

FGF21 通过 FGFR1/PI3K/Akt 通路减轻高糖下视网膜色素上皮细胞的氧化应激损伤

田野^{1,2}, 张国恒¹, 袁天浩¹, 王欣¹, 常天芳¹, 陈媛¹, 窦国睿¹

引用:田野, 张国恒, 袁天浩, 等. FGF21 通过 FGFR1/PI3K/Akt 通路减轻高糖下视网膜色素上皮细胞的氧化应激损伤. 国际眼科杂志, 2026, 26(3): 383-390.

基金项目:国家自然科学基金项目 (No. 82371071, 82571238); 军队高层次科技创新人才工程自主研究项目 (No. 2023RCZZ009); 国防生物科技优秀青年人才基金 (No. 02-SWKJYCJJ12); 陕西省创新能力支撑计划-科技创新团队项目 (No. 2025RS-CXTD-050); 空军军医大学交叉融合专项 (No. 2024JC019)

作者单位:¹(710032) 中国陕西省西安市, 空军军医大学西京医院眼科 全军眼科研究所; ²(350001) 中国福建省福州市, 武警福建省总队医院卫勤处

作者简介:田野, 在读硕士研究生, 研究方向: 糖尿病视网膜膜病变。

通讯作者:窦国睿, 博士, 教授, 博士研究生导师, 副主任医师, 研究方向: 糖尿病视网膜膜病变. fierywang@126.com; 陈媛, 硕士, 初级研究员, 研究方向: 糖尿病视网膜膜病变. cyuan115@163.com

收稿日期: 2025-11-12 修回日期: 2026-01-22

摘要

目的:探究成纤维细胞生长因子 21 (FGF21) 对高糖诱导的视网膜色素上皮 (RPE) 细胞氧化应激损伤的影响及其分子机制。

方法:通过 GEO 数据库中的小鼠视网膜组织单细胞测序数据, 分析 FGF21 受体 FGFR1 在 RPE 细胞中的表达丰度, 培养人 ARPE-19 细胞系, 随机分为对照组、高糖组 (30 mmol/L 葡萄糖)、高糖+ FGF21 类似物处理组, 并设置 siFGFR1 处理组及 PI3K 抑制剂处理组, CCK8 检测不同处理组细胞的活力变化, 利用 DCFH-DA 荧光探针, 结合免疫荧光染色及流式细胞术检测不同处理组细胞中的 ROS 水平, 对高糖组及高糖+FGF21 组的细胞进行转录组测序检测, 分析 PI3K/Akt 信号通路富集程度, 采用免疫印迹法检测 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白的磷酸化水平。

结果:单细胞测序发现糖尿病模型小鼠视网膜中 FGF21 受体 FGFR1 在 RPE 细胞特异性高表达。体外实验中, 高糖 (30 mmol/L) 处理使 ARPE-19 细胞活力下降 49.7%, 并诱导活性氧水平升高约 2 倍; 而 FGF21 类似物 (60 ng/mL) 干预可恢复细胞活力, 并降低高糖诱导的 ROS 升高。机制研究表明, 敲低 FGFR1 可抑制 FGF21 的抗氧化应激作用。进一步的分子机制验证显示, 高糖处理显著抑制了 PI3K/Akt 信号通路的磷酸化 (p-Akt 与 p-PI3K 水平分别降低 33.9% 与 36.6%), 而 FGF21 有效逆转了这一抑制效应, 使 p-Akt 与 p-PI3K 表达均恢复。使用 PI3K 抑制剂 LY294002 可抑制 FGF21 的细胞保护作用, 显著提升 ROS 阳性细胞率, 证实 PI3K/Akt 通路是 FGF21 发挥作用的必要下游机制。

结论:FGF21 通过受体 FGFR1 激活 PI3K/Akt 信号通路,

减轻高糖诱导的 RPE 细胞氧化应激水平, 减少细胞损伤。
关键词:视网膜色素上皮细胞; 高糖; 氧化应激; 单细胞测序; 成纤维细胞生长因子 21 (FGF21); 转录组测序; 信号通路

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2026.3.04

Fibroblast growth factor 21 attenuates oxidative stress injury in retinal pigment epithelial cells under high glucose via FGFR1/PI3K/Akt signal pathway

Tian Ye^{1,2}, Zhang Guoheng¹, Yuan Tianhao¹, Wang Xin¹, Chang Tianfang¹, Chen Yuan¹, Dou Guorui¹

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (No. 82371071, 82571238); Independent Research Projects for Scientific and Technological Innovation Talents of the Military (No. 2023RCZZ009); Outstanding Young Talent Fund for Defense Biotechnology (No. 02-SWKJYCJJ12); Shaanxi Province Innovation Capacity Support Program-Science and Technology Innovation Team Project (No. 2025RS-CXTD-050); Cross-fusion Special Project of Air Force Medical University (No. 2024JC019)

¹Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Air Force Medical University; Eye Institute of PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China; ²Department of Medical Service, Fujian Provincial Armed Police Corps Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Correspondence to: Dou Guorui. Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Air Force Medical University; Eye Institute of PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. fierywang@126.com; Chen Yuan. Department of Ophthalmology, Xijing Hospital, Air Force Medical University; Eye Institute of PLA, Xi'an 710032, Shaanxi Province, China. cyuan115@163.com

Received: 2025-11-12 Accepted: 2026-01-22

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on high glucose-induced oxidative stress in retinal pigment epithelial (RPE) cells and to clarify the underlying molecular mechanisms.

• **METHODS:** Single-cell sequencing data from the GEO database were analyzed to determine the expression profile of the FGF21 receptor FGFR1 in RPE cells. Human ARPE-19 cells were cultured and randomly assigned to control, high glucose (30 mmol/L), and high glucose+ FGF21 analog treatment groups, with additional siFGFR1 and PI3K inhibitor groups. Cell viability in different treatment groups was assessed using CCK-8 assay,

intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were quantified using DCFH-DA fluorescent probing combined with immunofluorescence staining and flow cytometry. Transcriptome sequencing was performed on cells from the high glucose group and high glucose+FGF21 group to analyze the enrichment level of the PI3K/Akt signaling pathway. Western blotting was performed to detect phosphorylation levels of PI3K/Akt pathway components.

• **RESULTS:** Single-cell sequencing revealed specific expression of FGFR1 in RPE cells of retinal tissues from diabetic model mice. Under *In vitro* experiments, high glucose (30 mmol/L) exposure reduced ARPE-19 cell viability by 49.7% and increased ROS levels by approximately 2-fold. Whereas treatment with the FGF21 analog (60 ng/mL) restored cell viability and attenuated high glucose-induced ROS accumulation. Mechanistic studies demonstrated that FGFR1 knockdown inhibited the antioxidative stress of FGF21. Further validation of the molecular mechanism revealed that high glucose significantly suppressed the PI3K/Akt pathway activation (the levels of p-Akt and p-PI3K were decreased by 33.9% and 36.6%, respectively), while FGF21 effectively reversed this inhibitory effect and restored the expression of p-Akt and p-PI3K. Treatment with the PI3K inhibitor LY294002 inhibited the cytoprotective effect of FGF21 and significantly increased the ROS-positive cells, these findings confirm that PI3K/Akt signaling is indispensable downstream mechanism for FGF21 to exert its effects.

• **CONCLUSION:** FGF21 alleviates high glucose-induced oxidative stress and cellular injury in RPE cells by activating the PI3K/Akt signaling pathway through its receptor FGFR1.

• **KEYWORDS:** retinal pigment epithelial cells; high glucose; oxidative stress; single-cell RNA sequencing; fibroblast growth factor 21 (FGF21); transcriptome sequencing; PI3K/Akt signal pathway

Citation: Tian Y, Zhang GH, Yuan TH, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates oxidative stress injury in retinal pigment epithelial cells under high glucose *via* FGFR1/PI3K/Akt signal pathway. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2026,26(3):383-390.

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病最常见的神经微血管并发症之一,已成为全球工作年龄人群致盲的主要原因^[1]。随着糖尿病患病率的持续攀升,DR的防治已成为公共卫生领域面临的重要挑战。DR的典型病理改变包括视网膜血管通透性增加、血视网膜屏障破坏、神经变性及晚期新生血管形成,其发病机制与长期高血糖引起的氧化应激、炎症反应及细胞凋亡密切相关^[2]。视网膜色素上皮 (retinal pigment epithelium, RPE) 细胞作为血视网膜外屏障的核心组分,在高糖环境下易发生功能异常,氧化应激损伤被认为是 DR 早期病变的关键驱动因素^[3]。研究表明,高糖通过激活 NADPH 氧化酶家族、抑制超氧化物歧化酶等抗氧化酶介导的抗氧化作用,诱发活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 过度积累,进而加速视网膜结构和功能的损害^[4-6]。然而,DR 中 RPE 细胞调控氧化应激反应的具体调控网络及分子机制,目前仍

存在诸多未明之处,亟待深入探索。

成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 是 FGF 家族的一种代谢调节因子^[7],对糖尿病微血管并发症方面的研究显示,FGF21 可缓解糖尿病肾病小鼠的肾小球氧化应激^[8],提示其可能对糖尿病引发的组织损伤具有保护效应。临床数据显示 DR 患者房水、玻璃体中 FGF21 水平显著增加^[9-10],提示 FGF21 可能参与 DR 疾病进程。然而,FGF21 是否直接参与 DR 中 RPE 细胞的氧化应激调控,其具体作用机制尚不明确。本研究旨在通过高糖处理 RPE 细胞,并建立 FGFR1 敲低细胞模型,探究 FGF21 在 RPE 细胞氧化应激中的保护效应,并分析其下游信号通路,探索 FGF21 在 DR 早期病变中的潜在分子机制,为 DR 防治策略提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人视网膜色素上皮细胞系 (ARPE-19) 购自赛柏慷公司。

1.1.2 试剂 胎牛血清 (InCellGene, IC-1905); DMEM/F12 培养基 (普诺赛, pm150310); 胰蛋白酶 (Gibco, 25200072)、青-链霉素 (中乔新舟, CSP006); CCK8 试剂盒 (新赛美, c6500); 活性氧检测试剂盒 (碧云天, S0033S); BCA 蛋白定量试剂盒 (碧云天, P0010); FGF21 类似物 PF-05231023 (Abmole, M10048); si-FGFR1 (吉玛基因); PI3K 抑制剂 LY294002 (InCellGene, IC-0227268); Trizol 试剂 (Takara, 9109); 反转录试剂盒 (Takara, RR036A); 荧光定量试剂盒 (笛医, DY20303); p-PI3K 抗体 (CST, 17366)、PI3K 抗体 (Proteintech, 82796); Akt 抗体 (Proteintech, 80816); p-Akt 抗体 (CST, 130038); β -actin 抗体 (Proteintech, 20536); HRP 标记山羊抗兔 IgG (Proteintech, SA00001-2)。

1.2 方法

1.2.1 视网膜组织单细胞测序数据分析 筛选 GEO (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 数据库中 DR 模型小鼠的视网膜组织单细胞测序数据集 GSE178121, 以及本课题组前期已发表的氧诱导视网膜病变 (oxygen-induced retinopathy, OIR) 模型小鼠的视网膜组织单细胞数据^[11], 分析不同 FGF21 受体在病理性视网膜的各细胞亚群中的表达丰度。

1.2.2 细胞培养与分组 ARPE-19 细胞系置于含 10% 胎牛血清及 1% 青-链霉素的 DMEM/F12 培养基中,于 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。将细胞分为正常对照组、高糖组 (20、30、40、50 mmol/L D-葡萄糖处理), 确定高糖损伤细胞模型所需的糖浓度; 在高糖组中以 50、60、80、100 ng/mL FGF21 类似物 PF-05231023 处理细胞, 筛选 FGF21 处理最佳浓度。根据高糖及 FGF21 最佳浓度, 设置对照组、高糖组、高糖+FGF21 组、高糖+siFGFR1+FGF21 组、高糖+FGF21 组+PI3K 抑制剂组。以上处理均为 48 h。

1.2.3 CCK8 法检测细胞活性 取对数生长期 ARPE-19 细胞, 以每孔 1×10^3 个的密度均匀接种于 96 孔板, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞贴壁后, 按以上实验设计进行分组处理。各组细胞继续培养 48 h 后, 向每孔中加入 10 μ L CCK8 试剂, 并于培养箱中避光孵育 1.5 h。随后, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔的吸光度 (OD 值)。本实验中, 每组处理均设置 6 个复孔, 并

设立仅含培养基和 CCK-8 试剂的空白孔以校正背景。实验独立重复 3 次。细胞活力计算如下:细胞活力 (%) = $[(\text{实验组 OD}_{(450)} - \text{空白孔 OD}_{(450)}) / (\text{对照组 OD}_{(450)} - \text{空白孔 OD}_{(450)})] \times 100\%$ 。

1.2.4 DCFH-DA 荧光探针法检测 ROS 水平 取对数生长期 ARPE-19 细胞,以每孔 1×10^4 个的密度均匀接种于 24 孔板中,待细胞融合度达 80% 时,随机分为对照组、高糖处理组、高糖+FGF21 处理组、高糖+si-FGFR1+FGF21 处理组、高糖+FGF21+PI3K 抑制剂处理组,并继续培养 48 h。干预结束后,弃去原培养基,各组加入用无血清培养基稀释至 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA 工作液(每孔 $500 \mu\text{L}$), 37°C 避光孵育 20 min。孵育结束后,用 PBS 轻柔洗涤 3 次,去除未进入细胞的探针。随后,使用荧光显微镜观察并采集图像,利用 Image J 1.54g 软件定量分析各组的平均荧光强度。或细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,细胞浓度为 1×10^6 至 2×10^7 cells/mL, 37°C 细胞培养箱内孵育 20 min。每隔 3-5 min 颠倒混匀,使探针和细胞充分接触,洗涤 3 次后使用流式细胞仪检测,使用 FlowJo v10.8.1 软件分析阳性细胞率。

1.2.5 si-FGFR1 细胞转染 靶向 FGFR1 的小干扰 RNA (siFGFR1) 及阴性对照 (NC) 购于吉玛基因 (siFGFR1-1: 正义链: $5' - \text{GUAGCAACGUGGAGUUAUUAU} - 3'$, 反义链: $5' - \text{AUGAACUCCACGUUGCUACTT} - 3'$)。取对数生长期 ARPE-19 细胞,以每孔 1×10^4 个的密度均匀接种于 24 孔板中,待细胞融合度达 60% 时,参照说明书配置并使用 siRNA 转染试剂,分别将 siFGFR1 及对照 siRNA 转染入细胞。转染 6 h 后更换为完全培养基,并继续培养 48 h,随后通过 qRT-PCR 验证 FGFR1 的敲低效率(引物序列: FGFR1-Hum-F: $5' - \text{AAACCAAACCGTATGCCCGT} - 3'$, FGFR1-Hum-R: $5' - \text{AACTCCACGTTGCTACCCAG} - 3'$)。

1.2.6 qPCR 检测 FGFR1 mRNA 相对表达量 ARPE-19 细胞经 siFGFR1 及对照 siRNA 转染处理后,使用 Trizol 试剂裂解细胞,通过氯仿抽提、异丙醇沉淀法纯化 RNA,并使用 RNase-free 水溶解。采用微量分光光度计检测 RNA 浓度及纯度;利用反转录试剂盒合成 cDNA。以 cDNA 为模板,使用 SYBR Green qPCR 试剂在实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。以 β -actin 作为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 FGFR1 mRNA 的相对表达量。

1.2.7 RNA-seq 检测细胞 PI3K/Akt 信号通路 取对数生长期 ARPE-19 细胞,以每孔 3×10^5 个的密度均匀接种于 6 孔板中,待细胞融合度达 80% 时,随机分为高糖处理组、高糖+FGF21 处理组,干预 48 h 后,弃去培养基,使用 Trizol 试剂裂解细胞,样本于 -80°C 保存备用。后续将样本委托杭州联川生物技术有限公司进行转录组测序。对获得的测序数据进行 KEGG 通路富集分析,并采用基因集富集分析(GSEA)验证 PI3K/Akt 信号通路的变化。

1.2.8 蛋白质免疫印迹法检测蛋白表达水平 取对数生长期 ARPE-19 细胞,以每孔 5×10^5 个的密度均匀接种于 6 孔板中,待细胞融合度达 80% 时,随机分为对照组、高糖处理组及高糖+FGF21 处理组。干预 48 h 后,弃去培养基,使用 RIPA 裂解液在冰上裂解细胞以提取总蛋白。采用 BCA 法测定蛋白浓度并定量。各组进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离,随后湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h 后,将膜与相应一抗(PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 及内参 β -actin, 1:1000) 4°C 过夜孵育。次日

TBST 洗涤 3 次,与二抗室温孵育 2 h。再次充分洗涤后,使用 ECL 化学发光试剂进行显影。采用 Image J 1.54g 软件分析目标条带灰度值,以靶蛋白与 β -actin 的灰度值比值表示其相对表达水平。

统计学分析:使用 GraphPad Prism 9 统计软件进行分析,定量数据以平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。三组及以上的比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。当 ANOVA 显示总体差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) 时,进一步进行 Tukey 事后多重比较检验 (Tukey's post hoc test) 以明确各组之间的两两差异。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 RPE 细胞是 DR 模型视网膜中响应 FGF21 的主要效应细胞 FGF21 主要通过其共受体 β -Klotho (KLB) 及 FGFR1 发挥作用。对 GEO 数据库中的单细胞测序数据 (GSE178121) 的分析结果显示,在 STZ 诱导的糖尿病小鼠视网膜中,KLB 呈广泛低表达,而 FGFR1 则在 RPE 细胞中特异性高表达,见图 1A。这一表达模式在 OIR 模型中得到一致性验证,见图 1B。证实了在糖尿病小鼠模型及氧诱导视网膜病变模型中,RPE 细胞是响应 FGF21 信号的关键效应细胞。

2.2 FGF21 改善高糖诱导的 RPE 细胞活力下降 为建立高糖损伤细胞模型,我们使用不同浓度 (20、30、40、50 mmol/L) 的葡萄糖处理 ARPE-19 细胞 48 h。CCK8 检测结果如图 2A 及表 1 所示,与正常对照 (CTL) 组相比,20-50 mmol/L 的葡萄糖处理均能显著降低细胞活力 (均 $P < 0.01$),且呈现剂量依赖性效应。其中,30 mmol/L 葡萄糖处理使细胞活力下降 49.7% ($P < 0.01$),被选定用于建立稳定的高糖损伤模型。50 mmol/L 甘露醇高渗对照组的细胞活力与正常组无差异,证明细胞损伤源于高糖本身而非渗透压变化。

在损伤模型基础上,为探究 FGF21 能否缓解高糖损伤,我们在高糖模型基础上加入了不同浓度的 FGF21 类似物 PF05231023。如图 2B 及表 2 所示,加入 60、80、100 ng/mL FGF21 类似物后,细胞活力较高糖组得到显著改善,差异具有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。与高糖模型 (HG) 组相比,HG+50 ng/mL FGF21 类似物的处理组与 HG 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。HG+60、80、100 ng/mL FGF21 类似物组细胞活力分别恢复 15.6%、16.3% 和 17.6%,且此三组间的保护效果无统计学差异 (均 $P > 0.05$)。以上结果表明,60 ng/mL 是 FGF21 类似物发挥保护作用的最低有效浓度,因此后续实验选用此浓度。以上结果证明 FGF21 可有效改善高糖诱导的 RPE 细胞活性损伤。

表 1 各组细胞活力结果比较

组别	处理浓度	细胞活力相对值
对照组	CTL	1.000 \pm 0.054
	50 mmol/L 甘露醇	0.948 \pm 0.123
HG 组	20 mmol/L	0.691 \pm 0.033
	30 mmol/L	0.503 \pm 0.032
	40 mmol/L	0.461 \pm 0.045
	50 mmol/L	0.436 \pm 0.014

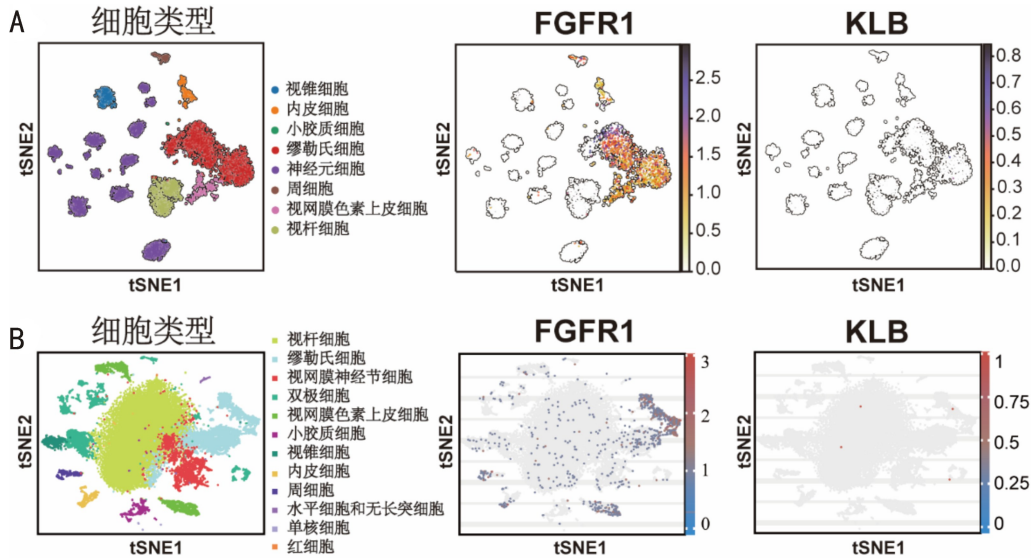


图1 FGF21受体在糖尿病与氧诱导视网膜病模型视网膜中的表达谱 A:STZ诱导的糖尿病小鼠视网膜细胞单细胞t-SNE聚类图(左)及FGF21受体FGFR1与KLB在视网膜中的表达分布;B:OIR模型小鼠视网膜细胞单细胞t-SNE聚类图(左)及FGF21受体FGFR1与KLB在视网膜中的表达分布。

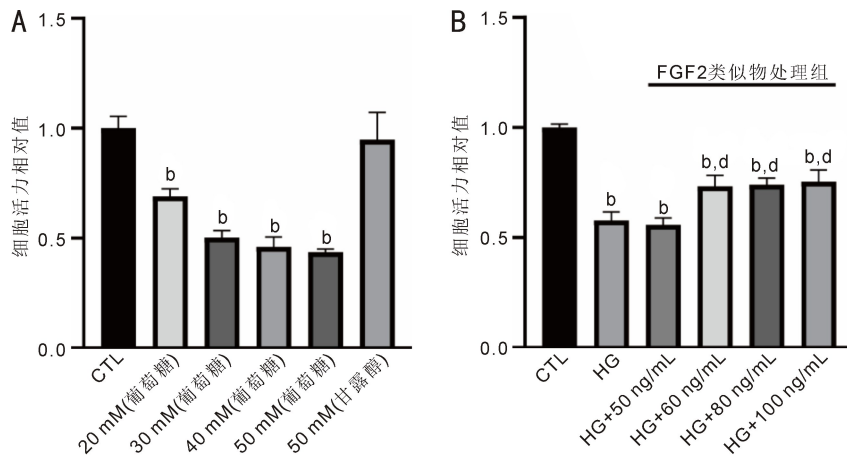


图2 CCK8检测高糖及FGF21对RPE细胞活力的影响 A:不同浓度的葡萄糖干预后细胞活力;B:FGF21类似物PF05231023干预高糖作用下细胞活力;^b $P < 0.01$ vs CTL组;^d $P < 0.01$ vs HG组。

表2 各组细胞活力结果比较

组别	HG 浓度 (mmol/L)	FGF21 类似物浓度 (ng/mL)	细胞活力相对值	$\bar{x} \pm s$
CTL 组	0	0	1.000±0.015	
HG 组	30	0	0.578±0.038	
HG+FGF21 类似物组	30	50	0.558±0.013	
		60	0.734±0.018	
		80	0.741±0.014	
		100	0.754±0.018	
		100	0.754±0.018	

2.3 FGF21抑制高糖诱导的RPE细胞氧化应激 为评估FGF21对高糖诱导的氧化应激的影响,我们检测了细胞内ROS水平。DCFH-DA探针染色显示,与正常对照(CTL)组(1.000±0.047)相比,高糖(HG)组ROS荧光强度(3.373±0.047)显著增加($P < 0.01$)。而在高糖条件下加入FGF21类似物处理后,ROS水平显著降低至1.884±0.047,较高糖(HG)组降低了44.1%($P < 0.01$),但仍高于正常对照(CTL)组($P < 0.01$),见图3。这些结果表明,FGF21能够显著缓解但不能完全逆转高糖诱导的RPE细胞氧化应激。

2.4 敲低FGFR1可逆转FGF21对RPE细胞氧化应激的抑制作用 采用4条siFGFR1转染敲低ARPE-19细胞中

的FGFR1,qPCR检测结果显示,阴性对照(NC)组(1.084±0.024)与正常对照(CTL)组(1.090±0.024)FGFR1表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。与阴性对照组和正常对照组相比,四条siRNA均能极显著地降低FGFR1的mRNA表达水平(均 $P < 0.01$),见图4。其中,siRNA-1的敲低效率最高,将FGFR1的表达降至0.068±0.024,敲低效率达93.8%,siRNA-2、siRNA-3和siRNA-4也表现出高效的敲低效果,分别将表达量降至0.153±0.024,0.179±0.024和0.146±0.024。siRNA-1展现出最高的敲低效率,故后续实验选用siRNA-1进行FGFR1的功能缺失研究。

为验证FGF21是否通过其受体FGFR1发挥抗氧化应

激作用,我们在高糖环境下同时使用 FGF21 类似物和 siFGFR1 处理 ARPE-19 细胞。如图 5 所示,与先前结果一致,高糖处理使 ROS 相对荧光强度显著升高至 301.5 ± 6.5 ,与对照 (CTL) 组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),而 FGF21 处理显著缓解了此效应,将 ROS 相对荧光强度降低至 149.7 ± 6.5 ,与高糖 (HG) 组相比差异具有统计学意义

($P < 0.01$)。然而,当同时敲低 FGFR1 时,FGF21 的保护作用被逆转,ROS 相对荧光强度回升至 310.5 ± 6.5 ,与高糖 (HG) 组对比差异无统计学意义 ($P > 0.05$),且显著高于 HG+FGF21 组 ($P < 0.01$)。这些结果表明,FGFR1 是 FGF21 发挥抗氧化应激保护作用所必需的受体,敲低 FGFR1 可逆转 FGF21 对高糖诱导的 ROS 升高的抑制作用。

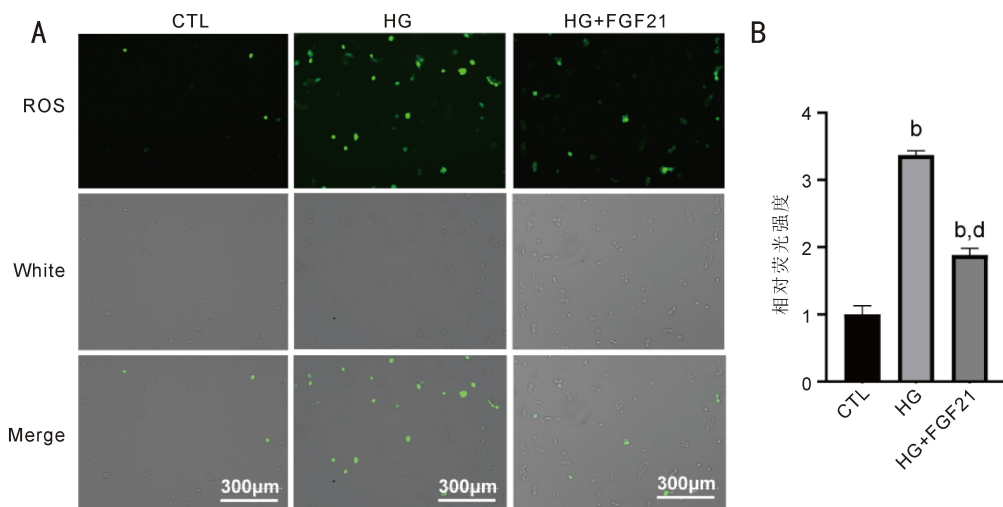


图 3 免疫荧光检测 FGF21 对高糖诱导的 ARPE-19 细胞氧化应激的影响 A:各组 ARPE-19 细胞内 ROS 荧光图;B:ROS 荧光统计柱状图;^b $P < 0.01$ vs CTL 组;^d $P < 0.01$ vs HG 组。

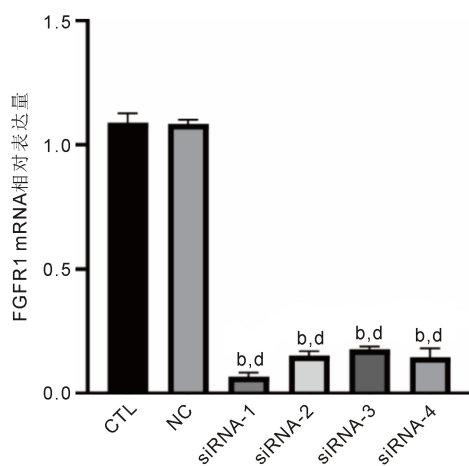


图 4 qRT-PCR 检测 FGFR1 的敲低效率 ^b $P < 0.01$ vs CTL 组;^d $P < 0.01$ vs NC 组。

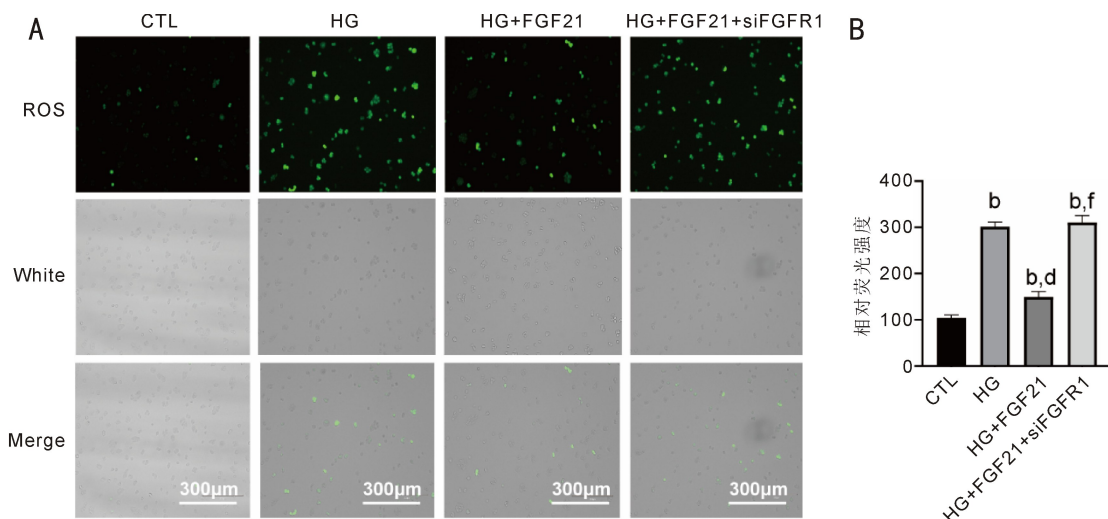


图 5 免疫荧光检测敲低 FGFR1 对 FGF21 抗氧化应激作用的影响 A:各组细胞总 ROS 荧光显微镜像,绿色荧光代表总 ROS; B:ROS 荧光比较柱状图;^b $P < 0.01$ vs CTL 组;^d $P < 0.01$ vs HG 组;^f $P < 0.01$ vs HG+FGF21 组。

2.5 FGF21 通过激活 PI3K/Akt 通路抑制高糖诱导的 RPE 细胞氧化应激细胞转录组测序数据分析显示,与高糖组相比,高糖+FGF21 组细胞的差异表达基因显著富集于 PI3K-Akt 信号通路,见图 6。

为进一步验证 FGF21 的下游作用机制,我们通过蛋白质免疫印迹法检测了 PI3K/Akt 信号通路关键蛋白的表达水平,见图 7。结果显示,高糖处理显著抑制了 PI3K/Akt 通路的活化,具体表现为高糖(HG)组磷酸化 Akt(p-Akt)和磷酸化 PI3K(p-PI3K)蛋白水平相较于对照(CTL)组分别降低了 33.9% ($P < 0.01$) 和 36.6% ($P < 0.01$)。值得注意的是,高糖环境对总 Akt 和总 PI3K 蛋白的表达量均无显著影响(均 $P > 0.05$),表明高糖特异性地抑制了该通路的磷酸化活化过程。而在高糖条件下加入 FGF21 类似物处理后,被抑制的 PI3K/Akt 通路得以重新激活。与高糖(HG)组相比,p-Akt 和 p-PI3K 的水平分别显著回升了 56.5% ($P < 0.01$) 和 23.8% ($P < 0.05$)。此外,HG+FGF21 组的 p-Akt 水平与正常对照(CTL)组差异无统计学意义($P > 0.05$)。以上结果证明,FGF21 能够逆转高糖

对 PI3K/Akt 信号通路活性的抑制,从而激活该通路磷酸化,而不影响通路蛋白的总表达量。

为最终证实 PI3K/Akt 通路在 FGF21 介导的细胞保护中的必要性,我们在使用 FGF21 类似物处理的同时,加入了 PI3K 抑制剂 LY294002。流式细胞术检测 ROS 阳性细胞率的结果见图 8,高糖处理使 HG 组 ROS 阳性细胞率上升至 $42.13\% \pm 1.23\%$,较对照(CTL)组($16.75\% \pm 1.23\%$)表达升高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。FGF21 处理显著缓解了高糖诱导的氧化应激,使 HG+FGF21 组 ROS 阳性细胞率降低至 $27.75\% \pm 1.23\%$,与高糖组对比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。然而,当使用 PI3K 抑制剂阻断该通路后,FGF21 的保护作用被显著削弱。与 HG+FGF21 组相比,HG+FGF21+PI3K 抑制剂组的 ROS 阳性细胞率显著回升至 $37.63\% \pm 1.23\%$,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。尽管 PI3K 抑制剂未能完全逆转 FGF21 的所有效应,但 ROS 水平的显著回升足以证明,PI3K/Akt 信号通路的激活是 FGF21 减轻高糖诱导的 RPE 细胞氧化应激所必需的关键环节。

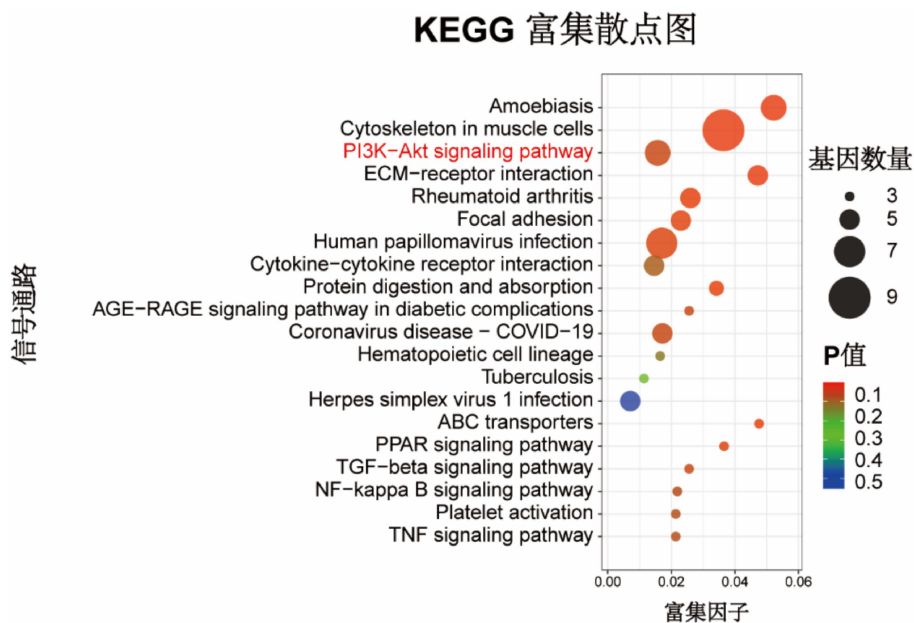


图 6 细胞转录组 KEGG 分析。

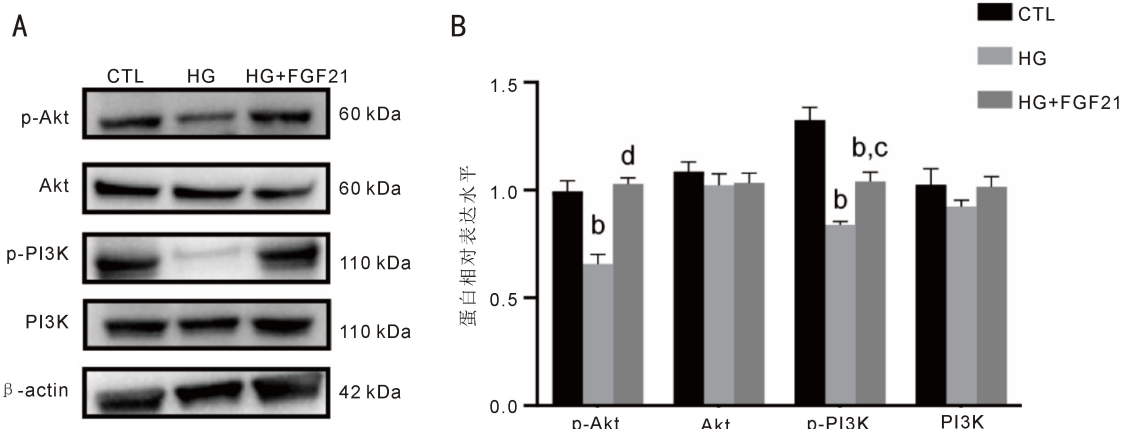


图 7 Western Blot 检测各组细胞蛋白表达情况 A: WB 检测各组间 PI3K、p-Akt、Akt 蛋白; B: 各组间蛋白相对表达量比较柱状图; ^b $P < 0.01$ vs CTL 组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs HG 组。

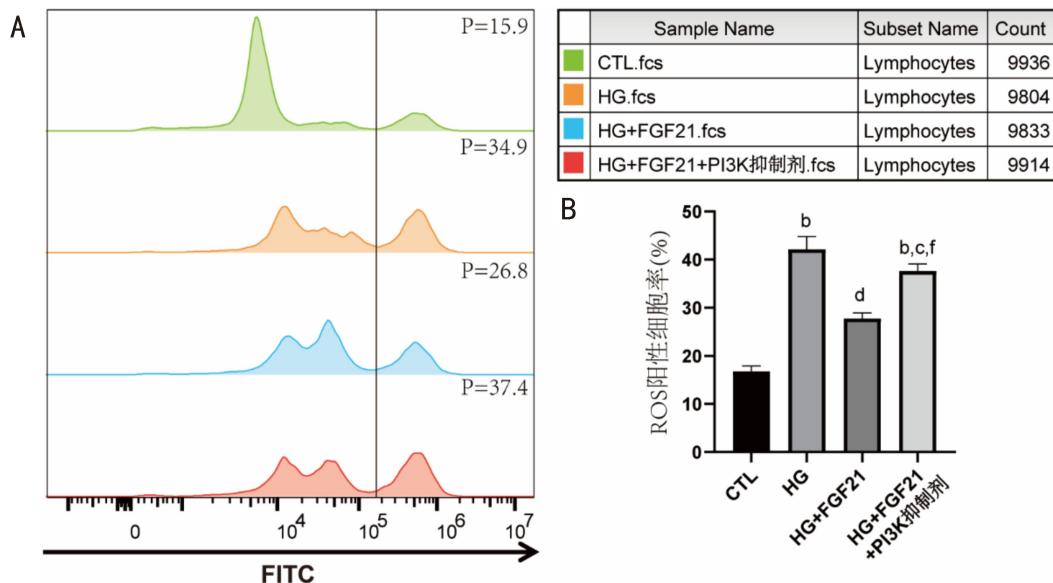


图8 流式细胞术检测各组 RPE 细胞 ROS 激活情况 A:四组细胞总 ROS 流式细胞检测,P 值部分代表 ROS 阳性细胞;B:ROS 阳性细胞率比较柱状图;^b $P < 0.01$ vs CTL 组;^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ vs HG 组;^e $P < 0.01$ vs HG+FGF21 组。

3 讨论

在 DR 的进展过程中,长期高糖环境所诱导的 RPE 细胞氧化应激损伤是连接代谢异常与视网膜结构损伤的核心病理环节。高糖可通过多元醇、己糖胺等多种代谢途径诱发氧化应激和糖化应激,叠加眼组织特有的光照暴露与高代谢负荷,共同导致 RPE 细胞内 ROS 生成与清除失衡^[12-15]。过量的 ROS 不仅直接攻击脂质、核酸等生物大分子,还可激活线粒体途径与内质网应激途径等信号级联反应,最终引发 RPE 细胞凋亡^[16-17]。RPE 细胞的丢失进一步破坏视网膜外屏障完整性,诱发新生血管形成与血视网膜屏障渗漏,从而加剧 DR 病情进展^[18]。与既往报道一致,本研究在体外也观察到高糖会增加 RPE 细胞中 ROS 含量,抑制细胞增殖,且细胞存活率呈糖浓度依赖性下降。因此,靶向调控凋亡及 ROS 生成,减轻氧化损伤,有望为 DR 防治提供新的思路。

FGF21 是 FGF 家族中的代谢调节因子,主要通过与其特异性受体复合 FGFR/KLB 结合,是一种具有多组织保护作用的代谢调节因子^[7]。本研究通过单细胞测序数据分析,发现 RPE 细胞表达 FGF21 受体 FGFR1,提示 RPE 细胞是 DR 中响应 FGF21 的关键细胞。FGF21 在抗氧化方面的功能呈现一定的组织特异性。在非酒精性脂肪肝、动脉粥样硬化等代谢性疾病中,FGF21 可通过激活 Nrf2、AMPK 信号缓解氧化损伤^[19-21]。在心肌与肾脏组织中,其作用涉及 UCP3、Akt2 等不同靶点^[22-24];而在肺部和脂肪组织中,则主要与 AMPK 通路相关^[25-26]。已有充足证据证实 FGF21 对抗高糖诱导的氧化应激的能力与其清除自由基的能力。在高糖损伤内皮细胞模型中,FGF21 可通过激活 IRS1/Akt 通路减轻细胞凋亡和氧化应激,提高细胞迁移能力和 Nrf2 水平^[27]。本研究通过转录组测序及蛋白表达验证实验,表明 FGF21 主要通过激活 PI3K-Akt 信号通路改善高糖诱导的 RPE 氧化损伤,而加入 PI3K 抑制剂,则可逆转 FGF21 对 RPE 细胞的抗氧化保护作用,证明 FGFR1/PI3K/Akt 通路是 FGF21 发挥抗氧化作用的关键分子途径。值得注意的是,近期研究报道 FGF21 可通过激活光感受器细胞中的 Akt-Nrf2 通路减轻氧化应激^[27],

与本研究在 RPE 中的发现高度一致,进一步支持 Akt 信号在视网膜抗氧化防御网络中的核心地位,也提示 FGFR1/PI3K/Akt 可能是 FGF21 在视网膜组织中相对保守的作用机制。

从临床转化角度看,FGF21 及其类似物在多种视网膜疾病模型中已显示出潜在的应用价值,如改善糖尿病小鼠视网膜功能、减轻氧诱导视网膜病变模型中的新生血管形成,以及增强血视网膜屏障完整性。研究表明,FGF21 类似物(如 PF-05231023)可改善糖尿病小鼠视网膜神经元功能,抑制 IL-1 β 表达并增强 Nrf2 通路活性,从而减轻光感受器细胞损伤^[27]。在氧诱导视网膜病变模型中,FGF21 可不依赖 VEGF-A 减少视网膜内病理性新生血管形成^[28]。此外,FGF21 还被证明可增强血视网膜屏障中内皮细胞间的紧密连接蛋白表达,改善小鼠视网膜渗漏^[29]。结合本研究结果,这些保护效应可能部分通过 FGFR1/PI3K/Akt 通路介导,该通路也有望成为增强 FGF21 疗效的联合靶点。值得关注的是,部分 FGF21 药物已进入 III 期临床试验阶段^[30],若在后续研究中进一步验证其对 RPE 细胞中该通路的激活作用,将有力推动其临床转化进程。

本研究仍存在一定局限:(1)仅基于 ARPE-19 细胞系,缺乏体内实验验证;(2)对 Akt 下游的具体效应分子及其功能联系尚未完全解析。后续研究将在动物模型中进一步验证该通路,并深入探索 FGF21 调控抗氧化反应的关键下游靶点,并在 DR 动物模型中验证 FGF21 的疗效。

综上,本研究明确 FGF21 是一种有前景的保护性细胞因子,通过 FGFR1/PI3K/Akt 通路减轻高糖诱导的 RPE 细胞氧化应激,不仅拓展了 FGF21 眼内保护机制的认知,也为 DR 的早期干预提供了新的实验依据与潜在靶点。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:陈媛、田野论文选题,研究实施,初稿撰写;张国恒、袁天浩、王欣、常天芳文献检索,数据分析;窦国睿、陈媛选题指导,论文修改及审阅。所有作者阅读并同意最终的文本。

参考文献

- [1] Steinmetz JD, Bourne RRA, Briant PS, et al. Causes of blindness and vision impairment in 2020 and trends over 30 years, and prevalence of avoidable blindness in relation to VISION 2020: the Right to Sight: an analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet Glob Health*, 2021,9(2):144-160.
- [2] Seo H, Park SJ, Song M. Diabetic retinopathy (DR): mechanisms, current therapies, and emerging strategies. *Cells*, 2025,14(5):376.
- [3] Tonade D, Kern TS. Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*, 2021,83:100919.
- [4] 王娟, 向小红, 吕红彬. 糖尿病视网膜病变中一氧化氮与氧化应激的相关性. *中华实验眼科杂志*, 2022,40(11):1095-1099.
- [5] Shi WX, Dong YC, Liu SY, et al. Corilagin alleviates ferroptosis in diabetic retinopathy by activating the Nrf2 signaling pathway. *Biomedicine Pharmacother*, 2024,179:117409.
- [6] Chiu CC, Cheng KC, Lin YH, et al. Prolonged exposure to high glucose induces premature senescence through oxidative stress and autophagy in retinal pigment epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp*, 2023,71(1):21.
- [7] Yang M, Liu C, Jiang N, et al. Fibroblast growth factor 21 in metabolic syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023,14:1220426.
- [8] Zhang YD, Wang F, Zhang CY, et al. FGF21 ameliorates diabetic nephropathy through CDK1-dependently regulating the cell cycle. *Front Pharmacol*, 2024,15:1500458.
- [9] Lamy R, Farber-Katz S, Vives F, et al. Comparative analysis of multiplex platforms for detecting vitreous biomarkers in diabetic retinopathy. *Transl Vis Sci Technol*, 2020,9(10):3.
- [10] Titz B, Siebourg-Polster J, Bartolo F, et al. Implications of ocular confounding factors for aqueous humor proteomic and metabolomic analyses in retinal diseases. *Transl Vis Sci Technol*, 2024,13(6):17.
- [11] Zhou ZY, Chang TF, Lin ZB, et al. Microglial Galectin3 enhances endothelial metabolism and promotes pathological angiogenesis *via* Notch inhibition by competitively binding to Jag1. *Cell Death Dis*, 2023,14(6):380.
- [12] Gao J, Tao LM, Jiang ZX. Alleviate oxidative stress in diabetic retinopathy: antioxidant therapeutic strategies. *Redox Rep*, 2023,28(1):2272386.
- [13] Zhang Z, Shan X, Li S, et al. Retinal light damage: From mechanisms to protective strategies. *Surv Ophthalmol*, 2024,69(6):905-915.
- [14] 王融, 李鹏飞, 刘家伟, 等. 糖化与氧化应激交互下自噬对糖尿病性白内障的调控. *国际眼科杂志*, 2025,25(12):1932-1937.
- [15] 秦婷婷, 张乐颖, 李婷, 等. mTOR-自噬途径调控糖尿病视网膜病变的研究进展. *国际眼科杂志*, 2025,25(10):1617-1622.
- [16] Böhm EW, Buonfiglio F, Voigt AM, et al. Oxidative stress in the eye and its role in the pathophysiology of ocular diseases. *Redox Biol*, 2023,68:102967.
- [17] 胡卫文, 周琼. 内质网应激在糖尿病视网膜病变中的作用机制及治疗研究进展. *中华眼底病杂志*, 2025,41(1):69-75.
- [18] Țălu Ș, Nicoara SD. Malfunction of outer retinal barrier and choroid in the occurrence and progression of diabetic macular edema. *World J Diabetes*, 2021,12(4):437-452.
- [19] Wu AM, Feng B, Yu J, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates iron overload-induced liver injury and fibrosis by inhibiting ferroptosis. *Redox Biol*, 2021,46:102131.
- [20] Xue JL, Liu YC, Liu BY, et al. Celastrol alleviates NAFLD by preserving mitochondrial function through activating the FGF21/AMPK/PGC-1 α pathway. *Front Pharmacol*, 2024,15:1444117.
- [21] 陈珍珍. FGF21 通过 AMPK/NRF2 信号通路抑制血管内皮细胞铁死亡改善动脉粥样硬化机制的研究. 吉林大学, 2023.
- [22] Planavila A, Redondo-Angulo I, Ribas F, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress. *Cardiovasc Res*, 2015,106(1):19-31.
- [23] Kawakami R, Sunaga H, Iso T, et al. Ketone body and FGF21 coordinately regulate fasting-induced oxidative stress response in the heart. *Sci Rep*, 2022,12(1):7338.
- [24] Cheng YL, Zhang XY, Ma FZ, et al. The role of Akt2 in the protective effect of fenofibrate against diabetic nephropathy. *Int J Biol Sci*, 2020,16(4):553-567.
- [25] Song YJ, Zhang W, Zhang JX, et al. TWIST2 inhibits EMT and induces oxidative stress in lung cancer cells by regulating the FGF21-mediated AMPK/mTOR pathway. *Exp Cell Res*, 2021,405(1):112661.
- [26] Chau MD, Gao JP, Yang Q, et al. Fibroblast growth factor 21 regulates energy metabolism by activating the AMPK-SIRT1-PGC-1 α pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010,107(28):12553-12558.
- [27] Sun CC, Wang LL, Huang HY, et al. Mitigation of gestational diabetes-induced endothelial dysfunction through FGF21-NRF2 pathway activation involving L-Cystine. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024,1870(7):167329.
- [28] Fu ZJ, Wang ZX, Liu CH, et al. Fibroblast growth factor 21 protects photoreceptor function in type 1 diabetic mice. *Diabetes*, 2018,67(5):974-985.
- [29] Fu ZJ, Gong Y, Liegl R, et al. FGF21 administration suppresses retinal and choroidal neovascularization in mice. *Cell Rep*, 2017,18(7):1606-1613.
- [30] Tomita Y, Fu ZJ, Wang ZX, et al. Long-acting FGF21 inhibits retinal vascular leakage in *in vivo* and *in vitro* models. *Int J Mol Sci*, 2020,21(4):1188.
- [31] Chui ZSW, Shen Q, Xu AM. Current status and future perspectives of FGF21 analogues in clinical trials. *Trends Endocrinol Metab*, 2024,35(5):371-384.