

原花青素激活 Nrf2/GPX4 途径抑制铁死亡及其对干性 ARMD 的保护作用

封传¹, 汤中²

引用:封传,汤中. 原花青素激活 Nrf2/GPX4 途径抑制铁死亡及其对干性 ARMD 的保护作用. 国际眼科杂志, 2026, 26(7): 1116-1126.

基金项目:永州职业技术学院重点课题(No.YZ25ZD02)

作者单位:¹(425000)中国湖南省永州市,永州职业技术学院医学技术学院眼视光技术教研室;²(425000)中国湖南省永州市,永州职业技术学院附属医院眼科

作者简介:封传,硕士,讲师,研究方向:年龄相关性黄斑病变。

通讯作者:汤中,硕士,副主任医师,研究方向:年龄相关性黄斑病变基础研究和临床诊治. inrkinrk@163.com

收稿日期:2025-11-05 修回日期:2026-05-27

摘要

目的:探讨原花青素(PAC)是否通过 Nrf2/GPX4 通路改善视网膜色素上皮(RPE)细胞铁死亡及其对干性年龄相关性黄斑变性(ARMD)的保护作用。

方法:通过体外 H₂O₂刺激的人 RPE 细胞(ARPE-19)模型和体内碘酸钠(NaIO₃)诱导的干性 ARMD 动物模型,评估 PAC 对铁死亡的保护作用。采用 CCK-8 法检测细胞活力,Calcein-AM/PI 染色检测细胞死亡,脂质过氧化(LPO)检测试剂盒测定 LPO 水平,CM-H2DCFDA 检测细胞内活性氧(ROS)水平,MitoSOX 探针检测线粒体 ROS 水平,JC-1 染色评估线粒体膜电位变化,Western Blot 检测 Nrf2 通路相关蛋白(Nrf2、GPX4、HO-1)表达水平,视网膜膜铺片评估 RPE 结构与功能,苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠视网膜形态变化,视紫红质(rhodopsin)和视蛋白(opsin)染色评估视网膜视功能,TUNEL 染色检测视网膜细胞凋亡。

结果:H₂O₂加重 ARPE-19 铁死亡,表现为 Fe²⁺、ROS 和 LPO 水平升高。PAC 预处理通过激活 Nrf2/GPX4 通路改善线粒体功能,降低细胞内 Fe²⁺、ROS 和 LPO 水平,抑制 RPE 细胞铁死亡。在 NaIO₃ 诱导的干性 ARMD 模型中,PAC 和铁死亡抑制剂 Fer-1 可逆转视网膜 Nrf2/GPX4 表达下调,减轻视网膜细胞死亡。

结论:PAC 通过 Nrf2/GPX4 通路抑制铁死亡,为视网膜退行性疾病提供了潜在治疗策略。

关键词:干性年龄相关性黄斑变性(ARMD);原花青素;Nrf2;GPX4;铁死亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2026.7.03

Proanthocyanidins activate Nrf2/GPX4 pathway to inhibit ferroptosis and exert protective effects on dry ARMD

Feng Chuan¹, Tang Zhong²

Foundation item: Key Project of Yongzhou Vocational Technical College (No.YZ25ZD02)

¹Optometry Teaching and Research Section, School of Medical Technology, Yongzhou Vocational Technical College, Yongzhou 425000, Hunan Province, China; ²Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Yongzhou Vocational Technical College, Yongzhou 425000, Hunan Province, China

Correspondence to: Tang Zhong. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Yongzhou Vocational Technical College, Yongzhou 425000, Hunan Province, China. inrkinrk@163.com

Received:2025-11-05 Accepted:2026-05-27

Abstract

• **AIM:** To investigate whether proanthocyanidins (PAC) can ameliorate ferroptosis in retinal pigment epithelium (RPE) cells *via* the Nrf2/GPX4 pathway, and to evaluate its protective effect in dry age-related macular degeneration (ARMD).

• **METHODS:** The protective effects of PAC against ferroptosis were evaluated using an *in vitro* model of H₂O₂-stimulated human RPE cells (ARPE-19) and an *in vivo* dry ARMD animal model induced by sodium iodate (NaIO₃). CCK-8 assay was applied to assess cell viability. Calcein-AM/PI staining was applied to determine the level of cell death. Lipid peroxidation (LPO) levels were measured using a lipid peroxidation assay kit. CM-H2DCFDA was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS) in cells. MitoSOX probe was employed to measure the mitochondrial ROS level. JC-1 staining was used to evaluate the changes in mitochondrial membrane potential. Western Blot was performed to detect the expression levels of proteins (Nrf2, GPX4, and HO-1) related to the Nrf2 pathway. Retinal flat mounts were used to evaluate the structure and function of RPE. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was applied to assess the morphological changes in rat retinas. Rhodopsin and opsin staining was used to evaluate visual function in the retina. TUNEL staining was employed to detect apoptosis in retinal cells.

• **RESULTS:** H₂O₂ exacerbates ferroptosis in ARPE-19 cells, as evidenced by elevated levels of Fe²⁺, ROS, and LPO. PAC preconditioning ameliorates mitochondrial function, reduces intracellular Fe²⁺, ROS, and LPO levels, and suppresses ferroptosis in RPE cells *via* activation of the Nrf2/GPX4 signaling pathway. In a NaIO₃-induced dry ARMD model, both PAC and the ferroptosis inhibitor Fer-1 reverse the downregulation of retinal Nrf2/GPX4 expression and attenuate retinal cell death.

• **CONCLUSION:** PAC inhibits ferroptosis *via* the Nrf2/GPX4 pathway, offering a novel potential therapeutic strategy for retinal degeneration.

• **KEYWORDS:** dry age - related macular degeneration (ARMD); proanthocyanidins; Nrf2; GPX4; ferroptosis

Citation: Feng C, Tang Z. Proanthocyanidins activate Nrf2/GPX4 pathway to inhibit ferroptosis and exert protective effects on dry ARMD. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)*, 2026,26(7):1116-1126.

0 引言

年龄相关性黄斑变性 (age - related macular degeneration, ARMD) 是老年人视力丧失的主要原因之一,分为干性和湿性两种类型。干性 ARMD (也称为非渗出性 ARMD) 是最常见的形式,其特征是视网膜色素上皮 (RPE) 细胞功能的逐渐退化变性,触发光感受器细胞的丢失,最终导致患者永久性视力丧失^[1]。铁死亡是一种铁依赖的程序性细胞死亡形式,其特征是细胞内脂质过氧化物的过度积累。近年来,铁死亡在干性 ARMD 中的作用逐渐受到关注。随着年龄增长,视网膜中的铁含量逐渐增多,ARMD 患者黄斑处的 RPE 和 Bruch 膜中的铁含量显著高于相同年龄组正常人,因此,铁过载与 ARMD 的发展密切相关^[2-3]。目前,湿性 ARMD 主要采用抗血管内皮生长因子 (VEGF) 药物干预治疗,但干性 ARMD 的有效治疗手段仍然有限。因此,本研究聚焦于干性 ARMD 的发病机制,旨在探寻可能的治疗药物。

在干性 ARMD 中,RPE 细胞中铁稳态的失衡被认为是导致细胞死亡的关键因素之一。铁蛋白的降解导致细胞内铁离子水平升高,导致细胞活性氧 (ROS) 过度生成,引发脂质过氧化 (LPO),最终导致铁死亡,加速 ARMD 的进展^[4]。研究表明,通过 H₂O₂ 或叔丁基过氧化氢 (tert-butyl hydroperoxide, TBH) 构建的氧化应激损伤模型不仅能够诱导 RPE 凋亡和坏死,还能够触发铁死亡^[5]。氧化应激是体内氧化与抗氧化系统失衡的结果,过量 ROS 的生成会加速细胞 LPO 的进程,触发铁死亡。ACSL4 是驱动铁死亡的核心蛋白,其通过将多不饱和脂肪酸 (PUFA) 整合到细胞膜的磷脂中,随后与铁离子共同驱动细胞铁死亡。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是一种应激诱导转录因子。当发生氧化应激时,Nrf2 分离进入胞核中启动基因转录,通过提高细胞抗氧化以抵御外界损害^[6]。Nrf2 在转录上控制谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4),这是一种通过降低 LPO 水平来防御铁死亡的关键酶^[7]。在帕金森疾病 (PD) 中,红景天苷通过上调 Nrf2/GPX4 改善细胞氧化应激抑制铁死亡,减少 PD 中多巴胺能神经元的丧失^[8]。

原花青素 (proanthocyanidins, PAC) 是一种天然的抗氧化剂,具有公认的抗衰老、抗炎和抗氧化特性^[9]。在氧化损伤模型中,PAC 能够降低细胞 ROS 水平,改善内质网应激,抑制 RPE 细胞凋亡^[10]。此外,PAC 能够通过激活 Nrf2/HO-1 通路抑制铁死亡以减轻小鼠脑缺血再灌注损伤^[11]。然而,关于 PAC 在 ARMD 中的应用,特别是其在保护 RPE 细胞免于铁死亡中的作用的现有研究有限。本研究旨在阐明 PAC 对 ARMD 的保护机制,并探讨其治疗干性 ARMD 的潜力。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 PAC、Fer-1、H2-DCFDA 购自 MCE 公

司,Nrf2、HO-1、GPX4、ACSL4、ZO-1、OTX2、GAPDH 抗体购自 Proteintech 公司,4-HNE 抗体购自 abcam 公司,线粒体超氧化物红色荧光探针购自上海翌圣生物科技股份有限公司,FerroOrange 探针购自 Dojindo 公司,线粒体绿色荧光探针、脂质过氧化检测试剂盒 (BODIPY 581/591 C11)、线粒体膜电位检测试剂盒、Calcein/PI 细胞活性与细胞毒性检测试剂盒、增强型 CCK-8 试剂盒、一步法 TUNEL 染色试剂盒、苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒均购自碧云天生物有限公司。

1.1.2 动物 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠购自长沙市天勤生物技术公司 [生产许可证号:SCXK (湘)2022-0011],平均体重 20±5 g。动物适应性喂养 1 wk 后进行造模。本研究经永州职业技术学院附属医院医学伦理委员会批准,研究符合伦理学标准,且通过伦理学委员会审查 (审批号:202502)。

1.1.3 ARPE-19 细胞 人 RPE 细胞系 ARPE-19 细胞购自中国典型培养物保存中心。细胞接种于培养瓶中,加入 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM/F12 培养液,并置于 5% CO₂ 的 37 °C 培养箱内培养传代。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将小鼠随机分为正常组、干性 ARMD 模型 (NaIO₃ 造模) 组和 FeSO₄ 组。干性 ARMD 模型组小鼠随机分为三亚组: NaIO₃ 组, NaIO₃ + PAC 组和 NaIO₃ + Fer-1 组。向干性 ARMD 模型组小鼠腹腔注射 NaIO₃ (30 mg/kg) 构建干性 ARMD 模型,以眼底照相出现点状病变为造模成功标志。注射 NaIO₃ 前 2 h,向 NaIO₃ + Fer-1 组玻璃体内注射 Fer-1 每眼 1 μL (50 ng/μL), NaIO₃ + PAC 组玻璃体内注射 PAC 每眼 1 μL (200 ng/μL), NaIO₃ 组注射相同体积的 PBS,均左眼单眼给药,从造模成功的干性 ARMD 模型组的三亚组每组取 20 只小鼠进行后续饲养取材。正常组为正常小鼠,无干预措施。将所有小鼠 (包括正常组) 保持在标准条件饲养 7 d 后处死并取材。FeSO₄ 组 (阳性对照组) 小鼠左眼单眼给药 FeSO₄ 1 μL (0.5 mmol/μL),持续 3 d,同样以眼底照相出现点状病变为造模成功标志,3 d 给药结束后选取 20 只造模成功小鼠作为阳性对照组处死并取材^[12]。最终共纳入正常组、FeSO₄ 组、NaIO₃ 组, NaIO₃ + PAC 组和 NaIO₃ + Fer-1 组共 5 组小鼠,每组各 20 只,所有小鼠于同一时间段通过 3% 的戊巴比妥钠过量麻醉处死小鼠并进行眼球取材。

1.2.2 HE 染色 将各组小鼠视网膜部位进行石蜡包埋切片,厚度为 5 μm,随后脱蜡,过梯度乙醇,再经苏木精染色,1% 盐酸乙醇快速分化,自来水冲洗反蓝后加入伊红染色,最后快速梯度乙醇脱水,二甲苯透明,待中性树脂胶封片干燥后,于普通白光显微镜下观察拍照。

1.2.3 TUNEL 染色 取各组小鼠视网膜进行石蜡包埋切片,厚度为 5 μm,石蜡切片进行脱蜡,随后高温抗原修复,待恢复室温后,PBS 浸泡清洗 2 遍,0.2% TritonX-100 破膜 10 min,PBS 清洗后通过免疫荧光封闭液封闭 1 h。随后,通过一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒进行染色,再使用含 DAPI 抗荧光淬灭封片液封片,最后于荧光显微镜下观察拍照。

1.2.4 ARPE-19 细胞分组给药 ARPE-19 细胞在细胞密度达到 60% - 70% 后进行给药干预。细胞随机分为正常组、H₂O₂ 组与 Erastin 组, H₂O₂ 组 ARPE-19 细胞经

200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激 12 h, Erastin 组经 10 $\mu\text{mol/L}$ 铁死亡诱导剂 Erastin 刺激 12 h。

为了探讨 PAC 对铁死亡的影响,取新一批细胞随机分为正常组、 H_2O_2 组、 H_2O_2 + PAC 组与 H_2O_2 + Fer-1 组, H_2O_2 + PAC 组细胞加入 PAC (200 $\mu\text{g/mL}$) 预处理 2 h 后加入 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , H_2O_2 + Fer-1 组细胞加入 Fer-1 (5 $\mu\text{mol/L}$) 预处理 2 h 后加入 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 , 刺激 12 h。

为了探讨 PAC 调控铁死亡的机制,取新一批细胞随机分为正常组、 H_2O_2 + siNC 组、 H_2O_2 + siNC + PAC 组与 H_2O_2 + siNrf2 + PAC 组, H_2O_2 + siNrf2 + PAC 组 ARPE-19 细胞转染敲低 Nrf2 的质粒,并在 PAC (200 $\mu\text{g/mL}$) 预处理 2 h 后,接受 200 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 刺激 12 h, H_2O_2 + siNC + PAC 组转染未敲低 Nrf2 的对照质粒,其他处理同 H_2O_2 + siNrf2 + PAC 组。所有组别均设 3 个复孔,于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 12 h 后,收集细胞用于后续相关实验。

1.2.5 基因敲低 将 ARPE-19 细胞接种于六孔板进行转染。使用 riboFECT CP 转染试剂盒 (RiboBio, 中国) 将 siRNA 转染至 ARPE-19 细胞。步骤如下:将含 12 μL riboFECT CP、100 nmol/L Nrf2 siRNA 或 100 nmol/L 阴性对照 (NC) 的 120 μL Opti MEM 培养基与细胞预混于六孔板。48 h 后通过 Western blot 评估转染效率。siRNA 序列设计如下: siNC: GTTCTCCGAACGTGTCACGT; siNrf2: GGAAG AAGAGGAAAGGAATT。

1.2.6 Western blot 检测 蛋白表达待给药刺激结束后收取细胞提蛋白,并根据目的蛋白分子量的大小配制不同浓度的凝胶。根据顺序上样后进行电泳, PVDF 转膜后于 5% 的脱脂牛奶中室温封闭 1 h,一抗孵育过夜。次日,室温孵育二抗 2 h,随后通过显影液进行显影,使用 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行统计分析,首先将各组目的蛋白表达量的灰度值除以内参灰度,随后再以“相对表达量 = 处理组校正值的均值/对照组校正值”进行相对表达量的量化。

1.2.7 细胞内脂质过氧化水平检测 通过脂质过氧化检测试剂盒 (BODIPY 581/591 C11) 检测细胞内 LPO 水平,待给药刺激结束后,将细胞在 C11-BODIPY (581/591) 染液 (10 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 30 min,随后,通过荧光显微镜下观察红色到绿色的荧光变化以检测 LPO (r-Bodipy/o-Bodipy) 水平,以“相对表达量 = 处理组校正值的均值/对照组校正值”进行相对表达量的量化。

1.2.8 线粒体膜电位检测 通过 JC-1 染色试剂盒检测线粒体膜电位。ARPE-19 细胞与 JC-1 染液孵育 30 min,随后吸弃染色液,用试剂盒内 1 \times 缓冲液清洗 3 次,随后荧光显微镜下观察细胞检测线粒体膜电位的变化,最后,通过 Image J 软件分析细胞红/绿荧光强度的比值,以此量化细胞去极化程度,并以“倍数变化 = 处理组校正值的均值/对照组校正值”进行相对表达量的量化。

1.2.9 线粒体超氧化物水平检测 通过 MitoSOX 色荧光探针检测线粒体活性氧 (ROS) 水平,给药刺激结束后,细胞在线粒体超氧化物红色荧光探针染色液 (5 $\mu\text{mol/L}$) 与 MitoTracker Green 探针 (200 nmol/L) 混合液中共同孵育 30 min,吸弃染色剂, PBS 清洗后通过荧光显微镜下观察线粒体 ROS 的表达水平,以“相对表达量 = 处理组校正值的均值/对照组校正值”进行相对表达量的量化。

1.2.10 细胞 ROS 水平检测 细胞给药刺激结束后,将细胞与 CM-H2DFAC 染液 (2 $\mu\text{mol/L}$) 孵育 30 min 后用 PBS 清洗 3 次,并在荧光显微镜下进行拍照观察。用 Image J 软件计算细胞 ROS 水平,以“相对表达量 = 处理组校正值的均值/对照组校正值”进行相对表达量的量化。

1.2.11 细胞 Fe^{2+} 水平检测 使用 FerroOrange (F374, Dojindo) 检测细胞内 Fe^{2+} 水平,待给药刺激结束后, RPE 细胞在 FerroOrange 探针染色液 (1 $\mu\text{mol/L}$) 中孵育 30 min, PBS 清洗后使用荧光显微镜进行拍照观察。用 Image J 测量荧光强度,以“相对表达量 = 处理组校正值的均值/对照组校正值”进行相对表达量的量化。

1.2.12 Calcein-AM/PI 染色 Calcein AM/PI 染色法检测各组细胞活细胞和死亡细胞的情况。将细胞与 Calcein AM (2 $\mu\text{mol/L}$) 和 PI (2 $\mu\text{mol/L}$) 染色液孵育 30 min 后,弃染液, PBS 清洗 3 次后,通过荧光显微镜对细胞活性进行分析,统计出每个视野下细胞死亡个数,并计算 3 次重复的平均值,以量化每组细胞每个视野下平均死亡数目。

1.2.13 CCK-8 染色 ARPE-19 细胞接种于 96 孔板之内,每孔约 2×10^4 个细胞,待各组给药处理结束后,吸弃培养基,每孔加入 100 μL 无血清基础培养基,随后每孔加入增强型 CCK-8 溶液 10 μL ,于 37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2 h,随后,将 96 孔板置于酶标仪中,在 450 nm 波长下测量 OD 值,并根据 (实验组 OD 均值/对照组 OD 均值) \times 100% 公式计算细胞存活率。

1.2.14 免疫荧光染色 细胞或组织经多聚甲醛固定 10 min, 0.5% TritonX-100 破膜 10 min,随后在 5% BSA 室温封闭 1 h。封闭结束后,一抗孵育过夜,次日加入荧光二抗避光孵育 2 h,加入含 DAPI 的抗荧光淬灭封片,随后荧光显微镜下对细胞进行拍照观察。

统计学分析:实验数据通过 SPSS 19.0 统计软件进行分析处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较时,若仅与一个对照组比较,采用 Dunnett's 检验;若需与不同对照组比较,则采用 Tukey HSD 法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氧化应激微环境对 ARPE-19 细胞的影响 H_2O_2 为细胞氧化损伤诱导剂,可诱导细胞铁死亡^[13-14], Erastin 为铁死亡诱导剂。为探究氧化应激微环境对 ARPE-19 细胞的影响,我们对 ARPE-19 细胞进行 H_2O_2 和 Erastin 干预。结果显示,与对照组相比, H_2O_2 和 Erastin 处理后细胞死亡率显著升高,细胞 ROS 水平及线粒体 ROS 水平均显著增加 (均 $P < 0.01$)。Western blot 数据显示 H_2O_2 和 Erastin 处理后 ACSL4 表达上调, GPX4 表达下调 (均 $P < 0.01$), 见图 1, 表 1、2。

2.2 PAC 对 H_2O_2 诱导的 ARPE-19 细胞铁死亡的影响 PAC 具有显著抗氧化的功能,为了评估 PAC 在体外对 ARPE-19 细胞的保护作用,首先,我们用不同浓度的 PAC 干预治疗 H_2O_2 影响的 ARPE-19 细胞,发现 PAC 可改善 H_2O_2 影响的细胞活力下降 (均 $P < 0.01$), 因此,我们选择了高浓度的 PAC (200 $\mu\text{g/mL}$) 用于后续体外实验,研究其在 H_2O_2 触发的铁死亡中的作用。LPO 是铁死亡的关键影响因素,铁超载是其潜在的诱导剂^[15]。我们通过 C11-BODIPY 和 FerroOrange 探针检测细胞 LPO 和铁离子水平,发现 H_2O_2 暴露显著增加了 RPE 细胞的 LPO 和 Fe^{2+} 水

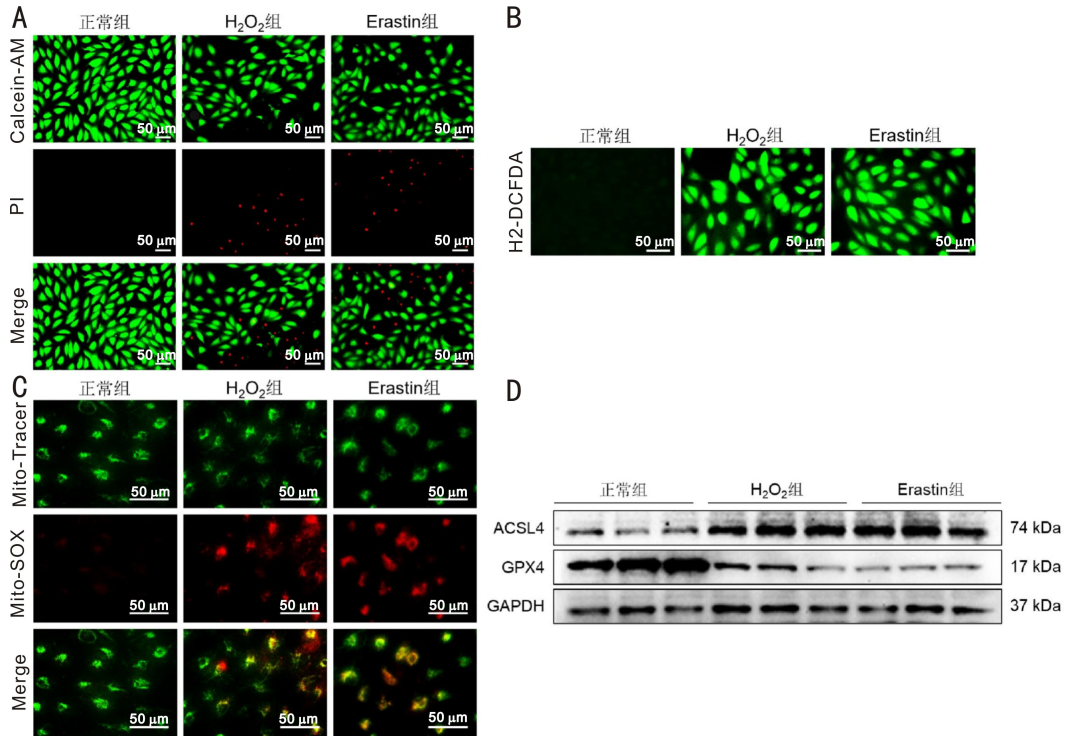


图1 H₂O₂诱导 ARPE-19 细胞氧化应激 A: Calcein-AM/PI 双重染色显示活细胞(绿色)和死细胞(红色); B: H₂-DCFDA 染色显示细胞内 ROS 水平; C: MitoSOX Red 和 MitoTracker Green 染色显示线粒体 ROS 水平; D: Western blot 显示 ARPE-19 细胞中 ACSL4 和 GPX4 蛋白的表达水平。

表1 各组细胞阳性 PI 数及 ROS 与 Mito-SOX 荧光强度的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	每个视野 PI 阳性细胞数(个)	ROS 平均荧光强度	Mito-SOX 平均荧光强度
正常组	0.33±0.58	1.00±0.31	1.00±0.17
H ₂ O ₂ 组	21.00±3.00 ^b	10.05±1.67 ^b	8.67±0.78 ^b
Erastain 组	21.67±3.05 ^b	10.15±0.88 ^b	8.91±0.38 ^b
<i>F</i>	70.929	110.888	230.334
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:^b*P*<0.01 vs 正常组。

表2 各组细胞 ACSL4 与 GPX4 的相对表达量比较 $\bar{x} \pm s$

组别	ACSL4	GPX4
正常组	1.00±0.31	1.00±0.31
H ₂ O ₂ 组	3.41±0.51 ^b	0.22±0.03 ^b
Erastain 组	3.64±0.28 ^b	0.19±0.03 ^b
<i>F</i>	44.306	140.859
<i>P</i>	<0.001	<0.001

注:^b*P*<0.01 vs 正常组。

平,并被 PAC 和 Fer-1 有效抑制(均 *P*<0.01)。4-HNE 是一种细胞毒性 LPO 产物,广泛存在于多种氧化应激相关的病理过程中,并在铁死亡过程中大量积聚^[16-17]。通过对细胞免疫荧光染色,发现 H₂O₂ 暴露后显著增加了 4-HNE 的荧光表达强度,而在 PAC 和 Fer-1 干预后被有效抑制(均 *P*<0.01)。Calcein-AM/PI double staining 进一步表明,细胞在 H₂O₂ 暴露后死亡率上升,而通过 PAC 和 Fer-1 干预后,细胞死亡率显著下降(均 *P*<0.01),见图 2,表 3。这些证据表明 PAC 能够有效抑制 H₂O₂ 介导的铁死亡。

2.3 PAC 对线粒体功能的影响 线粒体功能在铁死亡中

起着关键作用,可通过调控 ROS 的产生影响细胞对铁死亡的敏感性^[18-19]。为了探讨 PAC 对线粒体功能的影响,我们通过 H₂-DCFDA 染色和 MitoSox 探针染色对细胞和线粒体 ROS 水平进行检测,发现 H₂O₂ 处理后的 RPE 细胞和线粒体 ROS 水平显著上调,而 PAC 和 Fer-1 给药后抑制了 H₂O₂ 引起的 ROS 升高(均 *P*<0.01)。为了进一步检测线粒体功能状态,我们通过 JC-1 探针染色检测了线粒体膜电位(MMP)的变化,发现 PAC 和 Fer-1 预处理后能够改善 H₂O₂ 诱发的 MMP 下降(均 *P*<0.01),见图 3,表 4。综上,这些证据表明 PAC 能够纠正 H₂O₂ 诱导的线粒体损伤。

2.4 PAC 对 ARPE-19 细胞 Nrf2/GPX4 信号通路的调控

铁死亡的发生与多种因素密切相关,其中 Nrf2/GPX4 是氧化损伤相关性铁死亡的关键机制^[20-21]。PAC 作为抗氧化剂,能显著上调 Nrf2 的表达及核迁移能力以增强机体抗氧化能力。为了明确 PAC 是否通过 Nrf2/GPX4 以调控细胞铁死亡的发生,我们通过免疫荧光检测了 Nrf2 的表达及核定位情况,发现 PAC 与 Fer-1 显著回复了 H₂O₂ 诱发的 Nrf2 表达下降(均 *P*<0.01)。Nrf2 能够促进 HO-1 和 GPX4 的表达,改善细胞铁死亡。免疫荧光和 Western

blot 结果表明 PAC 或 Fer-1 预处理能够显著抑制 H₂O₂ 诱发 Nrf2、GPX4 和 HO-1 的表达水平的下降(均 $P < 0.01$),

见图 4,表 5-6。表明 PAC 通过上调 Nrf2 的表达,促进其核迁移,激活其下游 HO-1 和 GPX4。

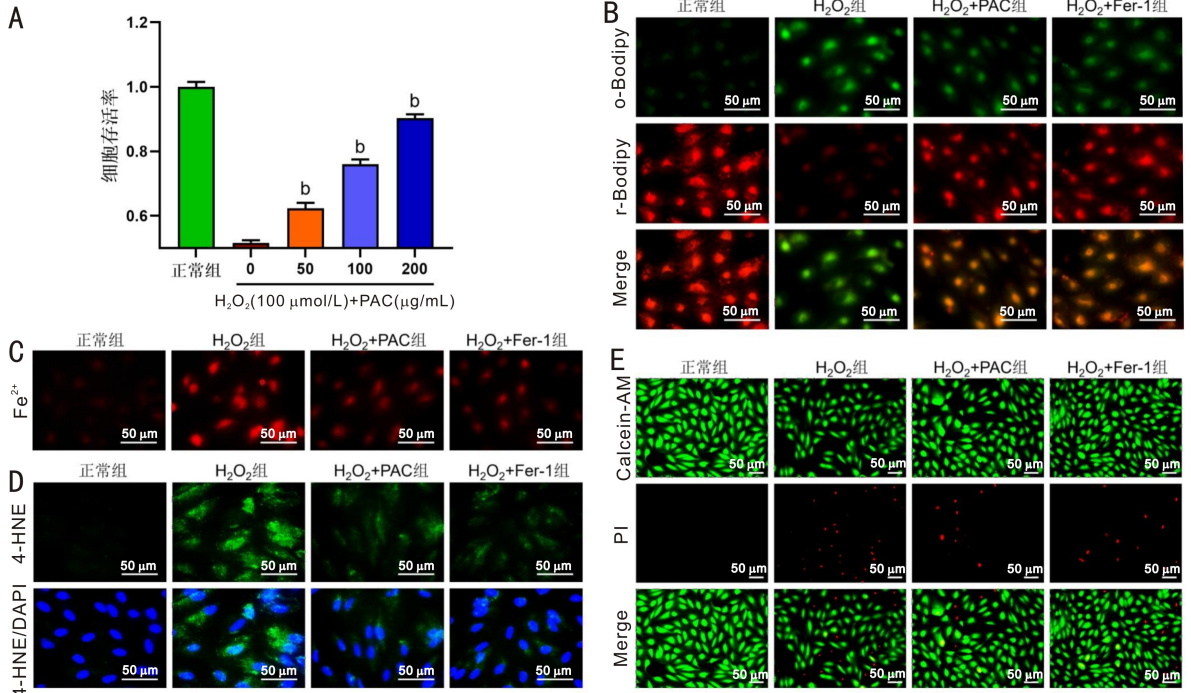


图 2 PAC 对 H₂O₂ 诱导的 ARPE-19 细胞铁死亡的影响 A: 在 200 μmol/L H₂O₂ 刺激下,不同浓度 PAC 预处理后的细胞存活率。^b $P < 0.01$ vs 100 μmol/L H₂O₂ + 0 μg/mL PAC 组; B: C11-bodipy 染色显示 LPO, 红色为还原型, 绿色为氧化型; C: FerroOrange 染色显示细胞内 Fe²⁺ 水平; D: 4-HNE 的免疫荧光染色。 E: Calcein-AM/PI 双重染色显示活细胞(绿色)和死细胞(红色)。

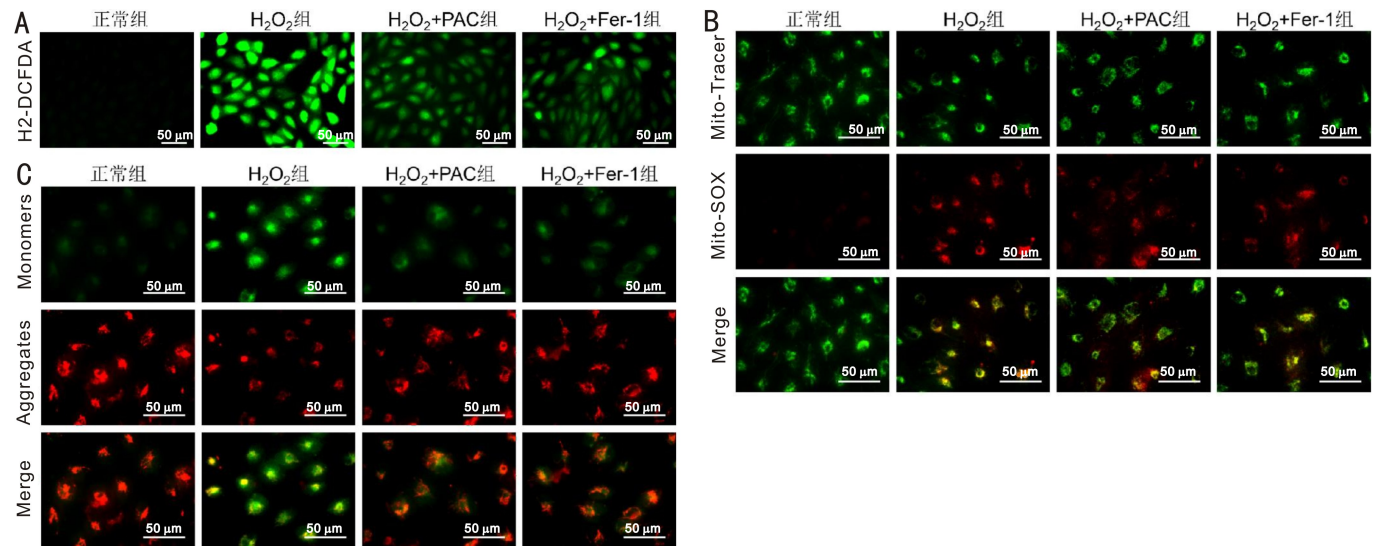


图 3 PAC 对线粒体功能的调节作用检测 A: H₂-DCFDA 染色显示细胞内 ROS 水平; B: 线粒体超氧化物红色荧光探针和线粒体绿色染色显示线粒体 ROS 水平; C: JC-1 染色显示线粒体膜电位, 红色染色(聚合物形式)表示线粒体膜电位较高, 反映线粒体功能正常、细胞处于健康状态。绿色染色(单体形式)表示线粒体膜电位较低, 提示线粒体去极化。

表 3 各组细胞氧化型/还原型比例与 Fe²⁺ 水平和 4-HNE 及 PI 阳性细胞数的比较

组别	氧化型/还原型比例	细胞 Fe ²⁺ 水平	4-HNE 平均荧光强度	每个视野 PI 阳性细胞数(个)	$\bar{x} \pm s$
正常组	1.00±0.12	1.00±0.12	1.00±0.06	0	
H ₂ O ₂ 组	9.20±0.79 ^b	7.70±0.56 ^b	6.92±0.55 ^b	20.33±2.52 ^b	
H ₂ O ₂ +PAC 组	3.85±0.38 ^d	4.60±0.40 ^d	2.89±0.56 ^d	11.00±2.00 ^d	
H ₂ O ₂ +Fer-1 组	3.77±0.51 ^d	4.55±0.58 ^d	3.08±0.13 ^d	10.33±2.08 ^d	
<i>F</i>	135.564	108.768	67.658	56.508	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	

注: ^b $P < 0.01$ vs 正常组; ^d $P < 0.01$ vs H₂O₂ 组。

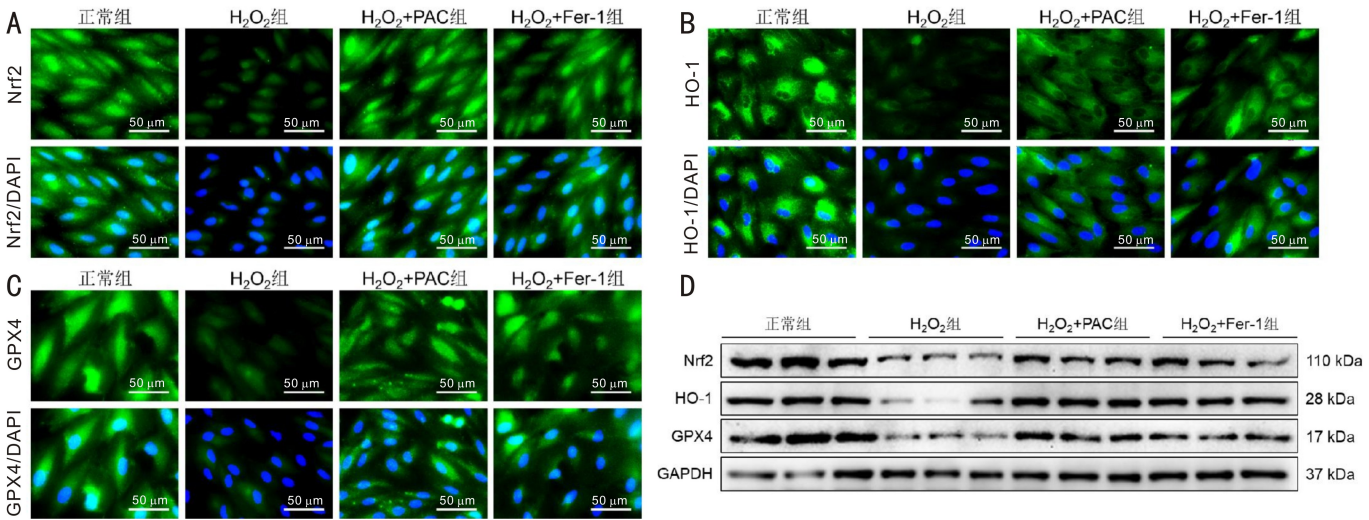


图4 免疫荧光与 Western blot 检测 PAC 对 ARPE-19 细胞中 Nrf2/GPX4 信号通路的调控 A: Nrf2 的免疫荧光检测结果; B: HO-1 的免疫荧光检测结果; C: GPX4 的免疫荧光检测结果; D: Western blot 检测 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1 和 GPX4 的蛋白表达水平。

表 4 各组细胞 ROS 和 Mito-SOX 荧光强度及 JC-1 红色/绿色的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	ROS 平均荧光强度	Mito-SOX 平均荧光强度	JC-1 红色/绿色
正常组	1.00±0.20	1.00±0.18	1.00±0.17
H ₂ O ₂ 组	9.01±0.80 ^b	9.61±0.71 ^b	0.15±0.01 ^b
H ₂ O ₂ +PAC 组	3.54±0.87 ^d	4.29±0.42 ^d	0.34±0.04 ^c
H ₂ O ₂ +Fer-1 组	3.55±0.58 ^d	3.88±0.90 ^d	0.38±0.07 ^c
<i>F</i>	77.247	101.441	46.731
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^b*P*<0.01 vs 正常组; ^c*P*<0.05, ^d*P*<0.01 vs H₂O₂组。

表 5 各组细胞 Nrf2 及 HO-1 与 GPX4 荧光表达强度的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	Nrf2 平均荧光强度	HO-1 平均荧光强度	GPX4 平均荧光强度
正常组	1.00±0.10	1.00±0.10	1.00±0.18
H ₂ O ₂ 组	0.28±0.04 ^b	0.22±0.03 ^b	0.27±0.04 ^b
H ₂ O ₂ +PAC 组	0.87±0.05 ^d	0.59±0.05 ^d	0.79±0.08 ^d
H ₂ O ₂ +Fer-1 组	0.88±0.05 ^d	0.59±0.06 ^d	0.79±0.07 ^d
<i>F</i>	72.596	66.886	24.603
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^b*P*<0.01 vs 正常组; ^d*P*<0.01 vs H₂O₂组。

表 6 各组细胞 Nrf2 及 HO-1 与 GPX4 蛋白表达量的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	Nrf2	HO-1	GPX4
正常组	1.00±0.22	1.00±0.17	1.00±0.21
H ₂ O ₂ 组	0.19±0.03 ^b	0.23±0.19 ^b	0.33±0.02 ^b
H ₂ O ₂ +PAC 组	0.66±0.12 ^d	0.85±0.06 ^d	0.75±0.08 ^d
H ₂ O ₂ +Fer-1 组	0.63±0.16 ^d	0.80±0.03 ^d	0.69±0.02 ^d
<i>F</i>	14.442	19.689	17.476
<i>P</i>	0.001	<0.001	<0.001

注: ^b*P*<0.01 vs 正常组; ^d*P*<0.01 vs H₂O₂组。

2.5 PAC 对敲减 Nrf2 的 ARPE-19 细胞的影响 为了进一步论证 PAC 对铁死亡的具体调控机制,我们对其核心基因 *Nrf2* 进行了敲减并进行了相关实验。如图 5 所示,蛋白质印迹表明 *Nrf2* 被成功敲减。C11-BODIPY 染色和 H₂-DCFDA 染色表明,敲减 *Nrf2* 消除了 PAC 在 H₂O₂ 下对 LPO 和细胞 ROS 水平的抑制作用。

同样,细胞死亡率也随着 *Nrf2* 的敲减而增加(均 *P*<0.01),见表 7。蛋白质印迹结果进一步表明,*Nrf2* 的敲减,会抑制 HO-1、GPX4 的表达水平(均 *P*<0.01),见表 8。因此,PAC 主要通过 *Nrf2* 以激活 HO-1、GPX4 的表达,改善细胞脂质过氧化,抑制细胞铁死亡的发生。

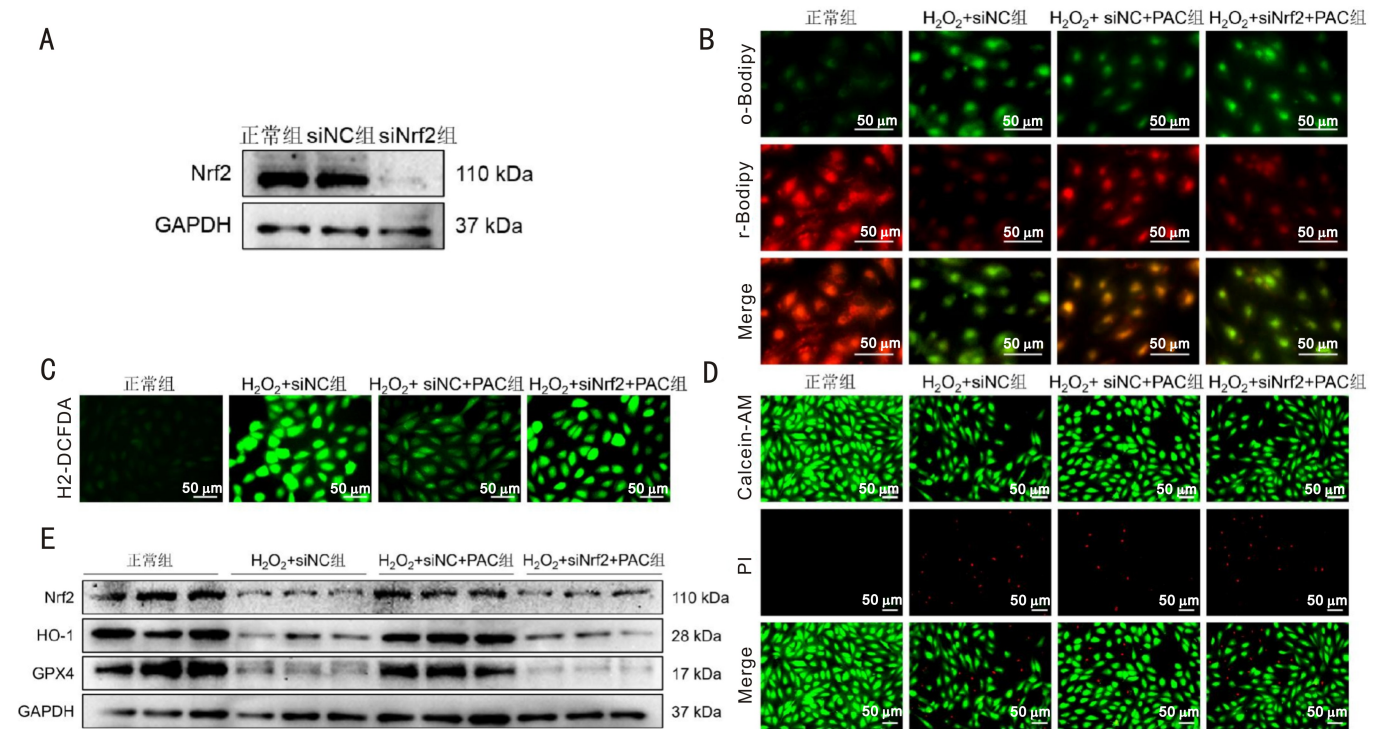


图5 敲减 Nrf2 后 PAC 对 ARPE-19 细胞的影响 A:Western blot 显示 ARPE-19 细胞中 Nrf2 的转染效率;B:C11-bodipy 染色检测脂质过氧化,还原型(红色)和氧化型(绿色);C:H₂-DCFDA 染色检测细胞内 ROS 水平;D:Calcein-AM/PI 双重染色检测活细胞(绿色)和死细胞(红色);E:Western blot 检测 ARPE-19 细胞中 Nrf2、HO-1 和 GPX4 的蛋白表达水平。

表7 各组细胞氧化型/还原型与 ROS 与 PI 阳性细胞数的比较

组别	氧化型/还原型	ROS 平均荧光强度	每个视野 PI 阳性细胞数(个)	$\bar{x} \pm s$
正常组	1.00±0.21	1.00±0.16	0	
H ₂ O ₂ +siNC 组	9.48±0.65 ^b	9.73±1.09 ^b	18.33±1.53 ^b	
H ₂ O ₂ +siNC+PAC 组	3.30±0.44 ^d	3.68±0.67 ^d	7.00±1.00 ^d	
H ₂ O ₂ +siNrf2+PAC 组	8.40±0.59 ^f	8.33±0.79 ^f	17.67±1.53 ^f	
<i>F</i>	195.684	87.062	165.863	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	

注:^b*P*<0.01 vs 正常组;^d*P*<0.01 vs H₂O₂+siNC 组;^f*P*<0.01 vs H₂O₂+siNC+PAC 组。

表8 各组细胞 Nrf2 及 HO-1 与 GPX4 蛋白表达量的比较

组别	Nrf2	HO-1	GPX4	$\bar{x} \pm s$
正常组	1.00±0.12	1.00±0.24	1.00±0.22	
H ₂ O ₂ +siNC 组	0.35±0.16 ^b	0.34±0.05 ^b	0.44±0.10 ^b	
H ₂ O ₂ +siNC+PAC 组	0.81±0.08 ^d	0.84±0.09 ^d	0.76±0.14 ^d	
H ₂ O ₂ +siNrf2+PAC 组	0.45±0.03 ^f	0.30±0.06 ^f	0.21±0.05 ^f	
<i>F</i>	52.949	20.749	18.402	
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	

注:^b*P*<0.01 vs 正常组;^d*P*<0.01 vs H₂O₂+siNC 组;^f*P*<0.01 vs H₂O₂+siNC+PAC 组。

2.6 PAC 对干性 ARMD 模型小鼠的影响 为了进一步证实 PAC 在干性 ARMD 中的中心作用,我们在对小鼠进行 PAC 及铁死亡抑制剂 Fer-1 药物预处理后,通过 NaIO₃ 诱导了干性 ARMD 小鼠模型。ZO-1 是维持 RPE 细胞间紧密连接的关键蛋白。ZO-1 染色能够直观反应视网膜 RPE 细胞间连接的完整性和连续性,是 RPE 细胞的屏障功能的关键指标^[22-24]。通过对各组小鼠视网膜铺片 ZO-1 染色,发现 FeSO₄ 组与 NaIO₃ 组小鼠视网膜 RPE 连接受损,出现了局部缺失或断裂,而 PAC 与铁死亡抑制剂

Fer-1 药物预处理的小鼠在 NaIO₃ 造模后,其 RPE 连接得到显著改善,见图 6A。进一步通过 HE 染色观察各组视网膜病理学变化,发现 FeSO₄ 组与 NaIO₃ 组小鼠视网膜厚度变薄,并伴随着 RPE 细胞的缺失,而通过 PAC 或铁死亡抑制剂 Fer-1 药物预处理后,小鼠视网膜厚度增加,同时 RPE 细胞丢失减少,见图 6B。Rhodopsin 和 Opsin 的表达差异及功能分化是视网膜适应多元光环境的核心机制。其表达的下降低是视网膜光感受器的功能受损的标志。我们发现 PAC 与铁死亡抑制剂 Fer-1 预处理能够逆转

NaIO₃诱导的 Rhodopsin、Opsin 表达下降,改善视网膜功能,而 FeSO₄组与 NaIO₃组无明显差异,见图 6C。TUNEL 法检测视网膜变性和细胞死亡。结果显示,PAC 与铁死亡抑制剂 Fer-1 挽救了 ARMD 小鼠中 NaIO₃诱导的细胞死亡,而 FeSO₄组与 NaIO₃组无明显差异,见图 7A。上述结果表明,PAC 与铁死亡抑制剂 Fer-1 改善 NaIO₃诱导视

网膜变性。蛋白质印迹结果进一步表明,PAC 与铁死亡抑制剂 Fer-1 均能够恢复 NaIO₃诱导的 Nrf2、HO-1 和 GPX4 蛋白表达的下(均 $P < 0.01$),见图 7B,表 9。以上结果表明,铁死亡在干性 ARMD 的发展中起着重要作用,PAC 能够通过 Nrf2/GPX4 改善 RPE 细胞铁死亡,可能成为一个有希望治疗干性 ARMD 的潜在药物。

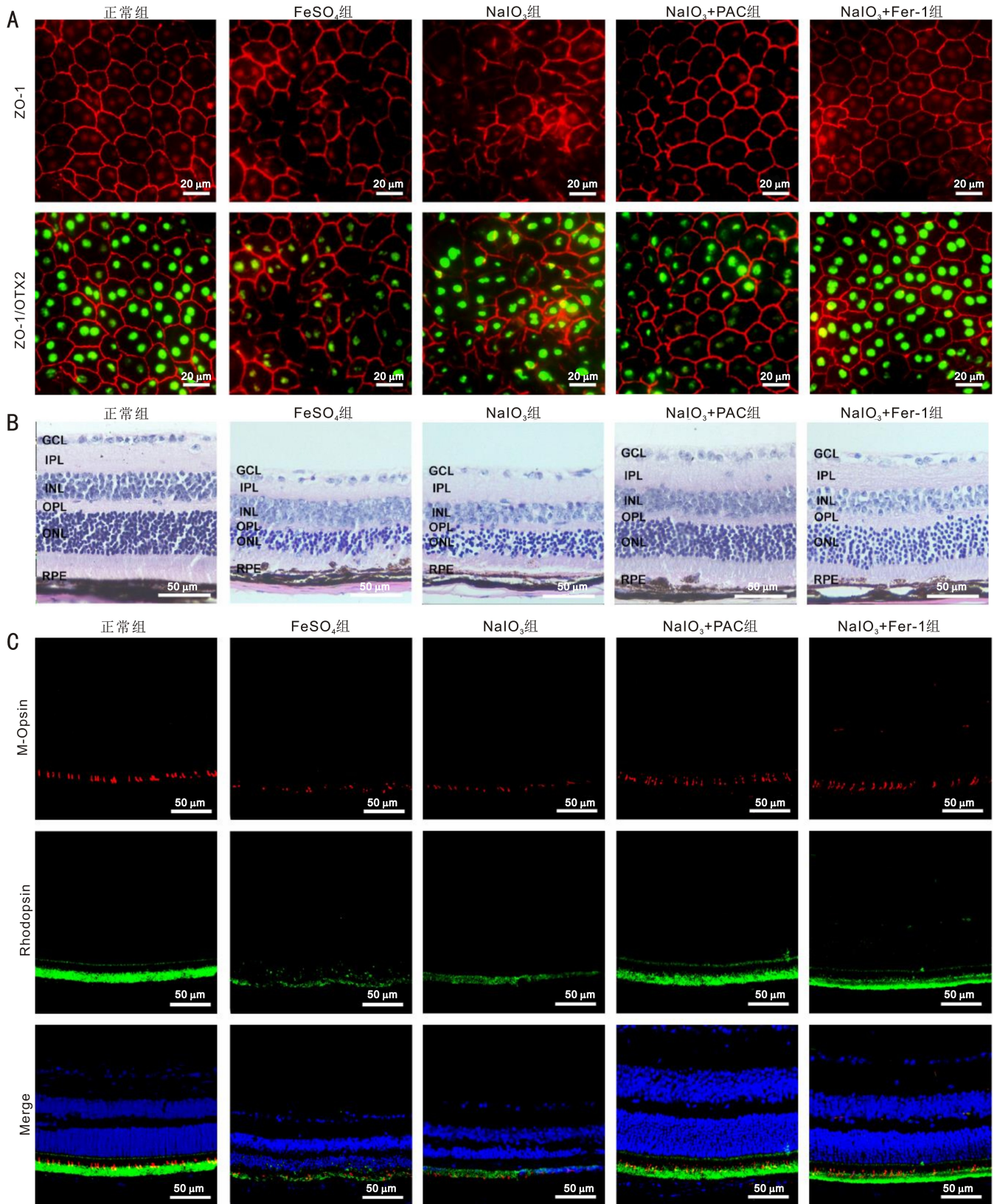


图 6 PAC 处理对 NaIO₃诱导的小鼠视网膜退行性变的影响 A:免疫荧光染色图像显示各组小鼠 RPE 铺片中 ZO-1 的表达;B:小鼠视网膜切片的 HE 染色结果;C:免疫荧光染色图像显示视网膜切片中 M-视蛋白(红色)、视紫红质(绿色)和 DAPI(蓝色)的表达。

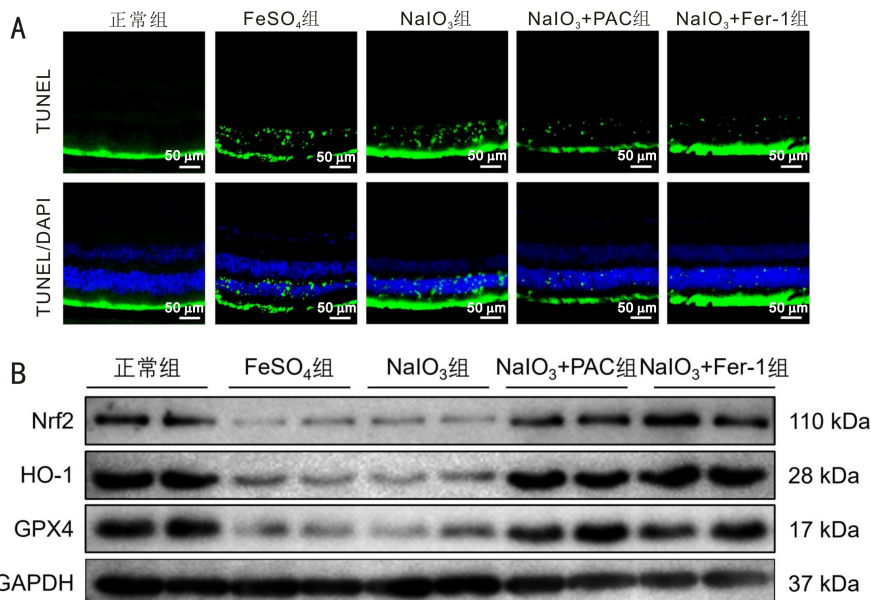


图7 PAC处理对NaIO₃诱导的小鼠视网膜退行性变的影响 A: TUNEL染色显示视网膜切片中细胞凋亡水平; B: Western blot检测视网膜中Nrf2、HO-1和GPX4的蛋白表达水平及其定量分析。

表9 各组小鼠视网膜Nrf2与HO-1与GPX4蛋白表达量的比较

组别	Nrf2	HO-1	GPX4	$\bar{x} \pm s$
正常组	1.00±0.07	1.00±0.15	1.00±0.12	
FeSO ₄ 组	0.35±0.01 ^b	0.26±0.02 ^b	0.30±0.08 ^b	
NaIO ₃ 组	0.33±0.01 ^b	0.23±0.06 ^b	0.34±0.13 ^b	
NaIO ₃ +PAC组	0.72±0.04 ^d	0.86±0.05 ^d	0.96±0.11 ^d	
NaIO ₃ +Fer-1组	0.84±0.05 ^d	1.11±0.16 ^d	1.08±0.17 ^d	
F	153.920	50.334	27.742	
P	<0.001	<0.001	<0.001	

注: ^bP<0.01 vs 正常组; ^dP<0.01 vs NaIO₃组。

3 讨论

干性ARMD是老年人不可逆视力丧失的主要原因,目前尚无有效的治疗方法。RPE的退行性变在干性ARMD的发病机制中起着关键作用。近期研究表明,铁死亡(一种由铁过载和LPO驱动的调节性细胞死亡形式)是干性ARMD中RPE退行性变的关键机制^[25-26]。为了阐明干性ARMD的发病机制,我们通过低剂量NaIO₃诱导建立了干性ARMD小鼠模型,并利用H₂O₂建立了RPE细胞的氧化应激模型^[27-28]。我们的主要发现如下:(1)铁死亡显著促进了干性ARMD的病理进程。(2)H₂O₂诱导的氧化应激触发了RPE细胞的铁死亡。(3)PAC和铁死亡抑制剂Fer-1通过激活Nrf2/GPX4信号通路,减轻RPE细胞的铁死亡,并改善干性ARMD的退行性改变,如图8所示。这些实验结果表明PAC作为干性视网膜疾病治疗药物的潜在可能性。

脂质代谢和LPO与铁死亡密切相关。在铁死亡过程中,由LPO产生的潜在毒性脂质过氧化物积累,导致细胞结构和功能损伤^[29-30]。LPO主要发生在多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)分子中,这些分子被整合到膜磷脂中。LPO可以通过酶促和非酶促途径发生。在非酶促途径中,磷脂被ROS氧化,产生LPO产物;在酶促途径中,如脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)等酶在双烯醇位置驱动PUFA的过氧化^[31-32]。这些PUFA在铁离子的

催化下产生大量ROS,从而触发LPO并诱导铁死亡。我们的研究表明,PAC抑制了H₂O₂诱导的ARPE-19细胞中LPO和ROS的产生。铁是一种氧化还原活性金属,铁离子的存在加速了PUFA的过氧化。此外,铁离子还可以通过芬顿反应催化H₂O₂转化为羟基自由基(·OH),从而触发LPO^[33-34]。因此,细胞内铁离子水平过高会增加对铁死亡的敏感性。我们的研究表明,PAC还可以抑制铁过载,从而进一步抑制细胞铁死亡。

Nrf2是细胞抗氧化防御的主要调节因子^[35]。PAC通过抑制糖原合成酶激酶-3β(glycogen synthase kinase-3β, GSK-3β)介导的磷酸化依赖性降解来稳定Nrf2,并通过蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)介导的磷酸化增强Nrf2的转录活性^[36-37]。我们的研究同样表明,PAC通过激活Nrf2增强了细胞的抗氧化能力。HO-1是一种关键的抗氧化酶,它可以将血红素分解为胆绿素、胆红素和一氧化碳——这些代谢产物具有抗氧化和抗炎特性^[38-39]。近期证据表明,通过Nrf2/HO-1信号通路,蟛蜞菊内酯(wedelolactone)可抑制高氧诱导的急性肺损伤中的铁死亡^[40]。同样,PAC预处理可上调RPE细胞中Nrf2和HO-1的表达,抑制铁死亡。

GPX4是铁死亡的关键调节因子,其将脂质过氧化物解毒为无害的脂质醇,维持膜脂质稳态^[41]。视网膜GPX4敲除可导致RPE变性损伤和地图样萎缩(geographic atrophy,

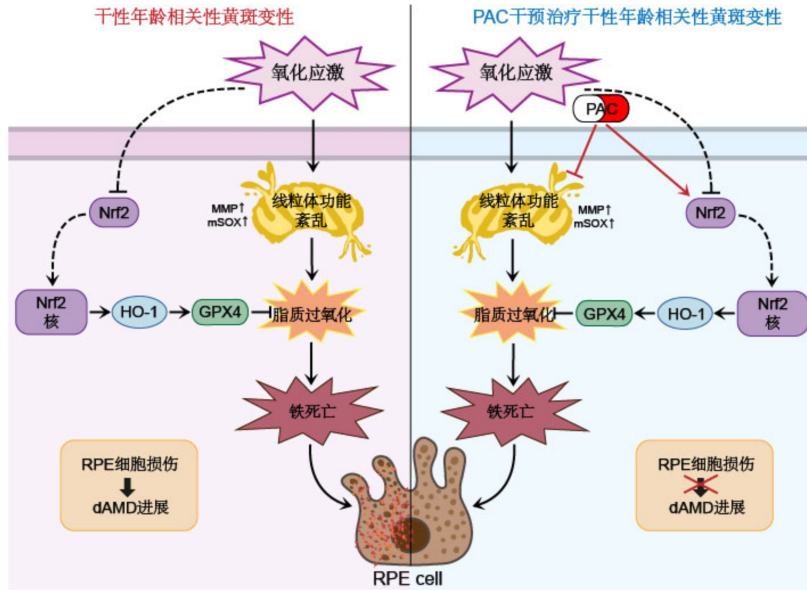


图8 PAC通过激活ARPE-19细胞中的Nrf2/GPX4通路改善干性ARMD中的铁死亡。PAC的干预通过抑制ROS的积累和改善线粒体功能障碍,缓解H₂O₂介导的RPE细胞铁死亡,促进了视网膜功能的恢复。

GA),这是晚期干性ARMD的标志^[42]。红景天苷能够通过激活Nrf2/SLC7A11/GPX4轴来改善ARMD病理^[43]。我们的研究表明,PAC通过激活Nrf2以上调GPX4的表达改善干性ARMD的视网膜退行性病变,这与先前的研究结果一致。

总之,我们的研究表明,PAC可以通过Nrf2/GPX4通路抑制干性ARMD中的铁死亡,为干性ARMD的治疗提供了新的见解。此外,我们的结果还表明,PAC可以改善RPE细胞的线粒体功能障碍,并减轻视网膜退行性变。然而,我们的研究也存在一些局限性:(1)PAC与其他铁死亡调节通路的相互作用需要进一步探索;(2)我们仅研究了PAC预处理在干性ARMD中的保护作用,还需要进一步研究在NaIO₃建模后给予PAC的治疗效果,重点关注克服其临床转化障碍,并探索其在精准医疗中的潜在价值;(3)铁死亡经典的诊断金标准是透射电子显微镜下线粒体形态的损伤,但本文暂未对此进行进一步的检测,后续相关研究将进一步探讨PAC对线粒体相关铁死亡的机制进行更深入的探讨;(4)在细胞机制研究中,缺少对H₂O₂刺激下Nrf2敲低后的相关实验探讨,使机制方面逻辑严谨性出现了一些不足。尽管存在这些局限性,我们的研究有助于理解PAC对干性ARMD的治疗作用,并为其在铁死亡相关疾病中的应用提供了理论支持。

利益冲突声明:本文不存在利益冲突。

作者贡献声明:封传论文选题与修改,初稿撰写,文献检索,数据分析;汤中选题指导,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] Chen J, Maurya M, Bora K, et al. Oxidative stress in retinal pigment epithelium degeneration: from pathogenesis to therapeutic targets in dry age-related macular degeneration. *Neural Regen Res*, 2023, 18(10):2173.
[2] Zhao N, Li SY, Wu H, et al. Ferroptosis: an energetic villain of age-related macular degeneration. *Biomedicines*, 2025, 13(4):986.
[3] Lu S, Wang L, Wang K, et al. As a novel ferroptosis inhibitor, primaquine alleviates L/R-induced retinal neuron death via increasing

GSTA1 activity. *Biomed Pharmacother*. 2026, 195:118973.
[4] Huang KK, Deng HY, Wang S, et al. Melanin-like nanomedicine functions as a novel RPE ferroptosis inhibitor to ameliorate retinal degeneration and visual impairment in dry age-related macular degeneration. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(30):2401613.
[5] Zhu XY, Wang TY, Jia HR, et al. A ferroptosis-reinforced nanocatalyst enhances chemodynamic therapy through dual H₂O₂ production and oxidative stress amplification. *J Control Release*, 2024, 367:892-904.
[6] Wang FF, Liao D, Liu CQ, et al. Ghrelin alleviates high glucose-induced retinal microvascular endothelial cell injury by activating Nrf2/HO-1 pathway to inhibit ferroptosis. *Int J Ophthalmol*, 2025, 18(6):978-985.
[7] Zhang ZY, Jin QQ, Zhao HM, et al. Qingganmingshi granules inhibited ferroptosis to treat diabetic retinopathy in mice through NRF2/GPX4 axis. *J Diabetes Res*, 2026, 2026:9978155.
[8] Shen J, Chen SS, Li X, et al. Salidroside mediated the Nrf2/GPX4 pathway to attenuates ferroptosis in Parkinson's disease. *Neurochem Res*, 2024, 49(5):1291-1305.
[9] Xiao JC, He ML, Chen PR, et al. Proanthocyanidins delay the senescence of young Asparagus stems by regulating antioxidant capacity and synthesis of phytochemicals. *Food Chem X*, 2024, 21:101222.
[10] Li WN, Jiang Y, Sun T, et al. Supplementation of procyanidins B2 attenuates photooxidation-induced apoptosis in ARPE-19 cells. *Int J Food Sci Nutr*, 2016, 67(6):650-659.
[11] Chen L, Huang J, Yao ZM, et al. Procyanidins alleviated cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting ferroptosis via the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Molecules*, 2023, 28(8):3582.
[12] Shu WT, Baumann BH, Song Y, et al. Ferrous but not ferric iron sulfate kills photoreceptors and induces photoreceptor-dependent RPE autofluorescence. *Redox Biol*, 2020, 34:101469.
[13] Tang HN, Zhou X, Liu LJ, et al. Superparamagnetic iron oxide-erastin-polyethylene glycol nanotherapeutic platform: a ferroptosis-based approach for the integrated diagnosis and treatment of nasopharyngeal cancer. *Mol Pharmaceutics*, 2024, 21(6):2767-2780.
[14] Burns GD, Schneider K, Atilano S, et al. Dual effects of erastin on aggressive osteosarcoma cells: ferroptosis sensitization and anti-ferroptotic gene activation. *Cytotechnology*, 2025, 77(4):128.
[15] Eltokhy AK, El-shaer RAA, El-Deeb OS, et al. Synergistic

effects of AgNPs and zileuton on PCOS *via* ferroptosis and inflammation mitigation. *Redox Rep*, 2025,30(1):2445398.

[16] Liu LL, Pang JJ, Qin DD, et al. Deubiquitinase OTUD5 as a novel protector against 4-HNE-triggered ferroptosis in myocardial ischemia/reperfusion injury. *Adv Sci (Weinh)*, 2023,10(28):e2301852.

[17] Jiang N, Ma YC, Chen HJ, et al. 4-HNE-induced cellular dysfunction from lipid peroxidation: a potential therapeutic target in diabetic cardiomyopathy. *Front Cell Dev Biol*, 2025,13:1663094.

[18] Ahola S, Langer T. Ferroptosis in mitochondrial cardiomyopathy. *Trends Cell Biol*, 2024,34(2):150-160.

[19] Li J, Jia YC, Ding YX, et al. The crosstalk between ferroptosis and mitochondrial dynamic regulatory networks. *Int J Biol Sci*, 2023,19(9):2756-2771.

[20] Jiang X, Yu M, Wang WK, et al. The regulation and function of Nrf2 signaling in ferroptosis-activated cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin*, 2024,45(11):2229-2240.

[21] Zheng Q, Xing JH, Li XZ, et al. PRDM16 suppresses ferroptosis to protect against sepsis-associated acute kidney injury by targeting the NRF2/GPX4 axis. *Redox Biol*, 2024,78:103417.

[22] D'Amico AG, Maugeri G, Magri B, et al. PACAP-ADNP axis prevents outer retinal barrier breakdown and choroidal neovascularization by interfering with VEGF secreted from retinal pigmented epithelium cells. *Peptides*, 2023,168:171065.

[23] Biswal MR, Paulson RJ, Vichare R, et al. Buspirone enhances cell survival and preserves structural integrity during oxidative injury to the retinal pigment epithelium. *Antioxidants (Basel)*, 2023,12(12):2129.

[24] Shen X, Chen Y, He B, et al. Ferrostatin-1, a ferroptosis inhibitor, mitigates all-trans-retinal-induced retinal pigment epithelium degeneration in mice. *J Transl Med*, 2025,23(1):1103.

[25] Bresciani G, Manai F, Felszeghy S, et al. VEGF and ELAVL1/HuR protein levels are increased in dry and wet AMD patients. A new tile in the pathophysiologic mechanisms underlying RPE degeneration? *Pharmacol Res*, 2024,208:107380.

[26] Zhang Z, Liang FM, Chang J, et al. Autophagy in dry AMD: a promising therapeutic strategy for retinal pigment epithelial cell damage. *Exp Eye Res*, 2024,242:109889.

[27] Anderson BD, Lee TT, Bell BA, et al. Optimizing the sodium iodate model: Effects of dose, gender, and age. *Exp Eye Res*, 2024,239:109772.

[28] Geathers JS, Grillo SL, Karakoleva E, et al. Sodium iodate: rapid and clinically relevant model of AMD. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2024,29(11):380.

[29] 李娟英, 张文芳. 铁死亡在眼底疾病中的研究进展. *国际眼科杂志*, 2024,24(5):767-771.

[30] Lee J, Roh JL. Lipid metabolism in ferroptosis: Unraveling key

mechanisms and therapeutic potential in cancer. *BiochimBiophys Acta BBA Rev Cancer*, 2025,1880(1):189258.

[31] Endale HT, Tesfaye W, Mengstie TA. ROS induced lipid peroxidation and their role in ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*, 2023,11:1226044.

[32] Danielli M, Perne L, Jarc Jovičić E, et al. Lipid droplets and polyunsaturated fatty acid trafficking: Balancing life and death. *Front Cell Dev Biol*, 2023,11:1104725.

[33] Qian W, Zhang CJ, He L, et al. X-ray induced *in-situ* ferroptosis through the Fenton reaction of iron supplements for the cancer therapy. *Bioorg Chem*, 2025,154:108021.

[34] Ma RY, Zhang YF, Ji HT, et al. Glucose oxidase-driven self-accelerating drug release nanosystem based on metal-phenolic networks orchestrates tumor chemotherapy and ferroptosis-based therapy. *Int J Biol Macromol*, 2025,290:139103.

[35] Hu ZL, Lin ZY, Ren WS, et al. Regulatory factors of Nrf2 in age-related macular degeneration pathogenesis. *Int J Ophthalmol*, 2024,17(7):1344-1362.

[36] Sun QR, Jia N, Li X, et al. Grape seed proanthocyanidins ameliorate neuronal oxidative damage by inhibiting GSK-3 β -dependent mitochondrial permeability transition pore opening in an experimental model of sporadic Alzheimer's disease. *Aging*, 2019,11(12):4107-4124.

[37] Navarro E, Esteras N. Multitarget effects of Nrf2 signalling in the brain: common and specific functions in different cell types. *Antioxidants (Basel)*, 2024,13(12):1502.

[38] Chen JJ, Zhou LL, Li XX, et al. Protective effect of zerumbone on sepsis-induced acute lung injury through anti-inflammatory and antioxidative activity *via* NF- κ B pathway inhibition and HO-1 activation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024,397(4):2241-2255.

[39] He SS, Ye HR, Wang Q, et al. Ginsenoside Rb1 targets to HO-1 to improve sepsis by inhibiting ferroptosis. *Free Radic Biol Med*, 2025,226:13-28.

[40] Li K, Wang XQ, Liao ZL, et al. Wedelolactone inhibits ferroptosis and alleviates hyperoxia-induced acute lung injury *via* the Nrf2/HO-1 signaling pathway. *Toxicol Sci*, 2024,202(1):25-35.

[41] Sok SPM, Pipkin K, Popescu NI, et al. Gpx4 regulates invariant NKT cell homeostasis and function by preventing lipid peroxidation and ferroptosis. *J Immunol*, 2024,213(7):941-951.

[42] Azuma K, Suzuki T, Kobayashi K, et al. Retinal pigment epithelium-specific ablation of GPx4 in adult mice recapitulates key features of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis*, 2024,15:763.

[43] Zhu MJ, Yu J. Salidroside alleviates ferroptosis in FAC-induced Age-related macular degeneration models by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis. *Int Immunopharmacol*, 2024,142:113041.