

黄腐酚调节 Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt 信号抑制铁死亡和氧化应激缓解干眼症小鼠模型损伤的分子机制

周 洋, 美丽巴努·玉素甫

新疆医科大学第五附属医院 眼科, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘 要: **目的** 探讨黄腐酚调节核因子红系 2 相关因子 2 (Nrf2)/核因子- κ B (NF- κ B)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)/蛋白激酶 B (Akt) 信号, 抑制铁死亡和氧化应激, 缓解干眼症小鼠模型损伤的分子机制。**方法** 体外研究采用人角膜上皮细胞系 HCECs 细胞建立高渗透压应激 (HOS) 模型, 并将细胞分组为对照组、模型组、黄腐酚 50 μ mol/L 组。CCK-8 法测定 HCECs 细胞存活能力。FITC-AnnexinV/PI 双标记流式细胞术测定细胞凋亡率。DCF-DA 荧光染料联合激光共聚焦显微镜和流式细胞术测定细胞内活性氧自由基水平。ELISA 测定细胞内铁死亡相关指标丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 和亚铁离子 (Fe^{2+}) 水平。Western blotting 法测定各分组 HCECs 细胞中凋亡相关指标[B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、裂解型-半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cleaved-Caspase-3)、Caspase-3]、铁死亡相关指标[谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、溶质载体家族 7A11 (SLC7A11)、血红素加氧酶-1 (HO-1)]。在体动物模型研究, 建立干眼症小鼠模型, 将 32 只雄性 Balb/c 小鼠随机分为对照组、模型组、黄腐酚组、黄腐酚+ML385 组。苏木精-伊红 (HE) 染色和 TUNEL 染色小鼠眼角膜组织。Western blotting 法测定各组小鼠眼角膜组织中 Nrf2、p-p65、p65、p-mTOR、mTOR、p-Akt、Akt 的表达水平。**结果** 与模型组相比, 黄腐酚 50 μ mol/L 组细胞存活能力显著增强 ($P<0.05$)。与模型组相比, 黄腐酚组细胞凋亡率显著降低; Bax、cleaved-Caspase-3 蛋白相对表达水平显著降低, Bcl-2 蛋白相对表达水平显著升高; GPX4、SLC7A11、HO-1 蛋白相对表达水平显著升高; MDA 和 Fe^{2+} 水平显著降低, GSH 水平升高; DCF-DA 相对荧光强度值和 DCF-DA 染色阳性细胞数值显著降低 ($P<0.05$)。而与黄腐酚组相比, 黄腐酚+ML385 组部分逆转了上述检测指标 ($P<0.05$)。HE 染色和组织病理学分析结果显示, 与模型组相比, 黄腐酚组小鼠角膜总厚度、角膜上皮厚度变厚, 角膜上皮细胞层数增加, 细胞间隙面积/视野面积的比值降低, 每视野下 TUNEL 阳性细胞数减少 ($P<0.05$); 黄腐酚组 Nrf2 蛋白相对表达水平显著增强, p-p65/p65、p-mTOR/mTOR、p-Akt/Akt 蛋白相对表达水平显著降低 ($P<0.05$)。与黄腐酚组相比, 黄腐酚+ML385 组部分逆转了上述检测指标 ($P<0.05$)。**结论** 黄腐酚调节 Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt 信号降低细胞铁死亡抑制氧化应激, 可用于保护干眼症小鼠模型的眼部损伤。

关键词: 黄腐酚; 干眼症; 核因子红系 2 相关因子 2; 核因子- κ B; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 蛋白激酶 B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)12-2981-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.12.003

Molecular mechanisms of xanthohumol in regulating Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt signaling pathway to inhibit ferroptosis and oxidative stress, and relieve dry eye disease mice model injury

ZHOU Yang, YUSUFU Meilibanu

Department of Ophthalmology, The Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanisms of xanthohumol in regulating Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt signaling pathway to inhibit ferroptosis and oxidative stress, and relieve dry eye disease mice model injury. **Methods** *In vitro* studies used human corneal epithelial cell line HCECs cells to establish a hyperosmotic stress (HOS) model, and the cells were divided into control group, model group, and xanthohumol 50 μ mol/L group. The viability of HCECs cells was determined by the CCK-8 method. The apoptosis rate of cells was determined by FITC-AnnexinV/PI double-labeled flow cytometry. The levels of reactive oxygen species

收稿日期: 2025-10-09

基金项目: 新疆医科大学第五临床医学院 (第五附属医院) 国自然启航项目 (XYDWFY-GQH-2024-14)

作者简介: 周 洋, 男, 主任医师, 硕士, 研究方向为白内障青光眼眼底疾病的诊治及临床基础研究。E-mail: zhouyang323@outlook.com

in cells were determined by DCF-DA fluorescent dye combined with laser confocal microscopy and flow cytometry. ELISA was used to determine the levels of MDA, GSH, and Fe^{2+} , which are related to ferroptosis in cells. The apoptosis-related indicators (Bcl-2, Bax, cleaved-Caspase-3, Caspase-3), and ferroptosis-related indicators (GPX4, SLC7A11, HO-1) in HCECs cells of each group were determined by Western blotting. *In vivo* animal model studies were conducted to establish a mice model of dry eye syndrome. Thirty-two male Balb/c mice were randomly divided into control group, model group, xanthohumol group, and xanthohumol + ML385 group. HE staining and TUNEL staining of mouse corneal tissues. The expression levels of Nrf2, p-p65, p65, p-mTOR, mTOR, p-Akt, and Akt in the corneal tissues of mice in each group were determined by Western blotting. **Results** Compared with the model group, the cell survival ability of the xanthohumol group was significantly enhanced ($P < 0.05$). Compared with the model group, the apoptosis rate of cells in the xanthohumol group was significantly reduced, the relative expression levels of Bax and cleaved-Caspase3 proteins were significantly decreased, while the relative expression level of Bcl-2 protein was significantly increased, the relative expression levels of GPX4, SLC7A11, and HO-1 proteins were significantly increased. The levels of MDA and Fe^{2+} decreased significantly, while the level of GSH increased. The relative fluorescence intensity value of DCF-DA and the number of positive cells stained with DCF-DA were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with xanthohumol group, the xanthohumol + ML385 group partially reversed the above detection indicators ($P < 0.05$). The results of HE staining and histopathological analysis showed that compared with the model group, the total corneal thickness and corneal epithelial thickness of mice in the xanthohumol group were increased, the number of corneal epithelial cell layers were increased, the ratio of intercellular space area to field area were decreased, and the number of TUNEL-positive cells per field were decreased ($P < 0.05$). The relative expression level of Nrf2 protein in the xanthohumol group was significantly enhanced, while the relative expression levels of p-P65 /p65, p-mTOR/mTOR, and p-Akt/Akt proteins were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the xanthohumol group, the xanthohumol + ML385 group partially reversed the above detection indicators ($P < 0.05$). **Conclusion** Xanthohumol regulated the Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt signaling pathway to reduce ferroptosis and inhibit oxidative stress. It could be used to protect the ocular damage in a mouse model of dry eye disease.

Key words: xanthohumol; dry eye syndrome; Nrf2; NF- κ B; mTOR; Akt

干眼综合征是一种由炎症引起的眼表和眼附件的动态慢性疾病,是一个涵盖多种与眼部润滑功能受损相关症状和体征的统称,即眼部表面泪液的质量降低或数量减少。最常见的症状包括发红、瘙痒和视力模糊,由睑板腺功能障碍和泪膜生成受损引起^[1]。导致干眼综合征发展的因素包括环境因素,如紫外线辐射;内部因素,包括激素失衡、肠道失调、自免疫性疾病和神经损伤^[2]。覆盖在眼睛表面的泪膜主要由水液、脂质和黏蛋白成分构成。泪腺负责分泌水液部分;脂质由睑板腺产生,疏水性的脂质层能够延缓泪膜的蒸发,并有助于防止泪水溢出到脸颊上;黏蛋白由结膜杯状细胞产生^[3]。在健康的眼睛中,角膜的神经感受作用驱动泪腺产生基础泪液^[3]。目前对干眼综合征发病机制的研究表明,炎症是核心驱动因素,即所谓的“炎症恶性循环”^[4]。干眼症患者结膜上皮细胞表面受体介导的炎症反应,细胞过度表达炎症细胞因子和细胞凋亡相关的标志物是干眼综合征的普遍特征^[5]。

黄腐酚是一种酚类化合物,在蛇麻草花中含量最多,在叶子和茎中也有,它通常作为补充剂被添加到膳食和化妆品中^[6]。黄腐酚被认为是一种有效的抗氧化物质。黄腐酚调控核因子红系 2 相关因子

2 (Nrf2)/核因子- κ B (NF- κ B)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)/蛋白激酶 B (Akt) 通路,诱导强抗氧化和抗炎作用;还能通过增强 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2) 的表达加强细胞自噬^[7]。黄腐酚凭借其 Michael 受体单元,通过抑制丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 活化和 I κ B 激酶 (IKK) 磷酸化,抑制 NF- κ B 的转录活性和 Nrf2 的表达,从而发挥抗炎活性^[8]。但是由于黄腐酚难溶于水,易溶于有机溶剂,限制了其在药物领域的使用。目前,已有少量研究探讨了黄腐酚导向的新抗炎化合物的设计和人工合成,以期对其水溶性进行改良和提高,并对其抗炎活性加以更有效的利用^[8-9]。本研究拟通过体外和在体实验探讨黄腐酚上调 Nrf2,抑制 NF- κ B/mTOR/Akt 信号通路降低细胞铁死亡抑制氧化应激,缓解干眼症小鼠模型的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

32 只 10~12 周龄雄性 Balb/c 小鼠,体质量 18~21 g,购自新疆医科大学实验动物中心[合格证批号 SYXK (新) 2025-027]。人角膜上皮细胞系 HCECs 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。CCK-8 细胞增殖/毒性检测试剂盒 (货号

KTC011001)购自艾美捷科技有限公司。黄腐酚(货号 X0379, CAS 号 6754-58-1, 粉末状, 质量分数 $\geq 96\%$)、Nrf2 抑制剂(ML385, 货号 SML1833, CAS 号 846557-71-9)、鹰嘴豆芽素 A(BCA, 货号 92142, CAS 号 491-80-5)均购自默克 Sigma-Aldrich 公司。丙二醛(MDA)分光光度计法测定试剂盒(货号 BL1481A)购自上海经科化学科技有限公司。还原型谷胱甘肽(GSH)比色法测定试剂盒(货号 E-BC-K030-M)、亚铁离子(Fe^{2+})荧光法测定试剂盒(货号 E-BC-F101)、FITC-Annexin V/PI 双标记流式细胞术测定细胞凋亡率试剂盒(货号 E-CK-A211)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。DCF-DA 荧光染料(货号 D6471)购自北京索莱宝科技有限公司。兔抗小鼠 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)单抗(货号 MA5-14003)、Bcl-2 单抗(货号 MA5-11757)、裂解型-半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cleaved-Caspase-3)多抗(货号 PA5-114687)、Caspase-3 单抗(货号 35-1600Z)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)多抗(货号 PA5-102521)、溶质载体家族 7A11(SLC7A11)多抗(货号 PA1-16893)、血红素加氧酶-1(HO-1)单抗(货号 MA1-112)、Nrf2 多抗(货号 PA5-27882)、NF- κ B p65 多抗(货号 51-0500)、p-p65 单抗(货号 MA5-15160)、p-mTOR 多抗(货号 44-1125G)、mTOR 多抗(货号 PA5-34663)、p-Akt 单抗(货号 44-621G)、Akt 多抗(货号 44-609G)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单抗(货号 MA5-15738)、HRP 标记-IgG 二抗(货号 31460)均购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

KC-X3000 型激光共聚焦显微镜购自奥林巴斯。BB15 型 CO_2 培养箱、Attune NxT 型流式细胞仪、Multiskan SkyHigh 型全波长酶标仪购自 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 细胞实验

1.2.1 细胞培养 HCECs 细胞培养于补充有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的完全 DMEM 培养液中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温、相对湿度 90%、通入 5% CO_2 的细胞培养箱中维持培养。

1.2.2 建立高渗透压应激细胞模型 为了建立高渗透压应激(HOS)细胞模型, 向 HCECs 细胞培养液中加入终浓度为 69 mmol/L 的 NaCl, 使得细胞培养液的渗透压为 450 mOsmol/L^[10]。

1.2.3 细胞实验分组和处理 细胞实验分组: 对照组(不加药物); 模型组, 建立 HOS 细胞模型; 黄

腐酚组, 在模型组基础上分别给予黄腐酚 10、25、50、75 $\mu\text{mol/L}$, 处理 48 h^[11]。

1.2.4 细胞存活能力测定 使用 CCK-8 试剂盒测定细胞存活能力, 操作方法参见试剂盒说明书。在 450 nm 下测定各皿细胞吸光度(A)值。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

1.2.5 细胞凋亡率测定 流式细胞术测定细胞凋亡率, 按照实验分组处理并消化各分组细胞培养物, 制备细胞浓度为 1.0×10^6 个/mL 的单细胞悬液。使用 FITC-Annexin V/PI 双标记流式细胞术测定细胞凋亡率试剂盒, 按照说明书染色单细胞, 上机流式细胞仪进行测定。流式细胞术结果图中活细胞为 Q1 象限细胞, 机械损伤细胞为 Q2 象限细胞, 早期凋亡细胞为 Q4 象限细胞, 晚期凋亡和坏死细胞为 Q3 象限细胞。

$$\text{细胞凋亡率} = \text{Q3 象限细胞占比} + \text{Q4 象限细胞}$$

1.2.6 相关蛋白检测 每皿 6 孔板细胞培养物中加入 1 mL 补充有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制混合物的 RIPA 裂解液裂解细胞; 按照常规方法进行 SDS-PAGE 和半干电转印法将 PAGE 上的总蛋白质电转印至 PVDF 膜上。采用 5% 脱脂奶粉对 PVDF 膜进行封闭。向膜上滴加一抗工作液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜; 次日向膜上滴加二抗工作液, 室温孵育 1 h。ECL 超敏化学发光底物对目的条带进行显影。采用 Image J v1.48 软件分析和计量条带的灰度值。以 GAPDH 为内参, 其余各分组靶标条带灰度值/对应分组 GAPDH 条带灰度值为该分组靶标的条带灰度值; 以对照组的靶标灰度值对其他分组该靶标条带灰度值进行归一化处理。抗体工作液稀释度如下: Bax (1 : 1 500)、Bcl-2 (1 : 1 500)、cleaved-Caspase-3 (1 : 1 000)、Caspase-3 (1 : 1 500)、GAPDH (1 : 1 500)、GPX4 (1 : 1 500)、SLC7A11 (1 : 1 500)、HO-1 (1 : 1 500)。

1.2.7 MDA、GSH、 Fe^{2+} 水平检测 采用 ELISA 法测定细胞 MDA、GSH、 Fe^{2+} 水平。

1.2.8 细胞活性氧自由基测定 将 1.0×10^4 个 HCECs 细胞均匀铺置于激光共聚焦细胞培养皿中, 过夜培养。按照 1.2.3 项下处理细胞 12 h 后, 向每皿细胞培养物中加入 1 mL DCFH-DA 溶液, 避光孵育 20 min。弃上清液, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的 PBS 缓冲液洗细胞 3 次。上机激光共聚焦显微镜观察各分组细胞中的 DCF-DA 荧光。通过流式细胞仪分别在激发波长(E_x)=488 nm 和发射波长(E_m)=525 nm

波长下测量每个样本的 DCFH-DA 荧光强度。

1.3 动物实验

1.3.1 实验动物 32 只雄性 Balb/c 小鼠饲养于恒温 (23±2)℃、恒湿 (60±10)%，每日光照：黑暗周期为 12 h：12 h 的标准 SPF 级鼠房。小鼠饲喂标准啮齿类动物饲料，可以自由采食和饮水。小鼠接受造模处理之前，先适应性饲养 1 周。所有动物实验均经新疆医科大学第五附属医院伦理委员会批准，伦理号 XYDWFYLSk-2024-67。

1.3.2 干眼症小鼠模型 参考相关文献报道方法^[12] 建立干眼症小鼠模型。每天使用添加有 0.2% BCA 的透明质酸钠人工泪液 (不含防腐剂)，每次 5 μL，分 2 次 (9：00 和 21：00 时) 给药，连续给药 14 d 诱导建立干眼症小鼠模型。

1.3.3 药物配制方法和给药浓度 黄腐酚储存液配制：现将黄腐酚、无水乙醇、生理盐水按 1 g：1 L：4 L 的配比配制黄腐酚储存液，其中黄腐酚的浓度为 588 μmol/L^[13]。配制好的黄腐酚储存液分装成小份，冻存于 -20℃，现用现稀释。ML385 干粉溶解于生理盐水中，ML385 储存液浓度为 1 mg/mL^[14]。

1.3.4 分组和处理 32 只雄性 Balb/c 小鼠随机分为对照组、模型组、黄腐酚组、黄腐酚+ML385 组，每组 8 只。对照组不做任何处理，常规饲养；模型组按照 1.3.2 项下方法建立干眼症小鼠模型，造模后小鼠每日 ip 1 mg 戊巴比妥钠麻醉，然后向其眼睛滴加与黄腐酚组等体积的无水乙醇-生理盐水溶液；黄腐酚组小鼠造模后小鼠每日 ip 1 mg 戊巴比妥钠麻醉，然后向其眼睛滴加 50 μmol/L 黄腐酚^[15]；黄腐酚+ML385 组小鼠模型造模后小鼠每日 ip 1 mg 戊巴比妥钠麻醉，然后向其眼睛滴加 50 μmol/L 黄腐酚和 10 μg/L ML385^[16]。各组连续给予 3 d。药物治疗 3 d 结束后，采用 CO₂ 窒息法处死小鼠，采集其眼角膜组织，立即浸没于 4% 多聚甲醛中 4℃ 固定超过 48 h，备用。

1.3.5 苏木精-伊红(HE)染色和 TUNEL 染色 制备小鼠眼角膜组织石蜡组织切片 (沿垂直于角膜表面方向纵切，厚度 8 μm)，采用 HE 染色液套装试剂盒和动物组织 TUNEL 染色试剂盒套装进行染色，操作步骤参见对应说明书即可。

1.3.6 Western blotting 实验 小鼠眼角膜组织，按照每毫克组织加入 1 mL 上述同样的 RIPA 裂解液裂解组织。制备组织匀浆并提取总蛋白质。按照常

规方法进行 SDS-PAGE 和半干电转印法将 PAGE 上的总蛋白质电转印至 PVDF 膜上。采用 5% 脱脂奶粉对 PVDF 膜进行封闭。向膜上滴加一抗工作液，4℃ 下孵育过夜；次日向膜上滴加二抗工作液，室温孵育 1 h。ECL 超敏化学发光底物对目的条带进行显影。采用 Image J v1.48 软件分析和计量条带的灰度值。以 GAPDH 为内参，其余各分组靶标条带灰度值/对应分组 GAPDH 条带灰度值为该分组靶标的条带灰度值；以对照组的靶标灰度值对其他分组该靶标条带灰度值进行归一化处理。抗体工作液稀释度如下：Bax (1：1 500)、Bcl-2 (1：1 500)、cleaved-Caspase-3 (1：1 000)、Caspase-3 (1：1 500)、GPX4 (1：1 500)、SLC7A11 (1：1 500)、HO-1 (1：1 500)、Nrf2 (1：1 500)、NF-κB p65 (1：1 500)、p-p65 (1：1 000)、p-mTOR (1：1 000)、mTOR (1：1 500)、p-Akt (1：1 000)、Akt (1：1 500)、GAPDH (1：1 500)，HRP-标记山羊抗兔 IgG 二抗 (1：5 000)。

1.3.7 统计学方法 采用 GraphPad Prism v10 软件进行分析。计量数据均表示为 $\bar{x} \pm s$ 的形式。多组间比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA) 和事后 Tukey's 检验进行组间两两差异的比较。

2 结果

2.1 黄腐酚对角膜上皮细胞存活能力的影响

如表 1 所示，与模型组相比，黄腐酚各浓度组细胞活力显著增强 ($P < 0.05$)；且与黄腐酚 50 μmol/L 组细胞活力最强，故后续直接选取黄腐酚 50 μmol/L 组作为研究对象进行下游实验指标的测定。

表 1 不同浓度黄腐酚对 HOS 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Influence of different concentrations of xanthohumol on the proliferation ability of HOS cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/(μmol·L ⁻¹)	细胞活力/%
对照	—	100.0±1.2
模型	—	58.2±0.8*
黄腐酚	10	60.4±0.7 [#]
	25	68.8±0.8 ^{#&}
	50	82.5±1.3 ^{#&@}
	75	75.6±1.1 ^{#&}

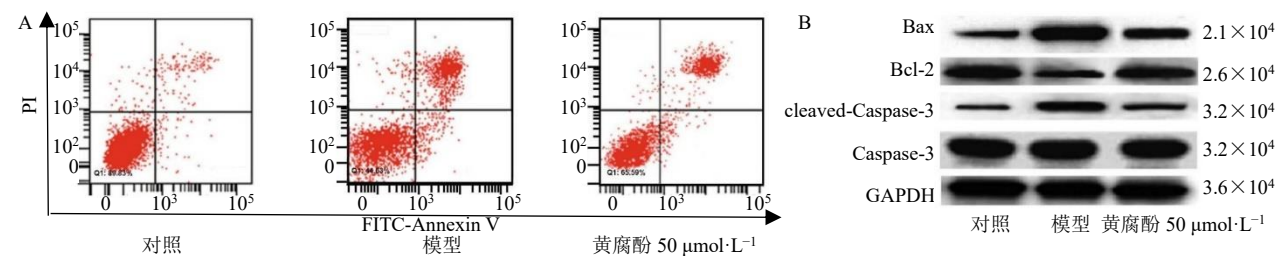
与对照组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ；与黄腐酚组 10 μmol·L⁻¹ 组比较：[&] $P < 0.05$ ；与黄腐酚组 25 μmol·L⁻¹ 组比较：[@] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; [&] $P < 0.05$ vs xanthohumol 10 μmol·L⁻¹ group; [@] $P < 0.05$ vs xanthohumol 25 μmol·L⁻¹ group.

2.2 黄腐酚对角膜上皮细胞凋亡的影响

如图 1、表 2 所示，与模型组相比，黄腐酚 50 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$)；黄腐酚

50 $\mu\text{mol/L}$ 组 Bax 和 cleaved-Caspase-3/Caspase-3 相对表达水平显著降低，Bcl-2 相对表达水平显著升高 ($P<0.05$)。



A-流式细胞术结果图，B-Western blotting 法检测凋亡相关蛋白表达情况。
A-results of flow cytometry, B-expression of apoptosis-related proteins detected by Western blotting.

图 1 黄腐酚对 HOS 细胞模型细胞凋亡和凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of xanthohumol on the apoptosis rate and the expression level of apoptosis-related proteins in the HOS cell model

表 2 黄腐酚对 HOS 细胞模型细胞凋亡率和凋亡相关蛋白表达定量水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of xanthohumol on the apoptosis rate and the quantitative expression level of apoptosis-related proteins in the HOS cell model ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞凋亡率/%	Bax 蛋白相对表达量	Bcl-2 蛋白相对表达量	cleaved-Caspase-3/Caspase-3
对照	—	7.33 $\pm$ 1.38	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.10	0.12 $\pm$ 0.02
模型	—	55.62 $\pm$ 2.63*	2.53 $\pm$ 0.16*	0.33 $\pm$ 0.04*	0.46 $\pm$ 0.04*
黄腐酚	50	31.23 $\pm$ 1.45 [#]	1.77 $\pm$ 0.14 [#]	0.82 $\pm$ 0.06 [#]	0.27 $\pm$ 0.03 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs model group.

2.3 黄腐酚对角膜上皮细胞铁死亡相关指标水平的影响

如图 2、表 3 所示，与模型组相比，黄腐酚 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 GPX4、SLC7A11 和 HO-1 蛋白相对表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

2.4 黄腐酚对角膜上皮细胞 MDA、GSH、 Fe^{2+} 水平的影响

如表 4 所示，与模型组相比，黄腐酚 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 MDA、 Fe^{2+} 水平显著降低，GSH 水平显著升高 ($P<0.05$)。

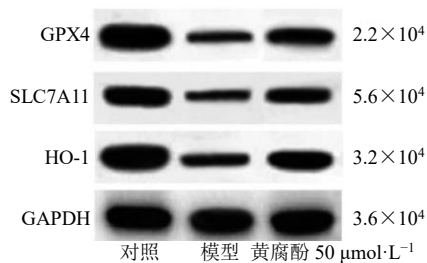


图 2 黄腐酚对 HOS 细胞模型铁死亡相关蛋白表达水平的影响

Fig. 2 Effect of xanthohumol on the expression level of ferroptosis-related proteins in HOS cell models

表 3 黄腐酚对 HOS 细胞模型铁死亡相关蛋白定量表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Influence of xanthohumol on the quantitative expression level of ferroptosis-related proteins in HOS cell models ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	蛋白相对表达量		
		GPX4	SLC7A11	HO-1
对照	—	1.00 $\pm$ 0.12	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.13
模型	—	0.21 $\pm$ 0.02*	0.32 $\pm$ 0.03*	0.27 $\pm$ 0.02*
黄腐酚	50	0.63 $\pm$ 0.05 [#]	0.86 $\pm$ 0.08 [#]	0.55 $\pm$ 0.06 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ vs model group.

2.5 黄腐酚对角膜上皮细胞氧化应激水平的影响

如图 3、表 5 结果所示，与模型组相比，黄腐酚 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 DCF-DA 相对荧光强度值和 DCF-DA 染色阳性细胞数值降低 ($P<0.05$)。

2.6 黄腐酚通过上调 Nrf2 对小鼠角膜上皮细胞的影响

如图 4、表 6 HE 染色结果所示，对照组小鼠角膜组织结构完整，表面具有 5~6 层紧密连接的角膜上皮细胞；模型组小鼠角膜组织表层上皮出现脱

表 4 黄腐酚对 HOS 细胞模型 MDA、GSH、Fe²⁺水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effects of xanthohumol on MDA, GSH, and Fe²⁺ levels in HOS cell models ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	MDA/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	GSH/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	Fe ²⁺ /($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	0.45 ± 0.04	16.27 ± 1.13	0.37 ± 0.07
模型	—	1.27 ± 0.11*	9.24 ± 1.01*	0.83 ± 0.10*
黄腐酚	50	0.76 ± 0.07 [#]	13.18 ± 1.15 [#]	0.56 ± 0.08 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group.

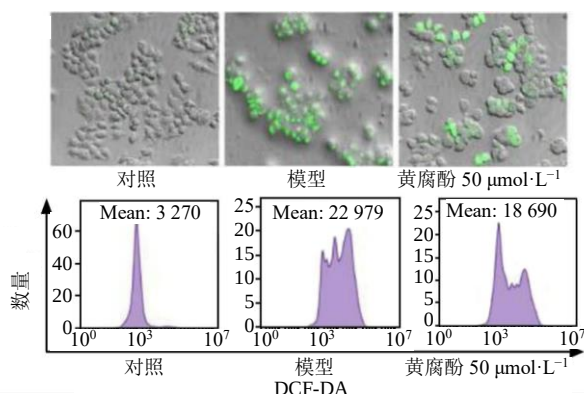


图 3 黄腐酚对 HOS 细胞模型氧化应激水平的影响

Fig. 3 Effect of xanthohumol on oxidative stress level in HOS cell model

表 5 黄腐酚对 HOS 细胞模型氧化应激水平定量结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Quantitative results of xanthohumol on oxidative stress levels in HOS cell models ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	DCF-DA 相对荧光强度	DCF-DA 染色阳性细胞数
对照	—	1.00 ± 0.21	3 270 ± 81
模型	—	8.77 ± 0.46*	22 979 ± 215*
黄腐酚	50	5.21 ± 0.34 [#]	18 690 ± 142 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group.

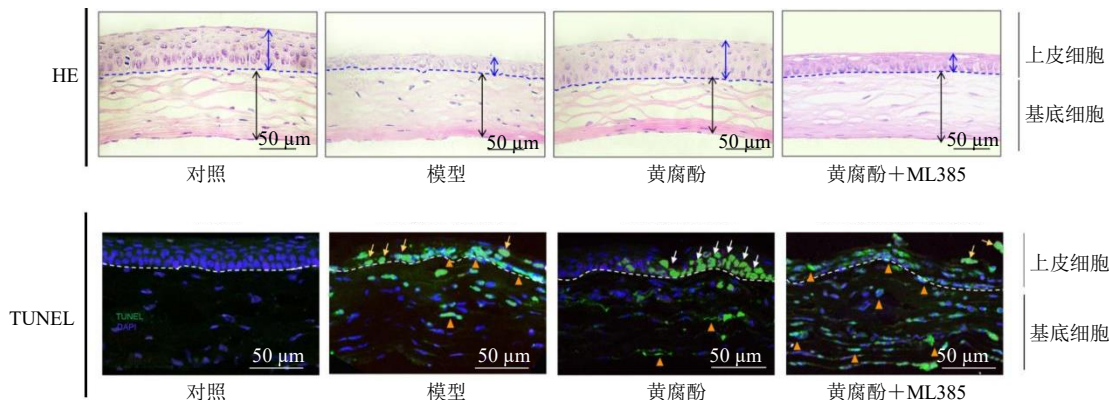


图 4 小鼠角膜 HE 染色和 TUNEL 染色图

Fig. 4 HE staining and TUNEL staining images of mouse corneas

落和不平整的现象,同时角膜上皮细胞排列紊乱、松散且明显变薄,相较于对照组,模型组小鼠角膜总厚度、角膜上皮厚度和角膜上皮细胞层数显著降低 ($P < 0.05$),细胞间隙面积/视野面积的比值升高 ($P < 0.05$)。黄腐酚组尽管角膜上皮仍然较薄,但角膜上皮细胞的排列整齐紧密,相较于模型组,黄腐酚组小鼠角膜总厚度、角膜上皮厚度变厚,角膜上皮细胞层数增加 ($P < 0.05$),细胞间隙面积/视野面积的比值降低 ($P < 0.05$)。黄腐酚+ML385 组角膜上皮较薄,角膜上皮细胞排列紊乱、松散,相较于黄腐酚组,黄腐酚+ML385 组小鼠角膜总厚度、角膜上皮厚度和角膜上皮细胞层数降低 ($P < 0.05$),细胞间隙面积/视野面积的比值升高 ($P < 0.05$)。

TUNEL 染色结果(图 4、表 6)所示,与模型组相比,黄腐酚组每视野下 TUNEL 阳性细胞数减少 ($P < 0.05$);与黄腐酚组相比,黄腐酚+ML385 组每视野下 TUNEL 阳性细胞数增多 ($P < 0.05$)。

2.7 黄腐酚通过上调 Nrf2 抑制 NF- κ B/mTOR/Akt 信号通路活性

如图 5、表 7 所示,与模型组相比,黄腐酚组 Nrf2 蛋白相对表达水平显著增强, p-p65/p65、p-mTOR/mTOR 和 p-Akt/Akt 相对表达水平显著降低 ($P < 0.05$);与黄腐酚组相比,黄腐酚+ML385 组

表 6 小鼠角膜 TUNEL 染色统计结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 6 Statistical results of TUNEL staining of mouse corneas ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	浓度	角膜总厚度/ μm	角膜上皮厚度/ μm	角膜上皮细胞层数	细胞间隙面积/视野面积	TUNEL 阳性细胞数
对照	—	103.5 ± 1.6	31.2 ± 0.4	7.8 ± 0.5	0.075 ± 0.004	5.2 ± 0.6
模型	—	$82.4 \pm 1.3^*$	$8.7 \pm 0.5^*$	$2.4 \pm 0.5^*$	$0.102 \pm 0.007^*$	$15.7 \pm 1.1^*$
黄腐酚	$50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$97.2 \pm 0.8^\#$	$11.3 \pm 0.7^\#$	$6.0 \pm 0.8^\#$	$0.083 \pm 0.003^\#$	$9.2 \pm 0.8^\#$
黄腐酚+ML385	$50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$88.7 \pm 0.9^{\#\&}$	$9.8 \pm 0.5^{\#\&}$	$4.1 \pm 0.6^{\#\&}$	$0.096 \pm 0.005^\&$	$13.4 \pm 0.8^{\#\&}$

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与模型组比较: $^\#P < 0.05$; 与黄腐酚组比较: $^\&P < 0.05$ 。
 $^*P < 0.05$ vs control group; $^\#P < 0.05$ vs model group; $^\&P < 0.05$ vs xanthohumol group.

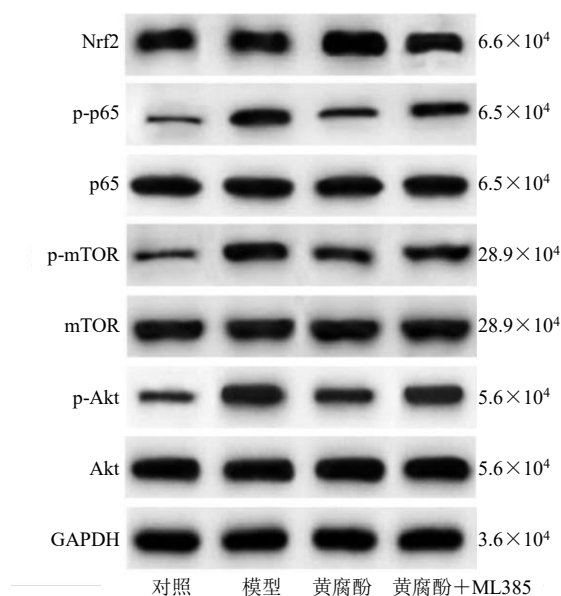


图 5 小鼠角膜组织 Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt 信号通路表达水平

Fig. 5 Expression level of the Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt signaling pathway in mouse corneal tissue

表 7 小鼠角膜组织 Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt 信号通路表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Expression level of the Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt signaling pathway in mouse corneal tissue ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	浓度	蛋白相对表达水平			
		Nrf2	p-p65/p65	p-mTOR/mTOR	p-Akt/Akt
对照	—	1.00 ± 0.11	0.16 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.32 ± 0.03
模型	—	1.06 ± 0.12	$0.64 \pm 0.04^*$	$0.89 \pm 0.05^*$	$0.76 \pm 0.04^*$
黄腐酚	$50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	$2.21 \pm 0.16^\#$	$0.37 \pm 0.03^\#$	$0.46 \pm 0.04^\#$	$0.45 \pm 0.02^\#$
黄腐酚+ML385	$50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} + 10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	$1.04 \pm 0.10^\&$	$0.61 \pm 0.02^\&$	$0.85 \pm 0.06^\&$	$0.73 \pm 0.03^\&$

与对照组比较: $^*P < 0.05$; 与模型组比较: $^\#P < 0.05$; 与黄腐酚组比较: $^\&P < 0.05$ 。
 $^*P < 0.05$ vs control group; $^\#P < 0.05$ vs model group; $^\&P < 0.05$ vs xanthohumol group.

化应激的途径。虾青素利用 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路抑制炎症和氧化应激,能够改善苯扎氯铵诱导的干眼症^[21]。过表达膜联蛋白 A1 通过调节

Nrf2 相对表达水平降低 ($P < 0.05$)。与黄腐酚组相比,黄腐酚+ML385 组 p-p65/p65、p-mTOR/mTOR 和 p-Akt/Akt 相对表达水平显著增强 ($P < 0.05$)。

3 讨论

炎症在干眼综合征的病理生理机制中起着至关重要的作用,也是干眼综合征病理性恶性循环的关键一环。对泪腺的组织学检查发现,患有干眼症但无 Sjögren 综合征的患者泪腺中存在淋巴细胞浸润;大量研究也支持干眼综合征并非由泪腺的老年性萎缩引起,而是慢性炎症的一个促成因素;细胞因子和受体介导的炎症是干眼症的普遍特征^[17-18]。干眼综合征中的炎症循环,炎症性细胞因子不仅募集淋巴细胞浸润眼角膜、结膜等部位,还引起上述部位的上皮细胞凋亡和铁死亡^[19-20]。单细胞测序揭示了在干眼综合征小鼠模型中存在一个独特的促炎和促纤维化的角膜上皮细胞亚群,以及这些亚群细胞上调表达炎症相关的 I κ B α /NF- κ B 信号通路,促进角膜炎症性细胞因子的分泌和角膜细胞凋亡的发生。Nrf2 信号通路被认为是体内最重要的抗氧

TRIM72/Nrf2/HO-1 信号通路抑制细胞焦亡并改善干眼症小鼠模型眼部症状^[22]。硝基二氢辣椒素通过上调 SIRT1/Nrf2/HO-1 通路减轻高渗应激引起的角

膜上皮细胞炎症^[23]。通过激活 Nrf2 上调表达 AKR1C1 靶向炎症,能够通过抑制干眼综合征小鼠模型角膜上皮细胞氧化应激和铁死亡缓解干眼综合征小鼠模型干眼症状^[24]。在干眼综合征和 Sjögren 综合征中,炎症相关 JAK/STAT 信号通路、MAPK/ERK 信号通路、PI3K/Akt/mTOR 信号通路、PD-1/PD-L1 信号通路、TLR/MyD88/NF- κ B 信号通路、BAF/BAF-R 信号通路和 IFN 信号通路都是介导疾病炎症性进展的核心信号通路^[25-26]。

大量研究显示黄腐酚是一种有效的抗炎、抗氧化应激,降低线粒体 ROS 的一类化合物。黄腐酚能够通过上调 Nrf2,增强 GPX4 的表达,在药物引起的肝细胞铁死亡过程中发挥保护肝细胞的功能^[27]。黄腐酚通过调控 AMPK/ULK1/FUNDC1 信号通路调节骨肉瘤细胞中的线粒体自噬,促进骨肉瘤细胞凋亡^[28]。在本次研究结果中显示,黄腐酚能够在体外增强角膜上皮细胞存活、降低其凋亡和铁死亡,以及降低高渗透诱导的网膜上皮细胞氧化应激水平;并在体内实验结果中显示出通过上调 Nrf2,抑制 NF- κ B/mTOR/AKT 信号通路活性,保护模型小鼠模型角膜上皮细胞降低其凋亡的疗效。因黄腐酚难溶于水,易溶于有机溶剂,这限制了其在药物领域中的使用。需要进一步对其分子进行设计、合成,以改良其水溶性,并进一步提高其抗炎活性。在本次研究结果中已显示出黄腐酚在干眼症治疗中的良好的抗炎活性,可通过调节 Nrf2/NF- κ B/mTOR/Akt 信号降低细胞铁死亡抑制氧化应激,或许可用于保护干眼症小鼠模型的眼部损伤。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Caban M, Omulecki W, Latecka-Krajewska B. Dry eye in Sjögren's syndrome - characteristics and therapy [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2022, 32(6): 3174-3184.
- [2] Britten-Jones A C, Wang M T M, Samuels I, et al. Epidemiology and risk factors of dry eye disease: Considerations for clinical management [J]. *Medicina*, 2024, 60(9): 1458.
- [3] Huang R J, Su C Y, Fang L J, et al. Dry eye syndrome: comprehensive etiologies and recent clinical trials [J]. *Int Ophthalmol*, 2022, 42(10): 3253-3272.
- [4] Rao S K, Mohan R, Gokhale N, et al. Inflammation and dry eye disease-where are we [J]. *Int J Ophthalmol*, 2022, 15(5): 820-827.
- [5] Messmer EM, Ahmad S, Benitez Del Castillo J M, et al. Management of inflammation in dry eye disease: Recommendations from a European panel of experts [J]. *Eur J Ophthalmol*, 2023, 33(3): 1294-1307.
- [6] Oledzka E. Xanthohumol-A miracle molecule with biological activities: A review of biodegradable polymeric carriers and naturally derived compounds for its delivery [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(6): 3398.
- [7] Piekara J, Piasecka-Kwiatkowska D. Antioxidant potential of xanthohumol in disease prevention: Evidence from human and animal studies [J]. *Antioxidants*, 2024, 13(12): 1559.
- [8] 郑家芳. 设计黄腐酚等天然产物导向的抗炎和抗癌试剂及其机制研究 [D]. 兰州: 兰州大学, 2017.
- [9] 马光群. 黄腐酚新衍生物的合成及其对成骨细胞 MC3T3-E1 增殖与分化作用的研究 [D]. 烟台: 烟台大学, 2023.
- [10] Pan X H, Yang K, Li J J, et al. Long noncoding RNA *MIATNB* regulates hyperosmotic stress-induced corneal epithelial cell injury by inhibiting autophagy in dry eye disease [J]. *Curr Eye Res*, 2023, 48(9): 805-816.
- [11] Torrens-Mas M, Alorda-Clara M, Martínez-Vigara M, et al. Xanthohumol reduces inflammation and cell metabolism in HT29 primary colon cancer cells [J]. *Int J Food Sci Nutr*, 2022, 73(4): 471-479.
- [12] Chen T G, Zhou N, Liang Q, et al. Biochanin A: Disrupting the inflammatory vicious cycle for dry eye disease [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 977: 176583.
- [13] Bai H H, Xia T S, Jiang Y P, et al. Absorption, metabolism, and pharmacokinetic profile of xanthohumol in rats as determined via UPLC-MS/MS [J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2022, 43(1): 11-22.
- [14] Singh A, Venkannagari S, Oh K H, et al. Small molecule inhibitor of NRF2 selectively intervenes therapeutic resistance in KEAP1-deficient NSCLC tumors [J]. *ACS Chem Biol*, 2016, 11(11): 3214-3225.
- [15] Dabrowski W, Pfortmueller C A, Kotfis K, et al. Is there a place for natural agents with anti-inflammatory and antioxidative properties in critically ill patients? Potential usefulness of xanthohumol [J]. *Pharmacol Ther*, 2025, 266: 108766.
- [16] Sun Y Y, Zhu H J, Zhao R Y, et al. Remote ischemic conditioning attenuates oxidative stress and inflammation via the Nrf2/HO-1 pathway in MCAO mice [J]. *Redox Biol*, 2023, 66: 102852.
- [17] Perez V L, Stern M E, Pflugfelder S C. Inflammatory basis for dry eye disease flares [J]. *Exp Eye Res*, 2020, 201: 108294.
- [18] Yoon H J, Jin R J, Yoon H S, et al. Bacillus-derived manganese superoxide dismutase relieves ocular-surface

- inflammation and damage by reducing oxidative stress and apoptosis in dry eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2023, 64(12): 30.
- [19] 于息明, 张致睿, 赵玲影, 等. 铁死亡在干眼中的研究进展 [J]. 中国中医眼科杂志, 2025, 35(6): 573-578.
- [20] 熊涛, 张宸, 邵佳, 等. 干眼症治疗的研究进展 [J]. 新疆医科大学学报, 2025, 48(6): 858-863.
- [21] Liu Z Y, Li Y Q, Bao J Y, *et al.* Astaxanthin ameliorates benzalkonium chloride-induced dry eye disease through suppressing inflammation and oxidative stress via Keap1-Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. *Animal Model Exp Med*, 2025, 8(6): 1056-1079.
- [22] Zhang L, Chen P, Han P F, *et al.* Overexpression of annexin A1 inhibits pyroptosis and improves dry eye signs by regulating the TRIM72/Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2025, 73(1).
- [23] Ngoenkam J, Pejchang D, Nuamchit T, *et al.* Nitro dihydrocapsaicin attenuates hyperosmotic stress-induced inflammation in the corneal epithelial cells via SIRT1/Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Exp Eye Res*, 2025, 261: 110680.
- [24] Zuo X, Zeng H, Wang B W, *et al.* AKR1C1 protects corneal epithelial cells against oxidative stress-mediated ferroptosis in dry eye [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2022, 63(10): 3.
- [25] 任渊, 崔戈丹, 高永翔. 原发性干燥综合征患者颌下腺炎症反应机制研究进展 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2021, 50(6): 783-794.
- [26] 刘国英, 侯江平, 吴幻, 等. 干眼患者结膜上皮细胞及泪液中 TLR4 和 NF- κ B 的表达及临床意义 [J]. 国际眼科杂志, 2025, 25(6): 975-979.
- [27] Deng Y Y, Chu X Y, Li Q, *et al.* Xanthohumol ameliorates drug-induced hepatic ferroptosis via activating Nrf2/xCT/GPX4 signaling pathway [J]. *Phytomedicine*, 2024, 126: 155458.
- [28] Ge Q F, Yan Z L, Tian Q, *et al.* Xanthohumol regulates mitophagy in osteosarcoma cells via AMPK-ULK1-FUNDC1 signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2025, 39(5): 2393-2406.

[责任编辑 高源]