

• 药理与临床 •

基于谷胱甘肽/谷胱甘肽过氧化物酶 4 轴探讨雷公藤甲素引起肝细胞铁死亡的作用机制

王伟艳¹, 刘 珊¹, 李会芳¹, 常银霞¹, 栾智华², 苏越蕊¹, 魏砚明^{1*}

1. 山西中医药大学中药与食品工程学院, 山西 晋中 030619

2. 山西中医药大学实验管理中心, 山西 晋中 030619

摘要: **目的** 观察雷公藤甲素对铁代谢和脂质过氧化的影响, 探讨雷公藤甲素引起肝细胞铁死亡的可能机制。 **方法** 利用雷公藤甲素处理人正常肝细胞 HL7702 和 C57BL/6J 小鼠, 或利用铁死亡抑制剂 (ferrostatin-1, Fer-1) 和雷公藤甲素共同处理 HL7702 细胞, CCK-8 法检测细胞存活率; 普鲁士蓝染色观察铁沉积; 试剂盒检测铁离子、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量以及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性; qRT-PCR 或 Western blotting 检测转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TFR1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 的表达。 **结果** 雷公藤甲素显著降低细胞存活率 ($P < 0.05$), 引起铁沉积, 升高血清中 ALT、AST 活性 ($P < 0.05$), 增加 HL7702 细胞和小鼠肝组织中铁离子、MDA 含量 ($P < 0.05$), 降低 GSH 含量、SOD 活性和 GPX4 表达 ($P < 0.05$), 上调 TFR1、PTGS2 及 ACSL4 表达 ($P < 0.05$)。 Fer-1 显著上调细胞存活率和 GPX4 表达量 ($P < 0.05$), 显著下调铁离子含量、TFR1、PTGS2 及 ACSL4 表达 ($P < 0.05$)。 **结论** 雷公藤甲素可能通过 GSH/GPX4 轴引起铁代谢异常和脂质过氧化, 诱导肝细胞铁死亡。

关键词: 雷公藤甲素; 铁死亡; 肝细胞毒性; 铁超载; 脂质过氧化; 谷胱甘肽/谷胱甘肽过氧化物酶 4 轴

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)09-2967-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.09.011

Mechanism of triptolide-induced ferroptosis in liver cells based on glutathione/glutathione peroxidase 4 axis

WANG Weiyan¹, LIU Shan¹, LI Huifang¹, CHANG Yinxia¹, LUAN Zhihua², SU Yuerui¹, WEI Yanming¹

1. College of Chinese Medicine and Food Engineering, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

2. Experimental Management Center, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, China

Abstract: Objective To investigate the effect of triptolide on iron metabolism and lipid peroxidation and evaluate the underlying mechanism of triptolide-induced ferroptosis in hepatic cells. **Methods** HL7702 cells and C57BL/6J mice were treated with triptolide, or HL7702 cells were co-treated with ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 (Fer-1) and triptolide, and then cell survival rate was detected by CCK-8 method; Iron deposition was detected by Prussian blue staining; Iron, glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) contents and superoxide dismutase (SOD), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) activities were detected by kit; Transferrin receptor 1 (TFR1), glutathione peroxidase 4 (GPX4), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) expressions were detected by qRT-PCR or Western blotting. **Results** Triptolide significantly decreased cell viability ($P < 0.05$), increased ALT and AST activities in serum ($P < 0.05$), and resulted in iron deposition,

收稿日期: 2023-11-20

基金项目: 山西省科技厅基础研究课题资助项目 (202103021224295); 山西中医药大学毒效关系研究创新团队 (2022TD1016); 山西省卫生健康委科研课题 (2022133); 山西中医药大学科技创新能力培养计划“基础研究专项”课题资助项目 (2020PY-JC-17)

作者简介: 王伟艳, 硕士研究生, 研究方向为中药临床药学与药事管理。E-mail: 1686880829@qq.com

*通信作者: 魏砚明, 副教授, 硕士生导师, 从事中药药理与毒理研究。Tel: (0351)3179717 E-mail: weiyanning2005@aliyun.com

increased iron, MDA contents ($P < 0.05$), decreased GSH content, SOD activity and GPX4 expression ($P < 0.05$), and up-regulated TFR1, PTGS2 and ACSL4 expressions in HL7702 cells and liver tissues ($P < 0.05$). Fer-1 significantly reversed the decreased cell viability induced by triptolide, and increased GPX4 expression ($P < 0.05$), as well as down-regulated iron content, TFR1, PTGS2 and ACSL4 expressions ($P < 0.05$). **Conclusion** Triptolide may induce iron overload and lipid peroxidation via GSH/GPX4 axis which ultimately leading to ferroptosis in hepatic cells.

Key words: triptolide; ferroptosis; hepatotoxicity; iron overload; lipid peroxidation; GSH/GPX4 axis

雷公藤作为传统中药, 具有清热解毒、祛风通络、舒筋活血、消肿止痛、杀虫止血等作用, 临床上对于类风湿性关节炎、肾病综合征、系统性红斑狼疮及自身免疫性肝炎等疾病具有独特疗效, 然而其严重的肝脏毒性制约了临床应用^[1]。作为一种环氧二萜内酯类化合物, 雷公藤甲素是雷公藤的主要药理活性成分之一, 亦是引起肝脏毒性反应的主要物质基础^[2]。雷公藤甲素可导致斑马鱼、小鼠及大鼠肝细胞水样变性、核萎缩, 肝组织结构紊乱, 出现灶状坏死、炎性细胞浸润、血清转氨酶活性升高、胆汁淤积等症状^[3]。体外条件下, 雷公藤甲素可降低肝巨噬细胞、肝癌细胞和正常肝细胞活力, 引起肝细胞死亡^[4-5]。研究表明, 雷公藤甲素导致肝损伤主要涉及氧化应激、细胞色素 P450 超家族代谢异常、细胞凋亡、细胞自噬、免疫稳态失衡、肠道菌群失调等多种机制^[6]。

铁死亡是一种新型调节性细胞死亡形式, 其特征是铁依赖性的脂质过氧化引发的细胞膜氧化损伤, 主要表现为细胞膜外膜起泡破裂、线粒体膜密度增加、嵴密度减少或消失等^[7]。铁死亡参与了多种疾病的病理发生过程, 如肿瘤、神经退行性疾病、急性肾衰竭、心脏缺血再灌注等^[8]。多种药物引起的肝毒性也与其干扰铁离子代谢过程导致铁死亡密切相关。解热镇痛药对乙酰氨基酚可减低体外培养原代小鼠肝细胞中抗氧化物谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量, 抑制谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 表达, 而铁死亡抑制剂 (ferrostatin-1, Fer-1) 则能够明显降低对乙酰氨基酚的肝细胞毒性作用, 提高细胞存活率^[9]; 体内条件下, Fer-1 可改善小鼠肝组织中铁代谢紊乱, 抑制铁死亡相关基因长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 和前列腺素内过氧化物合成酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 的高表达, 减轻对乙酰氨基酚引起的小鼠肝组织损伤^[10]。川楝素在激活蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R-like

endoplasmic reticulum kinase, PERK) -真核起始因子 2 α 亚基 (eukaryotic initiation factor 2 α subunit, eIF2 α) -激活转录因子 4 (activation transcription factor 4, ATF4) 信号通路, 引起 ATF3 介导的转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TFR1) 表达上调的同时, 可明显抑制铁输出蛋白溶质载体家族 40 成员 1 (solute carrier family 40 member 1, SLC40A1) 的表达, 导致肝细胞内铁超载, 并通过下调 GPX4 的表达, 引起肝细胞铁死亡^[11]。雷公藤甲素可呈剂量相关性引起铁离子聚集, 导致大鼠肝组织损伤, 表明铁死亡可能是雷公藤甲素导致肝损伤的关键机制^[12]。然而, 目前对于雷公藤甲素调节肝细胞铁死亡的作用途径及铁死亡在雷公藤甲素肝毒性中的功能仍有待阐明。

本研究拟在体外和体内条件下观察雷公藤甲素对肝细胞铁代谢和脂质过氧化的影响, 探讨雷公藤甲素对铁死亡的调控途径, 以期揭示雷公藤甲素肝毒性的作用机制, 寻找抑制雷公藤甲素肝毒性的作用靶点提供线索。

1 材料

1.1 细胞及动物

人源正常肝细胞 HL7702 购自北纳创联生物技术有限公司。SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 16~18 g, 6 周龄, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 动物许可证号 SCXK (京) 2019-0010。小鼠饲养于山西中医药大学 SPF 级动物房, 饲养温度 20~25 °C, 相对湿度 55%~65%, 自由进食饮水, 适应性喂养 7 d。动物实验经山西中医药大学动物伦理委员会批准 (批准号 2021DW207)。

1.2 药品与试剂

雷公藤甲素 (质量分数 >98%, 批号 230903) 购自上海融禾医药科技发展有限公司; 铁死亡抑制剂 Fer-1 (批号 149105) 购自美国 MedChemExpress 公司; RPMI 1640 完全培养基 (批号 2305002)、PBS 稀释液 (批号 20230517JH)、胰酶 (批号 2305002)、普鲁士蓝染色试剂盒 (批号 20220316)、BCA 蛋白

浓度试剂盒(批号 2307001)购自北京索莱宝科技有限公司; CCK-8 试剂盒(批号 MA0218-2-Mar-29H)、飞克特超敏 ECL 发光液(批号 MA0186-Apr-041)购自大连美仑生物技术有限公司; 铁离子含量检测试剂盒(批号 20220321)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号 20231020)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号 20231018)、GSH 检测试剂盒(批号 20231016)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)检测试剂盒(批号 C009-2-1)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)试剂盒(批号 C010-2-1)购自南京建成生物工程研究所; 胎牛血清(批号 J825FC0251)、Trizol 试剂(批号 G921KA7072)、HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号 J804AA0007)购自上海生工生物工程公司; MonScript™ RTIII All-in-One Mix 试剂盒(批号 140713)、MonAmp™ ChemoHS qPCR Mix 试剂盒(批号 00007547-110721)均购自莫纳生物科技有限公司; GPX4 抗体(批号 10026631)、ACSL4 抗体(批号 00108861)、PTGS2 抗体(批号 00104008)均购自武汉三鹰生物技术有限公司; TFR1 抗体(AF8136)、蛋白酶抑制剂(批号 CR2303056)、RIPA 蛋白裂解液(批号 011921210824)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号 090523231228)购自上海碧云天生物技术有限公司; β -actin 抗体(批号 AC220227004)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 仪器

Galaxy 170s 型 CO₂ 培养箱(德国 Eppendorf 公司); Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo 公司); QuickDrop 微量紫外分光光度计(美国 Molecular Devices 公司); Powercyclor 普通 PCR 仪(英国 Analytik Jena 公司); Archimed X4 型实时荧光定量 PCR 仪(北京鲲鹏基因科技有限责任公司); ImageQuant LAS 500 型化学发光成像系统(美国 GE 公司); Allegra X-30R 型台式冷冻离心机(美国 Beckman Coulter 公司); DYCZ-24DN 型电泳槽、DYCZ-40DN 型转印槽、DYY-7C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HL7702 细胞用含 10%胎牛血清、100 μ g/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 RPMI 1640 培养基, 于

37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

2.2 细胞实验分组和处理

取对数生长期的 HL7702 细胞, 以 1.5×10^5 个/孔接种于 96 孔板或以 3×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中, 加入 25、50、100 nmol/L 的雷公藤甲素, 处理细胞 24 h, 或者加入 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 12、24、48 h, 同时设置对照组(加入不含药物的培养基), 采用 CCK-8 法检测细胞存活率, 利用铁离子含量检测试剂盒测定铁离子含量, 普鲁士蓝染色观察铁沉积情况, qRT-PCR 检测 *TFR1*、*PTGS2* 和 *ACSL4* mRNA 表达, Western blotting 检测 TFR1、GPX4、PTGS2 和 ACSL4 蛋白表达, 试剂盒检测 GSH、MDA 含量和 SOD 活性。

取对数生长期的 HL7702 细胞, 以 1.5×10^5 个/孔接种于 96 孔板或以 3×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中, 设置对照组(加入不含药物的培养基)、雷公藤甲素组、Fer-1 组、雷公藤甲素+Fer-1 组, 用 Fer-1 (2 μ mol/L) 预处理细胞 24 h 后, 再用 50 nmol/L 的雷公藤甲素处理细胞 24 h。采用 CCK-8 法检测细胞存活率, 利用铁离子含量检测试剂盒测定铁离子含量, Western blotting 检测 TFR1、GPX4、PTGS2 和 ACSL4 蛋白表达。

2.3 CCK-8 检测细胞存活率

为了观察雷公藤甲素不同浓度和不同处理时间对细胞存活率的影响, 按“2.2”项下方法处理细胞, 按照 CCK-8 试剂盒说明书测定各孔吸光度(A)值, 并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 普鲁士蓝染色观察铁沉积情况

按“2.2”项下方法处理细胞, 经 4%多聚甲醛固定后, 用 Perls 染色液染色 30 min, 充分冲洗, 再用伊红染色液染色 15 s, 封片, 光学显微镜下观察铁沉积。参照文献方法^[13]用 Image J 软件分析普鲁士蓝染色蓝色区域面积占总面积的百分比。

2.5 铁离子、GSH、MDA 含量及 SOD 活性测定

按“2.2”项下方法处理细胞, 按照试剂盒说明书分别测定铁离子、GSH、MDA 含量和 SOD 活性。

2.6 qRT-PCR 检测 *TFR1*、*PTGS2* 和 *ACSL4* mRNA 表达

按“2.2”项下方法处理细胞, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

物种	基因	引物序列 (5'-3')
人	TFR1	F: CACCATCTCGGTCATCAGGATTGC
		R: TAATGCTTCTGCTGGGCTGAAACC
	PTGS2	F: GGTGATGAGCAGTTGTTC
		R: AATTCAGCAGCAATACGATT
	ACSL4	F: CATCCCTGGAGCAGATACTCT
		R: TCACCTAGGATTTCCCTGGTCC
GAPDH	F: GACATGCCGCCTGGAGAAAC	
	R: AGCCCAGGATGCCCTTTAGT	
小鼠	TFR1	F: CGCCATCTCAGTCATCAG
		R: GGGCTCCTACTACAACAT
	PTGS2	F: CAGTATCAGAACC GCATTG
		R: CAGGAGGATGGAGTTGTT
	ACSL4	F: CTCACCATTATATTGCTGCCTGT
		R: TCTCTTTGCCATAGCGTTTTTCT
GAPDH	F: CAGGAGAGTTTCTCGTCC	
	R: CCCAATACGGCCAAATCCGT	

2.7 Western blotting 检测 TFR1、GPX4、PTGS2 和 ACSL4 蛋白表达。

按“2.2”项下方法处理细胞，经 PBS 漂洗后，加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液，冰上裂解 15 min 后，23 号针头反复吹打破碎细胞，4 °C、12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，BCA 法测定蛋白浓度。将上清液与 SDS 上样缓冲液混匀，95 °C 加热 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入含 5% 脱脂奶粉的 TBST，室温封闭 1 h，按照 1 : 1 000 的稀释比例分别加入 TFR1、GPX4、PTGS2、ACSL4 及 β -actin 一抗，4 °C 孵育过夜后，加入二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 1 h。采用 ECL 化学发光试剂盒在化学发光成像系统下进行曝光，以 β -actin 为内参，Image J 软件定量目的条带。

2.8 动物实验分组、给药及指标检测

C57BL/6J 小鼠随机分为对照组和雷公藤甲素 (0.8 mg/kg) [2,14] 组，每组 10 只，雷公藤甲素组 ip 雷公藤甲素，对照组 ip 等体积的生理盐水，每隔 2 天注射 1 次，连续注射 3 次，末次给药 24 h 后，眼眶取血，分离血清，按照试剂盒说明书检测血清中 ALT、AST、SOD 活性和铁离子、GSH、MDA 含量。取相同部位的肝脏，于 4% 多聚甲醛中固定，石蜡包埋，切片经脱蜡、苏木素-伊红 (HE) 染色，光学显微镜下观察肝组织形态变化。qRT-PCR 检测肝组织 TFR1、PTGS2 和 ACSL4 mRNA 表达，Western blotting 检测肝组织 TFR1、GPX4、PTGS2 和 ACSL4 蛋白表达。

2.9 统计学分析

数据通过 GraphPad Prism 8.0 软件分析并作图，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用 *t* 检验，多组间比较采用单因素方差分析。

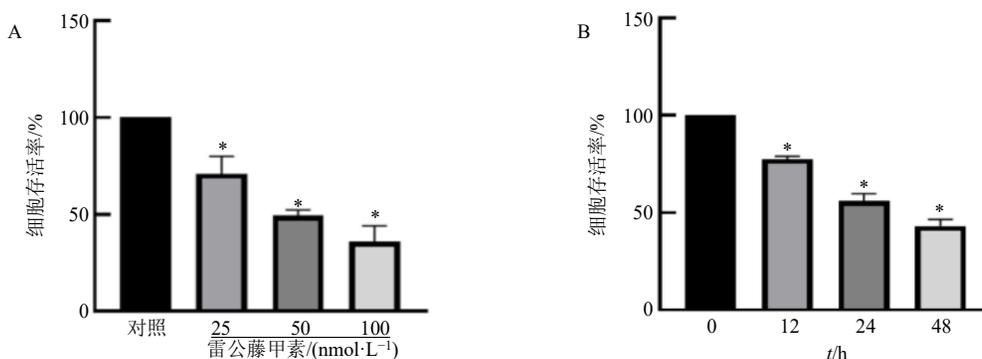
3 结果

3.1 雷公藤甲素抑制 HL7702 细胞存活率

HL7702 细胞经 25、50、100 nmol/L 的雷公藤甲素处理 24 h 后，随着给药浓度升高，细胞存活率逐渐下降 ($P < 0.05$ ，图 1-A)。HL7702 细胞经 50 nmol/L 雷公藤甲素处理 12、24、48 h 后，细胞存活率随着给药时间延长逐渐降低 ($P < 0.05$ ，图 1-B)。

3.2 雷公藤甲素引起 HL7702 细胞铁超载

铁代谢紊乱是铁死亡发生的必要条件 [15]。TFR1 作为铁代谢过程中关键的细胞表面受体，通过内吞作用负责铁离子的摄取 [16]。HL7702 细胞经不同浓度雷公藤甲素处理 24 h 后，随着给药浓度升高，细胞内铁离子含量逐渐增加 ($P < 0.05$ ，图 2-A)，并且



与对照组或 0 h 比较: * $P < 0.05$ ，图 2~4、6 同。

* $P < 0.05$ vs control group or 0 h group, same as below Figs. 2—4, 6.

图 1 不同浓度 (A) 和不同处理时间 (B) 的雷公藤甲素对 HL7702 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of triptolide treatment with different concentrations (A) and incubation times (B) on HL7702 cell viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

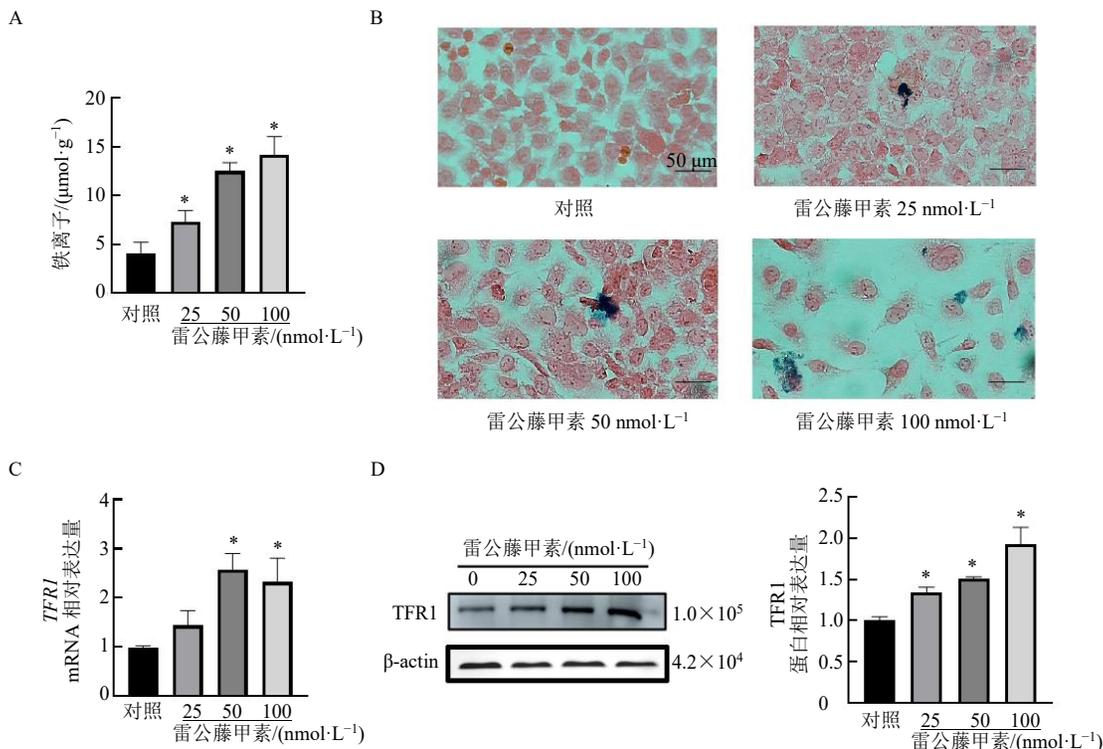


图2 雷公藤甲素对 HL7702 细胞中铁离子含量 (A)、铁沉积 (B, ×200) 和 TFR1 表达 (C、D) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 2 Effect of triptolide on iron content (A), iron deposition (B, ×200) and TFR1 expression (C, D) in HL7702 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

对照组未观察到明显的铁沉积，而雷公藤甲素可使铁沉积面积明显增加（图 2-B）。此外，qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示，随着雷公藤甲素给药浓度升高，TFR1 mRNA 和蛋白表达量较对照组显著增加 ($P < 0.05$, 图 2-C、D)。

3.3 雷公藤甲素引起 HL7702 细胞中脂质过氧化损伤

脂质过氧化损伤作为铁死亡的主要特征之一，是铁死亡检测的重要指标。GSH 和 SOD 是体内关键的抗氧化剂，MDA 作为脂质过氧化的副产物，可以间接反映过氧化损伤程度^[8]。HL7702 细胞经不同浓度雷公藤甲素处理 24 h 后，雷公藤甲素可显著降

低 GSH 的含量，抑制 SOD 活性，提高 MDA 含量，且呈现浓度相关性 ($P < 0.05$, 图 3)。

3.4 雷公藤甲素对 HL7702 细胞中铁死亡相关蛋白表达的影响

GPX4 是构成应对脂质过氧化防御系统的关键抗氧化酶^[8]；PTGS2 和 ACSL4 被认为是铁死亡的生物标志物。PTGS2 负责将花生四烯酸代谢为前列腺素，细胞发生铁死亡时 PTGS2 表达明显上调^[17]。ACSL4 是铁死亡的关键调控因子，可激活花生四烯酸和肾上腺素等多不饱和脂肪酸生成酰基辅酶 A，后者进入质膜磷脂中促使细胞发生铁死亡^[18]。HL7702 细胞经不同浓度雷公藤甲素处理 24 h 后，

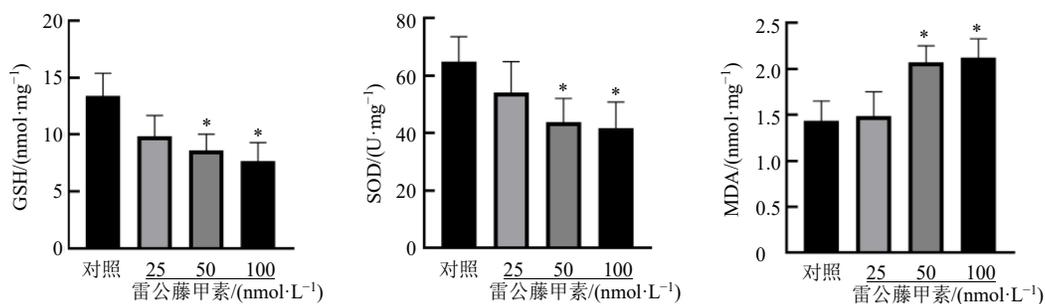


图3 雷公藤甲素对 HL7702 细胞 GSH、MDA 含量和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 3 Effect of triptolide on contents of GSH, MDA and SOD activity in HL7702 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

雷公藤甲素可显著抑制 GPX4 的表达 ($P < 0.05$, 图 4-A), 促进 PTGS2 和 ACSL4 表达 ($P < 0.05$, 图 4-B、C)。

3.5 Fer-1 逆转雷公藤甲素引起的 HL7702 细胞铁死亡

为了观察 Fer-1 对雷公藤甲素肝细胞毒性的影

响, 采用雷公藤甲素与 Fer-1 共同处理 HL7702 细胞。结果显示, 与雷公藤甲素组比较, Fer-1 与雷公藤甲素联合处理组细胞存活率和 GPX4 表达量显著升高 ($P < 0.05$, 图 5-A、C), 铁离子含量、TFR1、PTGS2 及 ACSL4 蛋白表达量显著降低 ($P < 0.05$, 图 5-B、C)。

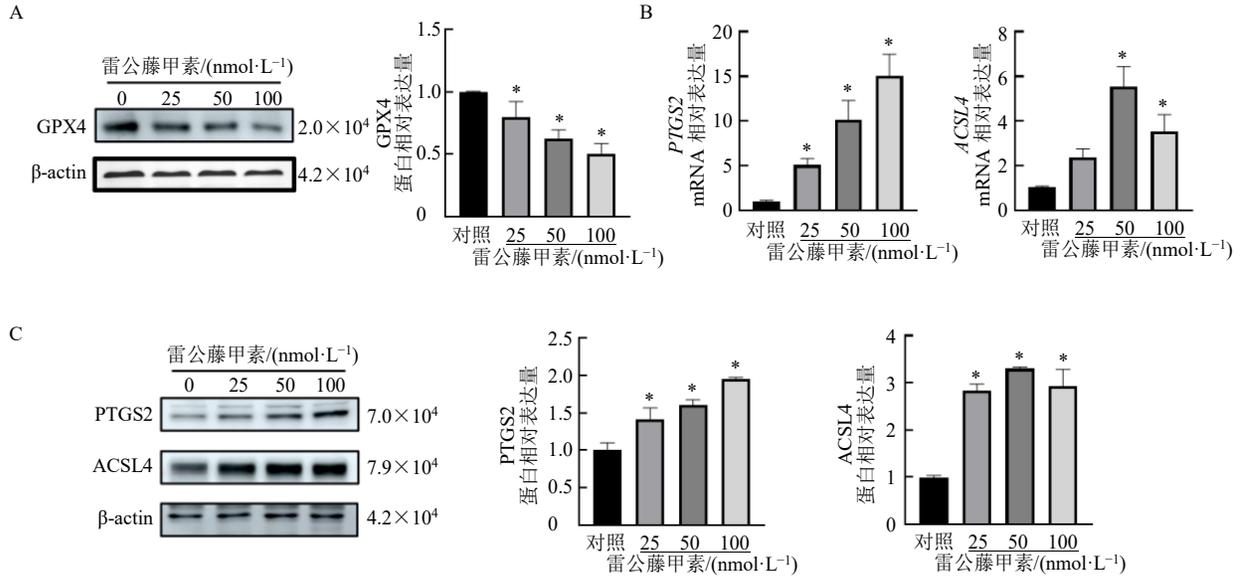
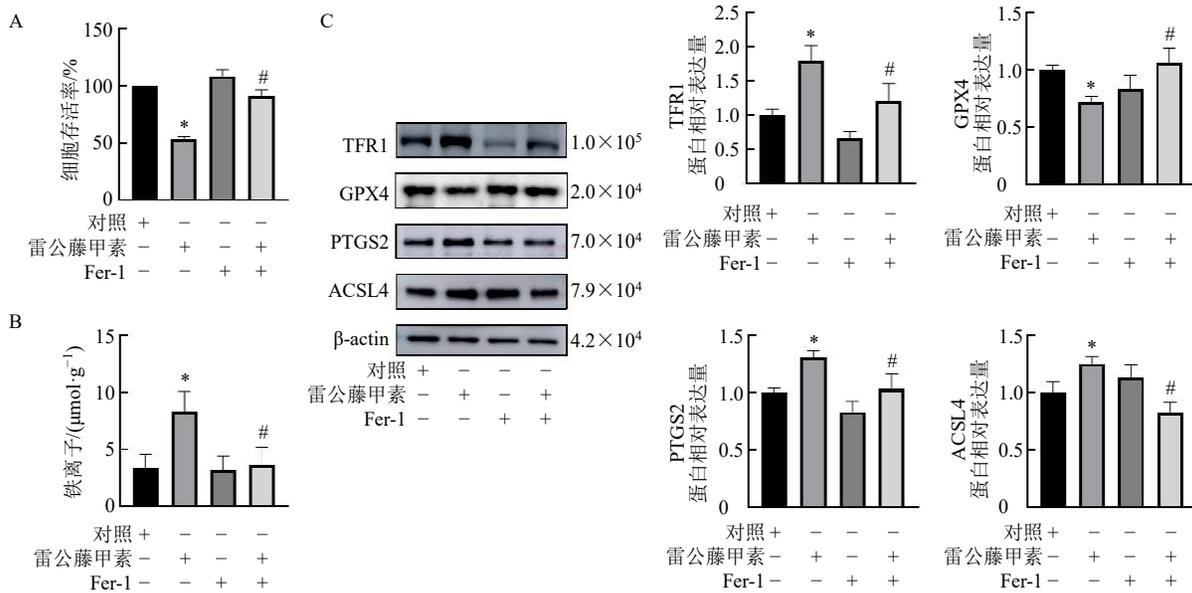


图 4 雷公藤甲素对 HL7702 细胞中 GPX4 (A)、PTGS2 和 ACSL4 (B、C) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of triptolide on expressions of GPX4 (A), PTGS2 and ACSL4 (B, C) in HL7702 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与雷公藤甲素组比较: # $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs triptolide group.

图 5 Fer-1 与雷公藤甲素共处理对 HL7702 细胞存活率 (A)、铁离子含量 (B) 和铁死亡相关蛋白表达 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of Fer-1 and triptolide cotreatment on cell viability (A), iron content (B) and ferroptosis-related protein expressions (C) in HL7702 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 雷公藤甲素引起小鼠肝组织铁死亡

课题组前期研究与本研究结果均表明, 小鼠 ip 雷公藤甲素后, 肝组织结构受损明显, 细胞肿胀、坏死, 局部可见炎症浸润, 血清 ALT、AST 活性明显升高^[2,14] ($P < 0.05$, 图 6-A、B)。体内观察雷公

藤甲素对肝细胞铁死亡的影响, 结果显示, 与对照组比较, 雷公藤甲素组 GSH 含量、SOD 活性和 GPX4 表达量显著降低 ($P < 0.05$, 图 6-C、F), 铁离子、MDA 含量及 TFR1、PTGS2、ACSL4 表达量显著升高 ($P < 0.05$, 图 6-C~F)。

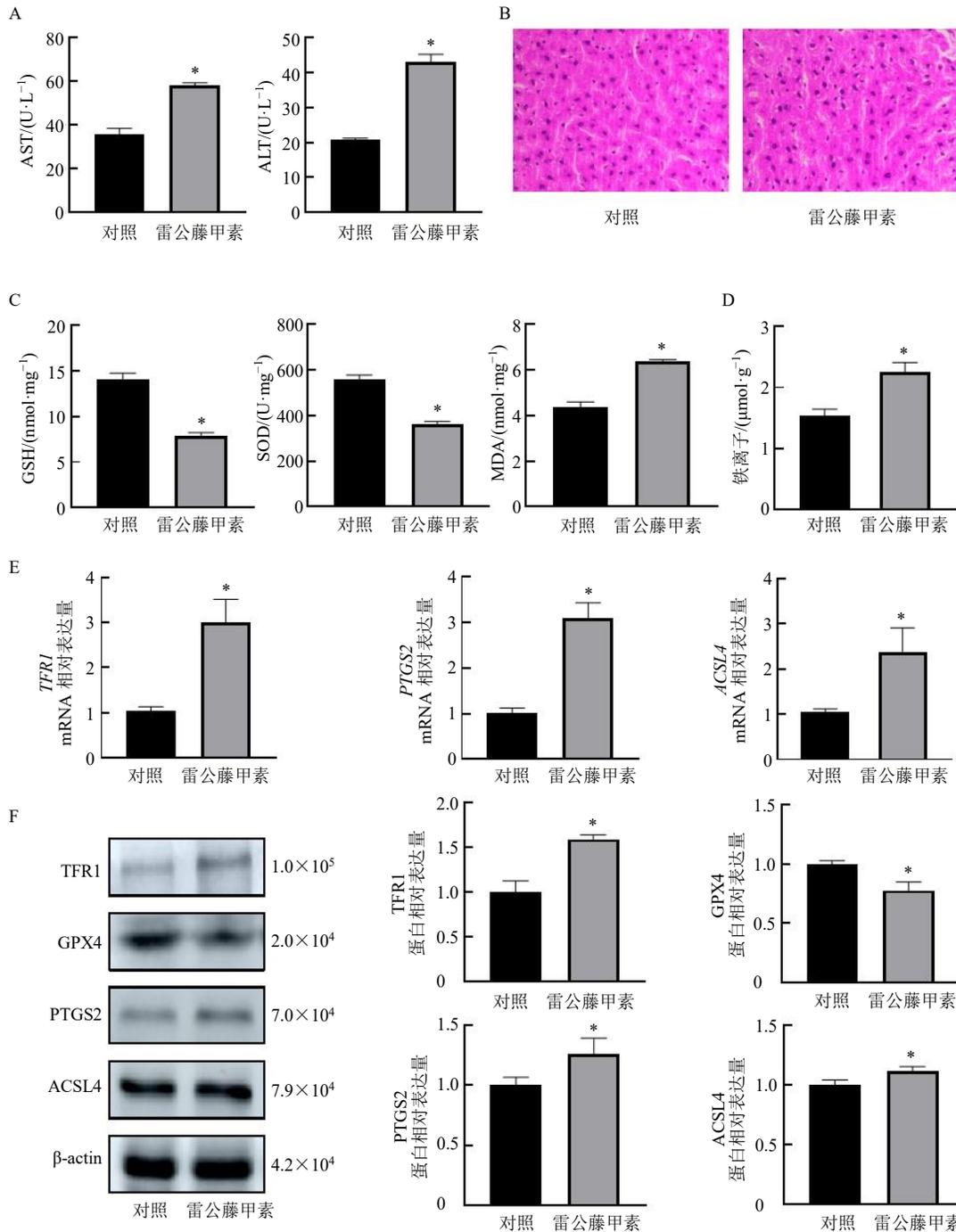


图 6 雷公藤甲素对小鼠肝功能 (A)、肝组织病理形态 (B, ×200)、氧化损伤指标 (C)、铁离子含量 (D) 及铁死亡相关蛋白表达 (E、F) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of triptolide on liver function (A), pathological morphology of liver tissue (B, ×200), oxidative damage index (C), iron content (D) and ferroptosis-related protein expressions (E, F) in mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本研究中,雷公藤甲素在降低肝细胞活性的同时,能够明显提高正常肝细胞和小鼠肝组织中的铁离子含量,引起铁代谢紊乱,导致铁超载,这可能与雷公藤甲素能够增加 TFR1 表达有关。TFR1 的过量表达可促进铁离子向细胞内转运,大量的铁离子则通过芬顿反应产生羟基和氢过氧自由基等大量活性氧,驱动破坏性的过氧化链式反应^[6]。本研究还观察到雷公藤甲素可明显降低肝细胞中 GSH 含量,抑制 SOD 活性,下调 GPX4 表达量,提高脂质过氧化产物 MDA 含量,促进肝细胞铁死亡,导致铁死亡标记物 ACSL4、PTGS2 的表达明显升高。GPX4 是一种清除脂质过氧化物的关键酶,在 GSH 存在的条件下,将其转化为氧化型谷胱甘肽并将有毒的脂质过氧化物还原为无毒的脂质醇以防止铁死亡的发生^[19]。GPX4 失活或表达量下调可诱导铁死亡,常作为铁死亡的参考标记物^[20]。Fer-1 作为人工合成的自由基捕获剂,可有效清除自由基,抑制脂质过氧化,阻断铁死亡^[21]。体外条件下, Fer-1 处理可以逆转雷公藤甲素引起的铁超载,减轻脂质过氧化,明显缓解雷公藤甲素引起的肝细胞铁死亡和细胞毒性。因此,雷公藤甲素可能通过 GSH/GPX4 轴干预铁代谢和脂质过氧化,引起肝细胞铁死亡,导致细胞活性降低。Fer-1 则通过下调 TFR1 和上调 GPX4 表达抑制铁死亡。然而,本研究仅在体外条件下观察了 Fer-1 对雷公藤甲素肝细胞毒性的改善作用,今后将尝试利用多种动物模型和包括 Fer-1 在内的不同类型铁死亡调节剂,如 RSL3、索拉非尼、Liproxstatin-1、去铁胺等^[22],进一步验证铁死亡对雷公藤甲素肝毒性的调控效应和作用途径。

铁死亡存在高度复杂和精细的调控网络,多种信号通路直接或间接影响铁代谢或脂质过氧化影响铁死亡过程,参与雷公藤甲素药理作用^[6]。溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 作为多通道跨膜蛋白负责将细胞外的胱氨酸和细胞内的谷氨酸等比例输入或输出,输入的胱氨酸随即被还原成半胱氨酸,用于 GSH 的合成。雷公藤甲素一方面可通过干预心肌细胞铁离子代谢,导致细胞内铁超载,并抑制抗氧化系统,导致细胞内活性氧累积;另一方面,雷公藤甲素直接结合 SLC7A11,导致 GSH 耗竭,从而抑制 SLC7A11/GPX4 信号轴,最终引起脂质过氧化物 MDA 水平升高,触发心肌细胞铁死亡^[23]。雷公藤甲素可抑制体内抗氧

化反应的主要调节因子核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 的表达,上调活性氧和脂质过氧化水平,降低 GPX4 表达,从而促进白血病细胞铁死亡,克服对阿霉素的耐药性^[24]。另外,雷公藤甲素还可同时抑制 Nrf2 和 SLC7A11 表达,引起活性氧聚集和铁离子超载,与铁死亡促进剂 Erastin 共用协同促进头颈部肿瘤细胞铁死亡^[25]。纳米材料包裹的雷公藤甲素可通过抑制 Nrf2 表达,导致活性氧累积和 GSH 耗竭,促进脂质过氧化,引起黑色素瘤细胞、乳腺癌细胞铁死亡^[26-27]。后续工作将探讨上述分子机制或信号通路是否在雷公藤甲素引起肝细胞铁死亡过程中发挥作用。

全基因组芯片分析结果显示,雷公藤甲素可明显改变氧化应激途径中多种关键基因表达,表明氧化应激与雷公藤甲素药理作用密切相关^[28]。除了肝毒性和心脏毒性外^[23],氧化应激也是雷公藤甲素导致其他多种器官毒性的关键机制。雷公藤甲素能够降低大鼠肾脏中抗氧化酶活性,引起体内活性氧累积和脂质过氧化物 MDA 含量异常升高,诱发肾脏氧化应激损伤^[29]。雷公藤甲素可引起卵母细胞线粒体功能障碍,导致活性氧过度累积,降低抗氧化酶活性,影响卵母细胞发育^[30]。雷公藤甲素还可通过破坏雄性生殖系统氧化还原平衡,引起氧化应激,导致睾丸组织损伤^[31]。另外,雷公藤甲素能够通过明显降低食管癌细胞 Nrf2 的表达,抑制其进入细胞核与抗氧化反应元件的结合,改变细胞氧化应激水平,促进细胞凋亡^[32]。雷公藤甲素可升高鼻咽癌细胞中活性氧水平,诱导氧化应激,从而抑制蛋白激酶 B 的表达与活化,抑制细胞生长^[33]。由于氧化应激引起的脂质过氧化是引起铁死亡的关键机制,未来有必要观察在上述病理生理条件下氧化应激能否引起铁死亡,以及铁死亡是否在上述药理作用中发挥相似作用。

综上,本研究观察了雷公藤甲素对正常肝细胞和小鼠肝组织中铁死亡途径相关指标的影响,结果验证了雷公藤甲素可能通过 GSH/GPX4 轴引起铁代谢异常和脂质过氧化,诱导肝细胞铁死亡,抑制铁死亡则可在体外条件下有效缓解肝细胞毒性,为揭示雷公藤甲素肝毒性的作用机制及铁死亡作为抑制雷公藤甲素肝毒性的潜在靶点提供了依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang Y Q, Mao X, Li W J, et al. *Tripterygium wilfordii*:

- An inspiring resource for rheumatoid arthritis treatment [J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(3): 1337-1374.
- [2] 张彩霞, 王伟艳, 李会芳, 等. MiR-20a 通过 ATG16L1 影响细胞自噬并参与调节雷公藤甲素肝毒性 [J]. *中草药*, 2023, 54(13): 4214-4223.
- [3] 周国梁, 宿树兰, 华永庆, 等. 雷公藤肝毒性机制及配伍减毒研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(24): 8263-8272.
- [4] Han C Y, Pei H Y, Sheng Y J, *et al.* Toxicological mechanism of triptolide-induced liver injury: Caspase-3-GSDME-mediated pyroptosis of Kupffer cell [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 258: 114963.
- [5] 林嘉伟, 杨依靠, 夏冰, 等. 基于雷公藤和雷公藤多苷片提取物肝毒性检测的微流控器官芯片技术研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(24): 8105-8116.
- [6] Hu Y Q, Wu Q G, Wang Y L, *et al.* The molecular pathogenesis of triptolide-induced hepatotoxicity [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 979307.
- [7] 陈晨, 程卓安, 王存, 等. 铁死亡调控在肝脏疾病治疗中的研究进展 [J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2023, 43(3): 365-373.
- [8] Jiang X J, Stockwell B R, Conrad M. Ferroptosis: Mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [9] Lőrincz T, Jemnitz K, Kardon T, *et al.* Ferroptosis is involved in acetaminophen induced cell death [J]. *Pathol Oncol Res*, 2015, 21(4): 1115-1121.
- [10] 蒋慰赢, 秦明强, 张程, 等. Ferrostatin-1 保护对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(10): 1584-1589.
- [11] Liang Y H, Chen S X, Han S Q, *et al.* Toosendanin induced hepatotoxicity via triggering PERK-eIF2 α -ATF4 mediated ferroptosis [J]. *Toxicol Lett*, 2023, 377: 51-61.
- [12] 刘春彤. 铁死亡在雷公藤甲素所致肝损伤中的作用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2021.
- [13] 韩志强, 巴图德力根, 薛兰, 等. 蒙药德都红花-7 味散对大鼠慢性肝损伤保护机制 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(21): 2596-2599.
- [14] 张彩霞, 杜晨晖, 周琨, 等. 抑制细胞自噬加剧雷公藤甲素所致小鼠肝毒性的研究 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(8): 1122-1126.
- [15] 王福梯. 铁科学 (Ferrolgy): 充满魅力的新型交叉学科 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2023, 53(10): 1331-1344.
- [16] Cheng Y F, Zak O, Aisen P, *et al.* Structure of the human transferrin receptor-transferrin complex [J]. *Cell*, 2004, 116(4): 565-576.
- [17] Zhu L, Yang F G, Wang L W, *et al.* Identification the ferroptosis-related gene signature in patients with esophageal adenocarcinoma [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 124.
- [18] Shui S F, Zhao Z L, Wang H, *et al.* Non-enzymatic lipid peroxidation initiated by photodynamic therapy drives a distinct ferroptosis-like cell death pathway [J]. *Redox Biol*, 2021, 45: 102056.
- [19] 管文斌, 刘新光, 赵炜. 铁死亡与衰老 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2024, 40(1): 28-37.
- [20] Zhao T M, Yu Z H, Zhou L, *et al.* Regulating Nrf2-GPx4 axis by bicyclol can prevent ferroptosis in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 380.
- [21] Scarpellini C, Klejborowska G, Lanthier C, *et al.* Beyond ferrostatin-1: A comprehensive review of ferroptosis inhibitors [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44(12): 902-916.
- [22] 张海林, 陈勇, 巴永峰, 等. 铁死亡调节剂及其在脑卒中中的作用研究进展 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2021, 26(11): 1320-1327.
- [23] Liu X, Chen C, Han D, *et al.* SLC7A11/GPX4 inactivation-mediated ferroptosis contributes to the pathogenesis of triptolide-induced cardiotoxicity [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3192607.
- [24] Wu X, Chen S Q, Huang K C, *et al.* Triptolide promotes ferroptosis by suppressing Nrf2 to overcome leukemia cell resistance to doxorubicin [J]. *Mol Med Rep*, 2023, 27(1): 17.
- [25] Cai J, Yi M, Tan Y X, *et al.* Natural product triptolide induces GSDME-mediated pyroptosis in head and neck cancer through suppressing mitochondrial hexokinase-II [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 190.
- [26] Fang K, Sun Y T, Yang J X, *et al.* A dual stimuli-responsive nanoplatform loaded Pt^{IV}-triptolide prodrug for achieving synergistic therapy toward breast cancer [J]. *Adv Healthc Mater*, 2023, 12(28): e2301328.
- [27] Wang S M, Guo Q Y, Xu R B, *et al.* Combination of ferroptosis and pyroptosis dual induction by triptolide nano-MOFs for immunotherapy of Melanoma [J]. *J Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 383.
- [28] Wang J Y, Jiang Z Z, Ji J Z, *et al.* Gene expression profiling and pathway analysis of hepatotoxicity induced by triptolide in Wistar rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 58: 495-505.
- [29] Yang F, Ren L, Zhuo L, *et al.* Involvement of oxidative stress in the mechanism of triptolide-induced acute nephrotoxicity in rats [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(7/8): 905-911.
- [30] Hao Q Q, Xu Z R, Nie H, *et al.* Triptolide exposure induces oxidative stress and decreases oocyte quality in mouse [J]. *Toxicol*, 2023, 221: 106964.
- [31] Wang K, Hu H N, Cui W B, *et al.* Palliative effects of metformin on testicular damage induced by triptolide in male rats [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 222: 112536.
- [32] 徐俊伟, 秦宁, 白宇, 等. 雷公藤甲素对食管癌细胞凋亡及氧化应激的影响 [J]. *中药材*, 2019, 42(1): 208-211.
- [33] 王秀, 张竞竞, 张配, 等. 雷公藤甲素诱导鼻咽癌细胞凋亡作用 [J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(8): 1147-1150.