

• 药理与临床 •

基于 HIF-1 α /SLC7A11 轴介导肝星状细胞铁死亡探讨香芹酚抗肝纤维化的作用机制

方 玲¹, 袁思雨¹, 彭 灿², 彭进城², 魏 灿^{3*}, 程光敏^{4*}

1. 安徽医科大学第一附属医院 药剂科, 国家中药化学三级实验室, 安徽 合肥 230022

2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012

3. 合肥市第二人民医院 泌尿外科, 安徽 合肥 230011

4. 安徽医科大学第一附属医院 肾脏内科, 安徽 合肥 230022

摘 要: **目的** 探究香芹酚对肝星状细胞 (hepatic stellate cell, HSC) 铁死亡的影响及其抗肝纤维化的作用机制。**方法** 体内实验以四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化模型为研究对象, 设置对照组、模型组和香芹酚低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 组。采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和 Masson 染色观察各组小鼠肝组织病理变化; 采用试剂盒检测小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性和羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 水平; 采用 Western blotting 检测小鼠肝组织谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type 1 $\alpha 1$, Col1 $\alpha 1$) 蛋白表达。体外实验以 HSC-T6 细胞为研究对象, 用不同浓度 (100、200、300、400、500、600 μ mol/L) 的香芹酚或铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1) 或缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 稳定剂 DMOG (1 mmol/L) 进行干预, CCK-8 检测细胞活力; 试剂盒检测 HSC-T6 细胞中 Fe²⁺、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量; Western blotting 检测 HSC-T6 细胞中 GPX4、 α -SMA、Col1 $\alpha 1$ 、HIF-1 α 、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 香芹酚组小鼠血清中 ALT、AST 活性和 HYP 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 肝脏肿胀、炎性细胞浸润和胶原沉积减少, 肝组织 α -SMA、COL1 $\alpha 1$ 和 GPX4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。香芹酚可降低 HSC-T6 细胞中 GSH 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并提高 Fe²⁺、MDA、ROS 的含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 其对 HSC-T6 细胞活力的抑制作用可被 Fer-1 逆转 ($P < 0.05$ 、 0.01); 香芹酚对 HSC-T6 细胞中 HIF-1 α 总蛋白水平无显著影响, 但可降低细胞核中的 HIF-1 α 水平以及细胞 SLC7A11 总蛋白水平 ($P < 0.01$); HIF-1 α 稳定剂 DMOG 可阻断香芹酚对 HSC-T6 细胞铁死亡的诱导作用 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 香芹酚能够通过 HIF-1 α /SLC7A11 轴诱导 HSC 铁死亡, 进而发挥抗肝纤维化的作用。

关键词: 肝纤维化; 肝星状细胞; 香芹酚; 铁死亡; 低氧诱导因子-1 α ; 溶质载体家族 7 成员 11

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)16-5494-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.012

Mechanism of carvacrol against liver fibrosis based on HIF-1 α /SLC7A11 axis mediated ferroptosis in hepatic stellate cell

FANG Ling¹, YUAN Siyu¹, PENG Can², PENG Jincheng², WEI Can³, CHENG Guangmin⁴

1. The Grade 3 Pharmaceutical Chemistry Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China

收稿日期: 2024-03-28

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82004010); 安徽省教育厅重点项目 (2022AH051163); 安徽省重点研发计划项目 (2022e07020061)

作者简介: 方 玲, 博士, 副主任药师, 从事中药抗肝纤维化相关研究。E-mail: fangling@ahmu.edu.cn

***通信作者:** 程光敏, 副主任护士, 主要从事肝肾衰老纤维化研究。E-mail: cgm88476@126.com

魏 灿, 男, 副主任医师, 主要从事器官纤维化和癌变研究。E-mail: weican@ahmu.edu.cn

3. Department of Urology, The Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230011, China

4. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China

Abstract: Objective To explore the effect of carvacrol on ferroptosis in hepatic stellate cell (HSC) and its mechanism against liver fibrosis. **Methods** *In vivo* experiment was conducted on a mouse liver fibrosis model induced by carbon tetrachloride. The control group, model group, and carvacrol low-, medium-, high-dose (25, 50, 100 mg/kg) groups were set up, hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining were used to observe the pathological changes of liver tissue in each group of mice; Kits were used to detect the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and hydroxyproline (HYP) level in serum of mice; Western blotting was used to detect the protein expressions of glutathione peroxidase 4 (GPX4), α -smooth muscle actin (α -SMA) and collagen type 1 α 1 (Col1 α 1) in liver tissue of mice. *In vitro* experiments were conducted on HSC-T6 cells, and different concentrations (100, 200, 300, 400, 500, 600 μ mol/L) of carvacrol or ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 (Fer-1) or hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) stabilizer DMOG (1 mmol/L) were used for intervention. Cell viability was detected by CCK-8; The reagent kits were used to detect the levels of Fe²⁺, glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) in HSC-T6 cells; Western blotting was used to detect the protein expressions of GPX4, α -SMA, Col1 α 1, HIF-1 α and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) in HSC-T6 cells. **Results** Compared with model group, the activities of ALT, AST and level of HYP in serum of mice in carvacrol group were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), while liver swelling, inflammatory cell infiltration and collagen deposition were reduced; The protein expression levels of α -SMA, COL1 α 1 and GPX4 in liver tissue were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$). Carvacrol could reduce GSH level in HSC-T6 cells ($P < 0.05, 0.01$) and increase the contents of Fe²⁺, MDA and ROS ($P < 0.05, 0.01$); Its inhibitory effect on HSC-T6 cell viability could be reversed by Fer-1 ($P < 0.05, 0.01$); Carvacrol had no significant effect on the total protein level of HIF-1 α in HSC-T6 cells, but could reduce the HIF-1 α level in nucleus and the total protein level of SLC7A11 in HSC-T6 cells ($P < 0.01$); The HIF-1 α stabilizer DMOG could block the induction effect of carvacrol on ferroptosis in HSC-T6 cells ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Carvacrol can induce ferroptosis in HSC through HIF-1 α /SLC7A11 axis, thereby exerting an anti-liver fibrosis effect.

Key words: hepatic fibrosis; hepatic stellate cell; carvacrol; ferroptosis; hypoxia inducible factor-1 α ; solute carrier family 7 member 11

我国是肝病流行最严重的国家之一,流行病学调查显示全球每年有 200 余万患者死于慢性肝病,其中有 1/3 在中国^[1-2]。各种病因长期刺激肝脏,星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)被病理性激活,分泌大量肝细胞外基质(extracellular matrix, ECM)并过度沉积,最终导致肝纤维化。肝纤维化是慢性肝损伤的基础病理改变,也是逆转慢性肝病进展的关键点,而 HSC 活化是肝纤维化的核心环节。因此,寻找抑制 HSC 活化的新型药物是治疗慢性肝病的关键。

香芹酚是一种单萜酚,普遍存在各种天然植物中,如麝香草、牛至、藏茴香等。香芹酚具有抗炎、抗氧化、抗菌、调血脂等生物活性,对缺血再灌注性肝损伤^[3]、酒精性肝损伤^[4]、非酒精性脂肪肝^[5]、糖尿病性肝损伤^[6]、化学性肝损伤^[7-8]等肝脏疾病也具有明确的治疗作用。课题组前期研究发现,香芹酚能减少炎症细胞浸润和 ECM 沉积,抑制肝纤维化^[9],但其内在机制尚不明确,有待于进一步研究。

铁死亡是一种铁依赖性的、区别于凋亡和自噬的新型细胞死亡方式,其参与中药抗纤维化的机制尚不明确。研究显示,诱导 HSC 铁死亡可减少 ECM 沉积,缓解肝纤维化^[10-11]。降低细胞内溶质载体家

族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)蛋白的水平,可导致细胞内谷胱甘肽(glutathione, GSH)和谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)耗竭,进而诱导 HSC 铁死亡,减轻肝纤维化^[12-13]。SLC7A11 是维持细胞氧化还原稳态的重要分子, HSC 内有多种机制对 SLC7A11 的表达进行严格地调控,包括转录因子如 p53 和缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)等^[13-14],其中 HIF-1 α 作为细胞核转录因子可正向调控 SLC7A11 的转录^[13]。本研究拟通过检测 HSC 细胞及肝纤维化小鼠模型中铁死亡指标、关键分子蛋白水平,探索香芹酚通过诱发 HSC 铁死亡进而抑制肝纤维化的具体分子机制。

1 材料

1.1 动物和细胞株

清洁级雄性 C57BL/6 小鼠 40 只, 6~8 周龄, 体质量 18~22 g, 购自安徽中医药大学实验动物中心, 实验动物许可证号 SCXK2019-0002。动物饲养于安徽医科大学实验动物中心, 温度 20~26 $^{\circ}$ C, 相对湿度 40%~70%, 光照 12 h/d, 动物适应性喂养 1 周, 采用标准的啮齿类动物饲料和水, 自由摄

取。动物实验经安徽医科大学动物实验伦理委员会批准(批准号 LLSC20200629)。

大鼠肝星状细胞系(HSC-T6)购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

香芹酚(质量分数 $\geq 98\%$, 批号 C10778700)、四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)溶液(批号 C10957961)购自麦克林公司; α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(批号 AF1032)、GPX4 抗体(批号 381958)、HIF-1 α 抗体(批号 340462)购自上海玉博生物科技有限公司;I 型胶原 $\alpha 1$ (collagen type 1 $\alpha 1$, Coll $\alpha 1$)抗体(批号 ab34710)、SLC7A11 抗体(批号 ab175186)购自英国 Abcam 公司;组蛋白 H3(histone H3)抗体(批号 A2631273)购自爱博泰克公司; β -actin 抗体(批号 66009-1-1g)购自武汉三鹰生物技术公司;HIF-1 α 稳定剂二甲草酰甘氨酸(dimethyloxallyl glycine, DMOG, 批号 S7483)、铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1, 批号 S7243)购自美国 Selleck 公司;山羊抗兔二抗(批号 222070418)、山羊抗小鼠二抗(批号 214801208)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;RIPA 裂解液(批号 P0013C)、BCA 蛋白检测试剂盒(批号 P0012)、细胞核提取试剂盒(批号 P0027)购自上海碧云天生物技术公司;胎牛血清(批号 19070510)购自杭州四季青公司;DMEM 高糖培养基(批号 AH29714108)购自美国 Hyclone 公司;CCK-8 试剂(批号 96992)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 批号 34943)购自美国 Sigma 公司;PVDF 膜(批号 188490)、超高敏的化学发光底物(批号 WBKLS0050)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号 D6883)购自美国 Millipore 公司;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)检测试剂盒(批号 G010-2-1)、羟脯氨酸(hydroxyproline, HYP)检测试剂盒(批号 A030-2-1)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒(批号 A006-2-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(批号 A003-4-1)、 Fe^{2+} 检测试剂盒(批号 A039-2-1)购自南京建成生物工程研究所。

1.3 仪器

Forma311 型细胞恒温培养箱(美国 Thermo 公司);SWCJ-1F 型细胞培养超净工作台(苏州安泰

空气技术有限公司);PowerPac300 型电泳仪和转膜仪(北京六一生物科技有限公司);5200Multi 型化学发光成像系统(上海天能公司);X-22 型超速离心机(美国 Beckman 公司);MK3 型酶标仪(荷兰雷勃公司)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 分组、小鼠肝纤维化模型的建立与给药 小鼠按随机数字表法分为对照组、模型组和香芹酚低、中、高剂量(25、50、100 mg/kg)组,每组 8 只。模型组和各给药组 ip 含 10% CCl_4 的橄榄油,对照组 ip 等体积的橄榄油,每周 2 次,连续 8 周。第 5 周起,各给药组小鼠每天 ip 相应浓度的香芹酚混悬液,对照组和模型组 ip 等体积的橄榄油。第 8 周末次给药后,小鼠禁食不禁水 24 h,处死小鼠,取血清和肝脏, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.1.2 血清中 ALT、AST 活性和 HYP 水平的检测 按照试剂盒说明书测定小鼠血清中 ALT、AST 活性和 HYP 水平。

2.1.3 肝组织病理观察

(1) 苏木素-伊红(HE)染色:将小鼠肝组织固定、包埋、切片,脱蜡水洗 2 min 后苏木素染色 5~10 min,流水冲洗,置伊红液中 1~3 min,流水冲洗。常规脱水,透明,封固,于显微镜下观察并采集图像。

(2) Masson 染色:将小鼠肝组织固定、包埋、切片,铁苏木素液染色 5~10 min,流水冲洗,置磷钼酸溶液中 5 min,苯胺蓝染液中 5 min,流水冲洗。常规脱水,透明,封固,于显微镜下观察并采集图像。

2.1.4 Western blotting 检测肝组织 GPX4、 α -SMA 和 Coll $\alpha 1$ 蛋白表达 取小鼠肝组织,用含 PMSF 和蛋白酶抑制剂的裂解液提取肝组织总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,制备蛋白样品。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转至 PVDF 膜,封闭、洗膜后,分别加入一抗 β -actin(1:1 000)、 α -SMA(1:500)、Coll $\alpha 1$ (1:500), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗涤后加入二抗(1:10 000),室温孵育 1 h。采用 ECL 法显影,采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 HSC-T6 细胞用含 10%胎牛血清和 1%双抗的 DMEM 培养液,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度的培养箱中培养。待细胞稳定生长,融合

度达到 70%~80%时,用 0.25%胰酶消化、传代或按密度接种于培养瓶、培养板。

2.2.2 CCK-8 测定细胞活力 HSC-T6 细胞以 5×10^3 个/孔接种至 96 孔板。待细胞完全贴壁后,使用基础培养基饥饿细胞 12 h。分别加入 100、200、300、400、500、600 $\mu\text{mol/L}$ 的香芹酚处理 24 h,另设置不含药物的对照组,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h,酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

HSC-T6 细胞以 5×10^3 个/孔接种至 96 孔板。待细胞完全贴壁后,使用基础培养基饥饿细胞 12 h。分别加入 100、300、500 $\mu\text{mol/L}$ 的香芹酚或联合铁死亡抑制剂 Fer-1 (1.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h,另设置不含药物的对照组,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h,酶标仪检测 450 nm 处的 A 值。

2.2.3 细胞内液 ROS、GSH、MDA 水平的测定 HSC-T6 细胞以 5×10^5 个/孔接种至 6 孔板。待细胞完全贴壁后,使用基础培养基饥饿细胞 12 h。设置对照组和香芹酚 (100、300、500 $\mu\text{mol/L}$) 组,分别加入药物处理 24 h。PBS 清洗 2 次,收集细胞至离心管中。研磨振荡使细胞裂解,离心,收集上清。按照 ROS、GSH、MDA 和 Fe^{2+} 试剂盒说明书检测 ROS、GSH、MDA 和 Fe^{2+} 水平。

2.2.4 Western blotting 检测 GPX4、 α -SMA 和 Coll α 1、HIF-1 α 、SLC7A11 蛋白表达 HSC-T6 细胞以 5×10^5 个/孔接种至 6 孔板。待细胞完全贴壁后,使用基础培养基饥饿细胞 12 h。设置对照组和香芹酚 (100、300、500 $\mu\text{mol/L}$) 组,分别加入药物处理 24 h。用含 PMSF 和蛋白酶抑制剂的裂解液提取 HSC-T6 细胞的总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,制备蛋白样品。用含 EDTA 的胰酶溶液消化细胞,离心,收集细胞,参照细胞核提取试剂盒说明书提取细胞核与细胞质蛋白。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,蛋白转至 PVDF 膜,封闭、洗膜后,分别加入一抗 β -actin (1:1 000)、 α -SMA (1:500)、Coll α 1 (1:500)、HIF-1 α (1:1 000)、GPX4 (1:500)、SLC7A11 (1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;TBST 洗涤后加入二抗 (1:10 000),室温孵育 1 h。采用 ECL 法显影,Image J 软件分析条带灰度值。

2.2.5 HIF-1 α 稳定剂 DMOG 对铁死亡相关指标及 HIF-1 α /SLC7A11 信号通路的影响

(1) DMOG 对细胞活力的影响: HSC-T6 细胞

以 5×10^3 个/孔接种至 96 孔板。待细胞完全贴壁后,使用基础培养基饥饿细胞 12 h。分别加入 100、300、500 $\mu\text{mol/L}$ 的香芹酚或联合 DMOG (1 mmol/L) 处理 24 h,另设置不含药物的对照组,每孔加入 10 μL 的 CCK-8 工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2 h,酶标仪检测 450 nm 处的 A 值。

(2) DMOG 对细胞内液 ROS、GSH、MDA、 Fe^{2+} 水平的影响: HSC-T6 细胞以 5×10^5 个/孔接种至 6 孔板。待细胞完全贴壁后,使用基础培养基饥饿细胞 12 h。设置对照组、香芹酚 (300 $\mu\text{mol/L}$) 组、DMOG (1 mmol/L) 组和香芹酚 (300 $\mu\text{mol/L}$) + DMOG (1 mmol/L) 组,分别加入药物处理 24 h。PBS 清洗 2 次,收集细胞至离心管中。研磨振荡使细胞裂解,离心,收集上清。按照试剂盒说明书检测 ROS、GSH、MDA、 Fe^{2+} 水平。

(3) DMOG 对 HIF-1 α /SLC7A11 信号通路相关蛋白表达的影响: HSC-T6 细胞以 5×10^5 个/孔接种至 6 孔板。待细胞完全贴壁后,使用基础培养基饥饿细胞 12 h。设置对照组、香芹酚 (300 $\mu\text{mol/L}$) 组、DMOG (1 mmol/L) 组和香芹酚 (300 $\mu\text{mol/L}$) + DMOG (1 mmol/L) 组,分别加入药物处理 24 h。收集细胞,按“2.2.4”项下方法提取蛋白,并检测 HIF-1 α /SLC7A11 信号通路相关蛋白表达。

2.3 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析,GraphPad Prism 9.0 软件对结果进行可视化处理。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析。

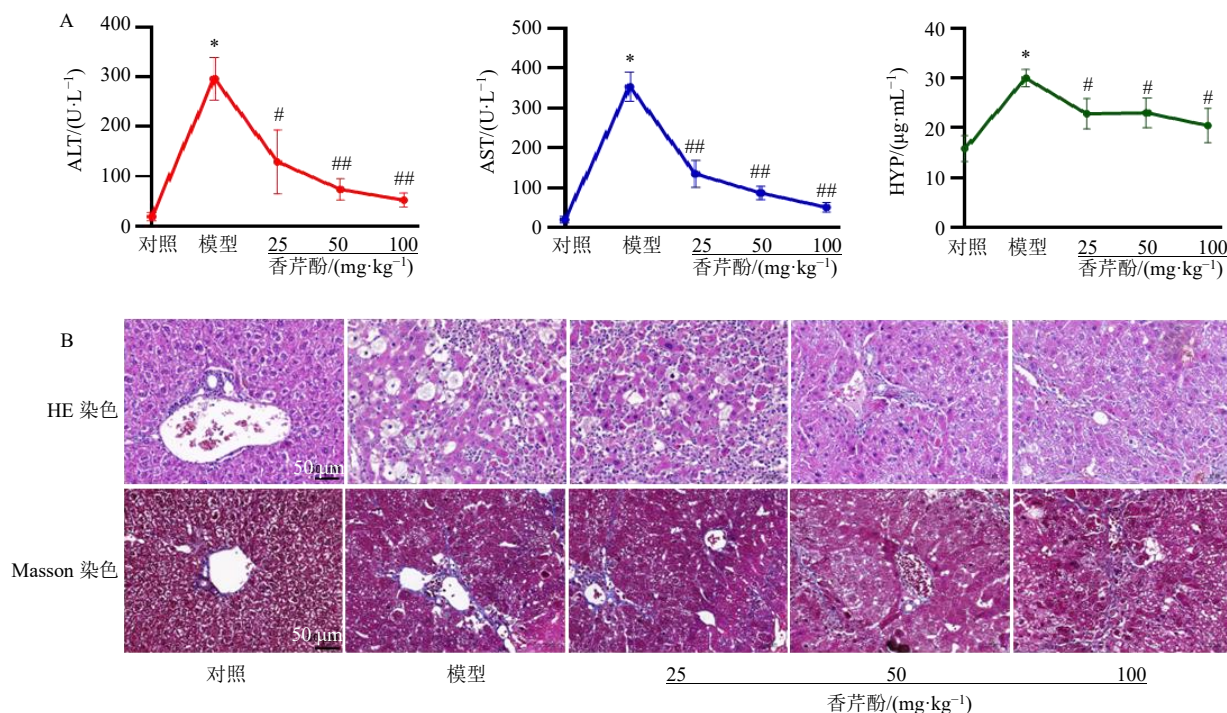
3 结果

3.1 香芹酚减轻 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤和肝纤维化

如图 1-A 所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中肝损伤指标 ALT、AST 活性和 HYP 水平均显著升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,香芹酚各剂量组血清中 ALT、AST 活性和 HYP 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01),且呈剂量相关性。如图 1-B 所示,HE 染色结果显示,香芹酚各剂量组肝汇管区及肝窦炎性细胞浸润减少,肝细胞肿胀和空泡化减轻;Masson 染色结果显示,香芹酚各剂量组小鼠肝脏中的胶原沉积程度减弱。以上结果提示香芹酚可减轻 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤和肝纤维化。

3.2 香芹酚对 CCl_4 诱导的小鼠肝组织和 HSC-T6 细胞中 GPX4、 α -SMA 和 Coll α 1 蛋白表达的影响

动物实验表明,与模型组比较,香芹酚中、高



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 图 2~4 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as Figs. 2—4.

图 1 香芹酚对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤 (A) 和肝纤维化 (B, ×400) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of carvacrol on hepatic injury (A) and fibrosis (B, ×400) of CCl₄-induced mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

剂量组小鼠肝组织中铁死亡负向调控蛋白 GPX4 蛋白水平显著降低 ($P < 0.01$), 同时胶原沉积蛋白 α -SMA 和 Colla1 的水平也显著降低 ($P < 0.05, 0.01$, 图 2-A), 香芹酚低剂量组小鼠肝组织中 GPX4 和 Colla1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。细胞实验表明, 与对照组比较, 香芹酚 (300、500 $\mu\text{mol/L}$) 组 HSC-T6 细胞中 GPX4、 α -SMA 和 Colla1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$, 图 2-B), 香芹酚 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组 HSC-T6 细胞中 Colla1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。以上结果提示香芹酚可以提高 CCl₄ 诱导的小鼠肝组织和 HSC-T6 细胞中的铁死亡水平, 减轻肝纤维化。

3.3 香芹酚诱导 HSC-T6 细胞铁死亡

如图 3-A 所示, 与对照组比较, 香芹酚 (300、400、500、600 $\mu\text{mol/L}$) 可显著抑制 HSC-T6 细胞的活力 ($P < 0.05, 0.01$), 且呈剂量相关性; 加入铁死亡抑制剂 Fer-1 后, 可部分抵消香芹酚对 HSC-T6 细胞活力的抑制作用 ($P < 0.05, 0.01$, 图 3-B)。进一步测定铁死亡相关指标, 如图 3-C 所示, 与对照组比较, 香芹酚 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组 ROS 水平显著升高 ($P < 0.01$); 香芹酚 (300、500 $\mu\text{mol/L}$) 组 Fe^{2+} 、MDA

和 ROS 水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), GSH 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 且呈剂量相关性。提示香芹酚可诱导 HSC-T6 细胞铁死亡。

3.4 香芹酚抑制 HSC-T6 细胞中 HIF-1 α /SLC7A11 信号通路的活性

如图 4 所示, 与对照组比较, 香芹酚处理后的 HSC-T6 细胞中 HIF-1 α 总蛋白水平无显著变化; 香芹酚 (300、500 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞质中 HIF-1 α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 而细胞核中的 HIF-1 α 蛋白及细胞 SLC7A11 总蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 香芹酚 (100 $\mu\text{mol/L}$) 组细胞核中的 HIF-1 α 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。表明香芹酚可降低转录因子 HIF-1 α 的入核能力, 减弱 HIF-1 α 的转录调控功能, 进而抑制 HSC-T6 细胞中 HIF-1 α /SLC7A11 信号通路的活性。

3.5 HIF-1 α 稳定剂 DMOG 对 HSC-T6 细胞中 HIF-1 α /SLC7A11 信号通路的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 用 HIF-1 α 稳定剂 DMOG 处理 HSC-T6 细胞后, 可显著增加胞质、细胞核和总的 HIF-1 α 蛋白表达水平 ($P < 0.05, 0.01$)。DMOG 联合香芹酚处理 HSC-T6 细胞后, 可显著升

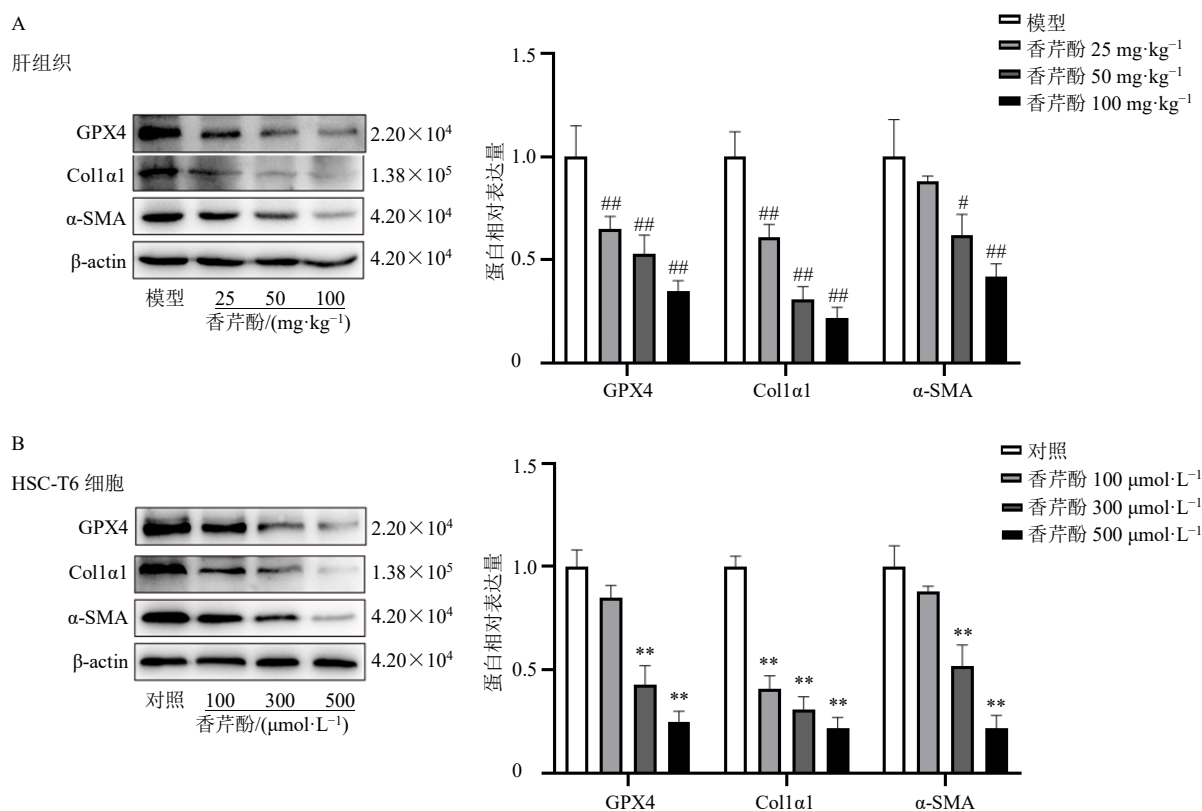
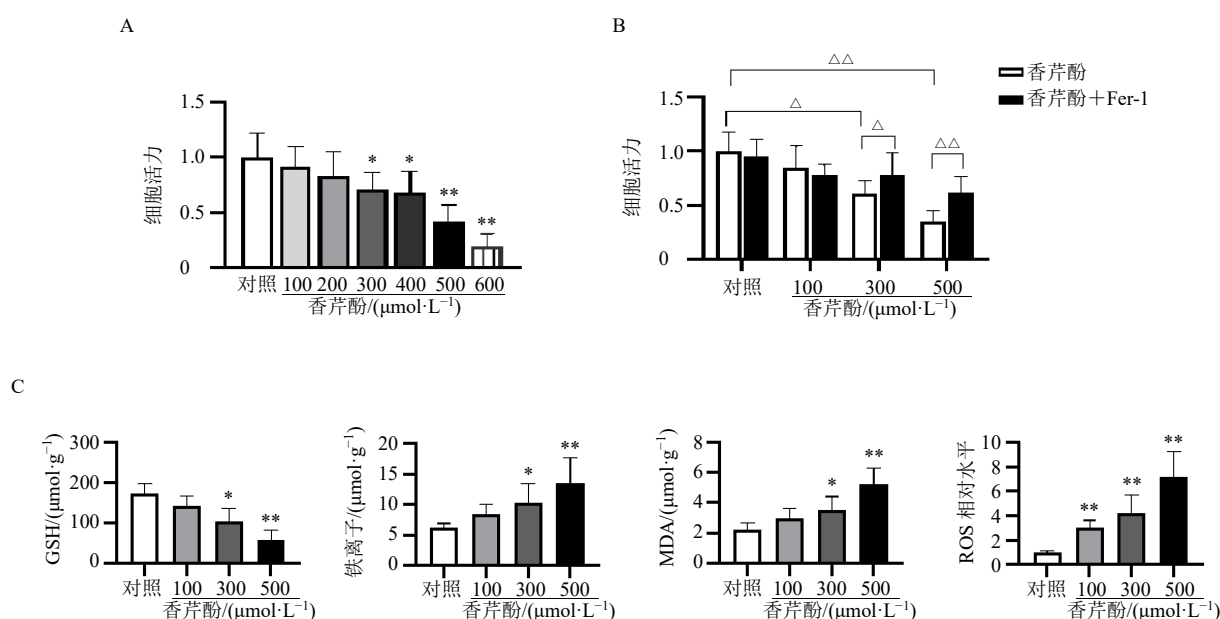


图 2 香芹酚对 CCl₄ 诱导的小鼠肝组织 (A) 和 HSC-T6 细胞 (B) 中 GPX4、α-SMA 和 Col1α1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of carvacrol on expressions of GPX4, α-SMA and Col1α1 proteins in liver tissue of CCl₄-induced mice (A) and HSC-T6 cells (B) ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



△ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$.

图 3 香芹酚对 HSC-T6 细胞活力 (A、B) 和铁死亡 (C) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of carvacrol on cell viability (A, B) and ferroptosis (C) in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

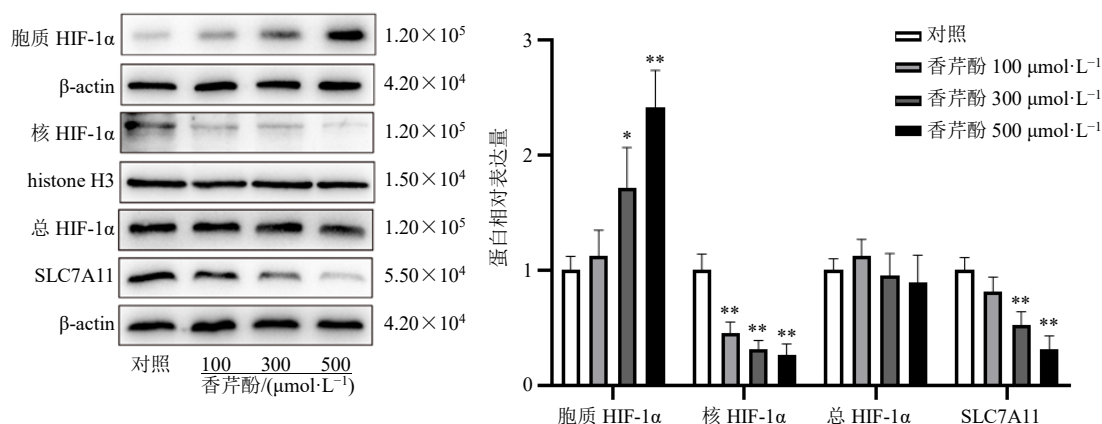
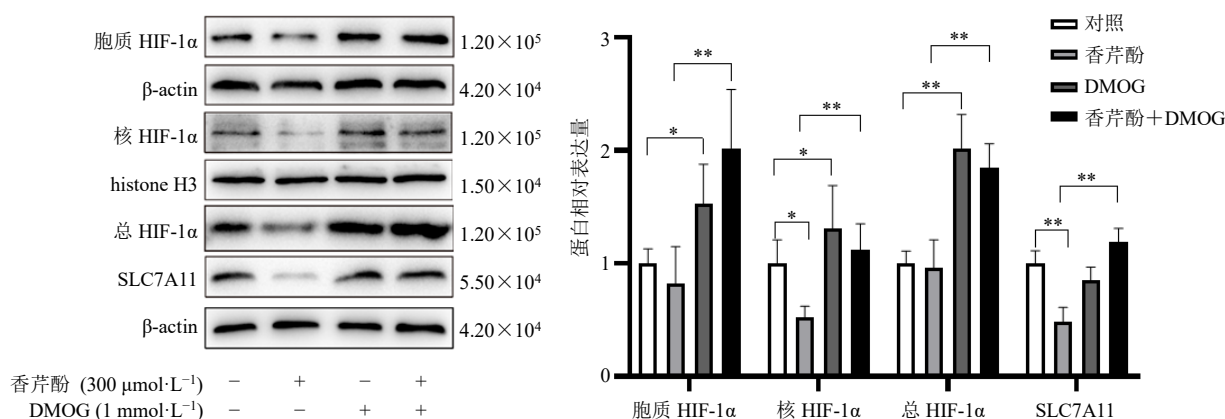


图 4 香芹酚对 HSC-T6 细胞中 HIF-1 α /SLC7A11 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of carvacrol on expressions of HIF-1 α /SLC7A11 signaling pathway related proteins in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 6 同。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, same as below Fig. 6.

图 5 DMOG 对 HSC-T6 细胞中 HIF-1 α /SLC7A11 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of DMOG on expressions of HIF-1 α /SLC7A11 signaling pathway related proteins in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

高胞质、胞核和总的 HIF-1 α 蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 并显著上调 SLC7A11 蛋白表达 ($P < 0.01$)。以上结果提示稳定 HIF-1 α 的活性可逆转香芹酚对 HIF-1 α /SLC7A11 信号通路的抑制作用。

3.6 DMOG 对香芹酚诱导的 HSC-T6 细胞铁死亡的影响

如图 6-A 所示, 香芹酚可抑制 HSC-T6 细胞活力, 而 DMOG 可部分逆转香芹酚的抑制作用。如图 6-B 所示, 香芹酚可诱导 HSC-T6 细胞出现铁死亡现象, 具体表现为 Fe^{2+} 、MDA 和 ROS 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), GSH 水平降低 ($P < 0.05$)。与香芹酚组比较, DMOG 联合香芹酚处理 HSC-T6 细胞后, 可降低 MDA 和 ROS 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 增加 GSH 水平 ($P < 0.05$), 但对 Fe^{2+} 水平无显著影

响。以上结果表明稳定 HIF-1 α 的活性可阻断香芹酚对 HSC-T6 细胞铁死亡的诱导作用。

4 讨论

肝纤维化是持续性肝损伤的共有病理改变, HSC 活化是肝纤维化形成的核心环节。肝脏受损时 HSC 活化, 转化为肌样成纤维细胞, 表达 α -SMA, 合成和分泌 ECM 增加, 导致 ECM 的合成与降解失衡。因此, 抑制 HSC 活化或诱导其失活是防治肝纤维化的关键。香芹酚是一种芳香酚单萜类化合物, 具有抗菌、镇痛、抗炎、护肝等多种生物学活性。课题组前期研究已证实香芹酚能减轻 CCl_4 诱导的小鼠肝纤维化^[9], 在此基础上, 本研究进一步揭示了其内在机制, 即香芹酚可诱导 HSC 铁死亡。

铁死亡是一种新型细胞程序性死亡模式, 其本

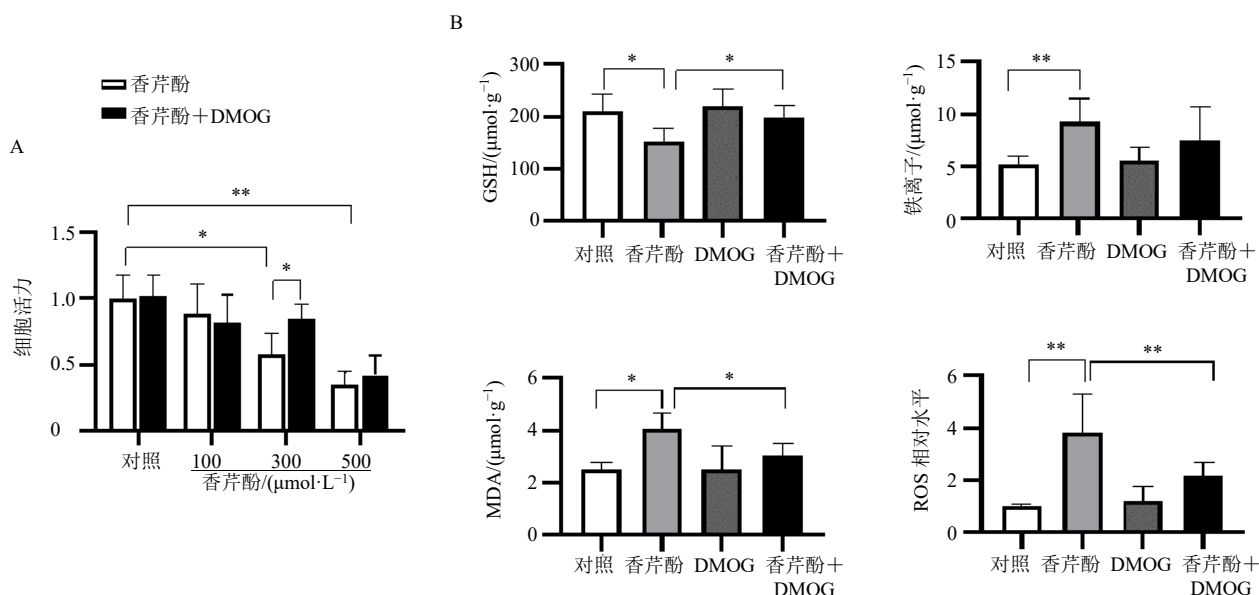


图 6 DMOG 对 HSC-T6 细胞活力 (A) 和铁死亡 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of DMOG on cell viability (A) and ferroptosis (B) in HSC-T6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

质是 Fe^{2+} 介导下的脂质氧化物的代谢障碍，导致细胞内铁超载、ROS 和脂质过氧化物堆积，破坏细胞氧化还原平衡和质膜结构，触发细胞死亡^[15]。近年来，本课题组和国内外多项研究表明，应用铁死亡诱导剂（索拉非尼、依拉斯汀和丁硫醚磺酰亚胺）可增加 HSC-T6 和 LX-2 细胞中 Fe^{2+} 、ROS 水平，降低 GSH 含量，诱发 HSC 铁死亡，进而减少 α -SMA 和 Coll1a1 等 ECM 的合成^[10-11,13]。因此，诱导 HSC 铁死亡诱导 HSC 铁死亡可能成为防治肝纤维化的新策略。

现已证实，某些中药单体可诱导 HSC 发生铁死亡。异甘草酸镁通过调节血红素加氧酶-1 及其下游因子包括转铁蛋白、转铁蛋白受体、铁蛋白重链和铁蛋白，诱导 HSC 铁死亡并改善肝脏纤维化^[16]。人参皂苷 Rh₂ 增加 HSC 内 Fe^{2+} 、ROS、MDA 水平和 GSH 消耗，诱导细胞铁死亡从而减轻肝纤维化^[17]。本课题组前期研究也发现，汉黄芩苷处理 HSC 后，电镜发现线粒体的皱缩以及线粒体嵴消失，细胞内 GSH 含量下降、 Fe^{2+} 含量和脂质过氧化产物增加，细胞发生铁死亡^[14]。本研究结果显示，香芹酚 (300 $\mu\text{mol/L}$) 可升高 HSC 内 Fe^{2+} 、ROS、MDA，降低 GSH，并显著抑制 HSC 活力，而铁死亡抑制剂 Fer-1 能阻断该抑制作用。表明香芹酚可诱导 HSC 铁死亡，减少 ECM 合成，从而缓解肝脏纤维。

铁死亡机制涉及多条途径，包括铁稳态调节途径、胱氨酸谷氨酸反向转运体途径和电压依赖性阴

离子通道。其中 GSH 合成减少以及 GPX4 活性抑制，被公认为铁死亡的中心环节。降低 HSC 细胞内 System XC-亚基 SLC7A11 蛋白的水平，可阻碍 GSH 合成原料——胱氨酸的转运，导致 GSH 和 GPX4 耗竭，从而诱导 HSC 铁死亡，减轻肝纤维化^[13-14]。SLC7A11 作为一类胱氨酸转运蛋白，其主要功能是将细胞外的胱氨酸运输至细胞内，被核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)^[18]、干扰素调节因子 1 (interferon regulatory factor 1, IRF1)^[17]、p53^[14]、HIF-1 α ^[17] 等多种转录因子调节。

HIF-1 α 是细胞对低氧或缺氧做出适应性反应的关键性转录因子。常氧下，HIF-1 α 容易被肿瘤抑制蛋白识别，经泛素蛋白酶途径降解，因此细胞内 HIF-1 α 水平较低。而低氧环境下，泛素降解途径受到抑制，细胞内 HIF-1 α 的表达增加，进入细胞核与 HIF-1 β 结合形成 HIF-1 转录复合物，进而激活靶基因转录表达。肝纤维化过程中 HSC 活化产生大量 ECM，窦状间隙 ECM 过度积累，肝窦内皮细胞之间的窗孔消失，造成肝细胞与血浆之间的物质交换受损和假性缺氧状态^[19]。因此，在多种肝纤维化模型中，HIF-1 α 表达均显著升高，且升高的幅度与肝纤维化严重程度呈正相关^[20-22]。HIF-1 α 缺失可诱导小鼠肝脏 ECM 的水平下调，减轻纤维化程度^[23]。进一步研究发现，HIF-1 α 可激活 HSC，促进肝纤维化的发生发展^[24]。HIF-1 α 作为转录因子，其主要功

能部位在细胞核,可促进 SLC7A11 的转录^[13]。本研究发现香芹酚对 HSC 中 HIF-1 α 总蛋白水平无显著影响,但可降低细胞核中 HIF-1 α 水平,阻碍 HIF-1 α 入核,影响 SLC7A11 转录,这提示 HIF-1 α /SLC7A11 是香芹酚诱导 HSC 铁死亡一个关键的中介调控轴。

综上,铁死亡与 HSC 活化和肝纤维化密切相关。本研究采用体外细胞学实验和小鼠肝纤维化模型实验,证实香芹酚能诱发 HSC 铁死亡进而抑制其活力,减少 ECM 沉积和减轻肝纤维化,此过程依赖 HIF-1 α /SLC7A11 通路的调控。本研究从新的视角阐释了香芹酚抑制肝纤维化的具体机制,即香芹酚通过 HIF-1 α /SLC7A11 轴诱导 HSC 细胞铁死亡,进而发挥抗肝纤维化的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Asrani S K, Devarbhavi H, Eaton J, *et al.* Burden of liver diseases in the world [J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1): 151-171.
- [2] Xiao J, Wang F, Wong N K, *et al.* Global liver disease burdens and research trends: Analysis from a Chinese perspective [J]. *J Hepatol*, 2019, 71(1): 212-221.
- [3] Suo L D, Kang K, Wang X, *et al.* Carvacrol alleviates ischemia reperfusion injury by regulating the PI3K-Akt pathway in rats [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e104043.
- [4] Khan I, Bhardwaj M, Shukla S, *et al.* Carvacrol inhibits cytochrome P450 and protects against binge alcohol-induced liver toxicity [J]. *Food Chem Toxicol*, 2019, 131: 110582.
- [5] Khalil M, Serale N, Diab F, *et al.* Beneficial effects of carvacrol on *in vitro* models of metabolically-associated liver steatosis and endothelial dysfunction: A role for fatty acids in interfering with carvacrol binding to serum albumin [J]. *Curr Med Chem*, 2022, 29(30): 5113-5129.
- [6] Zhao W, Chen L, Zhou H, *et al.* Protective effect of carvacrol on liver injury in type 2 diabetic db/db mice [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(5): 741.
- [7] Gursul C, Ozcicek A, Ozkaraca M, *et al.* Amelioration of oxidative damage parameters by carvacrol on methanol-induced liver injury in rats [J]. *Exp Anim*, 2022, 71(2): 224-230.
- [8] El-Gendy Z A, Ramadan A, El-Batran S A, *et al.* Carvacrol hinders the progression of hepatic fibrosis via targeting autotaxin and thioredoxin in thioacetamide-induced liver fibrosis in rat [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40(12): 2188-2201.
- [9] Cai S Y, Wu L J, Yuan S Y, *et al.* Carvacrol alleviates liver fibrosis by inhibiting TRPM7 and modulating the MAPK signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 898: 173982.
- [10] Zhang Z L, Guo M, Li Y J, *et al.* RNA-binding protein ZFP36/TTP protects against ferroptosis by regulating autophagy signaling pathway in hepatic stellate cells [J]. *Autophagy*, 2020, 16(8): 1482-1505.
- [11] Zhang Z L, Yao Z, Wang L, *et al.* Activation of ferritinophagy is required for the RNA-binding protein ELAVL1/HuR to regulate ferroptosis in hepatic stellate cells [J]. *Autophagy*, 2018, 14(12): 2083-2103.
- [12] Wang L, Zhang Z L, Li M M, *et al.* P53-dependent induction of ferroptosis is required for artemether to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation [J]. *IUBMB Life*, 2019, 71(1): 45-56.
- [13] Yuan S Y, Wei C, Liu G F, *et al.* Sorafenib attenuates liver fibrosis by triggering hepatic stellate cell ferroptosis via HIF-1 α /SLC7A11 pathway [J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(1): e13158.
- [14] Liu G F, Wei C, Yuan S Y, *et al.* Wogonoside attenuates liver fibrosis by triggering hepatic stellate cell ferroptosis through SOCS1/P53/SLC7A11 pathway [J]. *Phytother Res*, 2022, 36(11): 4230-4243.
- [15] Stockwell B R, Friedmann Angeli J P, Bayir H, *et al.* Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [16] Sui M, Jiang X F, Chen J, *et al.* Magnesium isoglycyrrhizinate ameliorates liver fibrosis and hepatic stellate cell activation by regulating ferroptosis signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 125-133.
- [17] Lang Z C, Yu S H, Hu Y H, *et al.* Ginsenoside Rh₂ promotes hepatic stellate cell ferroptosis and inactivation via regulation of IRF1-inhibited SLC7A11 [J]. *Phytomedicine*, 2023, 118: 154950.
- [18] Dong H, Xia Y Y, Jin S L, *et al.* Nrf2 attenuates ferroptosis-mediated IIR-ALI by modulating TERT and SLC7A11 [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(11): 1027.
- [19] Cannito S, Paternostro C, Busletta C, *et al.* Hypoxia, hypoxia-inducible factors and fibrogenesis in chronic liver diseases [J]. *Histol Histopathol*, 2014, 29(1): 33-44.
- [20] Bozova S, Elpek G O. Hypoxia-inducible factor-1 α expression in experimental cirrhosis: Correlation with vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis [J]. *APMIS*, 2007, 115(7): 795-801.
- [21] Han J, He Y P, Zhao H, *et al.* Hypoxia inducible factor-1 promotes liver fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease by activating PTEN/p65 signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14735-14744.
- [22] Moczydlowska J, Mityk W, Hermanowicz A, *et al.* HIF-1 α as a key factor in bile duct ligation-induced liver fibrosis in rats [J]. *J Invest Surg*, 2017, 30(1): 41-46.
- [23] Copple B L, Kaska S, Wentling C. Hypoxia-inducible factor activation in myeloid cells contributes to the development of liver fibrosis in cholestatic mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2012, 341(2): 307-316.
- [24] Hong F, Wan L, Liu J, *et al.* Histone methylation regulates HIF-1 signaling cascade in activation of hepatic stellate cells [J]. *FEBS Open Bio*, 2018, 8(3): 406-415.

[责任编辑 李亚楠]