

基于 Nrf2/GPX4 通路研究枸杞多糖对缺氧/复氧诱导的心肌细胞铁死亡的影响

黄 伟, 李 倩, 朱继田

安徽医科大学附属宿州医院 心血管内科, 安徽 宿州 234000

摘 要: 目的 探究枸杞多糖 (*Lycium barbarum* polysaccharides, LBP) 调控核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2) /谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 通路对缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 诱导的心肌细胞铁死亡的影响。方法 设置对照组、模型组及 LBP 低、中、高剂量 (25、50、100 mg/L) 组和 LBP (100 mg/L) + Nrf2 抑制剂 ML385 (5 μ mol/L) 组。构建 H9c2 细胞 H/R 模型, 并给予相应药物处理。采用 CCK-8 检测细胞活力; 采用 TUNEL 染色检测细胞凋亡; 采用试剂盒检测细胞 Fe^{2+} 、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性; 采用二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE) 荧光探针检测细胞活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 采用透射电镜观察细胞线粒体形态; 采用 Western blotting 检测转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TfR1)、二价金属离子转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1)、铁蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch like ECH associated protein 1, Keap1)、Nrf2、血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)、GPX4 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.001$), Fe^{2+} 、MDA、ROS 水平和 LDH 活性显著升高 ($P < 0.001$), GSH 水平和 SOD、CAT 活性显著降低 ($P < 0.001$), 线粒体缩短、膜密度增高且嵴数量减少, TfR1、Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$), DMT1、FTH1、ACSL4、Keap1 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, LBP 组细胞活力显著升高 ($P < 0.01$), Fe^{2+} 、MDA、ROS 水平和 LDH 活性显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), GSH 水平和 SOD、CAT 活性显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 线粒体形态较为规则, TfR1、Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), DMT1、FTH1、ACSL4、Keap1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001); 而 ML385 能够抑制枸杞多糖对细胞铁死亡的改善作用 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结论 枸杞多糖可能通过激活 Nrf2/GPX4 通路改善 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡。

关键词: 缺氧/复氧; 心肌细胞; 心肌缺血再灌注; 枸杞多糖; Nrf2/GPX4 通路; 铁死亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2025)10 - 3568 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.10.015

Effect of *Lycium barbarum* polysaccharides on hypoxia/reoxygenation-induced ferroptosis in cardiomyocytes based on Nrf2/GPX4 pathway

HUANG Wei, LI Qian, ZHU Jitian

Department of Cardiovascular Medicine, Suzhou Hospital, Anhui Medical University, Suzhou 234000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) on ferroptosis induced by hypoxia/reoxygenation (H/R) in cardiomyocytes by regulating nuclear factor E2 related factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) pathway. **Methods** Control group, model group, LBP low-, medium-, high-dose (25, 50, 100 mg/L) groups and LBP (100 mg/L) + Nrf2 inhibitor ML385 (5 μ mol/L) group were set up. H9c2 cells H/R model was constructed and treated with corresponding drugs. CCK-8 was used to detect cell viability; TUNEL staining was used to detect cell apoptosis; The reagent kits were used to detect levels of Fe^{2+} , glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), as well as activities of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase

收稿日期: 2024-12-06

基金项目: 安徽省宿州市卫生健康科研项目 (SZWJ2023a040)

作者简介: 黄 伟 (1984—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事冠心病介入研究。Tel: 15805576673 E-mail: hw64769594@163.com

(SOD) and catalase (CAT) in cells; Dihydroethidium (DHE) fluorescence probe was used to detect cellular reactive oxygen species (ROS) level; Transmission electron microscopy was used to observe the mitochondrial morphology of cells; Western blotting was used to detect the expressions of transferrin receptor 1 (TfR1), divalent metal transporter 1 (DMT1), ferritin heavy chain 1 (FTH1), acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4), Kelch like ECH associated protein 1 (Keap1), Nrf2, heme oxygenase-1 (HO-1), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and GPX4 protein. **Results** Compared with control group, cell viability in model group was significantly reduced ($P < 0.001$), levels of Fe^{2+} , MDA, ROS and LDH activity were significantly increased ($P < 0.001$). GSH level and activities of SOD and CAT were significantly reduced ($P < 0.001$), mitochondria was shortened, membrane density was increased, and the number of cristae was decreased, the protein expression levels of TfR1, Nrf2, HO-1, SLC7A11 and GPX4 were significantly reduced ($P < 0.001$), while the protein expression levels of DMT1, FTH1, ACSL4 and Keap1 were significantly increased ($P < 0.001$). Compared with model group, cell viability in LBP group was significantly increased ($P < 0.01$), Fe^{2+} , MDA, ROS levels and LDH activity were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), GSH level and SOD, CAT activities were significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), the morphology of mitochondria were relatively regular, protein expression levels of TfR1, Nrf2, HO-1, SLC7A11 and GPX4 were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), protein expression levels of DMT1, FTH1, ACSL4 and Keap1 were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$); ML385 could inhibit the improvement effect of LBP on cell ferroptosis ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** LBP may improve H/R-induced ferroptosis in cardiomyocytes by activating the Nrf2/GPX4 pathway.

Key words: hypoxia/reoxygenation; cardiomyocytes; myocardial ischemia-reperfusion; *Lycium barbarum* polysaccharides; Nrf2/GPX4 pathway; ferroptosis

铁死亡是一种铁依赖性的细胞死亡方式,以细胞内铁过载、活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累以及脂质过氧化为主要特征^[1]。最新研究显示,铁死亡在心血管疾病(包括心肌梗死、心肌缺血再灌注、心力衰竭等)发病机制中扮演了核心角色^[2]。心肌细胞铁死亡的发生机制主要涉及铁离子输入与还原、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)失活及线粒体 ROS 水平增加等^[3]。在缺氧环境下,二价金属离子转运蛋白 1 (divalent metal transporter 1, DMT1)、膜铁转运蛋白 1 (ferroportin 1, FPN1)和转铁蛋白受体(transferrin receptor, TfR)等表达异常,使得细胞内二价铁离子(Fe^{2+})过载,大量游离的 Fe^{2+} 通过催化细胞膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化,从而引发铁死亡;而在再灌注期间,氧气的重新供应可能导致 ROS 爆发,加剧铁死亡的发生^[4]。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)是一种重要的转录调控蛋白,在抵御氧化应激及保持细胞氧化还原平衡方面发挥举足轻重的作用^[5]。GPX4 是一种磷脂氢过氧化物酶,能够抑制细胞内脂质过氧化,防止铁死亡发生^[6-7]。在心肌缺血再灌注损伤细胞模型中,缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)能够诱导心肌细胞铁死亡^[8-9];而激活 Nrf2/GPX4 通路能够减轻心肌细胞铁死亡^[10-11]。

中医将心肌缺血再灌注损伤归属于“胸痹”“心痛”等范畴,其发病机制主要与气血运行不畅、血脉痹阻密切相关^[12]。中医常以活血化瘀、通阳宣痹、

益气养阴等为主要治则,通过调节人体整体机能,改善气血运行状态,从而缓解症状、恢复心脉功能^[13]。《本草纲目》记载:“枸杞,补肾生精,养肝,明目,坚精骨,去疲劳,易颜色,变白,明目安神,令人长寿”^[14]。中医认为枸杞味甘,性平,归肝、肾经,具有滋补肝肾、益精明目的功效^[15]。枸杞多糖是一种枸杞提取物,具有抗氧化、抗衰老、抗炎、抗纤维化等作用^[16]。研究显示枸杞多糖可通过调节 Nrf2/血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 通路抑制 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞焦亡^[17]。此外,枸杞多糖可通过 Nrf2/溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) /GPX4 途径缓解生殖损伤雄性小鼠塞尔托利细胞铁死亡^[18]。然而,枸杞多糖对 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡的影响尚不清楚。基于此,本研究拟探讨枸杞多糖对 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡的影响,以及 Nrf2/GPX4 通路在其中的调控作用,以期对中药治疗心肌缺血再灌注损伤提供借鉴意义。

1 材料

1.1 细胞

大鼠 H9c2 心肌细胞(批号 CL-0089)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药品与试剂

枸杞多糖(批号 XACY,质量分数为 50%,相对分子质量为 $2.2 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^4$,由阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖、木糖、鼠李糖 6 种单糖成分组成,杂质为植物纤维)购自西安昌岳生物科技

有限公司; Nrf2 抑制剂 ML385 (批号 HY-100523) 购自美国 MCE 公司; CCK-8 试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (批号分别为 C0037、S0131S、C0016、S0101S、S0051、S0052) 购自上海碧云天生物技术有限公司; TUNEL 染色试剂盒 (批号 T2190) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; Fe^{2+} 检测试剂盒 (批号 E1045) 购自北京普利莱基因技术有限公司; 二氢乙锭 (dihydroethidium, DHE) 荧光探针 (批号 KGAF019) 购自江苏凯基生物技术股份有限公司; 兔抗铁蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 单克隆抗体、兔抗 TfR1、DMT1、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch like ECH associated protein 1, Keap1)、Nrf2、HO-1、GPX4、 β -actin 多克隆抗体、HRP 标记的羊抗兔二抗 (批号分别为 bsm-54108R、bsm-62432R、bs-0988R、bs-3577R、bs-3648R、bs-1074R、bs-2075R、bs-3884R、bs-0061R、bs-80295G-HRP) 购自北京博奥森生物技术有限公司; 兔抗 SLC7A11 多克隆抗体 (批号 IPD-ANP13430) 购自湖北艾普蒂生物工程有限公司。

1.3 仪器

HD-SY96B 型酶标仪 (山东霍尔德电子科技有限公司); BM3000D 型荧光显微镜 (上海启步生物科技有限公司); EMUC7 型超薄切片机 (德国 Leica 公司); FEI Glacios 型透射电镜 (北京亿诚恒达科技有限公司); DYY-6C 型蛋白电泳仪 (北京六一生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞分组、造模及给药

H9c2 细胞用含 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO_2 培养箱中培养。设置对照组、模型组及枸杞多糖低、中、高剂量 (25、50、100 mg/L) 组和枸杞多糖 (100 mg/L) + ML385 (5 $\mu\text{mol/L}$)^[19] 组。对照组细胞继续常规培养, 其余各组细胞接种于无糖 DMEM 培养基中, 并置于含 94% N_2 、5% CO_2 、1% O_2 的培养箱中缺氧 12 h, 随后接种于 DMEM 培养基中, 并置于含 5% CO_2 的培养箱中复氧 2 h^[20]。培养结束后, 各组细胞分别在添加相应药物的 DMEM 培养基中继续培养

24 h, 收集细胞待测。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

取 100 μL H9c2 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 另设置不接种细胞不含药物的空白孔, 经 H/R 及药物干预后, 弃上清, 加入含 10 μL CCK-8 溶液的新鲜培养基, 37 °C 孵育 4 h, 酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞活力。

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

2.3 TUNEL 染色检测细胞凋亡

收集各组细胞, 并制作细胞爬片, 爬片中加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, PBS 洗涤, 爬片进行 Triton X-100 透化 5 min; PBS 洗涤, 加入 TUNEL 染色液于 37 °C 避光孵育 1 h; PBS 洗涤, 加入 Hoechst 染液于室温避光孵育 15 min; PBS 洗涤, 使用荧光显微镜观察细胞凋亡情况。

2.4 试剂盒检测细胞 Fe^{2+} 、GSH、MDA 水平及 LDH、SOD、CAT 活性

收集各组细胞, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 分离细胞和培养上清液。按照试剂盒说明, 使用 WST-8 法检测培养上清液中 LDH 活性。细胞中加入细胞裂解液裂解, 12 000 $\times g$ 离心 10 min, 分离裂解上清液, 按照试剂盒说明, 使用比色法检测 Fe^{2+} 水平, 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) 法检测 GSH 水平, 硫代巴比妥酸法检测 MDA 水平, WST-8 法检测 SOD 活性, 可见分光光度计法检测 CAT 活性。

2.5 DHE 荧光探针检测细胞内 ROS 水平

收集各组细胞, 经过 PBS 洗涤后, 加入 5 $\mu\text{mol/L}$ DHE 工作液, 于 37 °C 避光孵育 30 min。PBS 洗去细胞表面未结合的 DHE, 随后加入 DAPI 染液染色后封片, 使用荧光显微镜观察细胞内 ROS 水平。

2.6 透射电镜观察细胞超微结构

收集各组细胞, 加入 2.5% 戊二醛溶液于 4 °C 固定过夜。PBS 洗涤, 用 1% 锇酸溶液固定 1 h; PBS 洗涤, 梯度乙醇脱水, 用纯丙酮处理 20 min, 包埋剂和丙酮的混合液处理 3 h, 加入纯包埋剂处理过夜。最后使用超薄切片机制作 70~90 nm 的切片, 切片经柠檬酸铅溶液和醋酸双氧铀溶液染色 (各 10 min), 采用透射电镜观察细胞超微结构。

2.7 Western blotting 检测细胞 TfR1、DMT1、FTH1、ACSL4、Keap1、Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达

收集各组细胞, 裂解后收集蛋白裂解液, 使用二喹啉甲酸法测定细胞蛋白浓度。蛋白中加入上样

缓冲液，随后进行沸水浴加热变性。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，于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 2 h，经 TBST 洗涤后，分别加入 Trf1、DMT1、FTH1、ACSL4、Keap1、Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 一抗（1：1 000），4 ℃ 孵育过夜；TBST 洗涤后，加入二抗（1：5 000），37 ℃ 孵育 2 h。使用增强型化学发光试剂显色，凝胶成像系统拍照，Image J 软件分析条带灰度值。

2.8 统计学分析

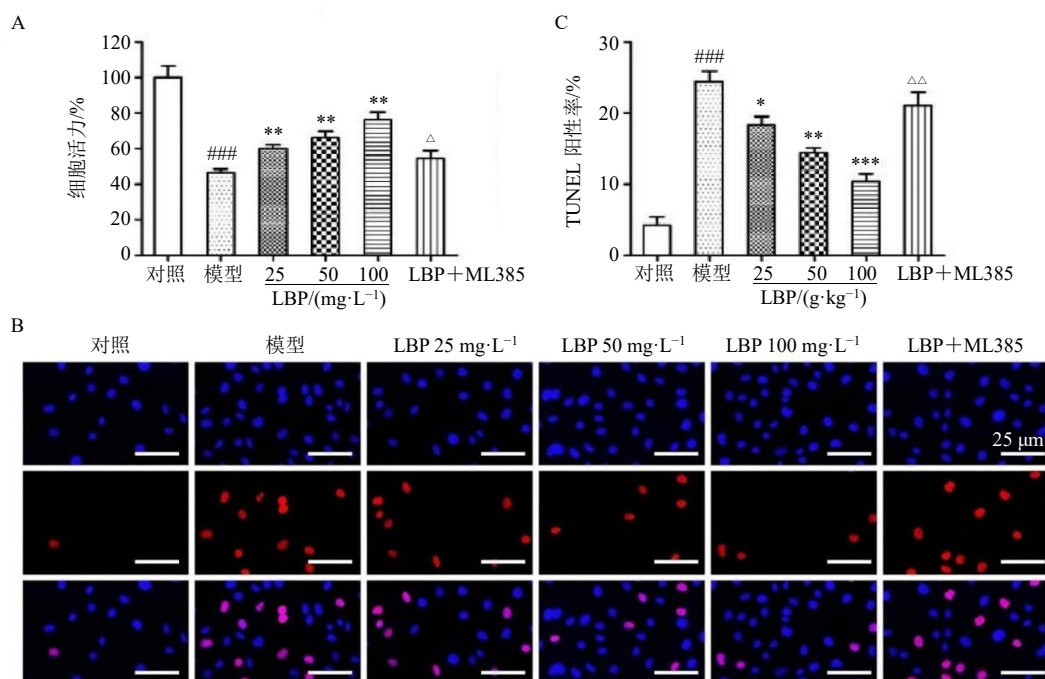
采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，计量资料均符合正态分布和方差齐性，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间

比较采用单因素方差（One-way ANOVA）分析，两两比较采用 LSD-*t* 检验。

3 结果

3.1 各组细胞活力和凋亡率比较

如图 1 所示，与对照组比较，模型组细胞活力明显降低（ $P < 0.001$ ），TUNEL 阳性率明显升高（ $P < 0.001$ ）；与模型组比较，枸杞多糖各剂量组细胞活力明显升高（ $P < 0.01$ ），TUNEL 阳性率明显降低（ $P < 0.05$ 、0.01、0.001）；与枸杞多糖高剂量组比较，枸杞多糖+ML385 组细胞活力明显降低（ $P < 0.05$ ），TUNEL 阳性率明显升高（ $P < 0.01$ ）。



A-细胞活力；B-TUNEL 染色（×200）；C-TUNEL 阳性率；与对照组比较：### $P < 0.001$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ；LBP-枸杞多糖；与枸杞多糖高剂量组比较：Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ ΔΔΔ $P < 0.001$ ，下同。

A-cell viability; B-TUNEL staining (× 200); C-TUNEL positivity rate; ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group; LBP-Lycium barbarum polysaccharides; Δ $P < 0.05$ ΔΔ $P < 0.01$ ΔΔΔ $P < 0.001$ vs Lycium barbarum polysaccharides high-dose group, same as below figures.

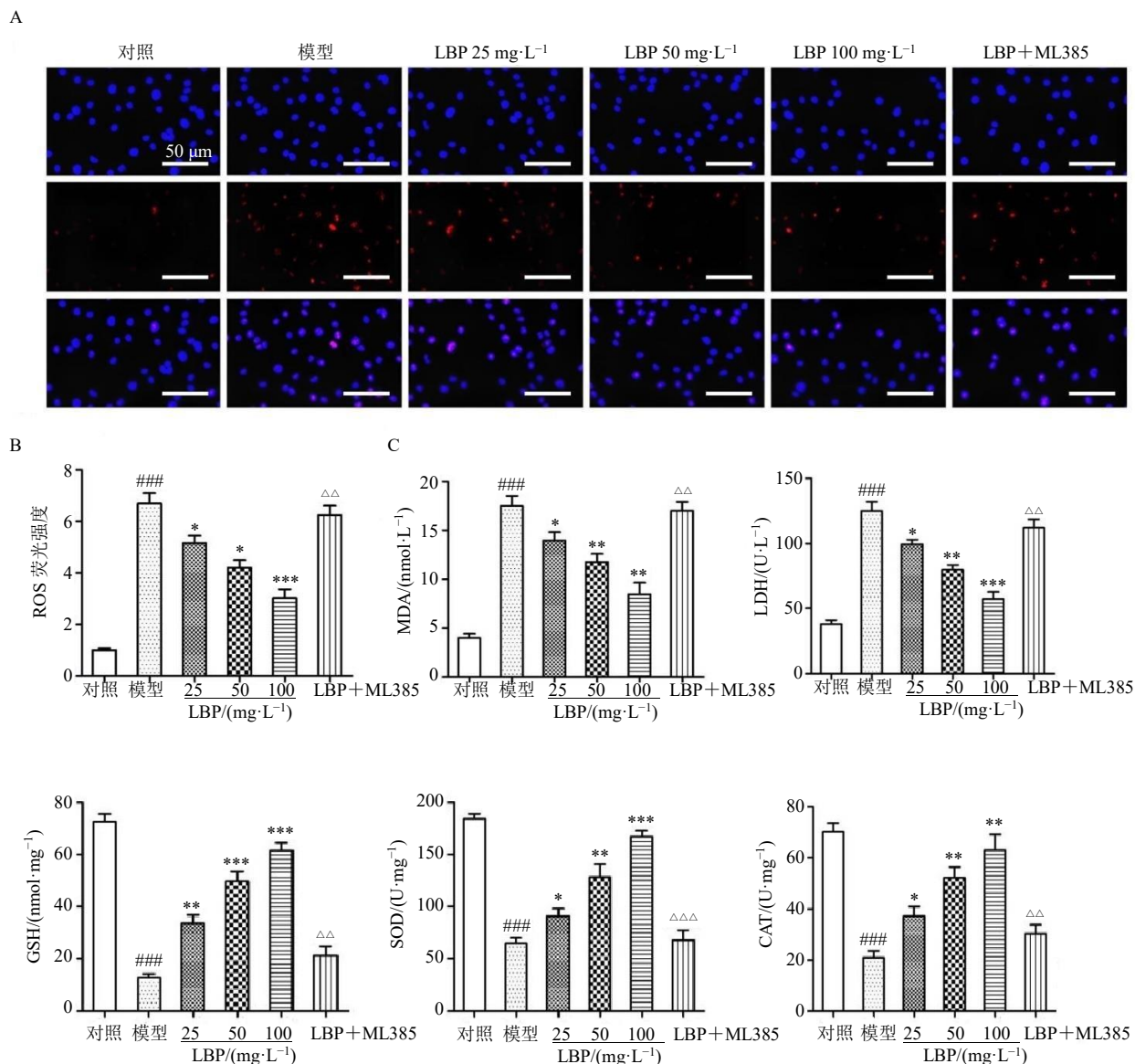
图 1 各组 H9c2 细胞活力和凋亡率比较（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 3$ ）

Fig. 1 Comparison of cell viability and apoptosis of H9c2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$ ， $n = 3$)

3.2 各组细胞 ROS 和脂质过氧化水平比较

如图 2-A、B 所示，与对照组比较，模型组细胞 ROS 荧光强度明显升高（ $P < 0.001$ ）；与模型组比较，枸杞多糖各剂量组细胞 ROS 荧光强度明显降低（ $P < 0.05$ 、0.001）；与枸杞多糖高剂量组比较，枸杞多糖+ML385 组细胞 ROS 荧光强度明显升高（ $P < 0.01$ ）。如图 2-C 所示，与对照组比较，模型组细胞 MDA 水平和 LDH 活性明显升高（ $P < 0.001$ ），

GSH 水平和 SOD、CAT 活性明显降低（ $P < 0.001$ ）；与模型组比较，枸杞多糖各剂量组细胞 MDA 水平和 LDH 活性明显降低（ $P < 0.05$ 、0.01、0.001），GSH 水平和 SOD、CAT 活性明显升高（ $P < 0.05$ 、0.01、0.001）；与枸杞多糖高剂量组比较，枸杞多糖+ML385 组细胞 MDA 水平和 LDH 活性明显升高（ $P < 0.01$ ），GSH 水平和 SOD、CAT 活性明显降低（ $P < 0.01$ 、0.001）。



A-DHE 荧光探针染色 ($\times 400$); B-ROS 水平; C-MDA、GSH 水平和 LDH、SOD、CAT 活性。

A-DHE fluorescence probe staining ($\times 400$); B-ROS level; C-MDA, GSH levels and LDH, SOD, CAT activities.

图 2 各组 H9c2 细胞 ROS 和脂质过氧化水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Comparison of ROS and lipid peroxidation levels of H9c2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 各组细胞线粒体形态和铁死亡相关指标表达比较

如图 3-A 所示, 对照组细胞线粒体形态正常; 与对照组比较, 模型组细胞线粒体明显缩短, 线粒体膜密度增加且嵴数量减少; 与模型组比较, 枸杞多糖各剂量组细胞线粒体明显增长, 线粒体膜密度降低且嵴数量增加; 与枸杞多糖高剂量组比较, 枸杞多糖+ML385 组细胞线粒体明显缩短, 线粒体膜密度增加且嵴数量减少。

如图 3-B~D 所示, 与对照组比较, 模型组细

胞 Fe^{2+} 水平和 DMT1、FTH1、ACSL4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$), Tfr1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 枸杞多糖各剂量组细胞 Fe^{2+} 水平和 DMT1、FTH1、ACSL4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), Tfr1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01, 0.001$); 与枸杞多糖高剂量组比较, 枸杞多糖+ML385 组细胞 Fe^{2+} 水平和 DMT1、FTH1、ACSL4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01, 0.001$), Tfr1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.001$)。

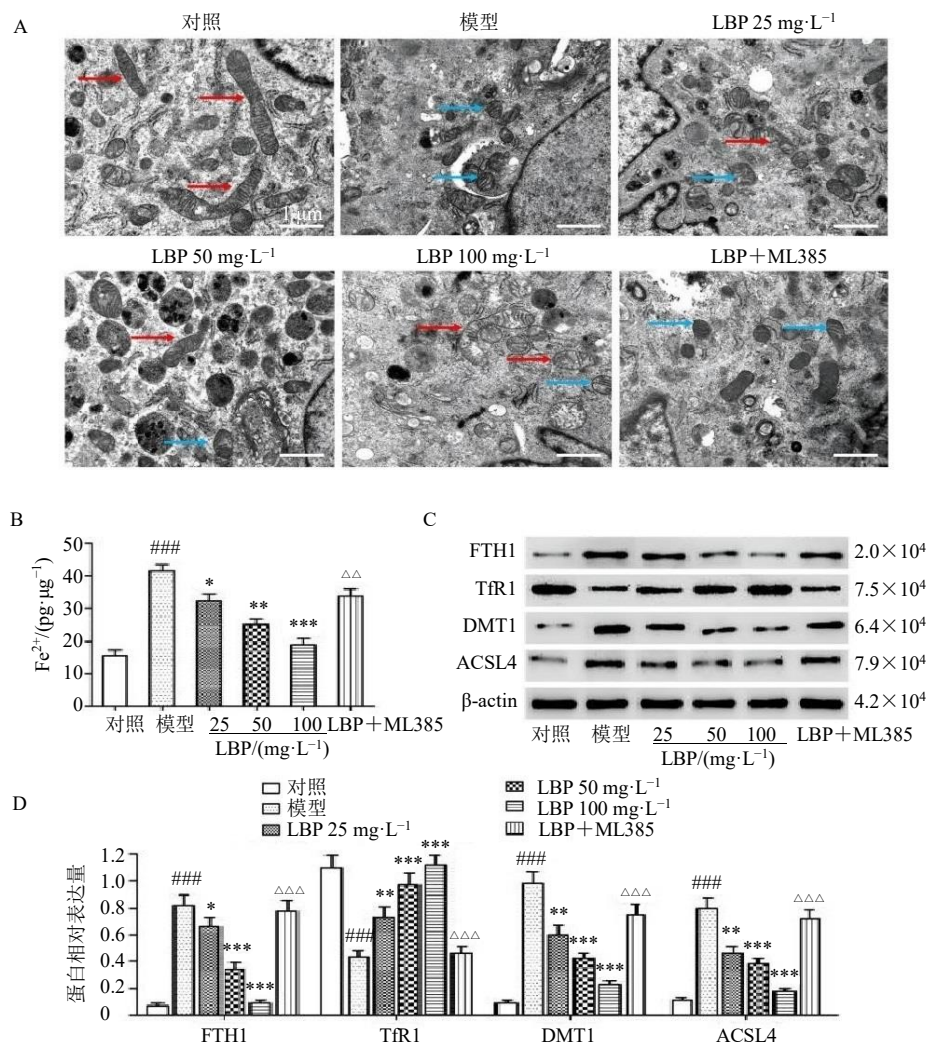


图 3 各组 H9c2 细胞线粒体损伤和铁死亡相关指标表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

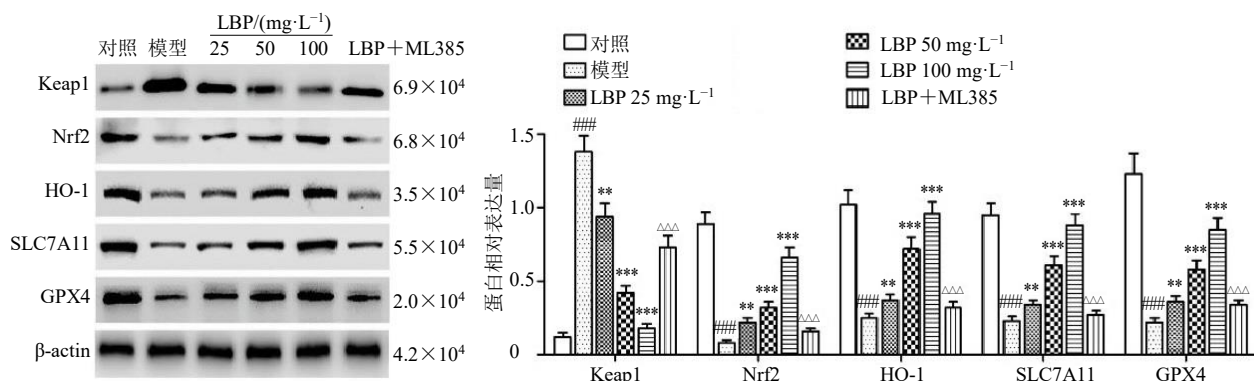
Fig. 3 Comparison of mitochondrial damage and expressions of ferroptosis related indicators of H9c2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 各组细胞 Nrf2/GPX4 通路相关蛋白表达比较

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞 Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.001$), Keap1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 枸杞多糖各剂量组 Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01, 0.001$), Keap1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01, 0.001$); 与枸杞多糖高剂量组比较, 枸杞多糖+ML385 组 Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.001$), Keap1 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.001$)。

4 讨论

铁死亡是一种新型的程序性细胞死亡通路, 其特点包括细胞内 Fe²⁺过载、ROS 积累以及广泛的脂质过氧化反应^[21]。研究显示, 缺氧应激能够诱导铁死亡相关蛋白表达上调^[22]。铁死亡可能导致心肌细胞损伤和凋亡, 进而引发各种心脏疾病^[23]。与上述研究一致, 本研究结果显示 H/R 诱导后, H9c2 细胞活力降低, TUNEL 阳性率升高, Fe²⁺水平升高, TfR1 表达降低, DMT1、FTH1、ACSL4 表达升高, 细胞 ROS、MDA 水平和 LDH 活性升高, GSH 水平和 SOD、CAT 活性降低, 进一步证实了 H/R 条

图 4 各组 H9c2 细胞 Nrf2/GPX4 通路相关蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Comparison of Nrf2/GPX4 pathway related protein expressions of H9c2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

件下铁死亡在心肌细胞损伤中的关键作用。缺血/再灌注是心肌损伤的主要原因，缺氧/复氧条件能够诱导线粒体复合物 III 产生更多的 ROS，ROS 通过破坏线粒体膜直接促进脂质过氧化反应，最终导致铁死亡发生^[24]。本研究观察到 H/R 诱导后，H9c2 细胞线粒体形态发生改变，包括线粒体缩短、膜密度增高且嵴数量减少，表明成功模拟了 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡过程。枸杞多糖已被证实能够有效减轻氧化应激诱导的心肌细胞损伤^[25]，抑制细胞凋亡^[26]，并保护线粒体功能^[27]。然而，枸杞多糖对 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡的影响尚不清楚。与上述研究一致，本研究发现枸杞多糖干预后，细胞活力升高，凋亡减少，ROS 积累和脂质过氧化程度减轻，线粒体形态趋于正常，进一步明确了枸杞多糖对 H/R 诱导心肌细胞损伤的保护作用。此外，枸杞多糖干预后，细胞 Fe^{2+} 水平以及铁死亡相关蛋白表达降低，

揭示了枸杞多糖在抑制铁死亡方面的新功能。

Nrf2/GPX4 通路在改善 H/R 诱导的细胞铁死亡中发挥重要作用。通常情况下，Nrf2 与 Keap1 结合并处于失活状态；当细胞受到缺氧刺激后，Nrf2 会从 Keap1 中释放并转移到细胞核内，激活 HO-1、SLC7A11 和 GPX4 等抗氧化酶的表达，从而增强细胞的抗氧化能力^[28]。已有研究显示，激活 Nrf2 通路能够减轻 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡^[29]。与上述研究一致，本研究同样发现 H/R 诱导后，H9c2 细胞 Keap1 表达升高，Nrf2、HO-1、SLC7A11、GPX4 表达降低，说明 H9c2 细胞中 Nrf2/GPX4 通路被抑制；并发现经过枸杞多糖干预后，细胞 Nrf2/GPX4 通路被激活，且 Nrf2/GPX4 通路抑制剂能够阻断枸杞多糖的保护作用，说明枸杞多糖可能通过 Nrf2/GPX4 通路发挥对 H/R 诱导心肌细胞铁死亡的抑制作用（图 5）。

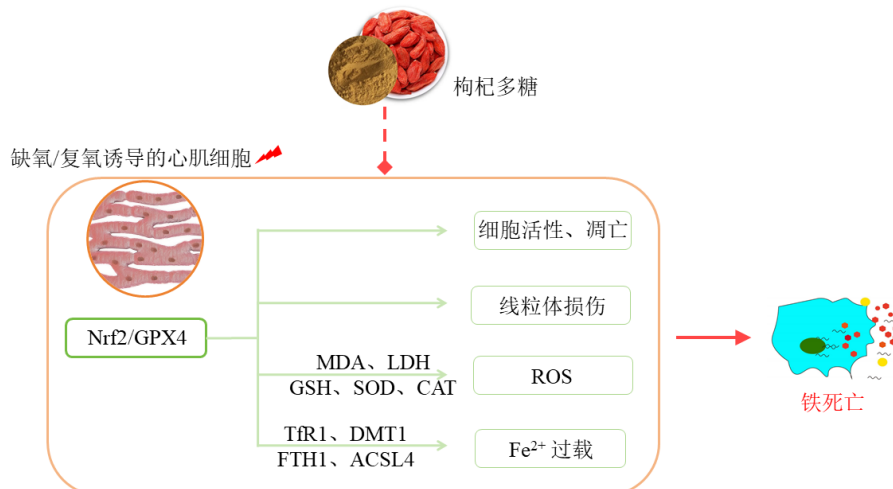


图 5 枸杞多糖调控 Nrf2/GPX4 通路抑制 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡

Fig. 5 *Lycium barbarum* polysaccharides inhibit H/R-induced ferroptosis in cardiomyocytes by regulating Nrf2/GPX4 pathway

综上,枸杞多糖能够改善 H/R 诱导的心肌细胞铁死亡,可能通过激活 Nrf2/GPX4 通路发挥作用,为中药治疗心肌缺血再灌注损伤提供了借鉴意义。但目前的研究仍存在一些不足,相关研究并未在体内进行验证。未来的研究将设置体内动物实验,并加快推进枸杞多糖在临床中的应用,以全面评估枸杞多糖在心肌缺血再灌注损伤中的疗效和安全性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Dai E Y, Chen X, Linkermann A, *et al.* A guideline on the molecular ecosystem regulating ferroptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2024, 26(9): 1447-1457.
- [2] Liu G Q, Xie X Y, Liao W, *et al.* Ferroptosis in cardiovascular disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 170: 116057.
- [3] Chen B X, Fan P, Song X, *et al.* The role and possible mechanism of the ferroptosis-related SLC7A11/GSH/GPX4 pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2024, 24(1): 531.
- [4] Wang J N, Jia N, Zhu K Y, *et al.* Shock wave therapy alleviates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury by inhibiting both apoptosis and ferroptosis [J]. *Anal Cell Pathol*, 2024, 2024: 8753898.
- [5] Song J J, Li S, Zhang B Y, *et al.* Quercetin protects human coronary artery endothelial cells against hypoxia/reoxygenation-induced mitochondrial apoptosis via the Nrf2/HO-1 axis [J]. *Biomed Res*, 2024, 45(5): 197-207.
- [6] Yao D S, Bao L X, Wang S C, *et al.* Isoliquiritigenin alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating the Nrf2/HO-1/SLC7a11/GPX4 axis in mice [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 221: 1-12.
- [7] 王飞飞, 陈伯艳, 李琼. 茯苓酸通过调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路抑制氧糖剥夺/复氧诱导的心肌细胞铁死亡 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2024, 22(2): 267-273.
- [8] Zhao C Y, Li J N. METTL14-mediated N⁶-methyladenosine modification induces the ferroptosis of hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocytes [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2024, 19(1): 265.
- [9] Lu Q Z, Yao X B, Zheng H, *et al.* SS-31 modification alleviates ferroptosis induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in hypoxia/reoxygenation cardiomyocytes [J]. *Heliyon*, 2024, 10(20): e38584.
- [10] Qiu Z Y, Shi K N, Li H H, *et al.* CBR-470-1 protects against cardiomyocyte death in ischaemia/reperfusion injury by activating the Nrf2-GPX4 cascade [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2024, 492: 117113.
- [11] Chen Y T, Ma L L, Yan Y Z, *et al.* *Ophiopogon japonicus* polysaccharide reduces doxorubicin-induced myocardial ferroptosis injury by activating Nrf2/GPX4 signaling and alleviating iron accumulation [J]. *Mol Med Rep*, 2025, 31(2): 36.
- [12] 张真, 郭宇祺, 李佩洋. 四逆汤治疗心血管病的研究进展 [J]. 光明中医, 2025, 40(4): 824-827.
- [13] 廖飞飞, 杨文文, 路爱梅, 等. 麝香通心滴丸调控 HIF-1 α /HO-1 通路抑制铁死亡缓解心肌缺血再灌注损伤研究 [J]. 陕西中医, 2025, 46(2): 147-152.
- [14] 孙文婷, 张小波, 郭盛, 等. 基于道地属性的枸杞子综合品质评价体系构建探索 [J]. 中草药, 2025, 56(5): 1489-1499.
- [15] 吴冰, 王轩. 基于 Notch 信号通路探讨枸杞多糖对糖尿病肾病大鼠肾纤维化的改善作用 [J]. 陕西医学杂志, 2023, 52(3): 267-272.
- [16] Feng Y Q, Song Y T, Zhou J, *et al.* Recent progress of *Lycium barbarum* polysaccharides on intestinal microbiota, microbial metabolites and health: A review [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 64(10): 2917-2940.
- [17] Gao Y, Li H G, Que Y K, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) suppresses hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced rat H9C2 cardiomyocytes pyroptosis via Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 280(Pt 4): 135924.
- [18] Yang H, Ding L Y, Xu B, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide alleviates ferroptosis in Sertoli cells through NRF2/SLC7A11/GPX4 pathway and ameliorates DEHP-induced male reproductive damage in mice [J]. *Int J Biol Macromol*, 2024, 282(Pt 5): 137241.
- [19] 马琳, 张蓓, 胡秀娟, 等. 枸杞多糖对小鼠海马神经元细胞系缺糖缺氧损伤保护作用及机制研究 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(4): 683-687.
- [20] 何飘, 朴美虹, 谢丽华, 等. 从肝治心组方通过 Nrf2/HO-1 通路对缺氧/复氧损伤 H9c2 心肌细胞铁死亡的影响 [J]. 中药药理与临床, 2024, 40(1): 16-23.
- [21] Wang Y W, Qiu J R, Yan H, *et al.* The Bach1/HO-1 pathway regulates oxidative stress and contributes to ferroptosis in doxorubicin-induced cardiomyopathy in H9c2 cells and mice [J]. *Arch Toxicol*, 2024, 98(6): 1781-1794.
- [22] Gao D X, Wu Y T, Zhan Y, *et al.* Chronic hypoxia drives the occurrence of ferroptosis in liver of fat greening (*Hexagrammos otakii*) by activating HIF-1 α and promoting iron production [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 285: 117135.
- [23] Ahola S, Langer T. Ferroptosis in mitochondrial cardiomyopathy [J]. *Trends Cell Biol*, 2024, 34(2): 150-

- 160.
- [24] Zhao L, Shi H T, Zhang F, *et al.* Hederagenin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuating ALOX5-mediated ferroptosis [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2024, 397(5): 3411-3424.
- [25] Wu F, Dang B R, Hu L M, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide inhibits blue-light-induced skin oxidative damage with the involvement of mitophagy [J]. *Photochem Photobiol*, 2024, 100(3): 604-621.
- [26] Li Y Q, Yang B, Zhang X P, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide antagonizes cardiomyocyte apoptosis by inhibiting the upregulation of GRK2 induced by I/R injury, and salvage mitochondrial fission/fusion imbalance and AKT/ENOS signaling [J]. *Cell Signal*, 2022, 92: 110252.
- [27] Wu H L, Liu Y J, Hao Y, *et al.* *Lycium barbarum* polysaccharide protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury via activation of SIRT3/CypD signaling [J]. *Ann Transl Med*, 2023, 11(2): 72.
- [28] Li C, Wu Z Y, Xue H, *et al.* Ferroptosis contributes to hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: Role of the SIRT1/Nrf2/GPx4 signaling pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2022, 28(12): 2268-2280.
- [29] 周云洁, 常红波, 王新洲. 龙牙楸木总皂苷通过调控 AMPK/Nrf2 信号抑制缺氧/复氧诱导的心肌细胞铁死亡 [J]. *中药材*, 2023, 46(12): 3091-3096.

[责任编辑 李亚楠]