

本文引用: 韩震海, 王飞飞, 潘立栋. 银杏素通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路抑制 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞铁死亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2023, 31(3): 231-237. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2023.03.008.

[文章编号] 1007-3949(2023)31-03-0231-07

· 实验研究 ·

银杏素通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路抑制 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞铁死亡

韩震海, 王飞飞, 潘立栋

(西安高新医院心血管内科一病区, 陕西省西安市 710000)

[摘要] **[目的]** 探讨银杏素调节核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4) 信号通路对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL) 诱导的血管内皮细胞铁死亡的影响。**[方法]** 将人脐静脉内皮细胞 EA.hy926 分为正常对照组(正常培养)、ox-LDL 组(50 mg/L ox-LDL)、银杏素低剂量组(50 mg/L ox-LDL+10 μmol/L 银杏素)、银杏素中剂量组(50 mg/L ox-LDL+20 μmol/L 银杏素)、银杏素高剂量组(50 mg/L ox-LDL+40 μmol/L 银杏素)、ML385 组(50 mg/L ox-LDL+40 μmol/L 银杏素+1 μmol/L 的 Nrf2 抑制剂 ML385)、Erastin 组(50 mg/L ox-LDL+40 μmol/L 银杏素+5 μmol/L 的 SLC7A11 抑制剂 Erastin)、RSL3 组(50 mg/L ox-LDL+40 μmol/L 银杏素+0.5 μmol/L 的 GPX4 抑制剂 RSL3); MTT 法检测细胞存活率; 试剂盒检测细胞超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH) 水平; 特异性荧光探针法检测细胞内铁含量; DCFH-DA 荧光探针法和氟硼二吡咯(BODIPYTM) 法检测细胞内活性氧(ROS) 和脂质 ROS 水平; Western blot 检测细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4、4-羟基壬烯酸(4-HNE)、环氧合酶 2(COX2)、p53 蛋白表达。**[结果]** 与正常对照组相比, ox-LDL 组细胞存活率、SOD 含量、GSH 含量以及 Nrf2、SLC7A11、GPX4 表达明显降低($P<0.05$), MDA 含量、细胞内 Fe²⁺ 含量、细胞内 ROS、脂质 ROS 以及 4-HNE、COX2、p53 表达显著升高($P<0.05$)。与 ox-LDL 组相比, 银杏素低、中、高剂量组细胞存活率、SOD 含量、GSH 含量及 Nrf2、SLC7A11、GPX4 表达明显升高($P<0.05$), MDA 含量、Fe²⁺ 含量、细胞内 ROS、脂质 ROS 及 4-HNE、COX2、p53 表达显著降低($P<0.05$)。与银杏素高剂量组相比, ML385 组、Erastin 组、RSL3 组均减弱了银杏素对 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞铁死亡的抑制作用。**[结论]** 银杏素通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路抑制 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞铁死亡。

[关键词] 银杏素; Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路; 血管内皮细胞; 铁死亡; 氧化型低密度脂蛋白

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

Influences of ginkgetin on ox-LDL-induced ferroptosis in vascular endothelial cells by regulating Nrf2/SLC7A11/GPX4 signaling pathway

HAN Zhenhai, WANG Feifei, PAN Lidong

(The First Ward, Department of Cardiovascular Medicine, Xi'an Gaixin Hospital, Xi'an, Shaanxi 710000, China)

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the influences of ginkgetin on the ferroptosis of vascular endothelial cells induced by oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) by regulating the nuclear factor erythroid-2 related factor 2 (Nrf2)/solute carrier protein 7 family member 11 (SLC7A11)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway. **Methods** Human umbilical vein cell fusion cells EA.hy926 were grouped into normal control group (normal culture), ox-LDL group (50 mg/L ox-LDL), and ginkgetin low dose group (50 mg/L ox-LDL+10 μmol/L ginkgetin), middle dose group (50 mg/L ox-LDL+20 μmol/L ginkgetin), high dose group (50 mg/L ox-LDL+40 μmol/L ginkgetin), ML385 group (50 mg/L ox-LDL+40 μmol/L ginkgetin+1 μmol/L Nrf2 inhibitor ML385), Erastin group (50 mg/L ox-LDL+40 μmol/L ginkgetin+5 μmol/L SLC7A11 inhibitor Erastin), RSL3 group (50 mg/L ox-LDL+40 μmol/L ginkgetin+0.5 μmol/L GPX4 inhibitor RSL3). Cell viability was detected by tetramethylazolium salt (MTT) method. The kits were applied to detect the levels of

[收稿日期] 2022-08-11

[修回日期] 2022-12-30

[基金项目] 西安市科技计划项目(20YXJ003(2))

[作者简介] 韩震海, 主治医师, 研究方向为心内科相关疾病诊断与治疗, E-mail: Hanzh1222@163.com。通信作者潘立栋, 主治医师, 研究方向为心内科相关疾病诊断与治疗, E-mail: 865269093@qq.com。

cellular superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH). The intracellular iron content was detected by specific fluorescent probe method. The levels of intracellular reactive oxygen species (ROS) and lipid ROS were detected by 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe method and boron dipyrrole (BODIPY™) method; Western blot was applied to detect the protein expressions of cellular Nrf2, SLC7A11, GPX4, 4-hydroxynonenic acid (4-HNE), cyclooxygenase 2 (COX2), and p53. **Results** Compared with the normal control group, the cell viability, SOD content, GSH content, expressions of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 were obviously decreased in the ox-LDL group ($P < 0.05$); the MDA content, Fe^{2+} content, ROS, lipid ROS, expressions of 4-HNE, COX2, p53 were obviously increased ($P < 0.05$). Compared with the ox-LDL group, the cell viability, SOD content, GSH content, expressions of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 were obviously increased in low, middle and high dose groups of ginkgetin ($P < 0.05$); the MDA content, Fe^{2+} content, ROS, lipid ROS, expressions of 4-HNE, COX2, p53 were obviously decreased ($P < 0.05$). Compared with the high dose ginkgetin group, the ML385 group, Erastin group and RSL3 group attenuated the inhibitory effect of ginkgetin on ox-LDL-induced vascular endothelial cell ferroptosis. **Conclusion** Ginkgetin inhibits ox-LDL-induced vascular endothelial cell ferroptosis by activating the Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway.

[**KEY WORDS**] ginkgetin; Nrf2/SLC7A11/GPX4 pathway; vascular endothelial cells; ferroptosis; oxidized low density lipoprotein

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种常见的进行性血管病变,发病率越来越高,是冠心病和心肌梗死的主要病因^[1-2]。铁死亡是一种铁依赖的抗氧化系统失衡,其特征是细胞内铁的增加和抗氧化能力的降低导致过氧化脂质的致死性积累,铁死亡已被证明对多种疾病具有重要意义^[3]。氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)在血管壁过度沉积可通过促进炎症和氧化应激损伤加速内皮细胞凋亡,而铁死亡过程也伴随着氧化应激损伤,并且有证据表明,铁死亡在As的发生发展中起到重要作用^[4]。例如,细胞内铁超载会诱导血管内皮细胞铁死亡,从而导致血管内皮细胞氧化还原失衡和细胞抗氧化功能障碍^[5]。银杏素是从银杏叶中提取的一种天然双黄酮类化合物,已被证明具有抗炎、抗真菌、抗癌、神经和血管保护活性等作用,具有较广泛的应用前景^[6]。郭丽等^[7]研究发现银杏素可通过抑制核因子 κB (nuclear factor- κB , NF- κB)信号通路活化,降低炎症因子的分泌从而缓解高糖刺激的人微血管内皮细胞(human microvascular endothelial cells, HMEC)的炎症反应。核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid-2 related factor 2, Nrf2)是抗氧化反应的关键调节因子,在铁/血红素代谢、脂质代谢以及细胞凋亡等关键代谢途径中起着至关重要的作用,已成为脂质过氧化和铁质疏松的主要调节剂^[8]。溶质载体家族7成员11(solute carrier protein 7 family member 11, SLC7A11)和谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)是Nrf2的重要下游因子,值得注意的是,已有研究证明Nrf2/SLC7A11/GPX4通路与铁死亡现象关系密切^[9]。SLC7A11是胱氨

酸/谷氨酸转运蛋白的重要组成部分,可调节细胞脂质过氧化,抑制铁质增多^[10]。GPX4作为一种抗氧化酶,可清除脂质过氧化物在细胞中的积累,从而抑制铁死亡发生^[11]。另外,Wang等^[12]研究发现抑制SLC7A11的活性,下调GPX4会导致肝癌细胞铁积累和脂质活性氧(ROS)的增加进而导致肝癌细胞铁中毒引起死亡。同样,Yuan等^[13]报道了山奈酚可以通过激活Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路提高葡萄糖剥夺/再灌注(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)诱导的神经元铁死亡保护作用。而银杏素能否通过激活Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路抑制血管内皮细胞铁死亡尚不明确。因此,本文主要探究银杏素调节Nrf2/SLC7A11/GPX4信号通路对ox-LDL诱导的血管内皮细胞铁死亡的影响。

1 材料和方法

1.1 主要材料

人脐静脉内皮细胞 EA.hy926 购自中国科学院上海细胞库。银杏素(CFN90173)购自武汉天植生物技术有限公司;DMEM培养基(12100-500)和四甲基偶氮唑盐(MTT, M8180-1)购自北京索莱宝科技有限公司;Nrf2抑制剂ML385(HY-100523)、SLC7A11抑制剂Erastin(HY-15763)、GPX4抑制剂RSL3(HY-100218A)购自MCE公司;胎牛血清(FBS, 10099141)购自美国Gibco公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(A001-3-2)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒(A003-1-1)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定试剂盒(A006-2-1)购自南京建成生物工程研究

所; 氟硼二吡咯 (BODIPY™) 581/591 C11 (D3861) 购自美国赛默飞世尔科技公司; Iron Assay 试剂盒 (ab83366)、抗体 Nrf2 (ab158547)、SLC7A11 (ab164946)、GPX4 (ab15684)、4-羟基壬烯酸 (4-Hydroxy-2-nonenal, 4-HNE) (ab46545)、环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX2) (ab10245)、p53 (ab26)、 β -actin (ab8226) 及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗 (ab205718) 均购自美国 Abcam 公司。

1.2 细胞培养

EA. hy926 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中, 培养于 37 °C 含 5% CO₂ 培养箱中。定期观察, 2~3 天换液, 当细胞达 85% 以上融合时进行传代或进行实验。

1.3 细胞分组与干预

取对数生长期 EA. hy926 细胞, 以 1×10^4 个/孔, 每孔 100 μ L 接种到 96 孔板中培养过夜。将 EA. hy926 细胞分为正常对照组 (正常培养)、ox-LDL 组^[3] (50 mg/L ox-LDL 处理细胞)、银杏素低剂量组 (50 mg/L ox-LDL+10 μ mol/L 银杏素处理细胞)、银杏素中剂量组 (50 mg/L ox-LDL+20 μ mol/L 银杏素处理细胞)、银杏素高剂量组^[6] (50 mg/L ox-LDL+40 μ mol/L 银杏素处理细胞)、ML385 组^[13] (50 mg/L ox-LDL+40 μ mol/L 银杏素+1 μ mol/L 的 Nrf2 抑制剂 ML385 处理细胞)、Erastin 组^[14] (50 mg/L ox-LDL+40 μ mol/L 银杏素+5 μ mol/L 的 SLC7A11 抑制剂 Erastin 处理细胞)、RSL3 组^[14] (50 mg/L ox-LDL+40 μ mol/L 银杏素+0.5 μ mol/L 的 GPX4 抑制剂 RSL3 处理细胞)。

1.4 MTT 法检测细胞存活率

取对数生长期 EA. hy926 细胞, 以 1×10^4 个/孔, 每孔 100 μ L 细胞液接种到 96 孔板中, 分别将各组细胞培养 24 h 后加入 20 μ L MTT 溶液 (5 g/L), 37 °C 孵育 4 h 后, 小心吸出上清液, 再加入 150 μ L 的 DMSO 震荡 10 min 充分溶解紫色结晶, 使用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度。

1.5 SOD、MDA、GSH 和 Fe²⁺ 含量检测

收集各组 EA. hy926 细胞, 加入提取液用超声粉碎仪粉碎制成细胞匀浆, 按照说明书步骤测定细胞 SOD、MDA、GSH 和 Fe²⁺ 含量。

1.6 细胞内 ROS 和脂质 ROS 水平检测

收集各组 EA. hy926 细胞, 加入终浓度为 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 探针或 1 μ mol/L 的 C11-BODIPY 581/591 荧光探针, 分别在 37 °C 下避光孵育 30 min, 用无血清培养液洗涤细胞后重悬细胞, 流式细胞仪分

别检测细胞内 ROS 含量和细胞内脂质 ROS 含量。

1.7 Western blot 检测蛋白表达

收集各组细胞加入 RIPA 裂解缓冲液裂解, 提取总蛋白。在 SDS-PAGE 凝胶中分离, 并转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 并在 4 h 内与一抗 SLC7A11、GPX4、Nrf2、4-HNE、COX2、p53 和 β -actin 在 4 °C 孵育过夜, 再将膜与稀释后的二抗在室温下孵育 1 h, 洗涤后加入 ECL 检测试剂, 观察蛋白条带, Image J 软件评估蛋白的灰度值。

1.8 统计分析

使用 SPSS25.0 软件进行数据分析。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 SNK-*q* 检验。P<0.05 被认为差异具有显著性。

2 结果

2.1 细胞存活率

与正常对照组相比, ox-LDL 组细胞存活率下降了 46.08% (P<0.05); 与 ox-LDL 组相比, 银杏素低、中、高剂量组细胞存活率分别升高 32.02%、48.55%、70.09%, 并呈剂量依赖性 (均 P<0.05); 与银杏素高剂量组相比, ML385 组、Erastin 组和 RSL3 组细胞存活率分别下降 14.56%、18.31%、10.89% (均 P<0.05; 图 1)。

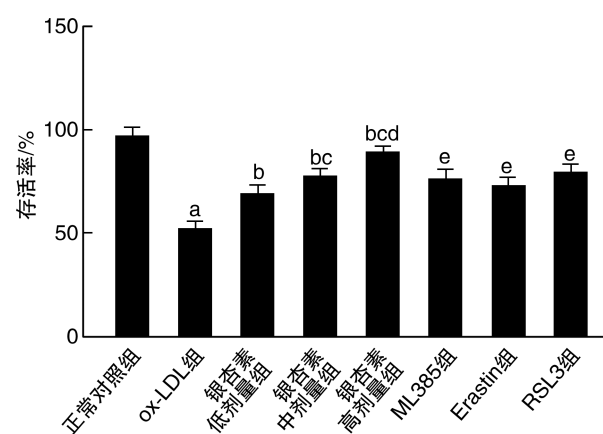


图 1. 各组细胞存活率情况 (n=6)

a 为 P<0.05, 与正常对照组相比; b 为 P<0.05, 与 ox-LDL 组相比; c 为 P<0.05, 与银杏素低剂量组相比; d 为 P<0.05, 与银杏素中剂量组相比; e 为 P<0.05, 与银杏素高剂量组相比。

Figure 1. Survival rate of cells in each group (n=6)

2.2 SOD、MDA、GSH 和 Fe²⁺ 含量

与正常对照组相比, ox-LDL 组细胞 SOD 和

GSH 含量分别下降 63.84% 和 59.59%, MDA 和 Fe^{2+} 含量分别上升 1.53 倍、1.36 倍(均 $P < 0.05$); 与 ox-LDL 组相比, 银杏素低、中、高剂量组细胞 SOD 和 GSH 含量分别升高 0.46 倍、0.81 倍、1.32 倍和 0.46 倍、0.89 倍、1.27 倍, MDA 和 Fe^{2+} 含量分别降低 17.89%、36.68%、51.09% 和 28.60%、42.26%、

54.28% (均 $P < 0.05$); 与银杏素高剂量组相比, ML385 组、Erastin 组、RSL3 组细胞 SOD 和 GSH 含量分别下降 30.49%、35.47%、22.58% 和 44.00%、45.63%、41.07%, MDA 和 Fe^{2+} 含量升高 0.48 倍、0.34 倍、0.47 倍和 0.35 倍、0.37 倍、0.42 倍(均 $P < 0.05$; 表 1)。

表 1. 各组 SOD、MDA、GSH 和 Fe^{2+} 含量($n=6$)

Table 1. Contents of SOD, MDA, GSH and Fe^{2+} in each group($n=6$)

分组	SOD/(U/mL)	MDA/(μ mol/L)	GSH/(mg/L)	Fe^{2+} /(μ mol/L)
正常对照组	17.45 \pm 1.69	3.97 \pm 0.39	14.08 \pm 1.22	2.33 \pm 0.29
ox-LDL 组	6.31 \pm 1.07 ^a	10.06 \pm 0.46 ^a	5.69 \pm 0.91 ^a	5.49 \pm 0.34 ^a
银杏素低剂量组	9.24 \pm 0.99 ^b	8.26 \pm 0.52 ^b	8.32 \pm 0.79 ^b	3.92 \pm 0.16 ^b
银杏素中剂量组	11.42 \pm 1.34 ^{bc}	6.37 \pm 0.27 ^{bc}	10.77 \pm 1.23 ^{bc}	3.17 \pm 0.22 ^{bc}
银杏素高剂量组	14.66 \pm 1.16 ^{bed}	4.92 \pm 0.32 ^{bed}	12.93 \pm 1.14 ^{bed}	2.51 \pm 0.19 ^{bed}
ML385 组	10.19 \pm 0.72 ^e	7.12 \pm 0.52 ^e	7.24 \pm 0.83 ^e	3.39 \pm 0.49 ^e
Erastin 组	9.46 \pm 0.79 ^e	6.59 \pm 0.29 ^e	7.03 \pm 0.75 ^e	3.45 \pm 0.41 ^e
RSL3 组	11.35 \pm 1.16 ^e	7.25 \pm 0.48 ^e	7.62 \pm 0.81 ^e	3.52 \pm 0.52 ^e

注:a 为 $P < 0.05$, 与正常对照组相比;b 为 $P < 0.05$, 与 ox-LDL 组相比;c 为 $P < 0.05$, 与银杏素低剂量组相比;d 为 $P < 0.05$, 与银杏素中剂量组相比;e 为 $P < 0.05$, 与银杏素高剂量组相比。

2.3 细胞内 ROS 含量和脂质 ROS 含量

与正常对照组相比, ox-LDL 组细胞内 ROS 和脂质 ROS 含量分别升高 1.41 倍和 1.95 倍(均 $P < 0.05$); 与 ox-LDL 组相比, 银杏素低、中、高剂量组细胞内 ROS 和脂质 ROS 含量分别降低了 23.19%、

33.59%、48.11% 和 24.54%、41.08%、55.94% (均 $P < 0.05$); 与银杏素高剂量组相比, ML385 组、Erastin 组、RSL3 组细胞内 ROS 和脂质 ROS 含量分别升高了 0.25 倍、0.18 倍、0.32 倍和 0.41 倍、0.33 倍、0.48 倍(均 $P < 0.05$; 图 2、图 3 和表 2)。

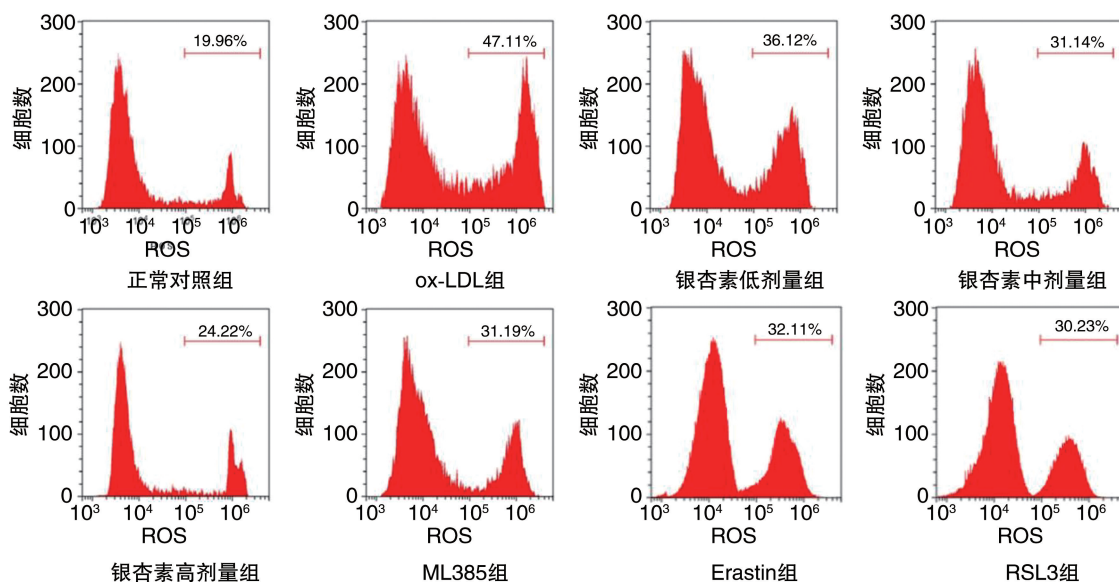


图 2. 各组细胞内 ROS 含量($n=6$)

Figure 2. Intracellular ROS content in each group($n=6$)

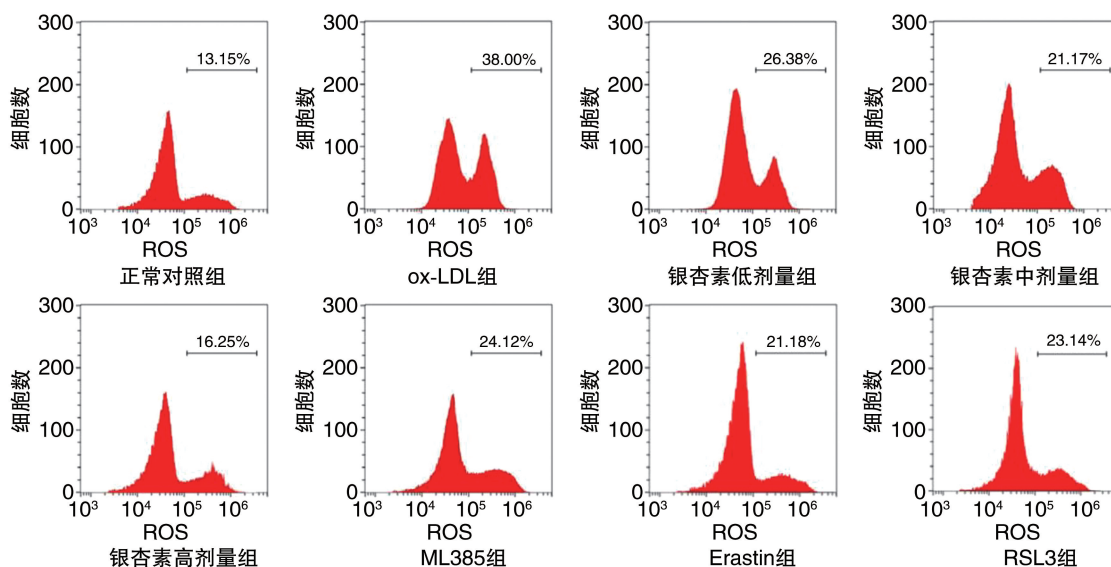


图 3. 各组细胞内脂质 ROS 含量 (n=6)

Figure 3. Intracellular lipid ROS content in each group (n=6)

表 2. 各组细胞内 ROS 含量和脂质 ROS 含量 (n=6)

Table 2. Intracellular ROS content and lipid ROS content in each group (n=6) 单位: %

分组	ROS 含量	脂质 ROS 含量
正常对照组	20.39±2.14	12.75±1.98
ox-LDL 组	49.12±2.67 ^a	37.61±1.52 ^a
银杏素低剂量组	37.73±1.93 ^b	28.38±2.74 ^b
银杏素中剂量组	32.62±2.34 ^{bc}	22.16±2.34 ^{bc}
银杏素高剂量组	25.49±2.07 ^{bcd}	16.57±2.11 ^{bcd}
ML385 组	31.91±1.69 ^e	23.34±1.65 ^e
Erastin 组	30.08±1.57 ^e	21.99±1.52 ^e
RSL3 组	33.75±1.76 ^e	24.58±1.67 ^e

注: a 为 P<0.05, 与正常对照组相比; b 为 P<0.05, 与 ox-LDL 组相比; c 为 P<0.05, 与银杏素低剂量组相比; d 为 P<0.05, 与银杏素中剂量组相比; e 为 P<0.05, 与银杏素高剂量组相比。

2.4 细胞中 Nrf2、SLC7A11、GPX4、4-HNE、COX2、p53 蛋白表达情况

与正常对照组相比, ox-LDL 组细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 表达分别下降 50.23%、53.73%、50.00%, 4-HNE、COX2 和 p53 表达分别上升 0.94 倍、0.98 倍、0.35 倍(均 P<0.05)。与 ox-LDL 组相比, 银杏素低、中、高剂量组细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 表达分别升高 0.47 倍、0.70 倍、0.91 倍, 0.32 倍、0.64 倍、0.96 倍和 0.37 倍、0.81 倍、1.10 倍, 4-HNE、COX2 和 p53 的表达分别降低 19.00%、30.32%、41.63%、14.06%、24.28%、34.38% 和 10.12%、19.05%、27.98% (均 P<0.05)。与银杏素高剂量组相比, ML385 组细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 表达分

别下降 30.3%、21.15%、28.46%, 4-HNE、COX2 和 p53 表达分别升高 0.26 倍、0.21 倍、0.17 倍(均 P<0.05); Erastin 组细胞 SLC7A11、GPX4 表达分别下降 18.27%、30.77%, 4-HNE、COX2 和 p53 表达分别升高 0.23 倍、0.17 倍、0.20 倍(均 P<0.05); RSL3 组细胞 GPX4 表达下降 25.38%, 4-HNE、COX2 和 p53 表达分别升高 0.20 倍、0.18 倍、0.16 倍(均 P<0.05; 图 4)。

3 讨论

As 是一种威胁人类生命的复杂慢性病变。ox-LDL 是一种作用广泛的风险因子, 通过促进内皮细胞损伤、斑块形成和炎性细胞因子释放参与 As 的发生和发展^[15]。铁死亡作为一种新型的细胞死亡方式, 成为许多疾病机制研究与干预的新靶点。

与细胞凋亡、细胞坏死、细胞自噬等死亡形式不同, 铁死亡主要表现为铁依赖的活性氧和脂质过氧化积累, COX2 上调、GSH 的耗竭和 GPX4 的失活等^[16-17]。GPX4 是一种抗氧化酶, 是铁死亡的关键调节因子, 它将 GSH 作为辅助因子催化脂质过氧化物的还原, 同时, GSH 也受 SLC7A11 的影响, 当 SLC7A11 的活性被抑制时, 会导致 GSH 合成降低, 引发氧化损伤, 最终导致铁死亡的发生^[18-19]。Nrf2 是一种关键的抗氧化转录因子, 它可增加 SLC7A11 和 GPX4 的表达^[20]。p53 是一种抑癌基因, 最近研究发现 p53 可以通过抑制 SLC7A11 的表达, 降低 GPX4 活性而激活铁死亡病理过程^[21]。4-HNE 是

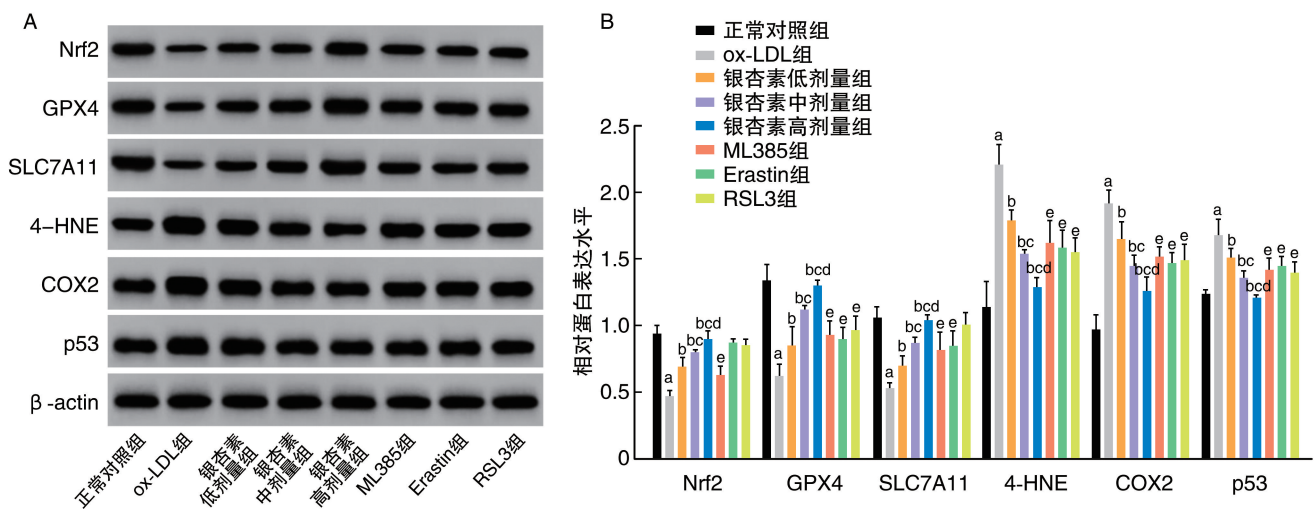


图 4. 各组细胞中 Nrf2、SLC7A11、GPX4、4-HNE、COX2 和 p53 蛋白表达情况 ($n=6$)

a 为 $P<0.05$, 与正常对照组相比; b 为 $P<0.05$, 与 ox-LDL 组相比; c 为 $P<0.05$, 与银杏素低剂量组相比; d 为 $P<0.05$, 与银杏素中剂量组相比; e 为 $P<0.05$, 与银杏素高剂量组相比。

Figure 4. Expression of Nrf2, SLC7A11, GPX4, 4-HNE, COX2 and p53 proteins in each group of cells ($n=6$)

脂质过氧化的最终产物,已被确定为参与调节细胞增殖、铁死亡和细胞凋亡的关键第二信使^[22]。近期有报道用 ox-LDL 处理血管内皮细胞后表现出铁死亡的特征,铁死亡抑制剂的使用明显逆转了细胞的死亡^[23]。本研究发现与文献报道一致,ox-LDL 诱导 EA. hy926 细胞死亡,并伴随着 MDA、 Fe^{2+} 、ROS、脂质 ROS 含量以及 4-HNE、COX2、p53 蛋白表达的增加,SOD、GSH 含量以及 Nrf2、GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达的降低,诱导铁死亡的发生。

银杏素是银杏叶中的一种天然双黄酮类化合物,已被证明具有抗炎、抗癌和减轻 As 等作用,具有广阔的应用前景^[24]。有研究表明银杏素在 TNF- α 诱导的成纤维样滑膜细胞 (fibroblast-like synoviocytes, FLS) 炎症细胞模型和胶原诱导的关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 大鼠模型中,可以通过上调 TNF 受体相关因子 3 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 3, TRAF3) 表达,降低炎症因子的分泌,减轻 CIA 大鼠的关节症状^[6]。已有将银杏叶提取物用于治疗心脑血管疾病的报道。Lian 等^[25]建立了大鼠 As 模型,发现银杏素可改善 As 大鼠的胸主动脉内膜结构,减少主动脉中的脂质沉积,降低大鼠的血清总胆固醇、甘油三酯和低密度脂蛋白胆固醇水平,对实验性 As 具有治疗作用。已证明铁死亡参与 As 的发病过程,过量的铁和脂质过氧化是铁死亡的主要机制,也是 As 发病的危险因素^[26]。因此抑制铁死亡减轻脂质过氧化和血管内皮的损伤,可以减轻血管粥样硬化进程。本研究结果发现,与

ox-LDL 组比较,银杏素低、中、高剂量组的细胞存活率、SOD 含量、GSH 含量以及 Nrf2、GPX4 和 SLC7A11 表达显著升高,ROS、脂质 ROS、MDA 含量、 Fe^{2+} 含量以及 COX2、4-HNE 和 p53 表达显著降低,提示银杏素通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路抑制 ox-LDL 诱导的 EA. hy926 细胞铁死亡。当分别使用 Nrf2、SLC7A11、GPX4 抑制剂 ML385、Erastin、RSL3 时减弱了银杏素对 EA. hy926 细胞的有益作用,说明银杏素确实可通过激活 Nrf2/SLC7A11/GPX4 通路抑制 ox-LDL 诱导的 EA. hy926 细胞铁死亡,为开发银杏素作为治疗 As 的天然药物提供了实验依据。

本研究为 As 的药物研发提供新的靶点和治疗策略。然而本研究仅仅从细胞层面研究银杏素对 ox-LDL 诱导的铁死亡的作用机制,后续将从动物层面进行更深层次的研究。

[参考文献]

- [1] KHYZHA N, ALIZADA A, WILSON M D, et al. Epigenetics of atherosclerosis: emerging mechanisms and methods [J]. Trends Mol Med, 2017, 23(4): 332-347.
- [2] CHENG X L, DING F, WANG D P, et al. Hexarelin attenuates atherosclerosis via inhibiting LOX-1-NF- κ B signaling pathway-mediated macrophage ox-LDL uptake in ApoE^{-/-} mice [J]. Peptides, 2019, 121: 170122.
- [3] OUYANG S Y, YOU J, ZHI C X, et al. Ferroptosis: the potential value target in atherosclerosis [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(8): 782.
- [4] MAO P, LIU X W, WEN Y Z, et al. LncRNA SNHG12

- regulates ox-LDL-induced endothelial cell injury by the miR-218-5p/IGF2 axis in atherosclerosis[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(16): 1561-1577.
- [5] LIN X Y, OUYANG S Y, ZHI C X, et al. Focus on ferroptosis, pyroptosis, apoptosis and autophagy of vascular endothelial cells to the strategic targets for the treatment of atherosclerosis[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2022, 715: 109098.
- [6] 吕昌伟, 张静涛, 郝海涛, 等. 银杏素促进成纤维样滑膜细胞中 TRAF3 蛋白的表达缓解类风湿关节炎[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(2): 178-184.
- LYU C W, ZHANG J T, XI H T, et al. Ginkgetin alleviates rheumatoid arthritis by promoting TRAF3 protein expression in fibroblast-like synoviocytes[J]. *Chin J of Osteoporos*, 2022, 28(2): 178-184.
- [7] 郭丽, 路青瑜, 张启云, 等. 银杏双黄酮对高糖致微血管内皮细胞炎症反应的保护作用及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(10): 1463-1469.
- GUO L, LU Q Y, ZHANG Q Y, et al. Protective effect and mechanism of ginkgo biflavones on inflammatory response of microvascular endothelial cells caused by high glucose[J]. *Chin Pharmacol Bulletin*, 2020, 36(10): 1463-1469.
- [8] DODSON M, CASTRO P R, ZHANG D D. Nrf2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2019, 23:101107.
- [9] YU W, LIU W D, XIE D, et al. High level of uric acid promotes atherosclerosis by targeting NRF2-mediated autophagy dysfunction and ferroptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9304383.
- [10] ZHAO X H, GAO M, LIANG J, et al. SLC7A11 reduces Laser-induced choroidal neovascularization by inhibiting RPE ferroptosis and VEGF production[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 639851.
- [11] 黄紫霞, 吴明月, 许峰, 等. 柴胡皂苷 A 通过抑制氧化应激和铁死亡减轻过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(1): 43-48.
- HUANG Z X, WU M Y, XU F, et al. Saikosaponin A inhibits oxidative stress and ferroptosis and reduces the injury of human umbilical vein endothelial cells induced by hydrogen peroxide[J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(1): 43-48.
- [12] WANG Q J, BIN C, XUE Q, et al. GSTZ1 sensitizes hepatocellular carcinoma cells to sorafenib-induced ferroptosis via inhibition of NRF2/GPX4 axis[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(5): 426.
- [13] YUAN Y, ZHAI Y Y, CHEN J J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(7): 923.
- [14] HAN L, BAI L, FANG X, et al. SMG9 drives ferroptosis by directly inhibiting GPX4 degradation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 567: 92-98.
- [15] 李敏, 张丹, 张林, 等. 银杏花化学成分对血管内皮细胞铁死亡的抑制作用[J]. *国际药学研究杂志*, 2020, 47(10): 857-862.
- LI M, ZHANG D, ZHANG L, et al. The inhibitory effect of chemical components from Ginkgo biloba flower on ferroptosis in vascular endothelial cells[J]. *J Int Pharm Res*, 2020, 47(10): 857-862.
- [16] MOU Y H, WANG J, WU J C, et al. Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer[J]. *J Hematol Oncol*, 2019, 12(1): 34.
- [17] YAN N, ZHANG J. Iron metabolism, ferroptosis, and the links with Alzheimer's disease[J]. *Front Neurosci*, 2020, 13: 1443.
- [18] HAMBRIGHT W S, FONSECA R S, CHEN L J, et al. Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration[J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 8-17.
- [19] 赵雨霏, 陶圆, 颜晓菁. SLC7A11 基因在恶性肿瘤中的研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(15): 795-799.
- ZHAO Y F, TAO Y, YAN X J. Emerging insights into the functional role of the SLC7A11 gene in malignant neoplasms[J]. *Chin J Clin Oncol*, 2019, 46(15): 795-799.
- [20] MA H D, WANG X D, ZHANG W L, et al. Melatonin suppresses ferroptosis induced by high glucose via activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway in type 2 diabetic osteoporosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9067610.
- [21] 张丽媛, 李芙蓉, 王超, 等. p53 对铁死亡的调节作用及潜在应用[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(12): 2299-2304.
- ZHANG L Y, LI F R, WANG C, et al. Emerging roles of p53 in ferroptosis and its potential application[J]. *Chin J of Pathophysiol*, 2019, 35(12): 2299-2304.
- [22] KIM S H, YUM H W, KIM S H, et al. Topically applied taurine chloramine protects against UVB-induced oxidative stress and inflammation in mouse skin[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(6): 867.
- [23] WUNDERER F, TRAEGER L, SIGURSLID H H, et al. The role of hepcidin and iron homeostasis in atherosclerosis[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 153: 104664.
- [24] ADNAN M, RASUL A, HUSSAIN G, et al. Ginkgetin; a natural biflavone with versatile pharmacological activities[J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 145: 111642.
- [25] LIAN N, TONG J, LI W, et al. Ginkgetin ameliorates experimental atherosclerosis in rats[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 510-516.
- [26] 蔡婉. 铁死亡机制及其在动脉粥样硬化中的应用研究进展[J]. *疑难病杂志*, 2022, 21(3): 309-311.
- CAI W. Research progress on the mechanism of ferroptosis and its application in atherosclerosis[J]. *Chin J Diffic and Compl Cas*, 2022, 21(3): 309-311, 316.

(此文编辑 许雪梅)