

本文引用: 谈世铭, 曹子彤, 王晶晶, 等. 膜联蛋白 A1 模拟肽 Ac2-26 对 RSL3 诱导的人脐静脉内皮细胞铁死亡及线粒体功能的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(4): 303-309, 341. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.04.004.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-04-0303-07

· 实验研究 ·

## 膜联蛋白 A1 模拟肽 Ac2-26 对 RSL3 诱导的人脐静脉内皮细胞铁死亡及线粒体功能的影响

谈世铭<sup>1</sup>, 曹子彤<sup>1</sup>, 王晶晶<sup>1</sup>, 贾金秋<sup>1</sup>, 李珂怡<sup>1</sup>, 蔡泽民<sup>2</sup>, 王佐<sup>1</sup>

1. 南华大学心血管疾病研究所 动脉硬化化学湖南省重点实验室 湖南省动脉硬化性疾病国际科技创新合作基地,
2. 南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001

**[摘要]** [目的] 探究膜联蛋白 A1 模拟肽 Ac2-26 对人脐静脉内皮细胞(HUVEC)铁死亡的影响及其机制。**[方法]** 用经典铁死亡激动剂 RSL3 诱发 HUVEC 铁死亡, 然后用膜联蛋白 A1 模拟肽 Ac2-26 进行干预。CCK-8 试剂盒检测细胞数量与活力, ELISA 检测丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)水平, Western blot 检测铁死亡相关分子及黏附分子表达, C11-BODIPY 荧光探针检测脂质活性氧(ROS)水平, MitoSOX 检测线粒体活性氧(mtROS)水平, FeRhoNOX-1 荧光探针检测细胞内 Fe<sup>2+</sup> 含量, 透视显微镜观察线粒体形态, JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位, 试剂盒检测 ATP 含量, 划痕实验检测细胞迁移能力, 硝酸还原酶法检测一氧化氮(NO)水平。**[结果]** Ac2-26 抑制 RSL3 诱导的 HUVEC 活力下降, 上调抑制铁死亡蛋白溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)、GPX4 和铁蛋白重链 1(FTH1)的表达, 增加 GSH 含量, 降低 MDA 含量, 减少细胞内脂质 ROS 生成, 降低细胞内 Fe<sup>2+</sup> 聚集( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); Ac2-26 抑制 RSL3 诱导 HUVEC 线粒体形态和功能的损伤, 上调 ATP 含量( $P < 0.05$ )及线粒体膜电位( $P < 0.001$ ); Ac2-26 抑制 RSL3 诱导的 HUVEC 迁移能力的下降, 上调 NO 水平, 抑制细胞间黏附分子 1(ICAM-1)及白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的蛋白表达( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**[结论]** Ac2-26 抑制 RSL3 诱导的 HUVEC 铁死亡, 并维护线粒体形态与功能及 HUVEC 功能。

**[关键词]** 动脉粥样硬化; 铁死亡; 线粒体; 膜联蛋白 A1; Ac2-26; RSL3

**[中图分类号]** R5; R363

**[文献标识码]** A

### Effects of annexin A1 mimic peptide Ac2-26 on ferroptosis and mitochondrial function of human umbilical vein endothelial cells induced by RSL3

TAN Shiming<sup>1</sup>, CAO Zitong<sup>1</sup>, WANG Jingjing<sup>1</sup>, JIA Jinqiu<sup>1</sup>, LI Keyi<sup>1</sup>, CAI Zemin<sup>2</sup>, WANG Zuo<sup>1</sup>

1. Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Laboratory of Arterial Hard Chemistry of Hunan Province & Hunan Province Arteriosclerotic Disease International Scientific and Technological Innovation Cooperation Base, 2. The First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China

**[ABSTRACT]** **Aim** To explore the effect and mechanism of annexin A1 mimic peptide Ac2-26 on ferroptosis in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). **Methods** Induction of HUVEC ferroptosis was achieved by the classical ferroptosis agonist RSL3, with subsequent intervention by the annexin A1 mimetic peptide Ac2-26. The cell number and viability were detected by CCK-8 kit, the levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were detected by ELISA, the expression of ferroptosis-related molecules and adhesion molecules was detected by Western blot, the lipid reactive oxygen species (ROS) levels were detected by C11-BODIPY fluorescent probe, and the mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) levels were detected by MitoSOX probe. FeRhoNOX-1 fluorescent probe was used to detect intracellular Fe<sup>2+</sup> content, perspective microscopy was used to observe mitochondrial morphology, JC-1 fluorescent probe was used to detect mitochondrial membrane potential, kit was used to detect ATP levels, the Scratch assay was used to detect cell migration ability, and nitrate reductase assay was used to detect nitric oxide (NO) level. **Results** Ac2-26 inhibi-

[收稿日期] 2024-10-25

[修回日期] 2025-03-18

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目(2024JJ9395)

[作者简介] 谈世铭, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病学与防治研究, E-mail: 719582339@qq.com。通信作者王佐, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化发病学与防治研究, E-mail: smt121101@163.com。

ted RSL3-induced decrease in HUVEC viability, up-regulated the expression of suppressor of ferroptosis proteolytic carrier family 7 member 11 (SLC7A11), GPX4, and ferritin heavy chain 1 (FTH1), increased the GSH content, decreased the MDA content, reduced the generation of intracellular lipid ROS, and decreased the intracellular Fe<sup>2+</sup> aggregation ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); Ac2-26 inhibited RSL3-induced damage to HUVEC mitochondrial morphology and function, up-regulated ATP content ( $P < 0.05$ ) and mitochondrial membrane potential ( $P < 0.001$ ); Ac2-26 inhibited RSL3-induced decrease in HUVEC migratory ability, up-regulated NO levels, inhibited intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) protein expression ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

**Conclusion** Ac2-26 inhibits RSL3-induced ferroptosis in HUVEC and maintains mitochondrial morphology and function, as well as HUVEC function.

[**KEY WORDS**] atherosclerosis; ferroptosis; mitochondria; annexin A1; Ac2-26; RSL3

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是一种复杂的慢性血管病变,其通过脂质代谢障碍、氧化应激、炎症反应和脂质过氧化等多个因素引起大中型动脉病变,导致多种心血管疾病的发生,如冠心病、中风、缺血性心脏病<sup>[1]</sup>。

铁死亡是一种铁代谢异常和脂质过氧化引起的细胞程序性死亡方式,铁死亡的主要机制是在二价铁或脂氧合酶的作用下,催化细胞膜上的不饱和脂肪酸发生脂质过氧化作用,造成脂质过氧化物大量累积和氧化还原失衡,从而诱导细胞死亡<sup>[1-2]</sup>。越来越多的研究表明,铁死亡在As的发生发展中起到了关键的作用<sup>[3-6]</sup>。

膜联蛋白 A1 (annexin A1, ANXA1) 是膜联蛋白家族的成员,已被证明参与多种生物学过程,如细胞信号传导、炎症、细胞凋亡等<sup>[7]</sup>。研究表明,ANXA1 表现出抗 As 的潜质,ANXA1 模拟肽 Ac2-26 具有抗炎、抗氧化应激、减少 As 斑块面积的作用<sup>[8]</sup>,而铁死亡则主要涉及铁过载、脂质过氧化和抗氧化体系失衡等机制。ANXA1 具有调控铁死亡的潜质,但 ANXA1 与铁死亡的关系尚不完全清楚,因此,本研究拟探讨 ANXA1 模拟肽 Ac2-26 在体外对人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)铁死亡的影响,并从线粒体形态/功能变化等方面探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

HUVEC(碧云天);一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒(雅酶);Ac2-26、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抑制剂 RSL3、Ferrostatin-1 [(Fer-1), MCE];山羊抗兔 IgG 二抗 (Abiowell);超敏型 ECL 发光液 (Abbkine);丙二醛 [(malondialdehyde, MDA), 碧云天];谷胱甘肽 [(glutathione, GSH), 南京建成];Hoechst33342 (Solarbio);BCA 蛋

白定量试剂盒(康为世纪);Erastin (Selleck);C11-BODIPY 581/591、MitoSOX 和 JC-1 (ThermoFisher);一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒(盒子生物);铁蛋白重链 1 [(ferritin heavy chain 1, FTH1), CST];溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7A member 11, SLC7A11) 和 GPX4 (ABCAM);细胞间黏附分子 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 和白细胞介素 1 $\beta$  [(interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ), Protein-tech]。

### 1.2 细胞培养

HUVEC 复苏后,于 25 mL 培养瓶中用含 10% FBS 的 DMEM 培养基培养,并在 5% CO<sub>2</sub> 和 95% 空气中于 37 °C 培养,每 2 天换液 1 次,待细胞密度达 80%,用于后续实验。

### 1.3 Western blot 检测

按照制造商的说明配置好分离胶与浓缩胶。根据目的蛋白分子量大小配制好电泳液,通常使用普通电泳液,对于分子量 < 20 kDa 的目的蛋白使用快速高分辨率电泳液。用微量上样针每孔上样 6  $\mu$ L 待测蛋白。上样完成后 150 V 电泳 60 min。当跑胶完成后,按照 Marker 指示和目的条带的位置切胶。将切好的胶放置在滤纸上,并覆盖 PVDF 膜,放入转膜槽内并用免冰浴转膜液于恒流 350 mA 转膜 35 min。对于分子量 > 100 kDa 的目的蛋白使用普通转膜液,200 mA 恒流转膜 120 min,整个转膜过程无需在 4 °C 的条件下进行。转膜完成后取出 PVDF 膜放入无蛋白快速封闭液中 15 min。按照抗体说明书稀释目的蛋白的一抗溶液,并将其置于 4 °C 冰箱孵育过夜,用 TBST 洗涤 3 次,孵育二抗,摇床 1 h, TBST 溶液洗涤 3 次后配制显影液,在凝胶成像系统中显影并记录数据。

### 1.4 细胞活力检测

取生长状态良好的细胞制备成一定浓度的细胞悬液,将细胞悬液接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L,待细胞贴壁后按照实验计划处理细胞。

24 h 后,向每孔中加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 工作液,并将细胞培养板放入培养箱培养 1~4 h。使用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值。

### 1.5 GSH、MDA 和 NO 检测

取生长状态良好的细胞接种于 12 孔细胞培养板中,待细胞贴壁后按照实验计划处理细胞。24 h 后,从细胞房中取出细胞培养板,弃去上清液,用 PBS 清洗 3 次;每孔加入 160  $\mu\text{L}$  RIPA 细胞裂解液(含 1 mmol/L PMSF)冰上裂解 30 min,将细胞刮下并收集在 EP 管中。于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。根据制造商的说明检测 GSH,使用酶标仪测定 420 nm 处的吸光度值;根据制造商的说明检测 MDA,使用酶标仪测定 532 nm 处的吸光度值;NO 检测试剂盒检测 NO,使用酶标仪测定 550 nm 处的吸光度值。

### 1.6 脂质过氧化物检测

将细胞接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后按照实验计划处理细胞。24 h 后,从细胞房中拿出细胞培养板,用 PBS 清洗 3 次,加入 2  $\mu\text{mol/L}$  C11-BODIPY-581/591 工作液,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  的黑暗环境下孵育 30 min,用 PBS 清洗细胞 1 次,加入 2 mg/L Hoechst33342 工作液,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  的黑暗环境下孵育 10 min,用 PBS 清洗 3 次,使用倒置荧光显微镜观察并记录数据。

### 1.7 细胞内亚铁离子检测

将细胞接种于 12 孔板中,待细胞贴壁后按照实验计划处理细胞。24 h 后,从细胞房中拿出细胞培养板,用 PBS 清洗 3 次,加入 5  $\mu\text{mol/L}$  FeRhoNox-1 工作液,每孔 500  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  的黑暗环境下孵育 60 min,用 PBS 清洗细胞 1 次,加入 2 mg/L Hoechst33342 工作液,每孔 500  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  的黑暗环境下孵育 10 min,用 PBS 清洗 3 次,使用倒置荧光显微镜观察并记录数据。

### 1.8 线粒体膜电位检测

将细胞接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后按照实验计划处理细胞。24 h 后,从细胞房中取出细胞培养板,用 PBS 清洗 3 次,加入 JC-1 工作液,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  的黑暗环境下孵育 30 min,用 PBS 清洗细胞 1 次,加入 2 mg/L Hoechst33342 工作液,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  的黑暗环境下孵育 10 min,用 PBS 清洗 3 次,使用倒置荧光显微镜观察并记录数据。

### 1.9 线粒体活性氧检测

将细胞接种于 24 孔板中,待细胞贴壁后按照实验计划处理细胞。24 h 后,从细胞房中取出细胞培养板,用 PBS 清洗 3 次,加入 1  $\mu\text{mol/L}$  MitoSOX 工作液,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  的黑暗环境下孵育 30 min,

用 PBS 清洗细胞 1 次,加入 2 mg/L Hoechst33342 工作液,每孔 200  $\mu\text{L}$ ,在 37  $^{\circ}\text{C}$  的黑暗环境下孵育 10 min,用 PBS 清洗 3 次,使用倒置荧光显微镜观察并记录数据。

### 1.10 划痕实验

在 6 孔板的底面用防乙醇的马克笔画 3 条直线作为标记线;选择生长状态良好的细胞,接种于 6 孔细胞培养板中,待细胞长满后,用细胞培养板的盖子比着,用枪头垂直于孔板和标记线画 1 条垂线,形成 3 个交叉点作为固定的检测点;弃培养基,用 PBS 润洗 3 次;按照实验计划加入低血清培养基(FBS<2%)并加入药物;加药后 0 h、24 h 用显微镜于不同检测点拍照。使用 Image J 软件分析划痕面积并计算细胞迁移率。

### 1.11 统计学分析

使用 Prism 9 进行统计学分析,所有数据以  $\bar{x}\pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验、One-Way ANOVA 分析。 $P<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Ac2-26 抑制 RSL3 诱导的 HUVEC 死亡

RSL3 和 Erastin 能够以剂量依赖的方式诱导 HUVEC 死亡,细胞活力分别降至 55.7% 和 64.2% ( $P<0.01$ ),并且都能够被铁死亡抑制剂 Fer-1 逆转,细胞活力分别恢复至 76.9% 和 76.2% ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。Ac2-26 能够以浓度依赖的方式逆转 RSL3 诱导的 HUVEC 死亡,浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$  时效果最佳,细胞活力提升 13.3% ( $P<0.01$ ),但 Ac2-26 不能逆转 Erastin 诱导的 HUVEC 死亡(图 1)。

### 2.2 Ac2-26 抑制 RSL3 诱导的 HUVEC 铁死亡

C11-BODIPY 荧光探针检测结果显示,RSL3 诱导的 HUVEC 显示出明显的绿色荧光,荧光强度比值是对照组的 9.92 倍 ( $P<0.01$ ),表明细胞中存在较多的过氧化脂质;经 Ac2-26 处理后,绿色荧光显著减少,荧光强度比值是 RSL3 组的 0.12 倍 ( $P<0.01$ ),表明 Ac2-26 对脂质过氧化有抑制作用。与对照组相比,RSL3 处理后细胞内 GSH、MDA 升高 43.7%、197.4% ( $P<0.01$ );与 RSL3 组相比,Ac2-26 处理后细胞内 GSH 升高 15.8%,MDA 降低 48.8% ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。FeRhoNox-1 荧光检测结果显示,与对照组相比,RSL3 处理后细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  含量增加 217.3% ( $P<0.01$ );与 RSL3 组相比,Ac2-26 可以减少 RSL3 诱导的  $\text{Fe}^{2+}$  在细胞内的过度聚集, $\text{Fe}^{2+}$

含量为 RSL3 组的 75.7% ( $P < 0.05$ )。Western blot 检测结果显示,与 RSL3 组相比,Ac2-26 处理后

SLC7A11、GPX4 和 FTH1 的蛋白表达分别增加 31.6%、45.7% 和 22.1% ( $P < 0.01$ ;图 2)。

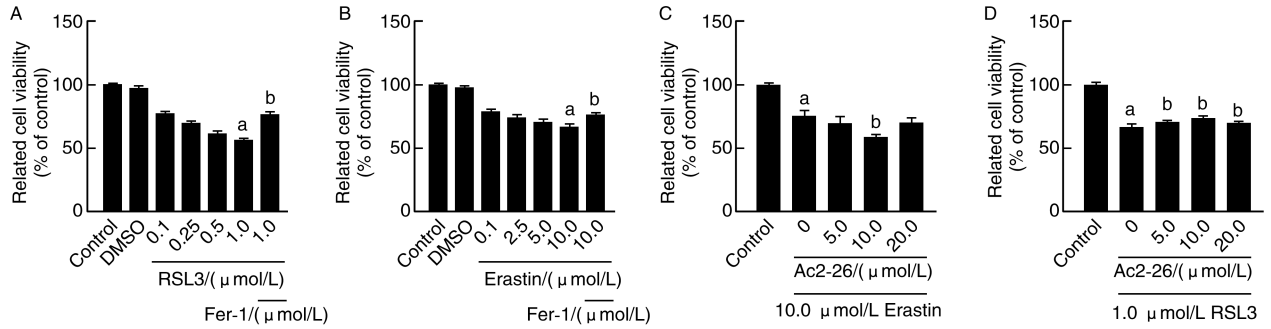


图 1. Ac2-26 对 RSL3 和 Erastin 诱导的 HUVEC 细胞活力的影响 ( $n = 3$ )

A 为 1.0 μmol/L Fer-1 处理 HUVEC 1 h,加入 DMSO (1%) 和不同浓度的 RSL3,然后用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力;  
 B 为 1.0 μmol/L Fer-1 处理 HUVEC 1 h,加入 DMSO (1%) 和不同浓度的 Erastin 处理 24 h,然后用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力;  
 C 为不同浓度的 Ac2-26 处理 HUVEC 1 h,加入 10.0 μmol/L Erastin 处理 24 h,然后用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力;  
 D 为不同浓度的 Ac2-26 处理 HUVEC 1 h,加入 1.0 μmol/L RSL3 处理 24 h,然后用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。  
 a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.01$ ,与 1.0 μmol/L RSL3 组比较;c 为  $P < 0.05$ ,与 10.0 μmol/L Erastin 组比较;  
 d 为  $P < 0.01$ ,与 0 μmol/L Ac2-26 组比较。

Figure 1. The effect of Ac2-26 on the viability of HUVEC treated with RSL3 and Erastin ( $n = 3$ )

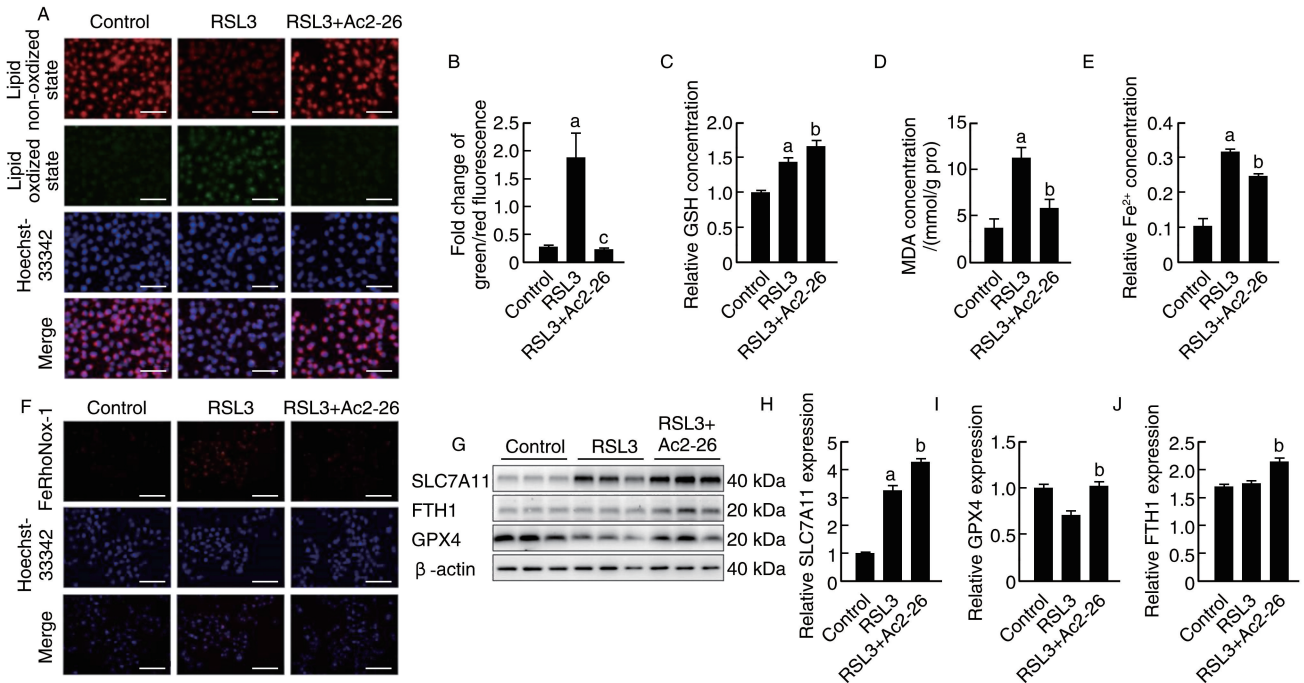


图 2. Ac2-26 对 RSL3 诱导的 HUVEC 铁死亡的影响 ( $n = 3$ )

A、B 为用 10.0 μmol/L Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0 μmol/L RSL3 处理 24 h,然后用 C11-BODIPY 荧光探针检测脂质过氧化物,红色代表脂质,绿色代表过氧化脂质,蓝色代表细胞核,Merge 图中黄色代表脂质与过氧化脂质共定位,比例尺为 75 μm;  
 C 为用 10.0 μmol/L Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0 μmol/L RSL3 处理 24 h,然后用 GSH 检测试剂盒检测 GSH 含量;  
 D 为用 10.0 μmol/L Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0 μmol/L RSL3 处理 24 h,然后用 MDA 检测试剂盒检测 MDA 含量;  
 E、F 为用 10.0 μmol/L Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0 μmol/L RSL3 处理 24 h,然后用 FeRhoNOX-1 探针检测细胞内 Fe<sup>2+</sup>,红色代表 Fe<sup>2+</sup>,蓝色代表细胞核,比例尺为 150 μm;G~J 为用 10.0 μmol/L Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0 μmol/L RSL3 处理 24 h,然后用 Western blot 检测铁死亡相关蛋白的表达。  
 a 为  $P < 0.01$ ,与对照组比较;b 为  $P < 0.05$ ,c 为  $P < 0.01$ ,与 RSL3 组比较。

Figure 2. The effect of Ac2-26 on RSL3-induced ferroptosis in HUVEC ( $n = 3$ )

### 2.3 Ac2-26 抑制 RSL3 诱导的 HUVEC 线粒体损伤

透射电镜结果显示,在 RSL3 处理的细胞中,线粒体形态固缩,嵴减少或消失,而 Ac2-26 可有效地保护和维持线粒体的正常形态。MitoSOX 探针检测结果显示,RSL3 处理后细胞内线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)含量是对照组的 21.8 倍( $P<0.01$ );与 RSL3 组相比,Ac2-26 能使细胞内 mtROS 含量减少 62.3% ( $P<0.01$ )。JC-1

荧光探针检测结果显示,RSL3 处理 HUVEC 后,荧光强度比值为对照组的 1.5 倍( $P<0.01$ ),说明 RSL3 能显著降低线粒体膜电位;Ac2-26 处理后,荧光强度比值为 RSL3 组的 0.817 倍( $P<0.01$ ),说明 Ac2-26 能够逆转这一变化。与对照组相比,RSL3 处理后 ATP 浓度升高 16.7% ( $P<0.05$ );与 RSL3 组相比,Ac2-26 能使 ATP 浓度升高 5.6% ( $P<0.05$ ;图 3)。

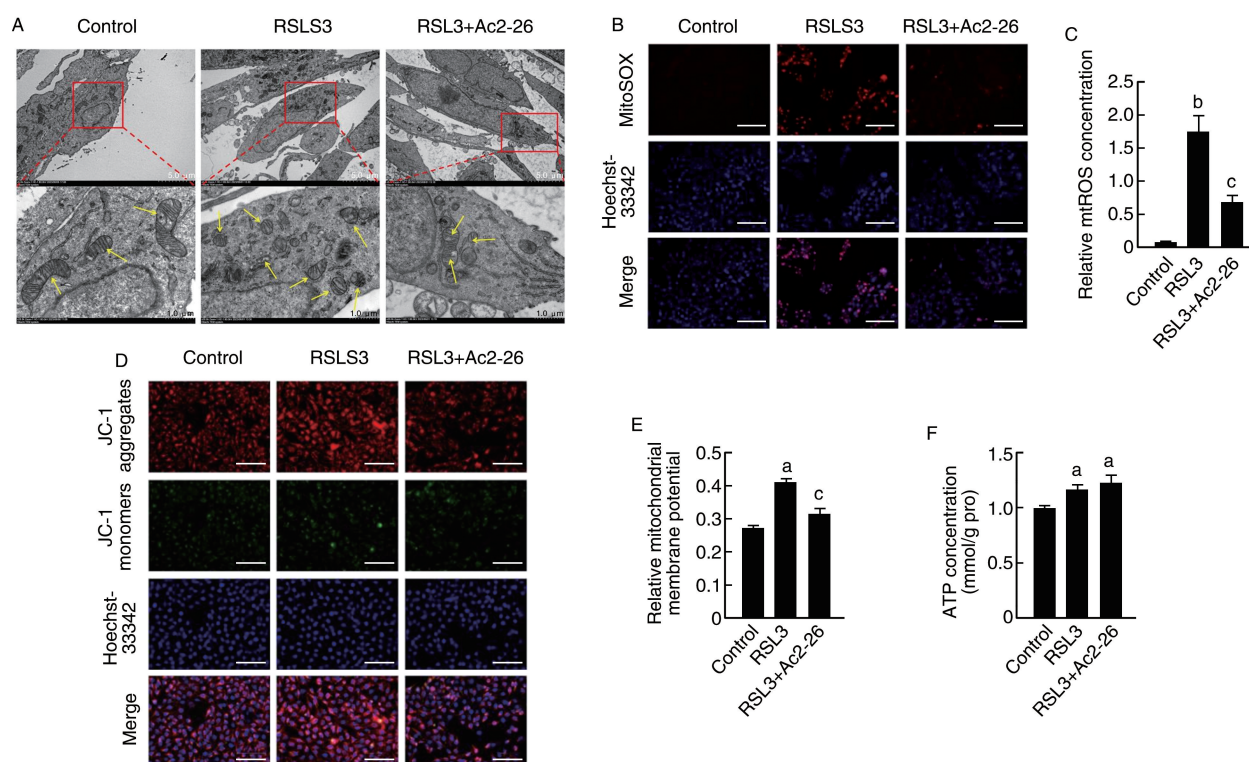


图 3. Ac2-26 对 RSL3 诱导的 HUVEC 线粒体功能异常的影响( $n=3$ )

A 为用 10.0  $\mu\text{mol/L}$  Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0  $\mu\text{mol/L}$  RSL3 处理 24 h,用电镜固定液固定 1 min,然后刮下细胞,使用透射电子显微镜观察线粒体,黄色箭头代表线粒体,比例尺为 5.0  $\mu\text{m}$ ,放大后比例尺为 1.0  $\mu\text{m}$ ;B、C 为用 10.0  $\mu\text{mol/L}$  Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0  $\mu\text{mol/L}$  RSL3 处理 24 h,然后用 MitoSOX 荧光探针检测 mtROS,红色代表 mtROS,比例尺为 300  $\mu\text{m}$ ;D、E 为用 10.0  $\mu\text{mol/L}$  Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0  $\mu\text{mol/L}$  RSL3 处理 24 h,然后用 JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位,红色代表正常线粒体,绿色代表线粒体膜电位受损,蓝色代表细胞核,Merge 图中黄色代表正常线粒体与膜电位受损线粒体共定位,比例尺为 150  $\mu\text{m}$ ;F 为用 10.0  $\mu\text{mol/L}$  Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0  $\mu\text{mol/L}$  RSL3 处理 24 h,然后用 ATP 检测试剂盒检测 ATP 含量。

a 为  $P<0.05$ ,b 为  $P<0.01$ ,与对照组比较;c 为  $P<0.01$ ,与 RSL3 组比较。

Figure 3. The effect of Ac2-26 on RSL3-induced mitochondrial dysfunction in HUVEC( $n=3$ )

### 2.4 Ac2-26 抑制 RSL 诱导的 HUVEC 功能障碍

细胞划痕实验结果显示,RSL3 处理后细胞迁移率为对照组的 40.7%;与 RSL3 组相比,Ac2-26 能够使细胞迁移率提高 74.3% ( $P<0.05$ )。Western blot 检测结果显示,与对照组相比,RSL3 处理后 ICAM-1 和 IL-1 $\beta$  的表达量分别增加 58.1% 和 32.4% ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ );与 RSL3 组相比,Ac2-26 能够使

ICAM-1 和 IL-1 $\beta$  的表达量降低 42.3% 与 39.8% ( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。一氧化氮(nitric oxide, NO)检测试剂盒检测结果显示,与对照组相比,RSL3 处理后 NO 含量降低 48.8% ( $P<0.05$ ),加入 Ac2-26 后 NO 含量恢复到正常水平,但与 RSL3 组相比,NO 含量增加了 51.8% ( $P<0.05$ ;图 4)。

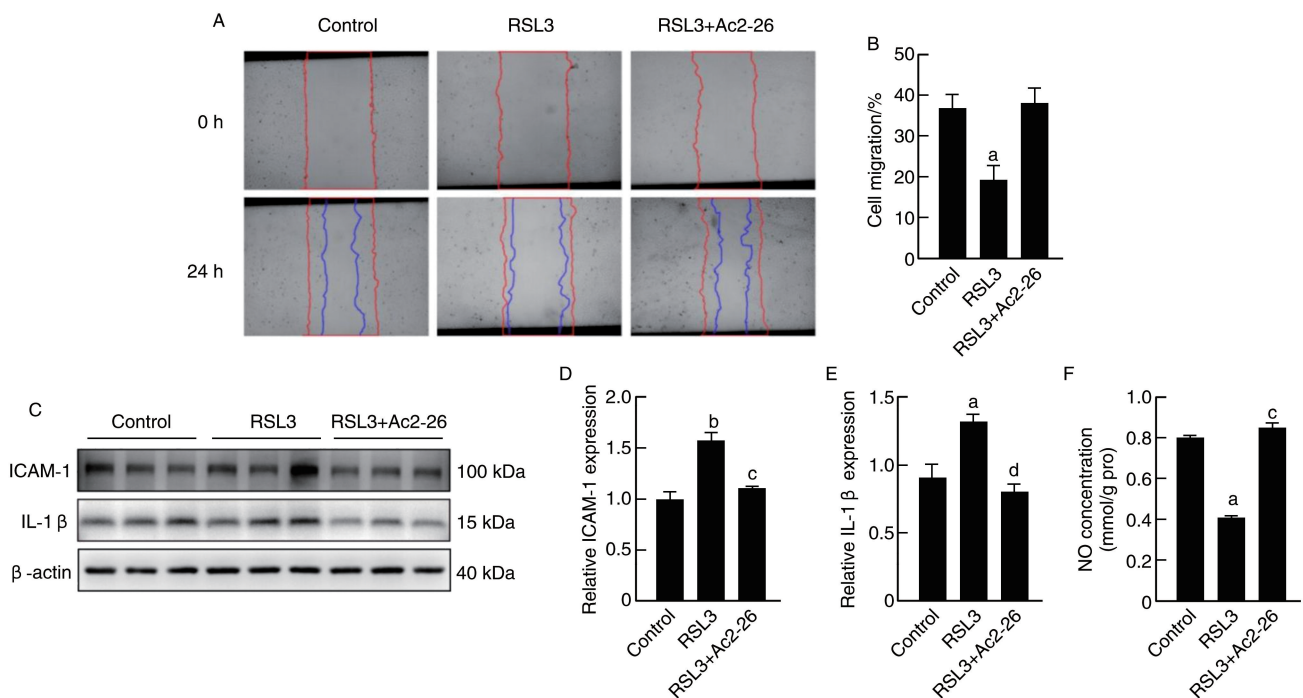


图 4. Ac2-26 对 RSL3 诱导的 HUVEC 功能障碍的影响 ( $n=3$ )

A、B 为 HUVEC 接种于 6 孔板至 95% 融合,用移液枪头画一条直线,然后用低血清培养基 (<2% FBS) 培养,经 10.0  $\mu\text{mol/L}$  Ac2-26 处理 HUVEC 1 h 后,加入 1.0  $\mu\text{mol/L}$  RSL3 处理 24 h,分别在 0 h (红色) 和 24 h (蓝色) 使用显微镜拍照;C、D、E 为 HUVEC 用 10.0  $\mu\text{mol/L}$  Ac2-26 处理 1 h,然后用 1.0  $\mu\text{mol/L}$  RSL3 处理 24 h,采用 Western blot 检测炎症信号蛋白的表达;F 为采用 NO 检测试剂盒检测 HUVEC 中 NO 含量。

a 为  $P<0.05$ , b 为  $P<0.01$ , 与对照组比较; c 为  $P<0.05$ , d 为  $P<0.01$ , 与 RSL3 组比较。

Figure 4. The effect of Ac2-26 on RSL3-induced dysfunction in HUVEC ( $n=3$ )

### 3 讨论

Ac2-26 作为 ANXA1 的模拟肽,是一种具有特定化学结构的化合物,具有 ANXA1 相似的生物学功能<sup>[9-10]</sup>。本研究通过在 HUVEC 中使用 RSL3<sup>[11]</sup> 与 Erastin<sup>[12]</sup> 这两种经典的铁死亡激动剂,构建铁死亡细胞模型。本研究发现,Ac2-26 能够抑制 RSL3 诱导的 HUVEC 铁死亡,但并不能抑制 Erastin 诱导的 HUVEC 铁死亡,这可能是与两种铁死亡诱导剂的作用机制不同导致的。有研究指出 Erastin 是通过结合电压依赖的阴离子通道,诱导脂质 ROS 产生,引起铁死亡<sup>[13]</sup>。而 RSL3 是通过作用于 GPX4 受体,抑制 GPX4 的表达,诱导铁死亡的发生<sup>[3,14]</sup>。

FHT1 与铁轻链蛋白 (ferritin light chain, FTL) 组成的铁蛋白可以储存大量的铁离子,调节细胞内铁离子平衡,抑制铁死亡的发生<sup>[15-16]</sup>。研究发现,增加 ANXA1 能够增加 FHT1 的含量,并且 FHT1 增加铁离子的吸收,降低铁离子在细胞内的聚集<sup>[17-18]</sup>。本研究也证实了 Ac2-26 能够通过增加 FHT1 的表达,降低细胞内铁离子的聚集,抑制铁死亡的发生。研究发现,SLC7A11 参与铁死亡的调

节,其作用主要通过促进半胱氨酸代谢通路,提高细胞内 GSH 水平,从而减少脂质过氧化物的堆积<sup>[19-20]</sup>。在铁死亡中,脂质过氧化是造成细胞死亡的主要原因之一<sup>[21-23]</sup>。Pecchillo 等<sup>[24]</sup> 的研究证实了 ANXA1 能够促进 SLC7A11 的表达。本研究结果也展现出了相同的趋势,认为 Ac2-26 通过增加 SLC7A11 的表达提高 HUVEC 中 GSH 水平,降低脂质过氧化物 MDA 的积累,起到抑制 RSL3 诱导的 HUVEC 铁死亡。

内皮细胞功能障碍在 As 的发生发展初期起到重要的作用。内皮细胞损伤导致内膜通透性增加以及炎症反应加剧,从而加速 As 的进展<sup>[25-26]</sup>。氧化型低密度脂蛋白是一种促 As 因子,有研究发现其能增加小鼠主动脉内皮细胞线粒体损伤、铁离子和 ROS 的含量<sup>[27]</sup>。在铁死亡的过程中,由于铁离子的积累,激活炎性小体,导致多种炎症因子分泌增加、活性增强<sup>[28]</sup>,这种趋势进而导致 As 的发生发展。Yang 等<sup>[29]</sup> 研究发现,通过抑制内皮细胞中铁与 ROS 的含量,能够抑制内皮细胞铁死亡,从而减轻 As 斑块面积。最新的研究发现,ANXA1 能够通过抑制核因子  $\kappa\text{B}$  与内皮型一氧化氮合酶信号减少白

细胞浸润、激活中性粒细胞凋亡,降低 ICAM-1 和 IL-1 $\beta$  的表达,起到抗炎以及抑制氧化损伤的作用<sup>[30-31]</sup>。本研究也证实了这一点,Ac2-26 通过抑制炎症因子的表达,降低了 RSL3 对 HUVEC 造成的功能损伤。

本研究还发现,Ac2-26 能够改善 RSL3 诱导的 HUVEC 线粒体功能障碍。分析其原因,可能与 Ac2-26 能够增加 GPX4 的表达有关。GPX4 作为铁死亡关键的调控因子,能够通过其催化活性,削弱脂质过氧化物的毒性,同时,GPX4 还能通过降低线粒体中脂质过氧化物的积累,从而改善线粒体功能<sup>[32-33]</sup>。有研究认为线粒体功能障碍是铁死亡的典型特征<sup>[34]</sup>,这似乎说明了 Ac2-26 还能够通过改善线粒体功能起到抑制铁死亡的作用。然而有研究者认为,线粒体在铁死亡中的作用随环境的变化而变化,如 GPX4 的活性受到了抑制,细胞仍会发生铁死亡,但与线粒体功能无关<sup>[35]</sup>。

综上所述,Ac2-26 能够抑制 RSL3 诱导的 HUVEC 铁死亡,并维护线粒体形态与功能以及 HUVEC 功能,但其作用的分子机制尚需进一步探索。

#### [参考文献]

- [1] LIN L, ZHANG M X, ZHANG L, et al. Autophagy, pyroptosis, and ferroptosis: new regulatory mechanisms for atherosclerosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 9: 809955.
- [2] CHEN X, LI J, KANG R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081.
- [3] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 317-331.
- [4] MA J, ZHANG H, CHEN Y, et al. The role of macrophage iron overload and ferroptosis in atherosclerosis[J]. *Biomolecules*, 2022, 12(11): 1702.
- [5] LI M, WANG Z W, FANG L J, et al. Programmed cell death in atherosclerosis and vascular calcification[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13(5): 467.
- [6] 王琼, 冯安妮, 牙侯弟, 等. 巨噬细胞铁死亡与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(3): 257-262.  
WANG Q, FENG A N, YA H D, et al. Macrophage ferroptosis and atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(3): 257-262.
- [7] WU L, LIU C, CHANG D Y, et al. Annexin A1 alleviates kidney injury by promoting the resolution of inflammation in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2021, 100(1): 107-121.
- [8] MOZAFFARI M S. Therapeutic potential of annexin A1 modulation in kidney and cardiovascular disorders[J]. *Cells*, 2021, 10(12): 3420.
- [9] LIAO W I, WU S Y, WU G C, et al. Ac2-26, an annexin A1 peptide, attenuates ischemia-reperfusion-Induced acute lung injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): 1771.
- [10] FERREIRA T P T, GUIMARÃES F V, SÁ Y A P J, et al. Annexin-A1-derived peptide Ac2-26 suppresses allergic airway inflammation and remodelling in mice[J]. *Cells*, 2022, 11(5): 759.
- [11] SUI X, ZHANG R, LIU S, et al. RSL3 drives ferroptosis through GPX4 inactivation and ROS production in colorectal cancer[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1371.
- [12] YAN R, XIE E, LI Y, et al. The structure of erastin-bound xCT-4F2hc complex reveals molecular mechanisms underlying erastin-induced ferroptosis[J]. *Cell Res*, 2022, 32(7): 687-690.
- [13] DU Y, GUO Z. Recent progress in ferroptosis: inducers and inhibitors[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 501.
- [14] LI S, HE Y, CHEN K, et al. RSL3 drives ferroptosis through NF-kappaB pathway activation and GPX4 depletion in glioblastoma[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 2915019.
- [15] DIXON S J, STOCKWELL B R. The role of iron and reactive oxygen species in cell death[J]. *Nat Chem Biol*, 2014, 10(1): 9-17.
- [16] MANCIAS J D, WANG X, GYGI S P, et al. Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy[J]. *Nature*, 2014, 509(7498): 105-109.
- [17] QIN S, REN Y, FENG B, et al. ANXA1sp protects against sepsis-induced myocardial injury by inhibiting ferroptosis-induced cardiomyocyte death via SIRT3-mediated p53 deacetylation[J]. *Mediators Inflamm*, 2023, 2023: 6638929.
- [18] FANG Y, CHEN X, TAN Q, et al. Inhibiting ferroptosis through disrupting the NCOA4-FTH1 interaction: a new mechanism of action[J]. *ACS Cent Sci*, 2021, 7(6): 980-989.
- [19] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599-620.
- [20] HIDA Y, OKAMOTO-KATSUYAMA M, MARUOKA S, et al. Effective ferroptotic small-cell lung cancer cell death from SLC7A11 inhibition by sulforaphane[J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(1): 71.
- [21] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG D D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2019, 23: 101107.
- [22] LEE J Y, KIM W K, BAE K H, et al. Lipid metabolism and ferroptosis[J]. *Biology (Basel)*, 2021, 10(3): 184.
- [23] ZHOU W, LIM A, ELMADBOUH O H M, et al. Verteporfin induces lipid peroxidation and ferroptosis in pancreatic cancer cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 212: 493-504.
- [24] PECCHILLO CIMMINO T, PUNZIANO C, PANICO I, et al. Formyl-peptide receptor 2 signaling modulates SLC7A11/xCT expression and activity in tumor cells[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2024, 13(5): 552.
- [25] 瞿凯, 邱菊辉, 王贵学. 血管内皮细胞屏障功能的血流动力学调控及其与动脉粥样硬化的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(1): 1-6.  
QU K, QIU J H, WANG G X. Hemodynamic regulation of vascular endothelial barrier function and its relationship with atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2020, 28(1): 1-6.

- 2024, 23(1): 124.
- [17] CHEN G, ZOU Y, ZHANG X, et al.  $\beta$ -actin protein expression differs in the submandibular glands of male and female mice[J]. *Cell Biol Int*, 2016, 40(7): 779-786.
- [18] MOUSTAFA-BAYOUMI M, ALHAJ M A, EL-SAYED O, et al. Vascular hypertrophy and hypertension caused by transgenic overexpression of profilin 1[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(52): 37632-37639.
- [19] NELSON J C, STAVOE A K, COLÓN-RAMOS D A. The actin cytoskeleton in presynaptic assembly[J]. *Cell Adh Migr*, 2013, 7(4): 379-387.
- [20] YANG S, ZHAO Y, CHEN X, et al. The ACTB variants and alcohol drinking confer joint effect to ischemic stroke in Chinese Han population [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2020, 27(3): 226-244.
- [21] SHEN W J, ZHANG Y. RPN1 promotes the proliferation and invasion of breast cancer cells by activating the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1): 25.
- [22] XU Z, LI X, DING Z, et al. LRPPRC inhibits autophagy and promotes foam cell formation in atherosclerosis[J]. *FEBS J*, 2022, 289(23): 7545-7560.
- [23] KUDOH R, MIKAMI K, KITAJIMA M, et al. Spontaneous micro-aggregation of platelets predicts clinical outcome in acute ischemic stroke [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2018, 27(8): 2074-2081.
- [24] KOLLIKOWSKI A M, PHAM M, MÄRZ A G, et al. Platelet activation and chemokine release are related to local neutrophil-dominant inflammation during hyperacute human stroke [J]. *Transl Stroke Res*, 2022, 13(3): 364-369.
- [25] HOLLAND S D. EPAC2 promotes axonal outgrowth and attenuates the glial reaction in an ex vivo model of spinal cord injury[J]. *J Neurosci*, 2020, 40(11): 2184-2185.
- [26] JICKLING G C, LIU D, ANDER B P, et al. Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 35(6): 888-901.
- [27] CASTELLANOS M, LEIRA R, SERENA J, et al. Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke [J]. *Stroke*, 2003, 34(1): 40-46.
- [28] GONG P, LIU Y, GONG Y, et al. The association of neutrophil to lymphocyte ratio, platelet to lymphocyte ratio, and lymphocyte to monocyte ratio with post-thrombolysis early neurological outcomes in patients with acute ischemic stroke[J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 51.
- [29] IADECOLA C, ANRATHER J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation[J]. *Nat Med*, 2011, 17(7): 796-808.
- [30] KLEINSCHNITZ C, SCHWAB N, KRAFT P, et al. Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation[J]. *Blood*, 2010, 115(18): 3835-3842.
- [31] SHICHITA T, OOBOSHI H, YOSHIMURA A. Neuroimmune mechanisms and therapies mediating post-ischaemic brain injury and repair[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2023, 24(5): 299-312.
- [32] HU S, CAI J, CHEN S, et al. Identification of novel biomarkers and immune infiltration characteristics of ischemic stroke based on comprehensive bioinformatic analysis and machine learning [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2023, 37: 101595.
- (此文编辑 文玉珊)

(上接第 309 页)

- [26] ZHANG G, QIN Q, ZHANG C, et al. NDRG1 signaling is essential for endothelial inflammation and vascular remodeling[J]. *Circ Res*, 2023, 132(3): 306-319.
- [27] BAI T, LI M, LIU Y, et al. Inhibition of ferroptosis alleviates atherosclerosis through attenuating lipid peroxidation and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cell[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 92-102.
- [28] KAZMIRCZAK F, VOGEL N T, PRISCO S Z, et al. Ferroptosis-mediated inflammation promotes pulmonary hypertension[J]. *Circ Res*, 2024, 135(11): 1067-1083.
- [29] YANG K, SONG H, YIN D. PDSS2 inhibits the ferroptosis of vascular endothelial cells in atherosclerosis by activating Nr1h2[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 77(6): 767-776.
- [30] GE P, LUO Y, YANG Q, et al. Ferroptosis in rat lung tissue during severe acute pancreatitis-associated acute lung injury: protection of qingyi decoction[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2023, 2023: 5827613.
- [31] GALVÃO I, DE CARVALHO R V H, VAGO J P, et al. The role of annexin A1 in the modulation of the NLRP3 inflammasome[J]. *Immunology*, 2020, 160(1): 78-89.
- [32] LIANG D, FENG Y, ZANDKARIMI F, et al. Ferroptosis surveillance independent of GPX4 and differentially regulated by sex hormones[J]. *Cell*, 2023, 186(13): 2748-2764.
- [33] ZHANG W, LIU Y, LIAO Y, et al. GPX4, ferroptosis, and diseases[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 174: 116512.
- [34] BATTAGLIA A M, CHIRILLO R, AVERSA I, et al. Ferroptosis and cancer: mitochondria meet the “iron maiden” cell death[J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1505.
- [35] GAO M, YI J, ZHU J, et al. Role of mitochondria in ferroptosis [J]. *Mol Cell*, 2019, 73(2): 354-363.
- (此文编辑 文玉珊)