

本文引用: 邓伟, 刘喜燕, 郭丽媛, 等. Ang II 激活 p53/SAT1 信号通路诱导白色脂肪细胞铁死亡[J]. 中国动脉硬化杂志, 2025, 33(5): 385-394. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2025.05.003.

[文章编号] 1007-3949(2025)33-05-0385-10

· 实验研究 ·

Ang II 激活 p53/SAT1 信号通路诱导白色脂肪细胞铁死亡

邓伟, 刘喜燕, 郭丽媛, 徐倩, 周坤, 赵元琴, 王昭月, 李想, 邓新梅, 秦昕怡, 任重, 姜志胜

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, 湖南省衡阳市 421001

[摘要] **[目的]** 探讨血管紧张素 II (Ang II) 对白色脂肪细胞铁死亡的影响及其机制。**[方法]** 通过诱导物刺激的方法使 3T3-L1 脂肪前体细胞向白色脂肪细胞分化, 实验分为对照组、Ang II 组、Ang II + Fer-1 (铁死亡抑制剂) 组和 Ang II + PFT- α (p53 抑制剂) 组。使用 Ang II 处理细胞, 利用 RT-qPCR 和 Western blot 检测细胞铁死亡因子和脂肪因子表达水平, JC-1 试剂盒检测线粒体膜电位 (MMP) 水平, 铁离子试剂盒检测细胞内铁含量, 谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒检测 GSH 含量。加入 Fer-1 和 Ang II 处理细胞, 检测细胞铁死亡水平变化。检测 p53 和亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶 1 (SAT1) 蛋白表达。随后加入 PFT- α 和 Ang II 共处理细胞, 检测 p53 和 SAT1 蛋白表达变化, 观察抑制 p53 表达对细胞铁死亡因子和脂肪因子表达水平的影响。**[结果]** 通过刺激物诱导分化法成功将 3T3-L1 细胞分化为白色脂肪细胞。Ang II 诱导白色脂肪细胞发生铁死亡。RT-qPCR 结果显示, 与对照组相比, Ang II 组的抗铁死亡因子谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11) 和铁调节蛋白 1 (IRP-1) 的 mRNA 表达均下调, 促铁死亡因子酯酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 的 mRNA 表达上调。Western blot 结果显示, 与对照组相比, Ang II 组的 SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达均下调, ACSL4 的蛋白表达上调。Ang II 处理使细胞内铁离子的含量增加, GSH 和 MMP 水平下降。与 Ang II 组相比, Ang II + Fer-1 组的 IRP-1 和 SLC7A11 的 mRNA 表达均上调。Ang II 诱导白色脂肪细胞的脂肪因子表达谱改变。Western blot 结果显示, 与对照组相比, Ang II 组的促炎脂肪因子瘦素 (LEP)、抵抗素 (RETN)、白细胞介素 6 (IL-6) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的蛋白表达均上调, 抗炎脂肪因子脂联素 (ADPN) 和网膜素 1 (ITLN1) 的蛋白表达下调。此外, Ang II 使 p53 和 SAT1 蛋白表达增加。抑制 p53 表达可改善 Ang II 处理下白色脂肪细胞的铁死亡水平和脂肪因子表达水平。Western blot 结果显示, 与 Ang II 组相比, Ang II + PFT- α 组的 p53 和 SAT1 蛋白表达下调, SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达上调, ACSL4 蛋白表达下调; Ang II + PFT- α 组的 ADPN 蛋白表达上调, TNF- α 、LEP 和 RETN 的蛋白表达均下调。**[结论]** Ang II 通过激活 p53/SAT1 信号通路诱导白色脂肪细胞铁死亡。

[关键词] 白色脂肪组织; 血管紧张素 II; 铁死亡; p53/SAT1 信号通路

[中图分类号] R363; R5

[文献标识码] A

Angiotensin II activates p53/SAT1 signaling pathway to induce ferroptosis in white adipocytes

DENG Wei, LIU Xiyuan, GUO Liyuan, XU Qian, ZHOU Kun, ZHAO Yuanqin, WANG Zhaoyue, LI Xiang, DENG Xinmei, QIN Xinyi, REN Zhong, JIANG Zhisheng

Institute of Cardiovascular Disease, University of South China & Key Lab for Arteriosclerosis of Hunan Province & Hunan Province Arteriosclerotic Disease International Scientific and Technological Innovation Cooperation Base, Hengyang, Hunan 421001, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect and mechanism of angiotensin II (Ang II) on ferroptosis in white adipocytes. **Methods** The 3T3-L1 preadipocytes were differentiated into white adipocytes by inducer stimulation. The experiment was divided into control group, Ang II group, Ang II + Fer-1 (ferroptosis inhibitor) group and Ang II + PFT- α

[收稿日期] 2024-11-27

[修回日期] 2025-02-17

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81670429 和 91839103); 湖南省创新型省份建设专项资金项目(2020SK2105)

[作者简介] 邓伟, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制及其防治, E-mail: a897505491@163.com。并列第一作者刘喜燕, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化病因发病学与防治, E-mail: 844782097@qq.com。通信作者姜志胜, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化及其发病机制, E-mail: zsjiang2016@163.com。

(p53 inhibitor) group. Ang II was used to treat cells. RT-qPCR and Western blot were used to detect the expression levels of ferroptosis factors and adipokines. JC-1 kit was used to detect mitochondrial membrane potential (MMP) level. Iron ion kit was used to detect intracellular iron content. Glutathione (GSH) kit was used to detect GSH content. Fer-1 and Ang II were added to treat cells to detect the changes of ferroptosis level. The expression of p53 and spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 (SAT1) protein was detected. Subsequently, PFT- α and Ang II were added to co-treat cells to detect the changes of p53 and SAT1 protein expression, and to observe the effect of inhibiting p53 expression on the expression levels of ferroptosis factors and adipokines. **Results** 3T3-L1 cells were successfully differentiated into white adipocytes by stimulator-induced differentiation. Ang II induced ferroptosis in white adipocytes. RT-qPCR results showed that compared with control group, the mRNA expression of anti-ferroptosis factor glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and iron regulatory protein 1 (IRP-1) was down-regulated in Ang II group, and the mRNA expression of pro-ferroptosis factor acyl-CoA synthetase of long-chain family member 4 (ACSL4) was up-regulated. Western blot results showed that compared with control group, the protein expression of SLC7A11 and GPX4 was down-regulated in Ang II group, and the protein expression of ACSL4 was up-regulated. Ang II treatment increased the content of intracellular iron ions and decreased the levels of GSH and MMP. Compared with Ang II group, the mRNA expression of IRP-1 and SLC7A11 was up-regulated in Ang II + Fer-1 group. Ang II induced changes in the expression profile of adipokines in white adipocytes. Western blot results showed that compared with control group, the protein expression of pro-inflammatory adipokine leptin (LEP), resistin (RETN), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was up-regulated in Ang II group, and the protein expression of anti-inflammatory adipokine adiponectin (ADPN) and omentin 1 (ITLN1) was down-regulated. In addition, Ang II increased the protein expression of p53 and SAT1. Inhibition of p53 expression can improve the level of ferroptosis and adipokine expression in white adipocytes treated with Ang II. Western blot results showed that compared with Ang II group, the protein expression of p53 and SAT1 was down-regulated in Ang II + PFT- α group, the protein expression of SLC7A11 and GPX4 was up-regulated, and the protein expression of ACSL4 was down-regulated. The protein expression of ADPN was up-regulated in Ang II + PFT- α group, and the protein expression of TNF- α , LEP and RETN was down-regulated. **Conclusion** Ang II induces ferroptosis in white adipocytes through activating the p53/SAT1 signaling pathway.

[**KEY WORDS**] white adipose tissue; angiotensin II; ferroptosis; p53/SAT1 signaling pathway

白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 是人体内主要的脂肪储存形式, 主要功能是储存能量、保温、缓冲保护器官, 并参与内分泌活动, 可以分泌一些激素和细胞因子, 如脂联素 (adiponectin, ADPN)、瘦素 (leptin, LEP) 和抵抗素 (resistin, RETN) 等, 这些物质在调节食欲、炎症和能量代谢等方面起着重要作用^[1]。研究发现, WAT 存在完整的肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 成分^[2]。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 作为 RAS 的主要生物活性肽, 对心血管系统、血压调节以及水和盐的平衡具有重要影响^[3]。研究表明, Ang II 不仅参与血压调节, 还与 WAT 的代谢和功能有密切关系。Ang II 通过上调 WAT 的炎症反应, 导致胰岛素抵抗增加, 这与肥胖和其相关的代谢性疾病 (如糖尿病、动脉粥样硬化等) 密切相关^[4]。然而, 目前关于 Ang II 调节 WAT 的研究较少, Ang II 调节 WAT 的机制尚未阐明, 进一步阐明 Ang II 对 WAT 的影响对于理解 Ang II 如何参与肥胖及其相关的代谢性疾病的发病具有重要意义。

近年来, Ang II 与铁死亡之间的关系越来越受

到关注^[5-7]。铁死亡是一种依赖于铁和脂质过氧化的细胞死亡方式, 可导致细胞膜和线粒体膜的损伤与功能丧失^[8]。其发生与多种分子和信号通路密切相关, 谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 与谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的相互作用对于抑制脂质过氧化并防止铁死亡至关重要; 溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 通过调节半胱氨酸的转运, 影响 GSH 的合成, 从而进一步调控细胞的抗氧化能力和对铁死亡的敏感性。铁调节蛋白 1 (iron regulatory protein-1, IRP-1) 可以调控细胞内的铁稳态, 影响铁积累与氧化应激, 从而参与铁死亡的调控。而酯酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase of long-chain family member 4, ACSL4) 通过促进多不饱和脂肪酸的酰基化, 增强脂质过氧化, 进而推动铁死亡的发生。同时, 铁死亡的一个标志性特征是线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 的丧失和线粒体功能障碍^[8-10]。随着研究的不断深入, Ang II 被发现通过增加氧化应激、调节铁代谢、促进脂质过氧化和激活炎症反应等机制, 促

进铁死亡的发生。铁死亡在一些疾病(特别是心血管疾病)中的作用逐渐被认识到,Ang II 可以通过这种机制对心血管疾病的发生和发展产生影响。

然而,Ang II 是否可以诱导 WAT 发生铁死亡尚未可知。因此,探索 Ang II 与 WAT 铁死亡的关系,有助于进一步阐明肥胖及其相关代谢性疾病的发生机制,探索新的干预策略。

1 材料和方法

1.1 主要材料

DMEM 培养基、IBMX、地塞米松、吲哚美辛和三碘甲状腺原氨酸(3,3',5-triiodo-L-thyronine, T3)购自美国 Sigma 公司;重组人胰岛素溶液购自武汉普诺赛生命科技有限公司;Ang II 购自美国 APEX BIO 公司;GSH 检测试剂盒购自北京康为世纪生物有限公司;组织铁检测试剂盒购自南京建成生物研究所;MMP 检测试剂盒(JC-1)购自上海百赛生物技术有限公司;抗 GAPDH 多克隆抗体、抗 GPX4 多克隆抗体、抗 SLC7A11 多克隆抗体、抗 ACSL4 多克隆抗体、抗亚精胺/精胺 N1-乙酰转移酶 1(spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1, SAT1)多克隆抗体和抗肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)多克隆抗体购自美国 Proteintech 公司;抗 p53 多克隆抗体购自美国 Sigma 公司;抗 RETN 多克隆抗体、抗 LEP 多克隆抗体、抗网膜素 1(intelectin 1, ITLN1)多克隆抗体和抗 ADPN 多克隆抗体购自武汉云克隆科技公司;RT-qPCR 所用的引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 细胞培养与处理

3T3-L1 前脂肪细胞来源于中国科学院细胞研究所。细胞种板前,在 6 孔板中加入 0.1% 明胶水溶液,每孔 1 mL,孵育至少 30 min。种板前弃去明胶,细胞消化后将细胞悬液加入 6 孔板中,每隔两天换液一次。待细胞汇合度达到 70%~90%后,换 DMEM 基础培养基饥饿处理细胞 24 h。随后进行白色脂肪细胞诱导分化处理,向细胞中加入分化培养基[1 mL DMEM 培养基+10 μ L IBMX(浓度为 500 μ mol/L)+0.1 μ L 地塞米松(浓度为 1 μ mol/L)+1 μ L 吲哚美辛(浓度为 125 μ mol/L)+1 μ L T3(浓度为 1 nmol/L)],孵育 3 天。分化过程中不需要更换培养基。3 天后,更换培养基为维持培养基[1 mL DMEM 培养基+1 μ L 胰岛素(浓度为 10 μ g/L)+1 μ L T3(浓度为 1 nmol/L)]。每两天更换一次维持培养基。在诱导分化后的第 6~7 天,油红 O 染

色观察 3T3-L1 细胞是否诱导分化为白色脂肪细胞,若已诱导分化成功,换液回基础培养基,此时细胞可做实验处理。

在第一部分体外实验中,将白色脂肪细胞分别与不同浓度(0、0.01、0.1、1、10 μ mol/L)和不同处理时间(0、12、24、36、48 h)的 Ang II 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养,选择最佳处理条件的 Ang II 进行后续实验。在第二部分实验中,实验分为对照组、Ang II 组和 Ang II +PFT- α (p53 抑制剂)(浓度为 20 μ mol/L)组。

1.3 油红 O 染色

油红 O 工作液的配置:取 0.5 g 油红 O 干粉溶于 100 mL 异丙醇中,充分混匀得到油红 O 原液,按原液与去离子水为 3:2 的比例稀释原液,然后用滤纸过滤稀释后的原液,得到油红 O 工作液。

将已进行诱导分化处理的细胞取出,用 PBS 溶液润洗 3 遍,然后用 4% 多聚甲醛固定细胞 1 h,弃去多聚甲醛,PBS 溶液润洗 3 遍。加入油红 O 工作液,室温染色 1 h,然后弃去多聚甲醛油红 O 工作液,PBS 溶液润洗 3 遍。使用 AFM-倒置光学显微镜耦合系统(Olympus IX2)观察细胞并拍摄图像。

1.4 GSH 测定

还原型 GSH 可与二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)反应,生成一种黄色化合物,在 405 nm 波长下进行比色定量可测定还原型 GSH 含量。收集细胞,按照微量还原型 GSH 测定试剂盒说明书进行检测。实验可分为空白孔(无细胞+培养基+不做实验处理)、标准孔(细胞+培养基+不做实验处理)和测定孔(细胞+培养基+做实验处理),分别加入说明书中试剂后,轻轻震荡孔板混匀,静置 5 min,405 nm 处酶标仪测定各孔吸光度值。

1.5 MMP 测定

MMP 检测试剂盒(JC-1)是一种以 JC-1 为荧光探针,快速灵敏地检测细胞、组织或纯化的 MMP 变化的试剂盒,可以用于早期的细胞凋亡检测。在 MMP 较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,可以产生红色荧光;在 MMP 较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体,可以产生绿色荧光。可以通过荧光颜色的转变来检测 MMP 的变化。本实验通过流式细胞仪检测 MMP,用红绿荧光的相对比例来衡量线粒体去极化的比例。

1.6 铁含量测定

用胰酶消化细胞,加入裂解液裂解,离心取上清液,按照组织铁检测试剂盒说明书分别加入试剂混匀。沸水浴 5 min,流水冷却后,离心取上清液,在 520 nm 波长处测定各管吸光度值。并按照公式:细

胞铁含量 = (测定 OD 值 - 空白 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值) × 标准品浓度 / 待测样本蛋白浓度, 计算细胞内铁离子含量。

1.7 RT-qPCR

使用 TRIzol 试剂从白色脂肪细胞中提取总 RNA。然后, 使用 HiFiScriPt cDNA Synthesis Kit (康为) 将 RNA 反转录成 cDNA。使用 Go Taq® qPCR Master Mix 运行 RT-qPCR, 使用 ABI Step One Plus 实时 PCR 扩增系统进行分析。GAPDH 用于标准化 ACSL4、IRP1、GPX4 和 SLC7A11 水平。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值进行数据分析。实验中各目的基因引物序列见表 1。

表 1. 各目的基因引物列表

Table 1. List of primers for each target gene

引物名称	引物序列
GPX4	上游 5'-ATACGCTGAGTGTGGTTTGC-3'
	下游 5'-CTTCATCCACTCCACAGCG-3'
SLC7A11	上游 5'-TGGAACGAGGAGGTGGAGAA-3'
	下游 5'-TGTGCTTTTTCCTTCACAGCG-3'
IRP-1	上游 5'-GAGACTCTCTTCAGCCATCTT-3'
	下游 5'-TGATCTCCTTCTGCATCCTGTC-3'
ACSL4	上游 5'-CTTCCTCTTAAGCCGGGAC-3'
	下游 5'-TGCCATAGCGTTTTTCTTAGATTT-3'
GAPDH	上游 5'-GCTGCCAGAACATCATCCCT-3'
	下游 5'-TGAAGTCGCAGGAGACAACC-3'

1.8 Western blot

使用含有 PMSF 的 RIPA 裂解液提取总蛋白, 并使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测样本蛋白浓度。蛋白经 10% SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜。用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入不同一抗进行抗体杂交, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 再加入与一抗对应种属来源的二抗孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 采用全自动化学发光成像分析系统显影, Image J 软件对条带灰度值进行统计学分析。

1.9 铁死亡数据集获取

从 FerrDb V2 (<http://www.zhouan.org/ferrdb/current/>) 数据库中下载铁死亡的驱动因子, 然后利用 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org>) 构建和分析铁死亡的蛋白质相互作用网络 (protein-protein interaction network, PPI)。

1.10 统计学分析

所有数据采用 Graphpad Prism 10.4.1 软件进行统计分析和作图。两组间比较采用独立样本 *t* 检

验 (Student's *t* test), 三组及以上之间的组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Ang II 诱导白色脂肪细胞铁死亡

通过刺激物诱导分化的方法, 本研究成功将 3T3-L1 细胞诱导分化为成熟的白色脂肪细胞 (图 1A)。为了确定 Ang II 处理白色脂肪细胞的最佳条件, 本研究首先进行了浓度梯度和时间梯度实验。在浓度梯度实验中, RT-qPCR 实验结果显示 Ang II 呈浓度依赖性的方式刺激铁死亡相关因子的 mRNA 水平改变, 在浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 这一变化最为显著, 此时, 与对照组相比, Ang II 组 ACSL4 的 mRNA 水平增加 26.74% ($P < 0.05$), SLC7A11、GPX4 和 IRP-1 的 mRNA 水平分别下降 15.84%、46.14% 和 66.64% ($P < 0.01$, 图 1B ~ 1E)。在 Western blot 实验中, 本研究得到了相似的结果, Ang II 处理使铁死亡相关因子的蛋白水平呈浓度依赖性变化, 当浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, ACSL4 的蛋白水平增加 57.85% ($P < 0.01$), SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达分别下降 58.76% 和 25.58% ($P < 0.01$, 图 1F ~ 1I)。由于铁离子过量蓄积会通过芬顿反应产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 从而促进铁死亡的发生。因此, 本研究检测了白色脂肪细胞内铁离子的蓄积情况, 结果显示, Ang II 显著刺激了细胞内铁离子的蓄积, 当浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$, 铁离子的含量增加了 72.40% ($P < 0.01$, 图 1G)。

接着在时间梯度实验中, Western blot 结果显示白色脂肪细胞中 GPX4 和 SLC7A11 的蛋白表达呈时间依赖性下降, 这一变化截点发生在 48 h, 此时, 与对照组相比, 两者的蛋白水平分别下降 36.15% 和 57.10% ($P < 0.01$, 图 1K ~ 1N)。根据这一部分实验结果, 本研究后续选择 1 $\mu\text{mol/L}$ 、48 h 作为 Ang II 处理白色脂肪细胞的最适条件。

铁死亡过程伴随着 GSH 含量下降和 MMP 的增加, 从而导致线粒体稳态失衡。为了进一步证实 Ang II 诱导白色脂肪细胞铁死亡, 本研究检测了 GSH 和 MMP 的变化, 结果显示, 与对照组相比, Ang II 组的 GSH 含量下降 47.50% ($P < 0.01$), MMP 下降 26.62% ($P < 0.05$, 图 2A 和 2B)。此外, 本研究还观察了添加铁死亡抑制剂 (Fer-1) 对 Ang II 刺激的影响, RT-qPCR 实验结果显示, Fer-1 缓解了 Ang II 刺激下的铁死亡, 与 Ang II 组相比, Ang II + Fer-1 组的

IRP-1 和 SLC7A11 的 mRNA 水平分别升高 124.1% 和 35.36% ($P < 0.01$, 图 2C 和 2D)。

以上实验结果证实 Ang II 诱导了白色脂肪细胞铁死亡。

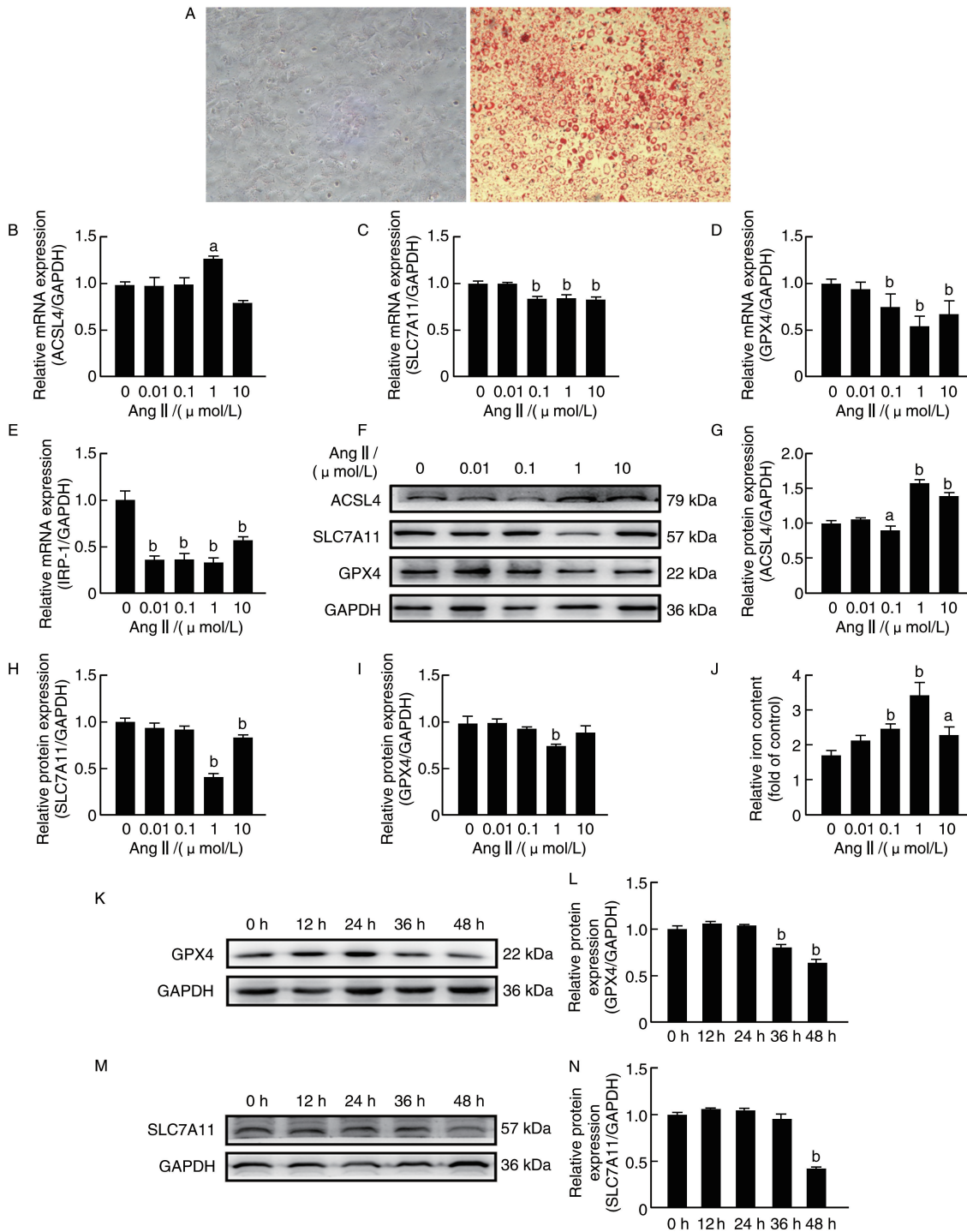


图 1. Ang II 诱导白色脂肪细胞铁死亡的浓度和时间梯度实验 ($n = 3$)

A 为油红 O 染色观察 3T3-L1 细胞诱导分化为成熟的白色脂肪细胞, 左图为未诱导分化的 3T3-L1 细胞, 右图为分化成熟的白色脂肪细胞, Bar=200 μm ; B ~ E 为 RT-qPCR 检测 Ang II 不同浓度处理下白色脂肪细胞中 GPX4、IRP-1、SLC7A11 和 ACSL4 mRNA 表达变化;

F ~ I 为 Western blot 检测 Ang II 不同浓度处理下白色脂肪细胞中 ACSL4、SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达及其量化分析结果;

J 为白色脂肪细胞的铁含量变化; K ~ N 为 Western blot 检测 Ang II 处理不同时间白色脂肪细胞中

SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达变化及其量化分析结果。

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$ Ang II 或 Ang II 处理 0 h) 比较。

Figure 1. Concentration and time gradient experiment of Ang II-induced ferroptosis in white adipocytes ($n = 3$)

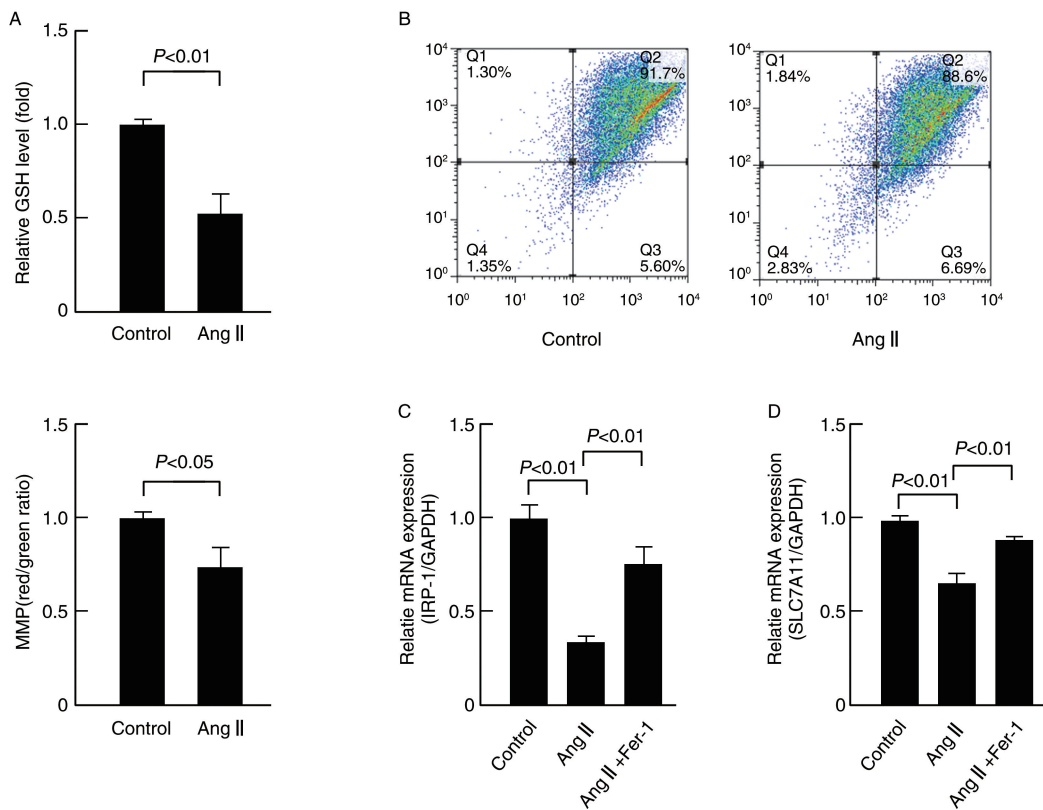


图 2. Ang II 诱导白色脂肪细胞铁死亡 ($n=3$)

A 为白色脂肪细胞中 GSH 含量变化; B 为白色脂肪细胞中 MMP 变化; C 和 D 为 RT-qPCR 检测加入 Fer-1 后白色脂肪细胞中 IRP-1 和 SLC7A11 的 mRNA 表达变化。

Figure 2. Ang II induces ferroptosis in white adipocytes ($n=3$)

2.2 Ang II 诱导白色脂肪细胞脂肪因子表达谱改变

WAT 具有重要的内分泌功能, 可分泌 ADPN、LEP、RETN 和 ITLN1、TNF- α 和白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 等激素和因子, 在调节全身代谢、胰岛素抵抗和与肥胖相关的低度系统性炎症中发挥作用。鉴于此, 本研究检测了 Ang II 处理下白色脂肪细胞的脂肪因子表达变化。Western blot 结果显

示, 与对照组比较, Ang II 组的抗炎脂肪因子 ADPN 和 ITLN1 的蛋白表达分别下降 12.53% ($P<0.05$) 和 25.51% ($P<0.01$), 促炎脂肪因子 IL-6、TNF- α 、LEP 和 RETN 的蛋白表达增加 33.82%、104.10%、10.20% 和 37.82% ($P<0.05$, 图 3), 这提示 Ang II 影响了白色脂肪细胞脂肪因子的表达, 导致白色脂肪细胞表达促炎脂肪因子增加, 抗炎脂肪因子减少。

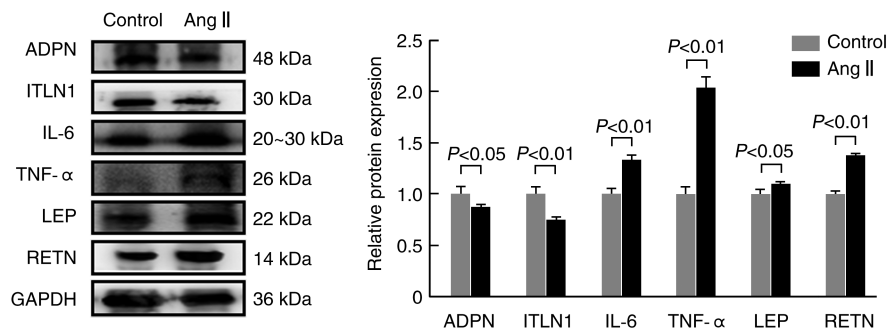


图 3. Ang II 影响白色脂肪细胞的脂肪因子表达 ($n=3$)

Figure 3. Ang II affects the adipokine expression of white adipocytes ($n=3$)

2.3 AngII 激活白色脂肪细胞中 p53/SAT1 信号通路

为了探究 Ang II 诱导白色脂肪细胞铁死亡的机制,本课题组通过文献复习发现抑癌基因 p53 与其靶基因 SAT1 参与铁死亡的发生。然而,Ang II 是否激活 p53/SAT1 信号通路参与铁死亡尚未可知。通过 FerrDb 数据库和 STRING 数据库进行生物信息分析,结果发现 p53/SAT1 信号通路与铁死亡密切

相关(图 4A~4C)。本研究检测了白色脂肪细胞中 p53 和 SAT1 的蛋白表达,结果显示 Ang II 显著促进 p53 和 SAT1 的蛋白表达,与对照组比较,分别增加 10.60% 和 50.30% ($P<0.05$,图 4D),表明 Ang II 诱导的白色脂肪细胞铁死亡可能与 p53/SAT1 信号通路激活有关。

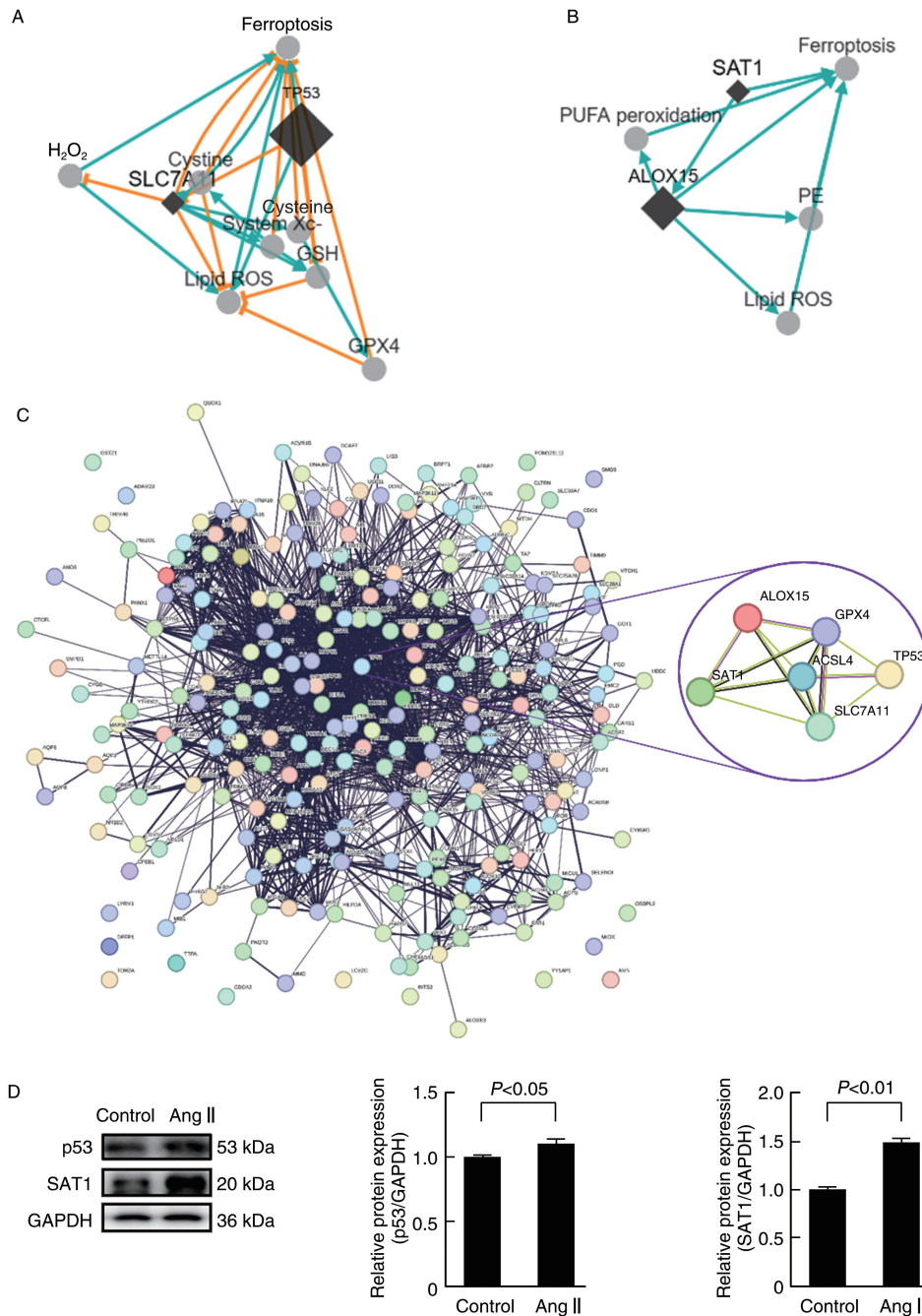


图 4. Ang II 激活白色脂肪细胞中 p53/SAT1 信号通路

A 和 B 为 FerrDb 数据库显示 p53 和 SAT1 均促进铁死亡的发生,图中蓝色线表示促进作用,橙色线表示抑制作用。C 为 PPI 网络分析显示 p53 与 SAT1 的调控关系。D 为 Western blot 检测白色脂肪细胞中 p53 和 SAT1 的蛋白表达变化($n=3$)。

Figure 4. Ang II activates the p53/SAT1 signaling pathway in white adipocytes

2.4 Ang II 激活 p53/SAT1 信号通路诱导白色脂肪细胞铁死亡和脂肪因子表达改变

为了明确 p53/SAT1 信号通路在 Ang II 诱导的白色脂肪细胞铁死亡中的作用,采用 p53 抑制剂 PFT- α 处理白色脂肪细胞。Western blot 结果显示, PFT- α 显著抑制了 p53 和 SAT1 的表达,与 Ang II 组相比, Ang II +PFT- α 组的 p53 和 SAT1 的蛋白表达分别降低了 70.90% 和 53.18% ($P < 0.01$, 图 5A)。在 Western blot 结果中,本研究发现 PFT- α 显著改善了 Ang II 诱导的白色脂肪细胞铁死亡,与 Ang II

组相比, Ang II +PFT- α 组的 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达分别上升 100.9% 和 17.07% ($P < 0.01$), ACSL4 蛋白表达下降 53.86% ($P < 0.01$, 图 5B)。同时, PFT- α 还改善了白色脂肪细胞的脂肪因子表达谱,与 Ang II 组相比, Ang II +PFT- α 组的 ADPN 蛋白表达上升 62.25% ($P < 0.01$), TNF- α 、LEP 和 RETN 蛋白表达分别下降 17.56%、30.18% 和 16.45% ($P < 0.05$, 图 5C)。以上结果证实 Ang II 通过激活 p53/SAT1 信号通路诱导白色脂肪细胞铁死亡,并改变其脂肪因子的表达。

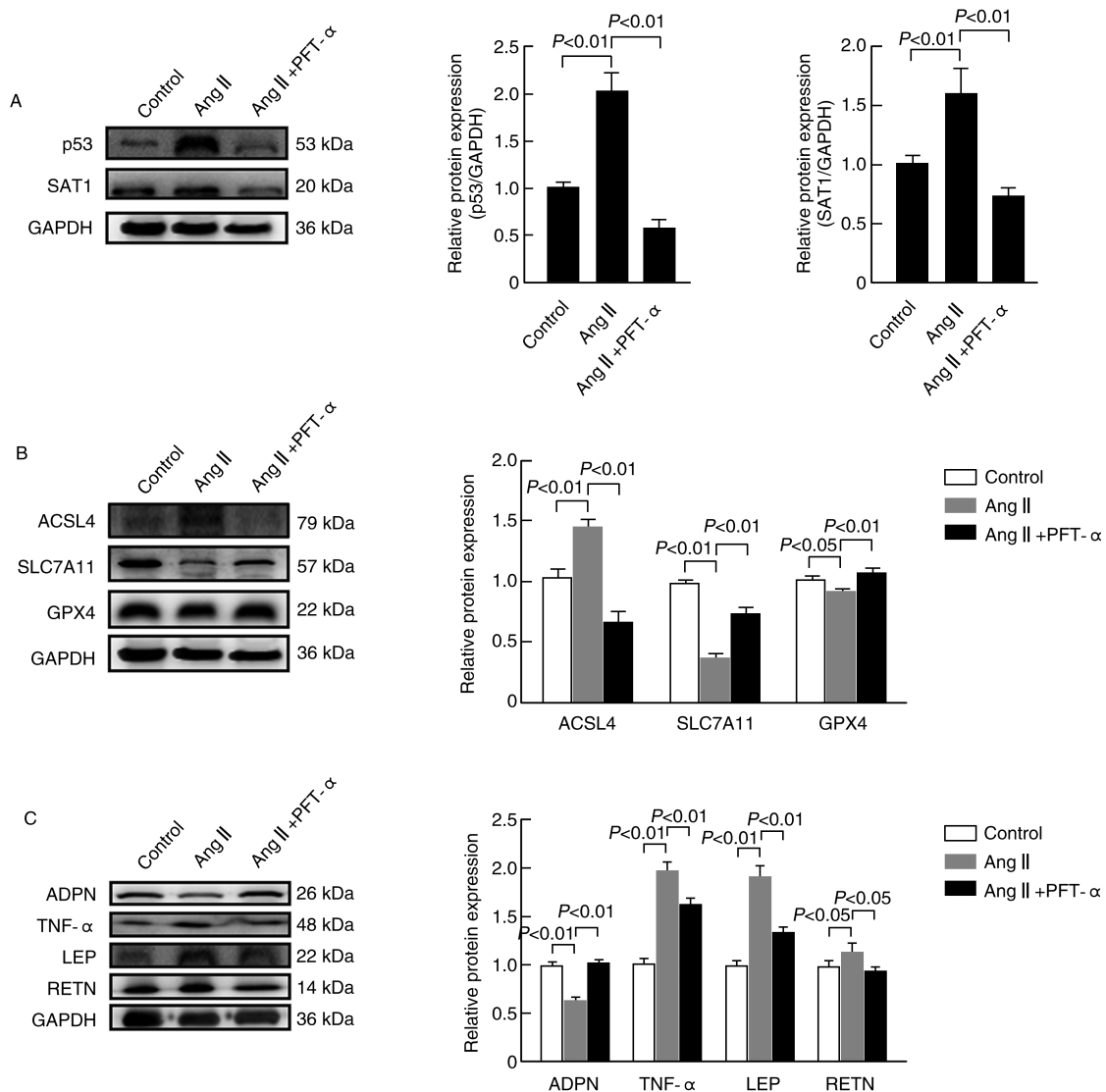


图 5. Ang II 激活 p53/SAT1 信号通路诱导白色脂肪细胞铁死亡和脂肪因子表达改变 ($n=3$)

A 为 Western blot 检测加入 PFT- α 后白色脂肪细胞中 p53 和 SAT1 的蛋白表达及其量化分析;

B 为 Western blot 检测加入 PFT- α 后白色脂肪细胞中 ACSL4、SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达及其量化分析;

C 为 Western blot 检测加入 PFT- α 后白色脂肪细胞中脂肪因子的蛋白表达及其量化分析。

Figure 5. Ang II activates p53/SAT1 signaling pathway to induce ferroptosis and adipokine expression changes in white adipocytes ($n=3$)

3 讨论

铁死亡与多种分子、酶以及细胞功能密切相关,特别是与抗氧化系统、铁代谢和脂肪酸代谢之间的交互作用。GSH 是维持细胞内抗氧化环境的关键物质,能够提供电子,帮助 GPX4 还原脂质过氧化物,GSH 水平下降会使抗氧化防御失效,从而促进铁死亡^[11]。SLC7A11 是一种氨基酸转运蛋白,主要负责谷氨酸的摄取和半胱氨酸的排出。而半胱氨酸是合成 GSH 的前体,因此,SLC7A11 对 GSH 合成至关重要。当 SLC7A11 的表达下降或功能失常时,细胞内的半胱氨酸供应减少,从而导致 GSH 的合成受限,抗氧化能力降低,促进铁死亡的发生^[12]。铁稳态失衡是铁死亡发生的主要机制之一,IRP-1 作为一种铁代谢调控蛋白,在铁的稳态调节中发挥重要作用,它通过与铁调节元素(iron regulating element,IRE)结合,调节铁代谢相关基因的表达,如转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1,TFR1)和铁硫蛋白(ferritin)^[13]。因此,IRP-1 在铁死亡中的作用是通过调节铁的代谢来影响铁死亡的发生。上述这些分子之间相互作用,影响细胞的氧化还原状态、铁代谢以及脂肪酸代谢,从而共同调控铁死亡的发生。在细胞功能层面,铁死亡的发生通常伴随着 MMP 的丧失。铁和过量的 ROS 会损伤线粒体膜,导致膜电位下降。膜电位的丧失不仅破坏了 ATP 合成和细胞的能量供应,还进一步促进氧化应激和脂质过氧化物的积累,从而推动铁死亡的发生^[14]。本研究发现,在体外利用 Ang II 处理 3T3-L1 诱导而来的白色脂肪细胞后,细胞内的 GPX4、IRP-1 和 SLC7A11 表达水平以及 GSH 含量和 MMP 水平均显著下调,ACSL4 的表达水平显著上调,且在加入 Fer-1 之后,其铁死亡水平得到了部分缓解,提示 Ang II 诱导了白色脂肪细胞的铁死亡,这可能为 Ang II 参与肥胖的发生和进展提供了新的研究视角。

除了储能和保温作用外,WAT 还是体内重要的内分泌器官,分泌的 ADPN、LEP 和 RETN 等脂肪因子,可参与调节胰岛素敏感性、代谢、炎症等重要生理过程^[15]。例如,ADPN 是 WAT 分泌的主要脂肪因子,具有提高胰岛素敏感性和抗炎特性,能够减少动脉粥样硬化和 2 型糖尿病的发生风险。RETN 被认为在胰岛素抗性中发挥重要作用,通过干扰胰岛素信号传导路径,降低胰岛素的敏感性,增加血糖水平。RETN 还可以通过促进炎症因子的分泌(如 TNF- α 、IL-6)进一步加速代谢疾病的进展。在肥胖个体中,RETN 水平通常升高,可能与肥胖相关

的代谢异常和心血管疾病有关。LEP 是由脂肪细胞分泌的激素,尤其在 WAT 中大量合成。LEP 通过作用于下丘脑,调节食欲和能量平衡。当体内脂肪储存充足时,LEP 水平升高,抑制食欲并增加能量消耗;反之,则刺激食欲^[15]。本研究发现,Ang II 改变了白色脂肪细胞的脂肪因子表达谱,使抗炎脂肪因子 ADPN 和 ITLN1 表达降低,促炎脂肪因子 LEP、RETN、TNF- α 和 IL-6 表达升高。

在观察到 Ang II 诱导白色脂肪细胞的铁死亡后,其背后的分子机制亦值得让人深究。p53 是一种肿瘤抑制基因,通常与细胞周期、DNA 修复、凋亡和衰老等生物学过程相关。近年来的研究发现,p53 也与铁死亡有着密切的联系^[16]。p53 上调可以通过 SAT1 的激活,增加脂质过氧化和铁的积累,从而促进铁死亡的发生^[17]。在抗肿瘤治疗中,调控 p53 诱导铁死亡来抑制肿瘤细胞的存活已成为一种有效的策略^[18]。在神经退行性疾病和肝脏损伤等疾病中,铁死亡的异常激活也可能与 p53 和 SAT1 的功能失调相关^[19]。因此,研究这两个因子的活动,可能为挖掘铁死亡的机制提供思路。本研究检测了 Ang II 诱导下的白色脂肪细胞内 p53 和 SAT1 的蛋白表达,结果显示两者的表达水平均升高。在加入 PFT- α 后,细胞内 p53 和 SAT1 的蛋白表达下调,细胞内铁死亡水平和脂肪因子表达得到了改善,这表明 Ang II 通过激活 p53/SAT1 信号通路诱导白色脂肪细胞铁死亡和脂肪因子表达谱改变。

综上所述,本研究结果表明 Ang II 通过激活 p53/SAT1 信号通路诱导白色脂肪细胞铁死亡,为 Ang II 参与肥胖和其相关的代谢性疾病提供了新的研究视角。

[参考文献]

- [1] 石晓东,阮承超. 脂肪功能紊乱参与心血管稳态失衡调控的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(1): 21-26.
- SHI X D, RUAN C C. Research progress of adipose dysfunction involved in the regulation of cardiovascular homeostasis imbalance[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(1): 21-26.
- [2] CAI Z, FANG L, JIANG Y, et al. Angiotensin II promotes white adipose tissue browning and lipolysis in mice[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 6022601.
- [3] LIN H, GEURTS F, HASSLER L, et al. Kidney angiotensin in cardiovascular disease: formation and drug targeting[J]. Pharmacol Rev, 2022, 74(3): 462-505.
- [4] PROENCA A B, MEDEIROS G R, REIS G D S, et al.

- Adipose tissue plasticity mediated by the counter regulatory axis of the renin-angiotensin system: role of Mas and MrgD receptors[J]. *J Cell Physiol*, 2024, 239(6): e31265.
- [5] GAO L, ZHANG J, YANG T, et al. Sting/ACSL4 axis-dependent ferroptosis and inflammation promote hypertension-associated chronic kidney disease[J]. *Mol Ther*, 2023, 31(10): 3084-3103.
- [6] ZHANG Z, TANG J, SONG J, et al. Elabela alleviates ferroptosis, myocardial remodeling, fibrosis and heart dysfunction in hypertensive mice by modulating the IL-6/STAT3/GPX4 signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 181: 130-142.
- [7] ZHONG X, WANG K, WANG Y, et al. Angiotensin II directly bind P2X7 receptor to induce myocardial ferroptosis and remodeling by activating human antigen R[J]. *Redox Biol*, 2024, 72: 103154.
- [8] 徐倩, 姜志胜. 动脉粥样硬化机制研究的新认识[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2024, 32(11): 921-931.
- XU Q, JIANG Z S. New insights into the mechanisms of atherosclerosis[J]. *Chin J Arterioscler*, 2024, 32(11): 921-931.
- [9] 周雅婷, 向琼, 廖韦, 等. 铁死亡: 腹主动脉瘤防治新靶点? [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2023, 31(6): 527-532.
- ZHOU Y T, XIANG Q, LIAO W, et al. Ferroptosis: a new target for the prevention and treatment of abdominal aortic aneurysm? [J]. *Chin J Arterioscler*, 2023, 31(6): 527-532.
- [10] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [11] CHEN X, LI J, KANG R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081.
- [12] BADGLEY M A, KREMER D M, MAURER H C, et al. Cysteine depletion induces pancreatic tumor ferroptosis in mice[J]. *Science*, 2020, 368(6486): 85-89.
- [13] YAO F, CUI X, ZHANG Y, et al. Iron regulatory protein 1 promotes ferroptosis by sustaining cellular iron homeostasis in melanoma[J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(3): 657.
- [14] ZHENG J, CONRAD M. The metabolic underpinnings of ferroptosis[J]. *Cell Metab*, 2020, 32(6): 920-937.
- [15] LIU L, SHI Z, JI X, et al. Adipokines, adiposity, and atherosclerosis[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(5): 272.
- [16] WANG H, GUO M, WEI H, et al. Targeting p53 pathways: mechanisms, structures, and advances in therapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 92.
- [17] KANG R, KROEMER G, TANG D. The tumor suppressor protein p53 and the ferroptosis network [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 162-168.
- [18] HASSANNIA B, VANDENABEELE P, VANDEN BERGHE T. Targeting ferroptosis to iron out cancer [J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(6): 830-849.
- [19] OU Y, WANG S J, LI D, et al. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(44): E6806-E6812.
- (此文编辑 许雪梅)

(上接第 384 页)

- [28] GABRIEL T L, TOL M J, OTTENHOF R, et al. Lysosomal stress in obese adipose tissue macrophages contributes to MITF-dependent Gpnmbinduction[J]. *Diabetes*, 2014, 63(10): 3310-3323.
- [29] LIU L, TAO Z, ZHENG L D, et al. FoxO1 interacts with transcription factor EB and differentially regulates mitochondrial uncoupling proteins via autophagy in adipocytes[J]. *Cell Death Discov*, 2016, 2: 16066.
- [30] ZHOU J, LU Y, LIN Y, et al. Overexpression of hepatic pescadillo 1 in obesity induces lipid dysregulation by inhibiting autophagy[J]. *Transl Res*, 2023, 258: 1-15.
- [31] KIM J, KIM S H, KANG H, et al. TFEB-GDF15 axis protects against obesity and insulin resistance as a lysosomal stress response [J]. *Nat Metab*, 2021, 3(3): 410-427.
- [32] PASTORE N, VAINSHTEIN A, KLISCH T J, et al. TFE3 regulates whole-body energy metabolism in cooperation with TFEB[J]. *EMBO Mol Med*, 2017, 9(5): 605-621.
- [33] JI J, PETROPAVLOVSKAIA M, KHATCHADOURIAN A, et al. Type 2 diabetes is associated with suppression of autophagy and lipid accumulation in β -cells[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2890-2900.
- [34] LIM H, LIM Y M, KIM K H, et al. A novel autophagy enhancer as a therapeutic agent against metabolic syndrome and diabetes [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1438.
- [35] TRIVEDI P C, BARTLETT J J, PEREZ L J, et al. Glucolipotoxicity diminishes cardiomyocyte TFEB and inhibits lysosomal autophagy during obesity and diabetes [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1861(12 Pt A): 1893-1910.
- [36] SALMA N, SONG J S, KAWAKAMI A, et al. Tfe3 and Tfeb transcriptionally regulate peroxisome proliferator-activated receptor γ 2 expression in adipocytes and mediate adiponectin and glucose levels in mice[J]. *Mol Cell Biol*, 2017, 37(15): e00608-e00616.
- [37] SCHILLING J D, MACHKOVECH H M, HE L, et al. TLR4 activation under lipotoxic conditions leads to synergistic macrophage cell death through a TRIF-dependent pathway [J]. *J Immunol*, 2013, 190(3): 1285-1296.
- (此文编辑 许雪梅)