

· 论著 ·

# 缺氧诱导因子1 $\alpha$ 通过介导铁死亡影响动脉粥样硬化的机制研究

扫描二维码  
查看更多

蔡荟芝, 罗玲

作者单位: 710000陕西省西安市, 西安交通大学第一附属医院心血管内科

通信作者: 罗玲, E-mail: jklling2013@foxmail.com

**【摘要】** **目的** 探讨缺氧诱导因子1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )通过介导铁死亡影响动脉粥样硬化的机制。**方法** 本实验时间为2022年2月—2023年6月。人体试验: 选取西安交通大学第一附属医院收治的6例行颈动脉内膜切除术的颈动脉粥样硬化患者的手术标本为颈动脉粥样硬化组, 6例因糖尿病动脉闭塞所致下肢坏死而截肢者的手术标本为糖尿病动脉闭塞组, 6例下肢动脉粥样硬化患者的手术标本为下肢动脉粥样硬化组, 6例先天性四肢动静脉痿患者的手术标本为正常组。对四组手术标本进行苏木素-伊红(HE)染色、油红O染色、透射电子显微镜检查, 采用Western blotting法检测谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、HIF-1 $\alpha$ 表达水平。动物实验: 选取ApoE<sup>-/-</sup> C57BL/6小鼠18只, 采用简单随机法将小鼠分为对照组、高脂肪饮食(HFD)组、PX-478组, 每组6只。对照组小鼠采用正常饲料喂养; HFD组和PX-478组小鼠采用HFD连续喂养5个月。之后PX-478组小鼠给予PX-478 5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 每2 d腹腔注射1次; 对照组和HFD组小鼠给予等量0.9%氯化钠溶液, 每2 d腹腔注射1次, 均连续给药2个月。腹腔注射结束后处死小鼠, 取其主动脉。对三组小鼠主动脉窦进行HE染色、油红O染色、Russell-Movall五色染色, 采用Western blotting法检测HIF-1 $\alpha$ 表达水平。细胞实验: 选取THP-1细胞并诱导其向巨噬细胞分化, 将THP-1巨噬细胞分为THP-1巨噬细胞组、氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)组和ox-LDL+PX-478组, 其中ox-LDL组加入ox-LDL并孵育48 h, ox-LDL+PX-478组加入ox-LDL和PX-478并孵育48 h。采用Western blotting法检测GPX4、HIF-1 $\alpha$ 表达水平, 采用Mito-Tracker染色法计数活性氧(ROS)阳性细胞数, 测定铁含量、谷胱甘肽(GSH)水平。**结果** 人体试验结果: HE染色结果显示, 与正常组相比, 颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组动脉中可见内膜增厚、纤维帽和核心坏死的动脉粥样硬化斑块。油红O染色结果显示, 与正常组相比, 颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组动脉内膜存在广泛的脂质沉积。透射电子显微镜检查结果显示, 与正常组相比, 颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组动脉中线粒体普遍较小, 线粒体嵴模糊。下肢动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和颈动脉粥样硬化组GPX4表达水平低于正常组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平高于正常组( $P<0.05$ )。动物实验结果: HE染色结果显示, 与对照组相比, HFD组小鼠主动脉窦中斑块形成, 胶原纤维沉积; 与HFD组相比, PX-478组小鼠主动脉窦中斑块形成、胶原纤维沉积减少。油红O染色结果显示, 与对照组相比, HFD组小鼠主动脉窦中脂质沉积; 与HFD组相比, PX-478组小鼠主动脉窦中脂质沉积减少。HFD组斑块面积、脂质面积、黏蛋白面积大于对照组和PX-478组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平高于对照组和PX-478组( $P<0.05$ )。细胞实验结果: ox-LDL组和ox-LDL+PX-478组GPX4表达水平、GSH水平低于THP-1巨噬细胞组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平、ROS阳性细胞数、铁含量高于THP-1巨噬细胞组( $P<0.05$ ); ox-LDL+PX-478组GPX4表达水平、GSH水平高于ox-LDL组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平、ROS阳性细胞数、铁含量低于ox-LDL组( $P<0.05$ )。**结论** 动脉粥样硬化过程中存在铁死亡现象, HIF-1 $\alpha$ 表达水平升高; 下调HIF-1 $\alpha$ 表达可减少ROS生成, 升高GSH水平, 抑制铁死亡, 从而减轻动脉粥样硬化。

**【关键词】** 动脉粥样硬化; 缺氧诱导因子1 $\alpha$ ; 铁死亡**【中图分类号】** R 543.5 **【文献标识码】** A **DOI:** 10.12114/j.issn.1008-5971.2024.00.014

## Mechanism of Hypoxia-Inducing Factor 1 $\alpha$ Influencing Atherosclerosis Mediated by Ferroptosis

CAI Huizhi, LUO Ling

Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710000, China

Corresponding author: LUO Ling, E-mail: jklling2013@foxmail.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the mechanism of hypoxia-inducing factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) influencing atherosclerosis mediated by ferroptosis. **Methods** The experiment time was from February 2022 to June 2023. Human trial: 6 surgical specimens from patients with carotid atherosclerosis undergoing carotid endarterectomy and admitted to the First Affiliated

Hospital of Xi'an Jiaotong University were selected as the carotid atherosclerosis group, 6 surgical specimens from patients with amputation due to lower limb necrosis caused by diabetes artery occlusion were selected as the diabetes artery occlusion group, 6 surgical specimens from patients with lower extremity atherosclerosis were selected as the lower extremity atherosclerosis group, 6 surgical specimens from patients with congenital arteriovenous fistula in the limbs were selected as the normal group. Surgical specimens in four groups were subjected to hematoxylin-eosin (HE) staining, oil red O staining, and transmission electron microscopy examination, Western blotting method was used to detect glutathioneperoxidase 4 (GPX4) and HIF-1 $\alpha$  expression levels. Animal experiment: 18 C57BL/6 mice with ApoE<sup>-/-</sup> were selected and divided into the control group, the high fat diet (HFD) group, and the PX-478 group by simple randomization, with 6 mice in each group. The mice in control group were fed with normal feed; the mice in HFD group and PX-478 group were continuously fed with HFD for 5 months. Afterwards, the mice in PX-478 group were given PX-478 5 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, intraperitoneal injection every 2 days; the mice in control group and HFD group were given an equal amount of 0.9% sodium chloride solution, intraperitoneal injection every 2 days, administered continuously for 2 months. After intraperitoneal injection, the mice were euthanized and their aortas were taken. Aortic sinus of mice in 3 groups were subjected to HE staining, oil red O staining, and Russell-Movall five color staining, Western blotting method was used to detect HIF-1 $\alpha$  expression level. Cell experiment: THP-1 cells were selected and induced to differentiation into macrophages. THP-1 macrophages cells were divided into the THP-1 macrophage group, oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) group, and ox-LDL + PX-478 group. The ox-LDL group was added to ox-LDL and incubated for 48 hours, the ox-LDL + PX-478 group was added to ox-LDL and PX-478 and incubated for 48 hours. Western blotting method was used to detect GPX4 and HIF-1 $\alpha$  expression levels, Mito-Tracker staining was used to count the number of reactive oxygen species (ROS) positive cells, and iron content and glutathione (GSH) level were measured. **Results** Human trial results: HE staining results showed that compared with the normal group, atherosclerotic plaques with thickening intima, fibrous cap and core necrosis were observed in carotid atherosclerosis group, diabetes artery occlusion group and lower extremity atherosclerosis group. Oil red O staining results showed that compared with the normal group, the carotid atherosclerosis group, diabetes artery occlusion group and lower extremity atherosclerosis group had extensive lipid deposition in the intima of the arteries. Transmission electron microscopy examination results showed that compared with the normal group, mitochondria of the carotid atherosclerosis group, diabetes artery occlusion group and lower extremity atherosclerosis group were generally smaller and the mitochondrial ridge was fuzzy. GPX4 expression level in lower extremity atherosclerosis group, diabetes artery occlusion group and carotid atherosclerosis group was lower than that in normal group, HIF-1 $\alpha$  expression level was higher than that in the normal group ( $P < 0.05$ ). Animal experiment results: HE staining results showed that compared with the control group, plaques formed in the aortic sinus and collagen fibers were deposited in the HFD group; compared with the HFD group, the formation of plaques and deposition of collagen fibers in the aortic sinus of PX-478 group were reduced. Oil red O staining results showed that compared with the control group, lipid deposition was observed in the aortic sinuses of mice in the HFD group; compared with the HFD group, lipid deposition decreased in the aortic sinuses of mice in the PX-478 group. The plaque area, lipid area, and mucin area in the HFD group were larger than those in the control group and PX-478 group, and HIF-1 $\alpha$  expression level was higher than that in the control group and PX-478 group ( $P < 0.05$ ). Cell experiment results: the GPX4 expression level and GSH level in the ox-LDL group and ox-LDL + PX-478 group were lower than those in the THP-1 macrophage group, HIF-1 $\alpha$  expression level, the number of ROS positive cells, and iron content were higher than those in the THP-1 macrophage group ( $P < 0.05$ ); the GPX4 expression level and GSH level in the ox-LDL + PX-478 group were higher than those in the ox-LDL group, HIF-1 $\alpha$  expression level, the number of ROS positive cells, and iron content were lower than those in the ox-LDL group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** During atherosclerosis, ferroptosis is activated, HIF-1 $\alpha$  expression level is increased. Down-regulating HIF-1 $\alpha$  expression can reduce ROS production, increase GSH level, inhibit ferroptosis, and thus reduce atherosclerosis.

**【 Key words 】** Atherosclerosis; Hypoxia-inducing factor 1 $\alpha$ ; Ferroptosis

动脉粥样硬化是一种慢性炎症性和代谢性疾病,可引起心脏疾病、缺血性脑卒中和外周动脉疾病,其以脂质积累和炎症浸润为主要病理特征。研究表明,在动脉粥样硬化初始阶段,循环中的单核细胞通过功能失调的内皮细胞迁移至内膜,后分化为巨噬细胞<sup>[1]</sup>。巨噬细胞可结合氧化型低密度脂蛋白(oxidized low-density

lipoprotein, ox-LDL),但当ox-LDL含量增多并超过巨噬细胞的清除能力时,巨噬细胞因内部的脂肪含量过高而出现泡沫化,而巨噬细胞泡沫化被认为是动脉粥样硬化坏死核心形成的关键步骤<sup>[2]</sup>。因此,阻止巨噬细胞泡沫化是动脉粥样硬化的治疗靶点。

铁死亡是一种新的细胞死亡形式,其特点是铁

积累过多和脂质过氧化<sup>[3]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶4 (glutathioneperoxidase 4, GPX4) 是一种关键的抗铁死亡酶, 其可将脂质氢过氧化物转化为无毒的脂质醇, 研究显示, 心肌细胞敲除GPX4基因后, 发生了脂质过氧化, 从而导致细胞铁死亡增加; 而GPX4过表达可减少脂质过氧化, 抑制动脉粥样硬化进展<sup>[4]</sup>。研究证实, 铁死亡可诱导动脉粥样硬化斑块不稳定, 而巨噬细胞泡沫化是晚期动脉粥样硬化斑块的一个重要特征, 其有助于动脉粥样硬化坏死核心的形成, 并导致斑块不稳定<sup>[5]</sup>。缺氧诱导因子1 $\alpha$  (hypoxia-inducing factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 与动脉粥样硬化之间存在密切关系。在缺氧条件下, HIF-1 $\alpha$  的泛素化和降解过程被抑制, 导致HIF-1 $\alpha$  迅速累积, 启动和促进巨噬细胞泡沫化、内皮细胞功能障碍, 加重炎症反应, 促进血管生成及动脉粥样硬化<sup>[6]</sup>。HIF-1 $\alpha$  被证实是动脉粥样硬化中与铁死亡相关的差异表达基因, PX-478是小分子量化合物, 其可以特异性地抑制HIF-1 $\alpha$ <sup>[7]</sup>。因此, 推测调节铁死亡可成为动脉粥样硬化的潜在治疗方法。本研究旨在探讨HIF-1 $\alpha$  通过介导铁死亡影响动脉粥样硬化的机制, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 人体试验

#### 1.1.1 研究对象

选取2022年2月—2023年6月西安交通大学第一附属医院收治的6例行颈动脉内膜切除术的颈动脉粥样硬化患者的手术标本为颈动脉粥样硬化组, 6例因糖尿病动脉闭塞所致下肢坏死而截肢者的手术标本为糖尿病动脉闭塞组, 6例下肢动脉粥样硬化患者的手术标本为下肢动脉粥样硬化组, 6例先天性四肢动静脉瘘患者的手术标本为正常组。

#### 1.1.2 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色

将四组手术标本纵向切开并暴露动脉内膜表面, 采用4%多聚甲醛溶液固定过夜, 切片, 后依次将切片放入二甲苯 I 10 min、二甲苯 II 10 min、无水乙醇 I 5 min、无水乙醇 II 5 min、95%乙醇溶液5 min、90%乙醇溶液5 min、80%乙醇溶液5 min、70%乙醇溶液5 min, 后采用蒸馏水清洗, 进行HE染色, 将切片脱水、封固后采用显微镜观察。

#### 1.1.3 油红O染色

将四组手术标本纵向切开并暴露动脉内膜表面, 采用4%多聚甲醛溶液固定过夜, 切片, 采用0.5%油红O溶液染色30 min, 后用60%异丙醇浸洗, 将切片脱水、封固后采用显微镜观察。

#### 1.1.4 透射电子显微镜检查

将四组手术标本置于0.1 mmol/L 2.5%戊二醛磷酸钠缓冲液 (pH值7.4) 中固定, 室内放置2~3 h, 采用

2.5%戊二醛磷酸钠缓冲液洗涤3次, 采用1%锇酸水溶液在4℃下固定2 h, 后分别采用10%、30%、50%、70%、90%、100%乙醇脱水, 采用3%醋酸铀酰和枸橼酸铅进行双染色, 在LVEM5台式透射电子显微镜下观察动脉结构变化。

### 1.1.5 Western blotting法检测GPX4、HIF-1 $\alpha$ 表达水平

将四组手术标本冷冻在液氮中, 在RIPA缓冲液中剪碎组织后, 4℃下12 000 r/min离心15 min (离心半径6.0 cm), 收集上清液, 采用BCA法测定样品中总蛋白浓度。每个样品分离50  $\mu$ g蛋白, 进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 然后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜上, 在含有0.05% Tween-20的tris缓冲液 (tris buffered saline, TBS) 中加入5%干奶粉, 室温封闭2 h后加入GPX4抗体 (67763-1-Ig)、HIF-1 $\alpha$  抗体 (BF8002) 与抗GAPDH小鼠单克隆抗体 (60004-1-Ig), 于4℃环境下孵育过夜, 加入经辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 处理的二抗, 室温孵育1 h, 采用Image J软件分析各目的蛋白条带的灰度值。

### 1.2 动物实验

#### 1.2.1 实验时间、实验动物及分组

实验时间: 2022年3月—2023年6月。从西安交通大学第一附属医院实验室实验动物中心选取ApoE<sup>-/-</sup> C57BL/6小鼠 (4周龄) 18只。将小鼠置于温度控制的环境中 (温度24~25℃, 相对湿度55%), 光照12 h/黑暗12 h, 自由摄入食物和水。采用简单随机法将小鼠分为对照组、高脂肪饮食 (high fat diet, HFD) 组、PX-478组, 每组6只。对照组小鼠采用正常饲料喂养; HFD组和PX-478组小鼠采用HFD连续喂养5个月。之后PX-478组小鼠给予PX-478 5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 每2 d腹腔注射1次; 对照组和HFD组小鼠给予等量0.9%氯化钠溶液, 每2 d腹腔注射1次, 均连续给药2个月。腹腔注射结束后处死小鼠, 取其主动脉。

#### 1.2.2 HE染色

将小鼠主动脉窦纵向切开并暴露内膜表面, 采用4%多聚甲醛溶液固定过夜, 切片, 检测方法同1.1.2。

#### 1.2.3 油红O染色

将小鼠主动脉窦纵向切开并暴露内膜表面, 采用4%多聚甲醛溶液固定过夜, 切片, 检测方法同1.1.3。

#### 1.2.4 Russell-Movall五色染色

Russell-Movall五色染色试剂盒购自上海钰博生物科技有限公司。将小鼠主动脉窦纵向切开并暴露内膜表面, 石蜡封层, 后进行脱蜡; 采用试剂盒A液染色20 min, 之后采用流水冲洗5 min; 采用试剂盒B液染色

1 h, 之后采用流水冲洗20 min; 采用试剂盒C液染色15 min, 之后采用蒸馏水冲洗5次; 采用试剂盒D液分化至弹力纤维与背景对比鲜明, 然后采用蒸馏水清洗5次; 采用试剂盒E液染色1 min, 之后采用流水冲洗5 min、蒸馏水稍洗; 采用试剂盒F液染色1~5 min, 之后采用蒸馏水冲洗5次、0.5%醋酸稍洗; 采用试剂盒G液染色2次、5 min/次, 之后采用0.5%醋酸稍洗, 然后速洗3次; 采用试剂盒H液染色15 min, 然后快洗3次; 采用二甲苯透明2~3次, 然后采用人工树脂封固。测量斑块面积、脂质面积和黏蛋白面积。

#### 1.2.5 Western blotting法检测HIF-1 $\alpha$ 表达水平

将小鼠主动脉标本冷冻在液氮中, 其余步骤同1.1.5。

### 1.3 细胞实验

#### 1.3.1 实验时间

2022年3月—2023年6月。

#### 1.3.2 细胞培养

THP-1细胞购自北京伊莱瑞生物科技有限公司, 将THP-1细胞在PRMI-1640培养基(含有10%胎牛血清和1%青霉素链霉素)中培养24 h, 培养条件: 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的潮湿孵化箱中。将THP-1细胞接种于6孔板中, 每孔 $1 \times 10^6$ 个细胞, 采用100 nmol/L佛波酯处理48 h, 以诱导THP-1细胞向巨噬细胞分化。将THP-1巨噬细胞分为THP-1巨噬细胞组、ox-LDL组和ox-LDL+PX-478组, 其中ox-LDL组加入100  $\mu$ g/ml ox-LDL并孵育48 h, ox-LDL+PX-478组加入100  $\mu$ g/ml ox-LDL和PX-478(100  $\mu$ mol/L)并孵育48 h。

#### 1.3.3 Western blotting法检测GPX4、HIF-1 $\alpha$ 表达水平

用含有Roche蛋白酶抑制剂和磷酸盐抑制剂的RIPA缓冲液在冰上裂解三组细胞。细胞裂解物进行SDS-PAGE, 4 $^{\circ}$ C下12 000 r/min离心15 min(离心半径6.0 cm), 收集上清液, 采用BCA法测定样品中总蛋白浓度, 之后操作步骤同1.1.5。

#### 1.3.4 Mito-Tracker染色法

使用Mito-Tracker染色法对三组细胞进行染色, 具体方法为: 在三组细胞中加入提前配制好的Mito-Tracker Red氯甲基-X-迷迭胺(chloromethyl-X-rosemary amine, CMXRos), 于37 $^{\circ}$ C阴暗环境中孵育30 min, 后采用PBS洗涤, 用4%多聚甲醛溶液固定, 在室温下静置15 min, 使用荧光显微镜计数20倍镜下随机5个视野中染色的细胞〔即活性氧(reactive oxygen species, ROS)阳性细胞〕数, 求平均值。

#### 1.3.5 铁含量测定

将三组细胞接种于24孔板, 密度为 $2 \times 10^3$ 个/孔, 采用细胞内铁比色测定试剂盒(E1042)检测铁含量。

### 1.3.6 谷胱甘肽(glutathione, GSH)测定

将三组细胞接种于24孔板, 密度为 $2 \times 10^3$ 个/孔, 收集细胞进行裂解, 使用谷胱甘肽测定试剂盒(A006-2)检测GSH水平, 按照试剂盒说明书进行操作。

### 1.4 统计学方法

采用SPSS 21.0统计学软件进行数据处理。计量资料符合正态分布以( $\bar{x} \pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用SNK- $q$ 检验, 两组间比较采用成组 $t$ 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 人体试验结果

#### 2.1.1 HE染色和油红O染色

HE染色结果显示, 与正常组相比, 颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组动脉中可见内膜增厚、纤维帽和核心坏死的动脉粥样硬化斑块, 见图1。油红O染色结果显示, 与正常组相比, 颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组动脉内膜存在广泛的脂质沉积, 见图2。

#### 2.1.2 透射电子显微镜检查

透射电子显微镜检查结果显示, 与正常组相比, 颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组动脉中线粒体普遍较小, 线粒体嵴模糊, 见图3。

#### 2.1.3 GPX4、HIF-1 $\alpha$ 表达水平

四组GPX4、HIF-1 $\alpha$ 表达水平比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 其中下肢动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和颈动脉粥样硬化组GPX4表达水平低于正常组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平高于正常组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 见表1。

### 2.2 动物实验结果

#### 2.2.1 HE染色、油红O染色

HE染色结果显示, 与对照组相比, HFD组小鼠主

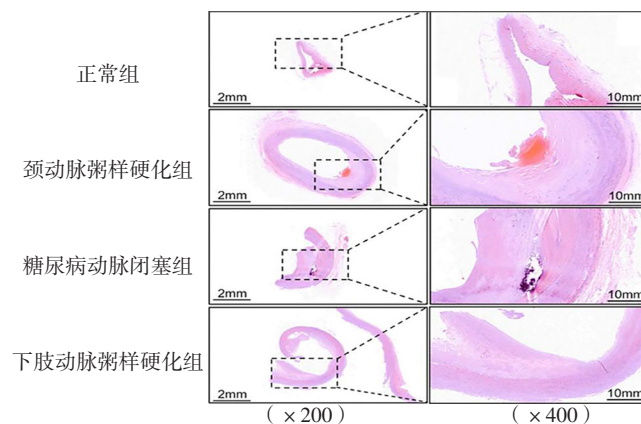


图1 正常组、颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组HE染色结果

Figure 1 HE staining results of normal group, carotid atherosclerosis group, diabetes artery occlusion group and lower extremity atherosclerosis group

动脉窦中斑块形成, 胶原纤维沉积; 与HFD组相比, PX-478组小鼠主动脉窦中斑块形成、胶原纤维沉积减少, 见图4。油红O染色结果显示, 与对照组相比, HFD组小鼠主动脉窦中脂质沉积; 与HFD组相比, PX-478组小鼠主动脉窦中脂质沉积减少, 见图5。

### 2.2.2 斑块面积、脂质面积、黏蛋白面积、HIF-1 $\alpha$ 表达水平

三组斑块面积、脂质面积、黏蛋白面积、HIF-1 $\alpha$

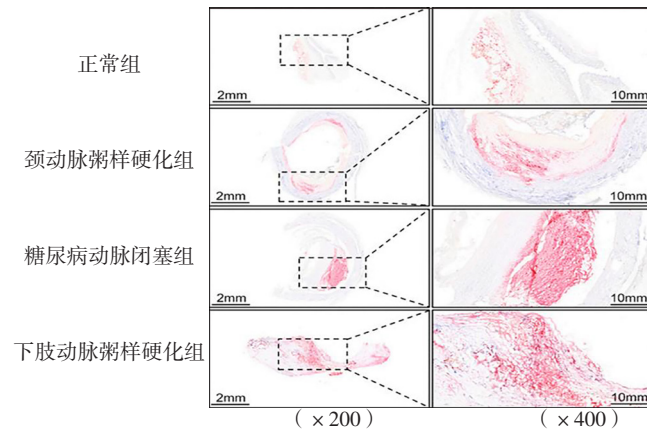


图2 正常组、颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组油红O染色结果

Figure 2 Oil red O staining results of normal group, carotid atherosclerosis group, diabetes artery occlusion group and lower extremity atherosclerosis group

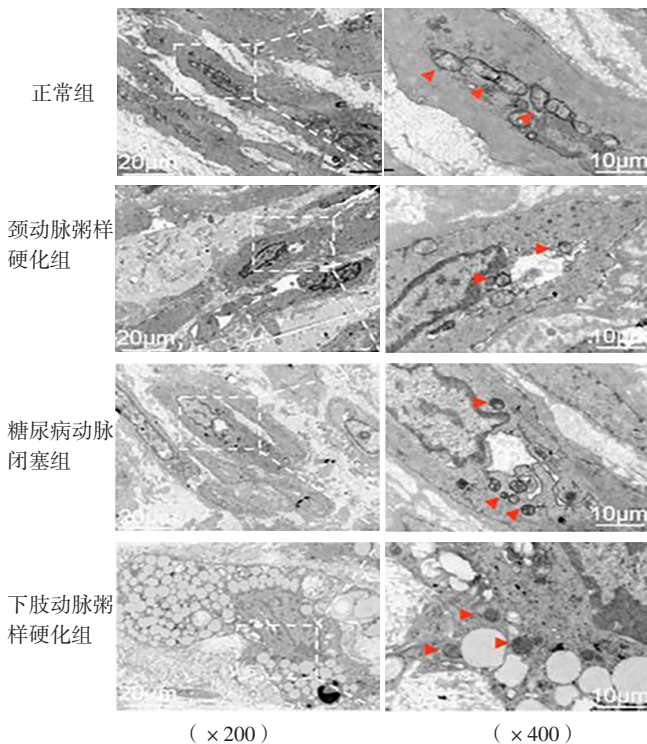


图3 正常组、颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组透射电子显微镜检查结果

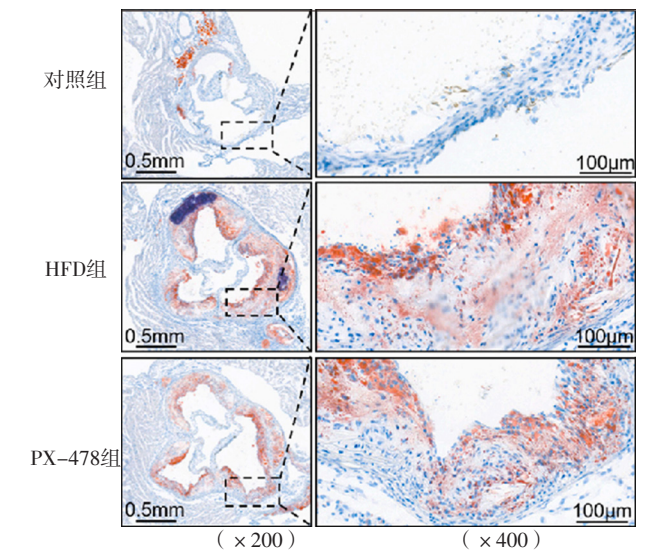
Figure 3 Transmission electron microscopy examination results of normal group, carotid atherosclerosis group, diabetes artery occlusion group and lower extremity atherosclerosis group

表1 正常组、颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组GPX4、HIF-1 $\alpha$  表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of GPX4 and HIF-1 $\alpha$  expression levels in normal group, carotid atherosclerosis group, diabetes artery occlusion group and lower extremity atherosclerosis group

组别	例数	GPX4	HIF-1 $\alpha$
正常组	6	1.31 $\pm$ 0.43	1.01 $\pm$ 0.31
下肢动脉粥样硬化组	6	0.51 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	1.92 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>
糖尿病动脉闭塞组	6	0.59 $\pm$ 0.33 <sup>a</sup>	2.56 $\pm$ 0.39 <sup>a</sup>
颈动脉粥样硬化组	6	0.71 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>	1.89 $\pm$ 0.38 <sup>a</sup>
F值		5.20	16.10
P值		0.04	<0.01

注: GPX4=谷胱甘肽过氧化物酶4, HIF-1 $\alpha$  =缺氧诱导因子1 $\alpha$ ; <sup>a</sup>表示与正常组比较,  $P < 0.05$ 。



注: HFD=高脂肪饮食。

图4 对照组、HFD组、PX-478组HE染色结果

Figure 4 HE staining results of control group, HFD group, PX-478 group

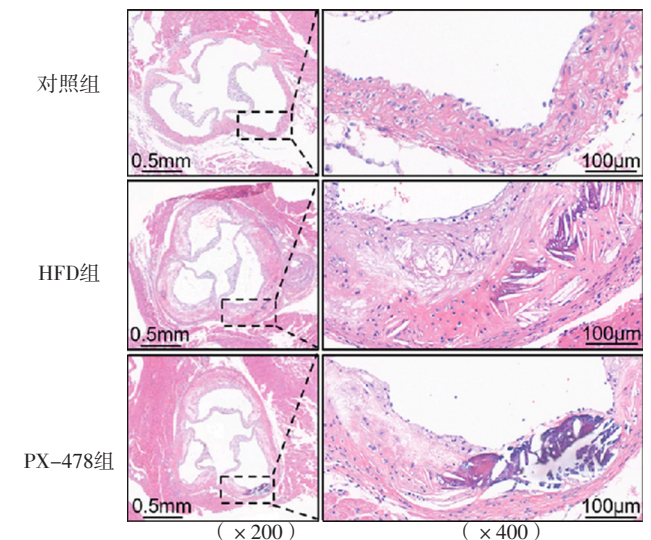


图5 对照组、HFD组、PX-478组油红O染色结果

Figure 5 Oil red O staining results of control group, HFD group, and PX-478 group

表达水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); HFD组斑块面积、脂质面积、黏蛋白面积大于对照组和PX-478组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平高于对照组和PX-478组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表2。

### 2.3 细胞实验结果

三组GPX4表达水平、HIF-1 $\alpha$ 表达水平、ROS阳性细胞数、铁含量、GSH水平比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 其中ox-LDL组和ox-LDL+PX-478组GPX4表达水平、GSH水平低于THP-1巨噬细胞组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平、ROS阳性细胞数、铁含量高于THP-1巨噬细胞组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); ox-LDL+PX-478组GPX4表达水平、GSH水平高于ox-LDL组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平、ROS阳性细胞数、铁含量低于ox-LDL组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表3。

### 3 讨论

研究显示, 铁死亡是铁依赖性调节性细胞死亡形式, 与细胞凋亡、坏死性凋亡和其他类型的细胞死亡不同<sup>[8]</sup>。研究显示, 抑制THP-1细胞向巨噬细胞分化及ox-LDL的促动脉粥样硬化作用可抑制铁死亡<sup>[9]</sup>。本研究人体试验结果显示: 颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组动脉中可见内膜增厚、纤维帽和核心坏死的动脉粥样硬化斑块; 动脉内膜存在广泛的脂质沉积; 动脉中线粒体普遍较小, 线粒体嵴模

糊。同时, 颈动脉粥样硬化组、糖尿病动脉闭塞组和下肢动脉粥样硬化组GPX4表达水平低于正常组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平高于正常组, 表明动脉粥样硬化过程中存在铁死亡现象。研究显示, 随着动脉粥样硬化的进展, 斑块的生长会导致血管狭窄, 从而限制血液中的氧气扩散到斑块区域的能力。随着斑块的发展, 氧气扩散到斑块的减少可能导致斑块内部缺氧, 导致动脉粥样硬化晚期斑块中心出现缺氧现象, 而斑块中心缺氧可能导致一些具有促动脉粥样硬化作用的分子和细胞的积累, 如巨噬细胞和泡沫细胞等, 这些细胞在缺氧环境下会释放出一些炎症因子和细胞因子等, 如HIF-1 $\alpha$ <sup>[10]</sup>。在缺氧条件下, HIF-1 $\alpha$ 聚集并易位到细胞核, 激活其功能靶基因, 且HIF-1 $\alpha$ 调控基因对动脉粥样硬化的进展有促进作用<sup>[11]</sup>。

研究表明, HIF-1 $\alpha$ 的积累与细胞外脂质核心的存在有关, 并与巨噬细胞和巨噬泡沫细胞之间有很好的共定位<sup>[12]</sup>。PX-478是一种抑制HIF-1 $\alpha$ 的特异性小分子抑制剂, 其通过调节参与胆固醇代谢的肝脏基因而降低胆固醇水平, 最终抑制动脉粥样硬化斑块形成或脂质的发展<sup>[13]</sup>。本研究动物实验结果显示, HFD组小鼠主动脉窦中斑块形成, 胶原纤维沉积, 脂质沉积; PX-478组小鼠主动脉窦中斑块形成、胶原纤维沉积、脂质沉积减少; HFD组斑块面积、脂质面积、黏蛋白面积大于对照组和PX-478组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平高于对照组和PX-478组。表明选择性HIF-1 $\alpha$ 抑制剂——PX-478可通过下调HIF-1 $\alpha$ 表达水平缩小斑块面积、脂质面积、黏蛋白面积, 进而抑制动脉粥样硬化, 提示PX-478是一种潜在的抗动脉粥样硬化药物。

研究显示, 抑制铁死亡可以减轻脂质过氧化, 从而减轻动脉粥样硬化小鼠主动脉内皮细胞的内皮功能障碍<sup>[9]</sup>。敲除HIF-1 $\alpha$ 基因能抑制巨噬细胞泡沫化, 也可抑制M1型巨噬细胞的分化, 降低炎症基因的表达, 进而减轻动脉粥样硬化<sup>[14-15]</sup>。本研究细胞实验结果显示, ox-LDL组和ox-LDL+PX-478组GPX4表达水平、GSH水平低于THP-1巨噬细胞组, HIF-1 $\alpha$ 表达水平、ROS阳性细胞数、铁含量高于THP-1巨噬细胞组;

表2 对照组、HFD组、PX-478组斑块面积、脂质面积、黏蛋白面积、HIF-1 $\alpha$ 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of plaque area, lipid area, mucin area and HIF-1 $\alpha$  expression level in control group, HFD group, PX-478 group

组别	只数	斑块面积 (mm <sup>2</sup> )	脂质面积 (mm <sup>2</sup> )	黏蛋白面积 (mm <sup>2</sup> )	HIF-1 $\alpha$
对照组	6	0.54 ± 0.14	0.62 ± 0.31	0.49 ± 0.22	0.96 ± 0.24
HFD组	6	1.22 ± 0.34 <sup>a</sup>	1.16 ± 0.37 <sup>a</sup>	1.19 ± 0.42 <sup>a</sup>	1.85 ± 0.31 <sup>a</sup>
PX-478组	6	0.66 ± 0.42 <sup>b</sup>	0.58 ± 0.41 <sup>b</sup>	0.54 ± 0.36 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.36 <sup>b</sup>
t值		7.59	8.41	6.43	9.02
P值		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: HFD=高脂肪饮食; <sup>a</sup>表示与对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>表示与HFD组比较,  $P < 0.05$ 。

表3 THP-1巨噬细胞组、ox-LDL组和ox-LDL+PX-478组GPX4、HIF-1 $\alpha$ 表达水平及ROS阳性细胞数、铁含量、GSH水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=6)

Table 3 Comparison of GPX4 and HIF-1 $\alpha$  expression levels, ROS positive cells, iron content, GSH level in THP-1 macrophage group, ox-LDL group, ox-LDL+PX-478 group

组别	GPX4	HIF-1 $\alpha$	ROS阳性细胞数 ( $\times 10^6/L$ )	铁含量 ( $\mu mol$ )	GSH ( $\mu mol$ )
THP-1巨噬细胞组	1.19 ± 0.41	1.22 ± 0.58	11.13 ± 1.33	1.56 ± 0.28	11.21 ± 0.98
ox-LDL组	0.52 ± 0.32 <sup>a</sup>	4.77 ± 0.64 <sup>a</sup>	78.98 ± 3.23 <sup>a</sup>	3.17 ± 0.41 <sup>a</sup>	7.71 ± 0.86 <sup>a</sup>
ox-LDL+PX-478组	0.64 ± 0.33 <sup>ab</sup>	2.09 ± 0.55 <sup>ab</sup>	54.64 ± 2.33 <sup>ab</sup>	2.01 ± 0.36 <sup>ab</sup>	9.09 ± 0.62 <sup>ab</sup>
F值	5.45	9.43	56.56	10.42	13.33
P值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注: ROS=活性氧, GSH=谷胱甘肽, ox-LDL=氧化型低密度脂蛋白; <sup>a</sup>表示与THP-1巨噬细胞组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup>表示与ox-LDL组比较,  $P < 0.05$ 。

ox-LDL+PX-478组GPX4表达水平、GSH水平高于ox-LDL组，HIF-1 $\alpha$ 表达水平、ROS阳性细胞数、铁含量低于ox-LDL组。表明ox-LDL可增加脂质ROS生成，降低GSH水平，促进铁死亡，而PX-478可抑制ox-LDL的上述作用。

#### 4 结论

综上所述，动脉粥样硬化过程中存在铁死亡现象，HIF-1 $\alpha$ 表达水平升高；下调HIF-1 $\alpha$ 表达可减少ROS生成，升高GSH水平，抑制铁死亡，从而减轻动脉粥样硬化。但本研究为单中心、小样本量基础研究，其结论需要在多中心、大样本量临床研究中进一步证实。

作者贡献：蔡荟芝、罗玲进行文章的构思与设计；蔡荟芝进行研究的实施与可行性分析、资料整理、论文撰写及修订；罗玲进行资料收集、统计学处理，负责文章的质量控制及审校，对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

#### 参考文献

- [1] KONG P, CUI Z Y, HUANG X F, et al. Inflammation and atherosclerosis: signaling pathways and therapeutic intervention [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7 (1): 131. DOI: 10.1038/s41392-022-00955-7.
- [2] WANG T, LU H H. Ganoderic acid A inhibits ox-LDL-induced THP-1-derived macrophage inflammation and lipid deposition via Notch1/PPAR $\gamma$ /CD36 signaling [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2021, 30 (10): 1031-1041. DOI: 10.17219/acem/137914.
- [3] TANG D L, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. *Cell Res*, 2021, 31 (2): 107-125. DOI: 10.1038/s41422-020-00441-1.
- [4] WANG Y L, YAN S, LIU X M, et al. PRMT4 promotes ferroptosis to aggravate doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibition of the Nrf2/GPX4 pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2022, 29 (10): 1982-1995. DOI: 10.1038/s41418-022-00990-5.
- [5] HE R Y, LIU B H, XIONG R, et al. Itaconate inhibits ferroptosis of macrophage via Nrf2 pathways against sepsis-induced acute lung injury [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8 (1): 43. DOI: 10.1038/s41420-021-00807-3.
- [6] KADOMOTO S, IZUMI K, MIZOKAMI A. Macrophage polarity and disease control [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 23 (1): 144. DOI: 10.3390/ijms23010144.
- [7] LIN Z H, SONG J L, GAO Y K, et al. Hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$ /lncRNA-PMAN inhibits ferroptosis by promoting the cytoplasmic translocation of ELAVL1 in peritoneal dissemination from gastric cancer [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102312. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102312.
- [8] YANG Y F, LUO M Y, ZHANG K X, et al. Nedd4 ubiquitylates VDAC2/3 to suppress erastin-induced ferroptosis in melanoma [J]. *Nat Commun*, 2020, 11 (1): 433. DOI: 10.1038/s41467-020-14324-x.
- [9] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Ferroptosis in infection, inflammation, and immunity [J]. *J Exp Med*, 2021, 218 (6): e20210518. DOI: 10.1084/jem.20210518.
- [10] THOMAS C, LELEU D, MASSON D. Cholesterol and HIF-1 $\alpha$ : dangerous liaisons in atherosclerosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 868958. DOI: 10.3389/fimmu.2022.868958.
- [11] WANG P C, ZENG G Y, YAN Y, et al. Disruption of adipocyte HIF-1 $\alpha$  improves atherosclerosis through the inhibition of ceramide generation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12 (4): 1899-1912. DOI: 10.1016/j.apsb.2021.10.001.
- [12] COWMAN S J, FUJA D G, LIU X D, et al. Macrophage HIF-1 $\alpha$  is an independent prognostic indicator in kidney cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26 (18): 4970-4982. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3890.
- [13] LUO F, LU F T, CAO J X, et al. HIF-1 $\alpha$  inhibition promotes the efficacy of immune checkpoint blockade in the treatment of non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2022, 531: 39-56. DOI: 10.1016/j.canlet.2022.01.027.
- [14] CHEN B, LIN S J, LI W T, et al. Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF in feline mammary gland carcinomas: association with pathological characteristics and clinical outcomes [J]. *BMC Vet Res*, 2020, 16 (1): 125. DOI: 10.1186/s12917-020-02338-y.
- [15] STEINBERGER K J, EUBANK T D. The underexplored landscape of hypoxia-inducible factor 2 alpha and potential roles in tumor macrophages: a review [J]. *Oxygen*, 2023, 3 (1): 45-76. DOI: 10.3390/oxygen3010005.

(收稿日期: 2023-08-03; 修回日期: 2023-12-15)

(本文编辑: 陈素芳)

(上接第69页)

- [39] LIM C S, VELTRI B, KASHON M, et al. Multi-walled carbon nanotubes induce arachidonate 5-lipoxygenase expression and enhance the polarization and function of M1 macrophages invitro [J]. *Nanotoxicology*, 2023, 17 (3): 249-269. DOI: 10.1080/17435390.2023.2204161.
- [40] LIU Y C, ZOU X B, CHAI Y F, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases [J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10 (5): 520-529. DOI: 10.7150/ijbs.8879.
- [41] CHEN J L, TANG Y, QIN D L, et al. ALOX5 acts as a key role in regulating the immune microenvironment in intrahepatic cholangiocarcinoma, recruiting tumor-associated macrophages through PI3K pathway [J]. *J Transl Med*, 2023, 21 (1): 923. DOI: 10.1186/s12967-023-04804-1.
- [42] RODRIGUEZ A E, DUCKER G S, BILLINGHAM L K, et al. Serine metabolism supports macrophage IL-1 $\beta$  production [J]. *Cell Metab*, 2019, 29 (4): 1003-1011.e4. DOI: 10.1016/j.cmet.2019.01.014.
- [43] HSIEH C Y, LIN C C, HUANG Y W, et al. Macrophage secretory IL-1 $\beta$  promotes docetaxel resistance in head and neck squamous carcinoma via SOD2/CAT-ICAM1 signaling [J]. *JCI Insight*, 2022, 7 (23): e157285. DOI: 10.1172/jci.insight.157285.

(收稿日期: 2023-10-27; 修回日期: 2024-01-08)

(本文编辑: 崔丽红)