

铁死亡抑制剂对心肌细胞缺氧/复氧损伤的干预作用及其机制*

韩月, 李凤翔, 杨国宏, 袁辉, 张绪东, 孙健[△]

(牡丹江医学院基础医学院, 黑龙江 牡丹江 157011)

【摘要】目的: 验证心肌细胞缺氧/复氧(H/R)损伤中是否有铁死亡的发生, 以及探讨铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 (Fer-1) 对心肌细胞 H/R 损伤的作用及其机制。**方法:** 新生 1~3 d SD 乳鼠, 提取原代心肌细胞, 随机分为正常对照组(Control)、H/R 组和 H/R+Fer-1 组。H/R 组细胞培养 52 h 后, 加入 4 mmol/L Na₂S₂O₄ 溶液, 缺氧 1 h 后, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养液复氧培养 3 h。H/R+Fer-1 组经 Fer-1 (2 μmol/L) 预处理 24 h 后再进行缺氧复氧处理。各组细胞应用紫外分光光度法检测乳酸脱氢酶 (LDH) 释放率, CCK-8 法检测细胞存活率, 黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶 (SOD), 化学比色法检测丙二醛 (MDA), 免疫荧光观测线粒体膜电位、活性氧 (ROS) 改变, Western blot 检测铁死亡关键蛋白 ACSL4、GPX4 的表达。**结果:** 与 control 组比较, H/R 组细胞活性、SOD 释放量和 MMP 水平均显著降低 ($P < 0.05$), LDH、MDA、ROS 释放量均显著增加 ($P < 0.05$), ACSL4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)、GPX4 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$)。与 H/R 组比较, H/R+ Fer-1 组细胞活性、SOD 释放量和 MMP 水平均显著升高 ($P < 0.05$), LDH、MDA、ROS 释放量均显著降低 ($P < 0.05$), ACSL4 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$)、GPX4 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。**结论:** 心肌细胞 H/R 损伤中有铁死亡的发生, Fer-1 可通过调控 ACSL4 和 GPX4 抑制细胞内 ROS 的产生, 从而减轻铁死亡引起的原代心肌细胞缺氧复氧损伤。

【关键词】 SD 乳鼠; 铁死亡; Ferrostatin-1; ACSL4; GPX4; 心肌缺氧复氧损伤

【中图分类号】 R122

【文献标识码】 A

【文章编号】 1000-6834 (2024) 01-131-006

【DOI】 10.12047/j. c. jap. 6321. 2022. 096

Effect of iron death inhibitor on hypoxia/reoxygenation injury of cardiomyocytes and its mechanism

HAN Yue¹, LI Feng-xiang², YANG Guo-hong², YUAN Hui², ZHANG Xyu-dong², SUN Jian^{2△}

(Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

【ABSTRACT】Objective: To investigate the effects of ferrostatin-1 (Fer-1) on cardiomyocyte hypoxia/reoxygenation injury and its mechanisms. **Methods:** The original generation of myocardial cells were extracted from 1~3 d newborn SD rats, which were randomly divided into normal control group (control), hypoxia reoxygenation (H/R) group and hypoxia reoxygenation + iron death inhibitors group (H/R + Fer-1). After 52 h of culture, cells in H/R group were added with 4 mmol/L Na₂S₂O₄ solution. After 1 h of hypoxia, cells were reoxygenated with DMEM medium containing 10% calf serum for 3 h. The H/R+ Fer-1 group was pretreated with Fer-1 (2 μmol/L) for 24 h and then subjected to hypoxia and reoxygenation. The release rate of lactate dehydrogenase (LDH) was measured by UV spectrophotometry, the cell survival rate was measured by CCK-8 method, SOD was measured by xanthine oxidase method, MDA was measured by chemical coloration, and the changes of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species (ROS) were observed by immunofluorescence. Western blot was used to detect the expressions of ACSL4 and GPX4. **Results:** Compared with the control group, the cell activity, SOD release and MMP level were decreased ($P < 0.05$), the levels of LDH, MDA and ROS were increased ($P < 0.05$), the protein expression of ACSL4 was increased ($P < 0.05$), and the protein expression of GPX4 was decreased ($P < 0.05$) in H/R group. Compared with the H/R group, the cell activity, SOD release and MMP level were increased ($P < 0.05$), the level of LDH, MDA and ROS were decreased ($P < 0.05$), the protein expression of ACSL4 was decreased ($P < 0.05$), and the protein expression of GPX4 was increased ($P < 0.05$) in H/R+Fer-1 group. **Conclusion:** Fer-1 can inhibit the production of intracellular reactive oxygen species by regulating ACSL4 and GPX4, thereby alleviating the hypoxia and reoxygenation injury of primary cardiomyocytes caused by iron death.

【KEY WORDS】 SD mice; iron death; Ferrostatin-1; ACSL4; GPX4; myocardial hypoxia reoxygenation injury

*【基金项目】牡丹江医学院博士科研启动基金(2021-MYBSKY-023); 黑龙江省省属高等学校基本科研业务费项目(2020-KYY-WFMY-0039); 黑龙江省卫生健康委科研项目(2020-416)

【收稿日期】2022-05-27【修回日期】2022-09-20

[△]【通讯作者】Tel: 15945349361; E-mail: mdjsunjian@ 126.com

缺血性心脏病对人类健康造成严重危害^[1], 而缺血后的再通会使原有心肌受损加重, 称为心肌缺血/再灌注损伤 (myocardial ischemia/reperfusion injury, MI/RI)^[2,3]。铁死亡是一种受调节的细胞死亡, 被确定为铁依赖性细胞死亡。铁死亡不同于其

他经典的非凋亡细胞死亡过程,其特征是线粒体缩小及脂质过氧化的积累^[4]。研究发现,铁死亡已经在心肌病、心肌梗塞和心力衰竭中起关键作用^[5],但其对心肌缺氧复氧损伤(myocardial hypoxia-reoxygenation injury, H/R)的影响及其机制尚不明确,本研究拟利用原代心肌细胞制备 H/R 损伤模型,观测铁死亡在心肌细胞 H/R 过程中的作用,探讨铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 能否对 H/R 损伤心肌细胞起到保护作用及其可能机制,旨在为临床治疗心肌缺血性疾病提供实验支持和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

新生 1~3 d SD 乳鼠(牡丹江医学院医药研究中心);铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1(陶素药业有限公司); $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (天津福晨化学试剂厂);LDH、CCK8 检测试剂盒(碧云天);MDA、SOD 检测试剂盒(南京建成);细胞培养试剂(Hyclone 公司)。

1.2 提取原代心肌细胞^[6]

将新生 1~3 d SD 乳鼠放置在乙醇中消毒,取心脏,置于冰上预冷的 D-hanks 中清洗残存血液。弃心房,保留心室部分,经 0.12% II 型胶原酶 37℃ 恒温水浴摇床中消化 10 min,重复 3 次以上直至所有组织被消化完全,离心后取沉淀加入完全培养基于正常培养箱中差速贴壁 1.5 h 后,将细胞悬液置于培养皿中培养 52 h 后进行相应检测。

1.3 免疫荧光染色 cTnT 鉴定心肌细胞纯度

取原代心肌细胞悬液,细胞爬片培养 52 h 后,用心肌特异性肌钙蛋白 T(cTnT)抗体染色阳性细胞呈绿色,定位于胞浆,激光共聚焦显微镜观察。计算方法:cTnT 阳性细胞比率=阳性细胞数/总细胞数×100%,即新生乳鼠原代心肌细胞的纯度^[7]。

1.4 活细胞成像仪监测心肌细胞动态变化

显微镜下选取 5 个视野,动态监测细胞收缩频率的改变。

1.5 分组

取培养 52 h 心肌细胞,随机分为 3 组,(1)正常对照组(control):正常心肌细胞常规培养;(2)缺氧复氧组(H/R):培养心肌细胞 52 h 后,加入终浓度为 4 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液,缺氧 1 h 后,换成含 10% 血清的完全培养基,复氧培养 3 h;(3)缺氧复氧+铁死亡抑制剂组(H/R+Fer-1):细胞在缺氧复氧处理前 24 h 给予 2 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1 处理。

1.6 细胞存活率及数量检测

将台盼蓝与细胞悬液以 1:9 混匀进行 3 min

染色,从中取 20 μl 滴到细胞计数板中。对每次分离得到的细胞进行计数,取平均值,计算出活细胞数、总细胞数。细胞存活率(%)=活细胞数/总细胞数×100%。

1.7 CCK-8 法检测细胞活性

将 5×10^5 cells/well 细胞接种于微孔板上,对照组于正常培养箱中培养,实验组按上述方法处理后,各孔加入 CCK-8 后 37℃ 孵育 1 h,酶标仪 450 nm 处测定光密度值。

1.8 LDH、SOD 及 MDA 含量测定

各组细胞数量一致 1.0×10^6 cells/ml。紫外分光光度法检测 LDH 释放量,黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 含量,TBA 法测定 MDA 活性,LDH 光密度值通过分光光度计在 450 nm 波长处测定,酶标仪在 532 nm 和 450 nm 波长测定 MDA、SOD 光密度值^[8]。

1.9 细胞内 ROS 水平

各组样本中加入 5 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 工作液 2 ml 后孵育,离心 10 min,置于激光共聚焦显微镜下观测并选取视野拍照。

1.10 线粒体膜电位(MMP)检测

按照 10^5 cells/well 将原代心肌细胞接种到小皿中,根据说明书配制 MMP 检测荧光探针(JC-1)工作液,分组处理后,用 500 μl 完全培养基重悬,然后加荧光探针(JC-1)工作液 500 μl 混匀细胞。37℃ 避光孵育 15 min 后加入 JC-1 染色缓冲液洗 3 次,除去游离的多余染料后上机检测。

1.11 Western blot 检测 GPX4、ACSL4 蛋白表达

取各组细胞加入 RIPA 裂解液提取蛋白。用 BCA 测定蛋白浓度,SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭、一抗过夜(1:2000)、二抗孵育 2 h(1:20000),内参蛋白为 β -actin,使用 Image J Lab V4.0 软件分析 ECL 发光液显影后蛋白条带灰度值,以目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值作为蛋白相对表达量。

1.12 统计学处理

实验数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Graphpad prism 8.0、SPSS 25.0 统计软件,组间分析采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 原代心肌细胞形态

通过活细胞成像仪实时观测到细胞在 0~5 h 部分贴壁(图 1A);24 h 后细胞几乎完全贴壁,多数贴壁细胞呈单一性搏动(图 1B);48 h 后伪足伸出彼此缠绕成网状,并进行同步搏动(图 1C);72 h 后

形成合胞体,细胞同步搏动(图 1D)。

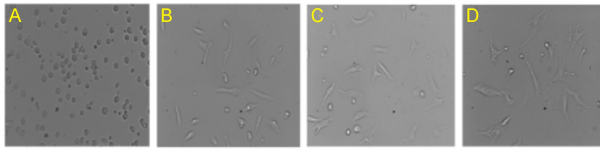


Fig. 1 Morphology of primary cultured cardiomyocytes under light microscope(× 200)

A: 0~5 h myocardial cell; B: 24 h myocardial cell; C: 48 h myocardial cell; D: 72 h myocardial cell

2.2 原代心肌细胞 cTnT 染色

随机选取 5 个视野,激光共聚焦显微镜下可见 cTnT 阳性细胞呈绿色(图 2A),DAPI 染细胞核呈蓝色(图 2B),计算出 cTnT 阳性细胞率则得出所提取的心肌细胞的纯度为(97.35±0.80)%。

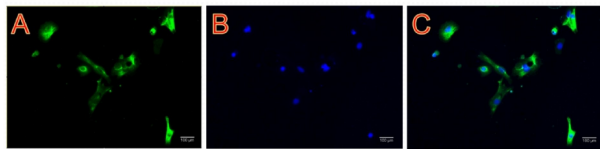


Fig. 2 Immunofluorescence staining of primary cardiomyocytes (×200)

A: cTnT positive cells is green; B: DAPI staining of the nucleus is blue; C: A+B Merge

2.3 不同浓度 Na₂S₂O₄对心肌细胞存活及 LDH 水平影响的比较

如表 1 所示,与 control 组比较,Na₂S₂O₄浓度为 4 mmol/L 时心肌细胞存活率明显下降($P < 0.05$),LDH 释放量明显上升($P < 0.05$),可见 4 mmol/L Na₂S₂O₄处理后效果最明显,故后续实验选用 4 mmol/L Na₂S₂O₄进行造膜。

Tab. 1 Comparison of effects of different concentrations of Na₂S₂O₄ on cardiomyocyte survival and LDH level($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	OD value (Cell survival)	Cell survival (%)	LDH (U/L)
Control	0.220±0.005	100	358±28
Na ₂ S ₂ O ₄ 1 mmol/L	0.217±0.009*	97*	396±60*
Na ₂ S ₂ O ₄ 2 mmol/L	0.205±0.003*	82*	423±41*
Na ₂ S ₂ O ₄ 4 mmol/L	0.190±0.006**	79**	538±52**
Na ₂ S ₂ O ₄ 8 mmol/L	0.164±0.003**	60**	557±48**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

2.4 4 mmol/L Na₂S₂O₄与不同缺氧时间对心肌细胞收缩频率影响的比较

正常收缩频率约 76 次/分(图 3-Control);4 mmol/L Na₂S₂O₄给予相同心肌细胞缺氧 10 min,其

频率约 54 次/分(图 3-10 min);缺氧 20 min,其频率约 37 次/分(图 3-20 min);缺氧 30 min,其频率约 28 次/分(图 3-30 min);缺氧 1 h,其频率约 1 次/分(图 3-1 h);缺氧 1.5 h,细胞死亡(图 3-1.5 h)。可见缺氧 1 h 效果最明显,故选后续实验用缺氧 1 h 心肌细胞。

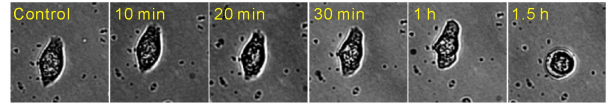


Fig. 3 Comparison of the effects of 4 mmol/L Na₂S₂O₄ and different hypoxia time on the precontractile rate of cardiomyocytes

2.5 4 mmol/L Na₂S₂O₄与缺氧 1 h/不同复氧时间对心肌细胞存活率及 LDH 水平影响的比较

如表 2 所示,与 control 组比较,缺氧 1 h 复氧 3 h 可致细胞存活率显著降低($P < 0.05$),LDH 释放量显著上升($P < 0.05$)。结果表明缺氧 1 h 复氧 3 h 效果最明显,故后续实验选用 4 mmol/L Na₂S₂O₄、缺氧 1 h、复氧 3 h 心肌细胞。

Tab. 2 Comparison of the effects of 4 mmol/L Na₂S₂O₄ and hypoxia 1 h/ different reoxygenation time on the survival rate and LDH level of cardiomyocytes($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	OD value (Cell Survival)	Cell survival (%)	LDH (U/L)
Control	0.248±0.009	100	364±58
H/R(1/1)	0.229±0.008*	85*	507±39*
H/R(1/2)	0.217±0.005*	82*	538±44*
H/R(1/3)	0.204±0.004**	75**	571±53**
H/R(1/4)	0.185±0.004**	64**	629±47**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control

2.6 不同浓度 Fer-1 对心肌细胞存活率和 LDH 水平影响的比较

如表 3 所示,与 control 组比较,control+2 μmol/L Fer-1 组细胞存活率无统计学意义,说明该药物浓度对正常细胞无影响,而 control+4 μmol/L Fer-1 组细胞存活率显著下降($P < 0.05$)。与 control 组比较,H/R 组细胞存活率显著下降($P < 0.05$)、LDH 释放量显著上升($P < 0.05$),与 H/R 组比较,H/R+Fer-1 组(2 μmol/L)细胞存活率显著升高($P < 0.05$)、LDH 释放量显著减少($P < 0.05$)。结果证实 Fer-1 (2 μmol/L)处理组与 H/R 组比较有统计学意义且对正常细胞损伤小,故后续实验选用 Fer-1 (2 μmol/L)进行处理。

Tab. 3 Comparison of the effects of different concentrations of Fer-1 on the survival rate and LDH level of cardiomyocytes ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Group	OD value (Cell survival)	Cell Survival (%)	LDH (U/L)
Control	0.249±0.007	100	327±74
Control+2 μmol Fer-1	0.245±0.008	96	341±59
Control+4 μmol Fer-1	0.217±0.005*	78*	462±41*
H/R	0.204±0.004*	65*	571±53*
H/R+1 μmol Fer-1	0.206±0.002	67	558±65
H/R+2 μmol Fer-1	0.231±0.006 [#]	83 [#]	386±89 [#]
H/R+4 μmol Fer-1	0.234±0.005 [#]	85 [#]	357±61 [#]
H/R+8 μmol Fer-1	0.212±0.003	71	439±48

* $P<0.05$ vs control; [#] $P<0.05$ vs H/R

2.7 Fer-1 (2 μmol/L) 对心肌细胞 H/R 中 MDA 及 SOD 活性的影响

如表 4 所示,与 control 组比较,H/R 组 MDA 释放量显著增加($P<0.05$)、SOD 释放量显著下降($P<0.05$);与 H/R 组比较,H/R+Fer-1 组 MDA 释放量显著降低($P<0.05$)、SOD 释放量显著升高($P<0.05$)。

Tab. 4 Effects of Fer-1 (2 μmol/L) on the activities of MDA and SOD in H/R of cardiomyocytes ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Group	MDA (μmol/g)	SOD (U/mg)	ROS	MMP
Control	6.35±0.27	23.26±4.63	7.35±2.46	17.64±4.27
H/R	12.89±0.46*	9.77±6.34*	39.54±1.61*	8.53±2.75*
H/R+Fer-1	8.47±0.39 [#]	14.69±5.26 [#]	11.58±2.74 [#]	12.61±3.94 [#]

* $P<0.05$ vs control; [#] $P<0.05$ vs H/R

2.8 Fer-1 (2 μmol/L) 对心肌细胞 H/R 中 ROS 水平的影响

如表 4 所示,与 control 组比较,H/R 组绿色荧光明显增强,说明细胞内 ROS 水平明显增高($P<0.05$),表明有铁死亡的发生;与 H/R 组比较,H/R+Fer-1 组 ROS 水平显著下降($P<0.05$),提示 Fer-1 能够显著降低心肌细胞 ROS 水平,减轻细胞膜脂质过氧化物的发生(图 4)。

2.9 Fer-1 (2 μmol/L) 对心肌细胞 H/R 中线粒体膜电位 (MMP) 水平的影响

如表 4 所示,与 control 组比较,H/R 组 MMP 水平显著降低($P<0.05$);与 H/R 组比较,H/R+Fer-1 组 MMP 水平显著升高($P<0.05$),提示 Fer-1 能够恢复心肌细胞 MMP 水平,减轻线粒体凋亡(图 5)。

2.10 心肌细胞 ACSL4、GPX4 蛋白表达

如表 6 所示,与 control 组比较,H/R 组者 GPX4

蛋白表达显著下降($P<0.05$),ACSL4 蛋白表达显著升高($P<0.05$)。与 H/R 组比较,H/R+Fer-1 组 GPX4 蛋白表达显著升高($P<0.05$),ACSL4 蛋白表达显著下降($P<0.05$)。

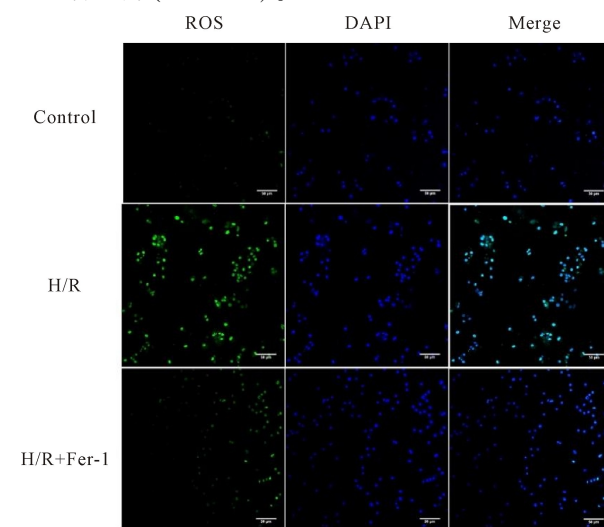


Fig. 4 Effect of Fer-1 (2 μmol/L) on ROS levels in H/R of cardiomyocytes Ros fluorescence images, ROS (green fluorescence), DAPI staining of the nucleus (blue fluorescence), Merge is ROS+DAPI (blue-green fluorescence), scale (= 50 μm)

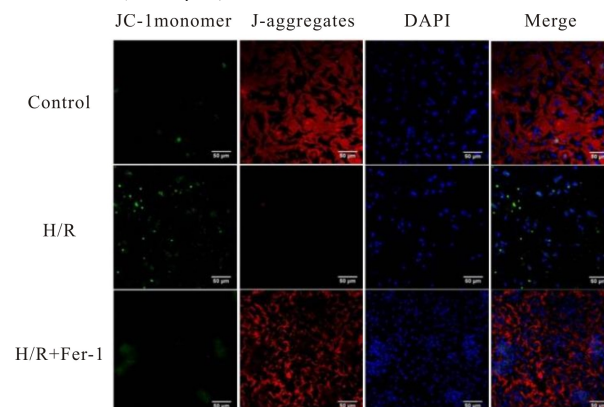


Fig. 5 Effect of Fer-1 (2 μmol/L) on mitochondrial membrane potential (MMP) level in H/R of cardiomyocytes the representative fluorescence images of JC-1 staining, aggregation (red fluorescence), monomer (green fluorescence), DAPI staining of the nucleus (blue fluorescence) and Merge is JC-1 aggregation+JC-1 monomer+DAPI (Red-Green-Blue fluorescence), (scale=50 μm)

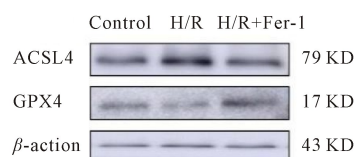


Fig. 6 Expressions of ACSL4 and GPX4 protein in cardiomyocytes

Tab. 6 Expressions of ACSL4 and GPX4 protein in cardiomyocytes ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Group	Gpx4	AcsL4
Control	0.88±0.09	0.28±0.07
H/R	0.39±0.01*	0.63±0.05*
H/R+Fer-1	0.61±0.01#	0.37±0.06#

* $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs H/R

3 讨论

心肌缺血目前占全球心血管疾病的前三,治疗心肌缺血的重要方法是通过缺血/再灌注进行血液再通,伴随而来的缺血/再灌注损伤是难以避免的。心肌损伤过程中,常伴有细胞存活率和心肌酶的改变,细胞存活率下降是心肌细胞损伤的典型表现;而LDH释放量与心肌细胞受损程度呈正相关。连二亚硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)是一种强还原剂,能夺取空气中的氧,将 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 作为耗氧剂,可快速消耗培养基中的氧气,且不损伤心肌细胞膜,最终导致细胞处于缺氧环境之中。本实验给予4 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 模拟心肌缺氧复氧损伤模型,通过CCK8法检测细胞存活率,结果表明与control组比较,H/R组细胞活性降低、LDH水平升高,证明本实验成功复制了心肌缺氧复氧损伤模型。

2012年Doxin^[9]等正式提出并命名了一种不同于其他的新的细胞死亡形式:铁死亡。作为一种全新的细胞死亡形式与自噬、凋亡、坏死、焦亡等细胞死亡类型不同,其是一种铁依赖性细胞死亡形式^[10]。这种细胞死亡形式的特征是细胞内铁积累、谷胱甘肽(GSH)的消耗、脂质过氧化和活性氧(ROS)的聚集。ROS是一类具有高反应性的含氧活性物质,过量ROS能导致细胞膜脂质过氧化及抗氧化系统紊乱。SOD催化超氧阴离子自由基歧化为过氧化氢和氧,是一种重要的氧自由基清除剂。MDA能反映机体氧化损伤程度。长期缺血缺氧使线粒体膜电位(MMP)降低和线粒体凋亡途径的激活导致缺血细胞的进一步破坏。因此,MMP、ROS、MDA、SOD4可作为反映细胞铁死亡的重要指标。为了观察铁死亡对心肌缺氧复氧损伤的影响,本研究采用原代心肌细胞建立H/R损伤模型,观测铁死亡在心肌细胞H/R过程中的作用。结果表明在心肌细胞H/R损伤过程中SOD释放量升高,MDA、ROS释放量降低,线粒体膜电位(MMP)下降。以上结果表明,在心肌细胞H/R发生过程中有铁死亡的发生。

有研究表明,铁死亡也是细胞生长的重要调控

因素,其主要由ACSL4、GPX4调控,细胞膜上ACSL4属于长链脂酰辅酶家族,可以把PUFA中的花生四烯酸催化成为花生四烯酰CoA,并生成相关脂质,随后进入脂质氧化环节,引起铁死亡;GPX4是一种含硒类的过氧化物还原酶,它能分解脂质过氧化物为没有毒性的羟基脂质,是拮抗铁死亡的核心蛋白酶。本实验Western blot技术,结果表明心肌缺氧复氧损伤导致心肌细胞中ACSL4表达增多、GPX4表达减少,提示心肌ACSL4、GPX4的表达参与了心肌缺氧复氧损伤的发生发展。

有研究证实^[11],减少氧化应激是改善心肌H/R损伤的关键治疗策略。Ferrostatin-1是一种抗氧化剂,能有效抑制铁死亡引起的细胞损伤^[12]。我们的实验结果发现,与H/R组比较,铁死亡关键指标ACSL4蛋白表达在H/R+Fer-1组下降,而GPX4蛋白表达升高,H/R+Fer-1组心肌细胞存活率升高,SOD、MMP水平升高,LDH、MDA、ROS含量降低,表明Fer-1可减轻脂质过氧化物的沉积,从而抑制氧化应激的产生,进一步对心肌细胞起到保护作用。

综上所述,本实验成功复制了心肌缺氧复氧损伤模型。本实验结果表明心肌细胞缺氧/复氧损伤中有铁死亡的发生,心肌细胞存活率及MMP水平显著降低,ROS释放量显著增加。铁死亡抑制剂Ferrostatin-1通过调控ACSL4和GPX4抑制细胞内活性氧(ROS)的产生,心肌细胞存活率及MMP水平显著增加,从而减轻铁死亡引起的原代心肌细胞缺氧复氧损伤,降低了由铁死亡引起的临床上心肌缺血相关疾病的发生。

【参考文献】

- [1] Ravingerová T, Kindernay L, Barteková M, et al. The molecular mechanisms of iron metabolism and its role in cardiac dysfunction and cardioprotection [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 78-89.
- [2] Ma S, Sun L, Wu W, et al. USP22 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via the SIRT1-p53/SLC7A11-dependent inhibition of ferroptosis-induced cardiomyocyte death [J]. *Front Physiol*, 2020, 11(55): 13-18.
- [3] Mokhtari-Zaer A, Marefati N, Atkin SL, et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 214-222.

(下转第199页)

- the relationship of intermittent fasting and β -amyloid in animal model of Alzheimer's disease: A scoping review [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 3215.
- [4] Varady KA, Hellerstein MK. Alternate-day fasting and chronic disease prevention: a review of human and animal trials[J]. *Crossref*, 2007, 86(1): 7-13.
- [5] Hoddy KK, Kroeger CM, Trepanowski JF, et al. Safety of alternate day fasting and effect on disordered eating behaviors[J]. *Nutr J*, 2015, 14: 44-46.
- [6] Klempel MC, Bhutani S, Fitzgibbon M, et al. Dietary and physical activity adaptations to alternate day modified fasting: implications for optimal weight loss[J]. *Nutr J*, 2010, 9(1): 1-8.
- [7] 刘子铭, 于亮. Irisin:新的运动因子? [J]. *生理科学进展*, 2018, 49(3): 201-211.
- [8] Bostrom P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis [J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 463-468.
- [9] 付悦, 于亮, 高扬. 改良隔日禁食干预对大鼠减脂效果的影响及 Irisin 调控作用[J]. *中国运动医学杂志*, 2021, 40(3): 200-207.
- [10] 刘子铭. 4 周运动与能量摄入限制对肥胖大鼠减脂效果及 Irisin 的影响[D]. 北京体育大学, 2019.
- [11] Varady KA, Roohk DJ, Loe YC, et al. Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size, triglyceride metabolism, and plasma adiponectin levels in mice[J]. *J Lipid Res*, 2007, 48(10): 2212-2219.
- [12] Varady KA, Allister CA, Roohk DJ, et al. Improvements in body fat distribution and circulating adiponectin by alternate-day fasting versus calorie restriction[J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21(3): 188-195.
- [13] King NA, Caudwell P, Hopkins M, et al. Metabolic and behavioral compensatory responses to exercise interventions: barriers to weight loss[J]. *Obesity (Silver Spring)* 2007, 15(6): 1373-1383.
- [14] Hoddy KK, Gibbons C, Kroeger CM, et al. Changes in hunger and fullness in relation to gut peptides before and after 8 weeks of alternate day fasting [J]. *Clin Nutr*, 2016, 35(6): 1380-1385.
- [15] Chausse B, Solon C, Caldeira da Silva, et al. Intermittent fasting induces hypothalamic modifications resulting in low feeding efficiency, low body mass and overeating [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(7): 2456-2466.
- [16] 王祯, 于亮, 付悦. 间歇性禁食与运动对骨骼肌自噬的激活及减脂效果的比较[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(4): 289-295.
- [17] Thyagarajan B, Foster MT. Beiging of white adipose tissue as a therapeutic strategy for weight loss in humans [J]. *Horm Mol Biol Clin Investig*, 2017, 31(2): 1-13.
- [18] Moraes RCM, Portari GV, Ferraz ASM, et al. Effects of intermittent fasting and chronic swimming exercise on body composition and lipid metabolism[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2017, 42(12): 1341-1346.
- [19] Shabalina IG, Petrovic N, De Jong JMA, et al. UCP1 in Brite/Beige adipose tissue mitochondria is functionally thermogenic[J]. *Cell Rep*, 2013, 5(5): 1196-1203.
- [20] Wu J, Boström P, Sparks LM, et al. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human [J]. *Cell Press*, 2012, 150(2): 366-376.
- [21] Roca-Rivada A, Castela C, Senin LL, et al. FNDC5/Irisin is not only a myokine but also an adipokine [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60563.
- [22] 高扬, 于亮, 付悦, 等. 4 周电针干预对大鼠白色脂肪"棕色化"的影响及其机制[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(5): 471-477.

(上接第 135 页)

- [4] Dai C, Kong B, Qin T, et al. Inhibition of ferroptosis reduces susceptibility to frequent excessive alcohol consumption-induced atrial fibrillation [J]. *Toxicology*, 2022, 465(15): 30-55.
- [5] Li T, Tan Y, Ouyang S, et al. Resveratrol protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via attenuating ferroptosis[J]. *Gene*, 2022, 808(14): 59-68.
- [6] Leone M, Engel FB. Isolation, culture, and live-cell imaging of primary rat cardiomyocytes[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 21(15): 109-124.
- [7] Im K, Mareninov S, Diaz MFP, et al. An introduction to performing immunofluorescence staining[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 18(12): 299-311.
- [8] Sakamoto T, Imai H. Hydrogen peroxide produced by superoxide dismutase SOD-2 activates sperm in *Caenorhabditis elegans*[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(36): 14804-14813.
- [9] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [10] Lillo-Moya J, Rojas-Solé C, Muñoz-Salamanca D, et al. Targeting Ferroptosis against ischemia/reperfusion cardiac injury[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(5): 667.
- [11] Liu P, Feng Y, Li H, et al. Ferrostatin-1 alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting ferroptosis[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2020, 25(7): 10-17.
- [12] Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis [J]. *Nat cell Biol*, 2020, 22(2): 225-234.