DOI:10.16016/j.2097-0927.202503022

积雪草苷通过激活*SMAD7*改善骨髓增生异常综合征的细胞铁死亡

王立烨,常 青,董腾腾,刘 亭,王 驰,李绵洋 解放军总医院第一医学中心检验科,北京

［**摘要**］ **目的** 探讨在骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome,MDS)中SMAD家族成员7(SMAD family member 7,*SMAD7*)信号通路异常与铁死亡关系,并探讨积雪草苷(asiaticoside,AC)提高MDS细胞系*SMAD7*的表达对铁死亡的影响。**方法** 通过基因表达综合(Gene Expression Omnibus,GEO)数据库筛选MDS相关数据集,比较MDS患者与健康对照人群的差异表达基因,再与铁死亡数据库(Ferroptosis Database,FerrDb)取交集,以寻找MDS铁死亡潜在靶点。收集2022年10月至2024年11月在解放军总医院第一医学中心血液科初次确诊的MDS患者骨髓血18例(MDS组)和同期16例健康供者骨髓血(Con组),提取骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells ,BMMNCs),RT-qPCR检测*SMAD7*及铁死亡相关基因表达水平。免疫磁珠分选髓系标志CD33$^+$细胞,RT-qPCR与Western blot检测*SMAD7*及铁死亡相关基因与蛋白表达水平。同时使用人正常骨髓细胞系(HS-5)与MDS细胞系(MUTZ-1、SKM-1),测定*SMAD7*及铁死亡相关指标的水平。采用不同浓度的*SMAD7*激动剂AC(AC组)和铁抑素-1(Ferrostatin-1,Fer-1)处理MDS细胞,探究其对MDS细胞铁死亡的影响。同时构建*SMAD7*过表达质粒(SMAD7过表达组),进一步研究*SMAD7*在铁死亡调控中的作用。Western blot与RT-qPCR实验检测细胞处理前后*SMAD7*与铁死亡相关基因的表达;同时检测谷胱甘肽(glutathione,GSH)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)和超氧歧化酶(superoxide dismutase,SOD)水平,流式细胞术与荧光显微镜测定活性氧(reactive oxygen species,ROS)水平。流式细胞术测定分化标志物CD11b$^+$表达,检测细胞分化水平。**结果** ①数据库分析结果显示,*SMAD7*在MDS患者中表达降低,并且与铁死亡有关。相较于Con组,MDS患者*SMAD7*表达下降(P<0.05),同时铁死亡负向调控基因谷胱甘肽过氧化酶4(glutathione peroxidase 4,GPX4)、铁蛋白重链(ferritin heavy chain,FTH1)表达下降(P<0.05),正向调控基因转铁蛋白受体(transferrin receptor protein1,TFRC)表达升高(P<0.05)。相较于人正常骨髓细胞HS-5,MDS细胞系*SMAD7*表达下降,*GPX4*、*FTH1*表达下降,而TFRC表达升高(P<0.05)。②经梯度浓度Fer-1处理后,MDS细胞系中*GPX4*与*FTH1*的表达呈浓度依赖性上调(P<0.05),TFRC显著下调(P<0.05),同时GSH含量与SOD活性升高,ROS水平与MDA含量下降(P<0.05),提示铁死亡被抑制。③过表达SMAD7后,结果显示*GPX4*、*FTH1*的表达升高,TFRC的表达降低(P<0.05),细胞的抗氧化能力提高,减少了铁死亡的发生。提高了CD11b$^+$表达(P<0.05),促进了细胞分化。④MDS细胞系经AC处理后*GPX4*与*FTH1*的表达呈浓度依赖性上调(P<0.05),但TFRC下调无统计学意义。AC处理还提高了细胞的抗氧化能力,同时提高了CD11b$^+$的含量(P<0.05),促进了细胞分化。**结论** AC激活MDS细胞系*SMAD7*,通过上调*GPX4*与*FTH1*并抑制*TFRC*,减轻氧化损伤和脂质过氧化,从而抑制MDS细胞铁死亡,同时激活*SMAD7*可以促进细胞分化。

［**关键词**］ *SMAD7*;积雪草苷;骨髓增生异常综合征;铁死亡;氧化应激

［**中图法分类号**］ R282.71;R551.3;R966 ［**文献标志码**］ A

［**通信作者**］ 北京市自然科学基金-昌平创新联合基金资助项目(L234048)

［**通信作者**］ 王 驰,E-mail:wangchi2018@126.com

李绵洋,E-mail:limianyang301@126.com

2097-0927/Copyright © 2025,陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

引用格式:王立烨,常青,董腾腾,等. 积雪草苷通过激活*SMAD7*改善骨髓增生异常综合征的细胞铁死亡[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(12):1319-1331. DOI:10.16016/j.2097-0927.202503022.

Citation:W L Y,CHANG Q,DONG T T,*et al*. Asiaticoside alleviates ferroptosis in myelodysplastic syndrome by activating *SMAD7*[J]. J Army Med Univ,2025,47(12):1319-1331. DOI:10.16016/j.2097-0927.202503022.

Asiaticoside alleviates ferroptosis in myelodysplastic syndrome by activating *SMAD7*

WANG Liye, CHANG Qing, DONG Tengteng, LIU Ting, WANG Chi, LI Mianyang Department of Clinical Laboratory, First Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing, China

[**Abstract**] Objective To investigate the relationship of aberrant SMAD family member 7 (*SMAD7*) signaling pathway and ferroptosis in myelodysplastic syndromes (MDS) and evaluate the effect of asiaticoside (AC) -modulating *SMAD7* up-regulation to suppress ferroptosis in MDS cell lines. Methods Publicly available MDS-related datasets from the Gene Expression Omnibus (GEO) database were analyzed to identify differentially expressed genes (DEGs) between MDS patients and healthy controls. These DEGs were cross-referenced with ferroptosis-associated genes from the Ferroptosis Database (FerrDb) to identify potential ferroptosis-related targets in MDS. Bone marrow mononuclear cells (BMMNCs) were isolated from 18 MDS patients freshly diagnosed in the First Medical Center of Chinese PLA General Hospitaland and from 16 healthy donors during October 2022 and November 2024. RT-qPCR was employed to detect the expression of *SMAD7* and ferroptosis-related genes. Immunomagnetic bead sorting was applied to purify $CD33^+$ cells, and then qPCR and Western blotting were utilized to measure the expression of *SMAD7* and ferroptosis-related biomarkers at mRNA and protein levels. Human normal bone marrow cells (HS-5) and MDS cell lines (MUTZ-1, SKM-1) were treated with gradient concentrations of AC (SMAD7 activator) and ferrostatin-1 (Fer-1, ferroptosis inhibitor), and *SMAD7* overexpression plasmids were transfected into MDS cells. qPCR and Western blotting were utilized to measure the expression of *SMAD7* and ferroptosis-related biomarkers at mRNA and protein levels, and the contents of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and reactive oxygen species (ROS) were detected. Flow cytometry of $CD11b^+$ was performed to measure cellular differentiation. Results ①Bioinformatics analysis revealed significant down-regulation of *SMAD7* in MDS patients, correlating with ferroptosis activation. Compared to the healthy controls, MDS patients exhibited decreased *SMAD7* expression ($P<0.05$), reduced levels of negative regulators of ferroptosis, glutathione peroxidase 4 (*GPX4*) and ferritin heavy chain (*FTH1*) ($P<0.05$), and elevated expression of its positive regulator transferrin receptor protein 1 (*TFRC*) ($P<0.05$). Consistent with this, when compared with the normal human bone marrow stromal cell line HS-5, the MDS cell lines MUTZ-1 and SKM-1 exhibited declined expression of *SMAD7*, *GPX4*, and *FTH1*, alongside elevated expression of TFRC ($P<0.05$). ②Treatment with gradient concentrations of the ferroptosis inhibitors ferrostatin-1 (Fer-1), the expression levels of GPX4 and FTH1 in MDS cell lines were significantly upregulated in a concentration-dependent manner ($P<0.05$), while TFRC was markedly downregulated ($P<0.05$). Additionally, GSH content and SOD activity were enhanced, whereas ROS levels and MDA content were significantly reduced ($P<0.05$). These results suggest that Fer-1 effectively suppresses ferroptosis in MDS cells. ③*SMAD7* overexpression led to up-regulation of *GPX4* and *FTH1* ih MDS cell lines, while downregulation of *TFRC*, improved anti-oxidative ability and reduced ferroptosis, with enhanced $CD11b^+$ expression and myeloid differentiation. ④ Following AC treatment, the expression levels of *GPX4* and *FTH1* in MDS cell lines were significantly upregulated in a concentration-dependent manner ($P<0.05$), whereas the downregulation of TFRC did not reach statistical significance. Additionally, AC treatment effectively enhanced the antioxidant capacity of the cells, increased the proportion of $CD11b^+$ cells ($P<0.05$), and facilitated cellular differentiation. Conclusion AC activates *SMAD7* in MDS cell lines, up-regulating *GPX4* and *FTH1* while suppressing *TFRC* expression. This mechanism alleviates oxidative damage and lipid peroxidation, thereby inhibiting ferroptosis in MDS cells. Concurrently, *SMAD7* activation promotes cellular differentiation.

[**Key words**] *SMAD7*; asiaticoside; myelodysplastic syndrome; ferroptosis; oxidative stress

Supported by the Natural Science Foundation of Beijing-Changping Innovation Joint Fund Project(L234048). Corresponding author: WANG Chi, E-mail: wangchi2018@126.com; LI Mianyang, E-mail: limianyang301@126.com

骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome,MDS)是一种由于造血干细胞异常导致的异质性、克隆性血液系统疾病[1]。研究表明由于输血、基因改变、线粒体功能异常等原因,50%~80%的MDS患者存在铁过载(iron overload,IO)[2]。同时由于IO,MDS患者的骨髓单个核细胞(bone marrow mononuclear cells,BMMNCs)可能更容易出现遗传异常[3]。铁死亡是一种铁依赖的细胞程序性死亡,其发生机制、分子特征与凋亡、自噬、坏死有着明显的区别。铁死亡的发生本质是由于细胞铁积累进而导致过氧化物增多和脂质过氧物代谢平衡异常,最终引起脂质过氧化物的积累造成细胞死亡[4]。有研究发现[5],MDS患者核红细胞铁蛋白重链(ferritin heavy chain,*FTH1*)水平降低成红系分化和血红蛋白合成障碍,表明铁死亡可能成为治疗MDS的新靶点。

SMAD家族成员7(SMAD family member 7,*SMAD7*)是转化生长因子-β(transforming growth factor-β,*TGF-β*)信号通路的关键负调控分子,它通过与*TGF-β*受体结合阻止SMAD2/3磷酸化进而阻止*TGF-β*信号通路的激活[6]。*TGF-β*信号通路在调节造血干细胞(hematopoietic stem cells,HSC)静止和自我更新等方面发挥着重要作用。而其过度激活会导致HSC分化成熟障碍[7]。

积雪草苷(asiaticoside,AC)是从积雪草中分离的中药提取物,可以在成纤维细胞中通过活化*SMAD7*,抑制*TGF-β*信号通路,具有抗氧化、抗炎、抗溃疡等作用[8]。有研究表明[9],AC通过调节*TGF-β/SMAD*通路延缓紫外线照射引起的细胞衰老并减少活性氧(reactive oxygen species,ROS)的产生。根据现有文献,目前AC是否在MDS中调控*SMAD7*表达还未见报道。

本研究旨在探究*SMAD7*信号通路在MDS中调控铁死亡的分子机制。并探究AC对*SMAD7*表达与铁死亡的影响,为开发新的治疗策略提供科学依据,为该疾病的预防和治疗提供新的靶点。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

人正常骨髓细胞HS-5与人MDS细胞系MUTZ-1、SKM-1所用的完全培养基均购自上海赛百慷公司,铁抑素-1(Ferrostatin-1,Fer-1)与AC均购自美国MedChemExpress公司。RNA提取试剂盒、HiScript® Q RT SuperMix for qPCR Kit逆转录试剂盒、荧光定量PCR试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒均购自南京诺唯赞公司。谷胱甘肽(glutathione,GSH)、ROS荧光探针DCFH-DA与丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒购自上海碧云天公司,超氧歧化酶(superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒购自上海东仁化学科技公司。CCK-8检测试剂盒购自北京富百科公司。蛋白裂解液、浓缩胶缓冲液、分离胶缓冲液、十二烷基硫酸钠、甘氨酸、ECL化学发光检测试剂盒均购自索莱宝公司。*SMAD7*抗体购自英国Abcam公司,谷胱甘肽过氧化酶4(glutathione peroxidase 4,*GPX4*)与*FTH1*购自美国CST公司,转铁蛋白受体(transferrin receptor protein1,*TFRC*)抗体购自中国Abclonal公司。PE anti-human CD11b购自美国BioLegend公司。人$CD33^+$免疫磁珠与PE-anti-human-CD33购自德国Miltenyi公司。

1.2 MDS铁死亡相关基因富集分析

从基因表达综合数据库(Gene Expression Omnibus,GEO)获取MDS相关数据集GSE19429(183例患者/17例健康对照人群)和GSE58831(159例患者/17例健康对照)。使用R语言limma包(v4.3.3)筛选患者与对照组的差异表达基因(differentially expressed genes,DEGs),筛选标准为$|Log_2FC|>2$且$P<0.05$。同时从铁死亡数据库(Ferroptosis Database,FerrDb,http://www.zhounan.org/ferrdb/current/)收集和整理铁死亡相关基因,并将DEGs和铁死亡相关基因的交集通过维恩图可视化。

1.3 人BMMNCs的提取与$CD33^+$分选

收集2022年10月至2024年11月在解放军总医院第一医学中心血液科初次确诊的MDS患者骨髓血18例(MDS组),另收集同期16例健康供者骨髓血(Con组)。本研究所有参与者签署知情同意书,并经解放军总医院伦理委员会批准(伦审第S2021-194-02号)。将收集到的新鲜骨髓血用Ficoll进行密度梯度离心分离BMMNCs,吸取白膜层,用PBS洗涤2次后,使用$CD33^+$免疫磁珠对骨髓单个核细胞进行阳选。

1.4 细胞培养与转染

人正常骨髓细胞HS-5与人MDS细胞系MUTZ-1购自上海赛百慷公司,SKM-1细胞系由中国中医科学院西苑医院周庆兵主任课题组赠送。MUTZ-1与SKM-1细胞均使用含有10%FBS的RPMI 1640完全培养基并置于37 ℃、含有5% CO_2的恒温培养箱里培养传代。取对数生长期细胞接种于6孔板,使用Lip3000配制转染体系,转染6 h后换成完全培养基,分别培养24 h和48 h后提取RNA与蛋白进行后续实验。

1.5 CCK-8检测细胞增殖能力

取对数生长的细胞,铺至96孔板内,培养体系为

每孔100 μL培养基含1×10⁴个,分别加入0、5、10、20、40、80、100 μmol/L的AC与Fer-1作用48 h,每组设置5个复孔,以探究AC与Fer-1作用的最适浓度。48 h后每孔避光加入10 μL CCK-8试剂,孵育2 h后用酶标仪检测450 nm处的吸光度值。

1.6 RT-qPCR

按照RNA提取试剂盒说明书,提取细胞RNA,用Nano-Drop仪器对RNA浓度进行检测,然后使用HiScript® Q RT SuperMix for qPCR Kit将RNA反转录为cDNA,使用荧光染料进行PCR反应。每组设置3个复孔。基因的mRNA相对表达量采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$计算,引物序列见表1。

表1 引物序列

基因	引物序列(5′→3′)
SMAD7	上游:TGAACCTGGACGCCAAAGTC 下游:GGGTTGAAAGGCTCGGGAAT
GPX4	上游:GAGGCAAGACCGAAGTAAACTAC 下游:GAGGCAAGACCGAAGTAAACTAC
FTH1	上游:TGGAGCTCTACGCCTCCTAC 下游:CCTGAAGGAAGATTCGGCCA
TFRC	上游:AGAAGCATTATCTTTGCCAGT 下游:CCAAGAACCGCTTTATCCAG

1.7 Western blot检测

使用加入PMSF的蛋白裂解液提取细胞蛋白,使用BCA法测定蛋白浓度,取10 μg蛋白上样,经电泳后转至PVDF膜上,转膜完成后用5%的脱脂奶粉室温孵育1 h后加入*SMAD7*一抗(1∶500)、*FTH1*一抗(1∶1 000)、*GPX4*一抗(1∶1 000)、*TFRC*一抗(1∶1 000),4 ℃过夜,用TBST洗膜后在摇床上孵育相应的二抗1 h,完成后用TBST洗膜,使用ECL超敏发光液进行曝光显影,条带灰度值使用Image J分析。

1.8 流式细胞术与荧光显微镜检测ROS水平

将细胞处理48 h后,收集细胞调节细胞密度为1×10⁶个/mL,用PBS洗涤2次,然后按ROS检测试剂盒说明,按照1∶1 000的稀释比孵育DCFH-DA荧光探针20 min,无血清培养液洗涤细胞3次,然后用流式细胞仪检测荧光强度。同时使用细胞贴壁粘附剂贴壁得(北京普利莱)预处理30 min,然后在铺板到6孔板内处理48 h后,用PBS洗涤2次,按照1∶1 000的稀释比原位装载DCFH-DA荧光探针,孵育20 min,无血清培养液洗涤细胞3次,使用荧光显微镜观察荧光强度。

1.9 GSH水平检测

离心收集细胞,吸尽上清。PBS洗涤细胞1次,加入细胞沉淀体积3倍量的蛋白去除试剂。利用液氮和37 ℃水浴对样品进行2次快速的冻融。4 ℃或冰浴放置5 min。然后4 ℃,10 000×*g*离心10 min。取上清用于GSH的测定。按照说明书配置工作液,添加试剂,室温孵育25 min后,用酶标仪检测420 nm处的吸光度。

1.10 MDA水平检测

细胞经过加药或转染处理后,每1×10⁶个细胞使用0.1 mL蛋白裂解液。10 000~12 000×*g*离心10 min取上清用于后续测定。按照试剂盒说明书配置检测工作液,取适量标准品用蒸馏水稀释至1、2、5、10、20、50 μmol/L,用于后续制作标准曲线。按照说明书添加样本与工作液至EP管内,混匀后,100 ℃加热15 min,水浴冷却至室温,1 000×*g*室温离心10 min。取200 μmol/L上清加入到96孔板中,用酶标仪在532 nm测定吸光度。根据标准曲线计算获得MDA的摩尔浓度。

1.11 SOD活性的测定

细胞经过处理后,收集至1.5 mL离心管内,2 000×*g*离心10 min,弃上清液。用1 mL PBS洗涤细胞,2 000×*g*离心10 min,重复一遍。在冰浴条件下,对细胞进行超声,然后在4 ℃ 10 000×*g*离心15 min,将上清液转移到新的离心管中待测。将WST Solution用稀释液稀释20倍,配成WST工作液。在样品孔和空白孔2中分别加入20 μL样品溶液,在空白孔1和空白孔3中分别加入20 μL超纯水。再分别加200 μL充分混匀的WST工作液,在37 ℃的培养箱中孵育20 min。使用酶标仪检测在450 nm处的吸光度。

按照公式计算SOD的抑制率:

$$SOD\ 抑制率(\%)=[(A_{空白1}-A_{空白3})-(A_{样品}-A_{空白2})]/(A_{空白1}-A_{空白3})\times100\%$$

1.12 流式细胞术检测细胞分化情况

将细胞处理48 h后,收集细胞用PBS洗涤1次,计数细胞,调整细胞数至1×10⁶个/管,加入流式抗体,混匀,避光孵育15 min,用PBS洗涤2次,上机检测。以CD11b单标设门,检测$CD11b^+$的表达情况。

1.13 统计学分析

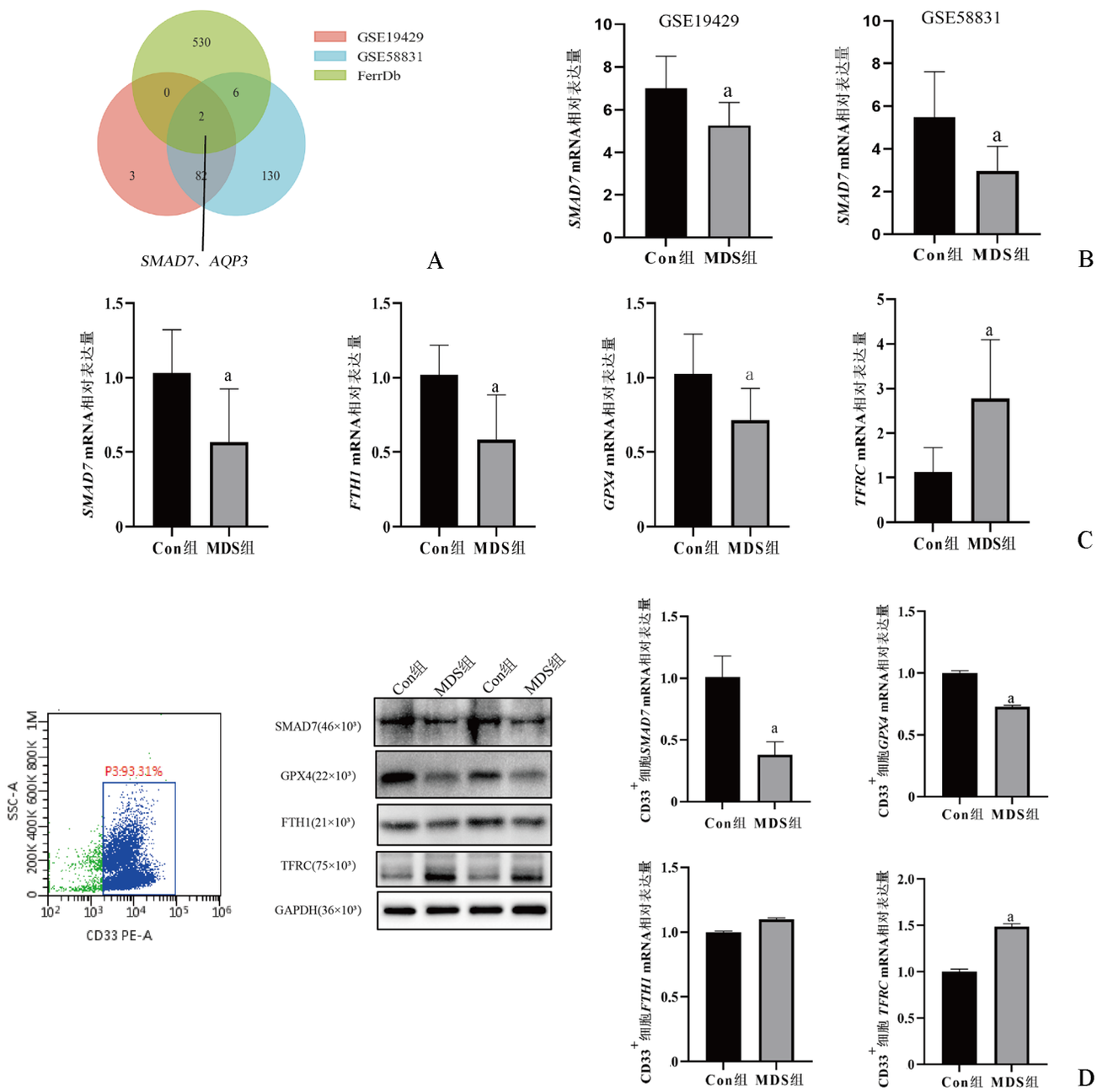
使用SPSS 26.0与GraphPad Prism 9软件进行统计学分析,实验均重复3次或3次以上,两独立样本均数比较采用*t*检验,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDS患者*SMAD7*表达减低,铁死亡水平升高

为筛选MDS铁死亡的关键靶点,本研究从GEO数据库获取MDS相关数据集(GSE19429和GSE58831),分析患者与健康人群的差异表达基因,并将其与FerrDb

的基因集进行交集分析。结果显示*SMAD7*与*AQP3*被富集到。在2个数据集中,*SMAD7*在MDS患者中表达降低(图1A、B)。随后通过收集MDS患者(MDS组)与正常人(Con组)的骨髓血标本,用密度梯度离心法分离BMMNCs,通过RT-qPCR检测*SMAD7*与铁死亡相关基因的表达情况,结果相较于Con组,MDS患者的*SMAD7*表达下降($P<0.05$),同时铁死亡负向调控基因*GPX4*与*FTH1*表达下降($P<0.05$),正向调控基因*TFRC*表达升高($P<0.05$,图1C)。随后通过免疫磁珠分选$CD33^+$细胞,分选后$CD33^+$细胞比例为93.31%,通过Western blot与RT-qPCR检测*SMAD7*与铁死亡相关基因的表达情况,结果显示,*SMAD7*表达下降($P<0.05$),*GPX4*表达下降,*TFRC*表达升高($P<0.05$),*FTH1*表达差异没有统计学意义(图1D)。



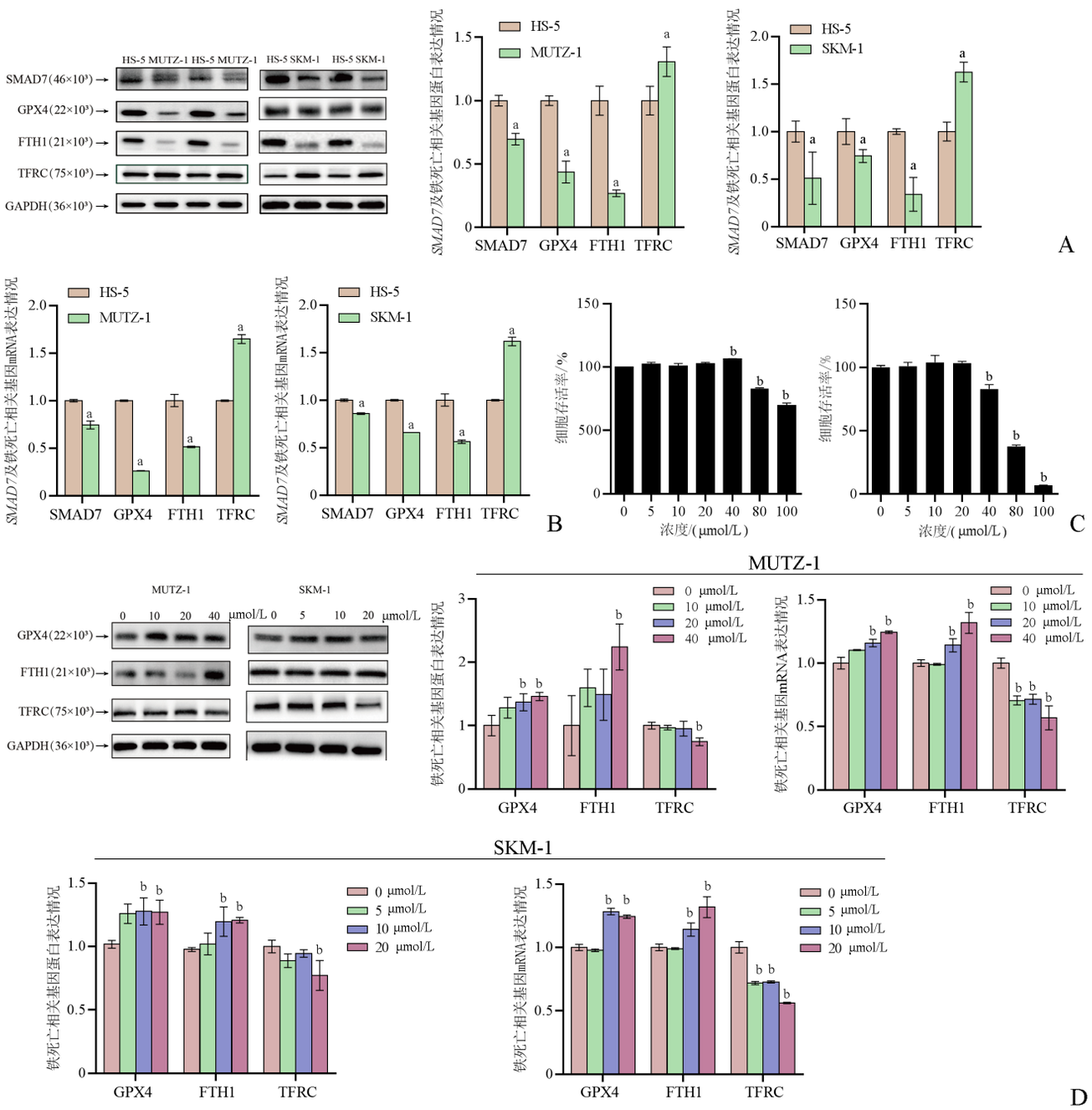
a:$P<0.05$,与Con组比较

A:GEO中MDS相关数据集GSE19429、GSE58831差异表达基因与铁死亡相关数据库FerrDb取交集;B:数据集GSE19429与GSE58831中*SMAD7*的表达情况;C:Con组与MDS组BMMNCs中*SMAD7*与铁死亡相关基因的表达情况;D:磁珠分选Con组与MDS组$CD33^+$细胞并检测*SMAD7*与铁死亡相关基因的表达情况

图1　MDS患者*SMAD7*表达降低同时铁死亡水平升高

2.2　Fer-1抑制MDS细胞系铁死亡

选取人正常骨髓细胞HS-5与MDS细胞系MUTZ-1、SKM-1，通过Western blot与RT-qPCR检测*SMAD7*与铁死亡相关基因的表达，结果显示，相较于人正常骨髓细胞，MDS细胞系*SMAD7*的表达降低（$P<0.05$），同时*GPX4*、*FTH1*的表达降低，*TFRC*的表达升高（$P<0.05$），提示MDS细胞系铁死亡水平升高（图2A、B）。随后给予MDS细胞系Fer-1处理，通过CCK-8实验评估Fer-1的最适浓度，结果显示，Fer-1浓度为80 μmol/L时显著抑制MUTZ-1的细胞活力，浓度为40 μmol/L时促进了



a：$P<0.05$，与HS-5比较；b：$P<0.05$，与0 μmol/L组比较

A：Western blot检测人正常骨髓细胞HS-5与MDS细胞系MUTZ-1、SKM-1的*SMAD7*与铁死亡相关蛋白表达；B：RT-qPCR检测HS-5与MUTZ-1、SKM-1的*SMAD7*与铁死亡相关基因表达；C：不同浓度Fer-1处理MDS细胞系对其活力影响；D：0、10、20、40 μmol/L的Fer-1处理MUTZ-1，0、5、10、20 μmol/L的Fer-1处理SKM-1后*SMAD7*与铁死亡相关基因表达情况

图2　Fer-1抑制MDS细胞系铁死亡（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

细胞增殖(P<0.05);Fer-1浓度为40 μmol/L时显著抑制SKM-1的细胞活力(P<0.05),浓度为20 μmol/L时对细胞活力没有明显影响(图2C)。因此选择0、10、20、40 μmol/L 4种不同浓度梯度的Fer-1处理MUTZ-1,0、5、10、20 μmol/L的Fer-1处理SKM-1后,Western blot与RF-qPCR结果显示,Fer-1提高了*GPX4*与*FTH1*的表达,降低了*TFRC*的表达(P<0.05),存在浓度依赖性(图2D)。

进一步探究了Fer-1对MDS细胞系氧化应激的影响。分别用40 μmol/L与20 μmol/L的Fer-1处理MUTZ-1与SKM-1(Fer-1组)后,通过流式细胞术与荧光显微镜发现Fer-1降低了MDS细胞系的ROS水平(图3A、B),同时提高了GSH含量与SOD活性,降低了MDA的含量(P<0.05,图3C),提示Fer-1提高了MDS细胞的抗氧化能力。通过流式细胞术检测分化标记物CD11b$^+$表达,但差异无统计学意义(P>0.05,图3D)。综上表明,Fer-1可以减少MDS细胞系氧化应激的水平,减少铁死亡的发生。

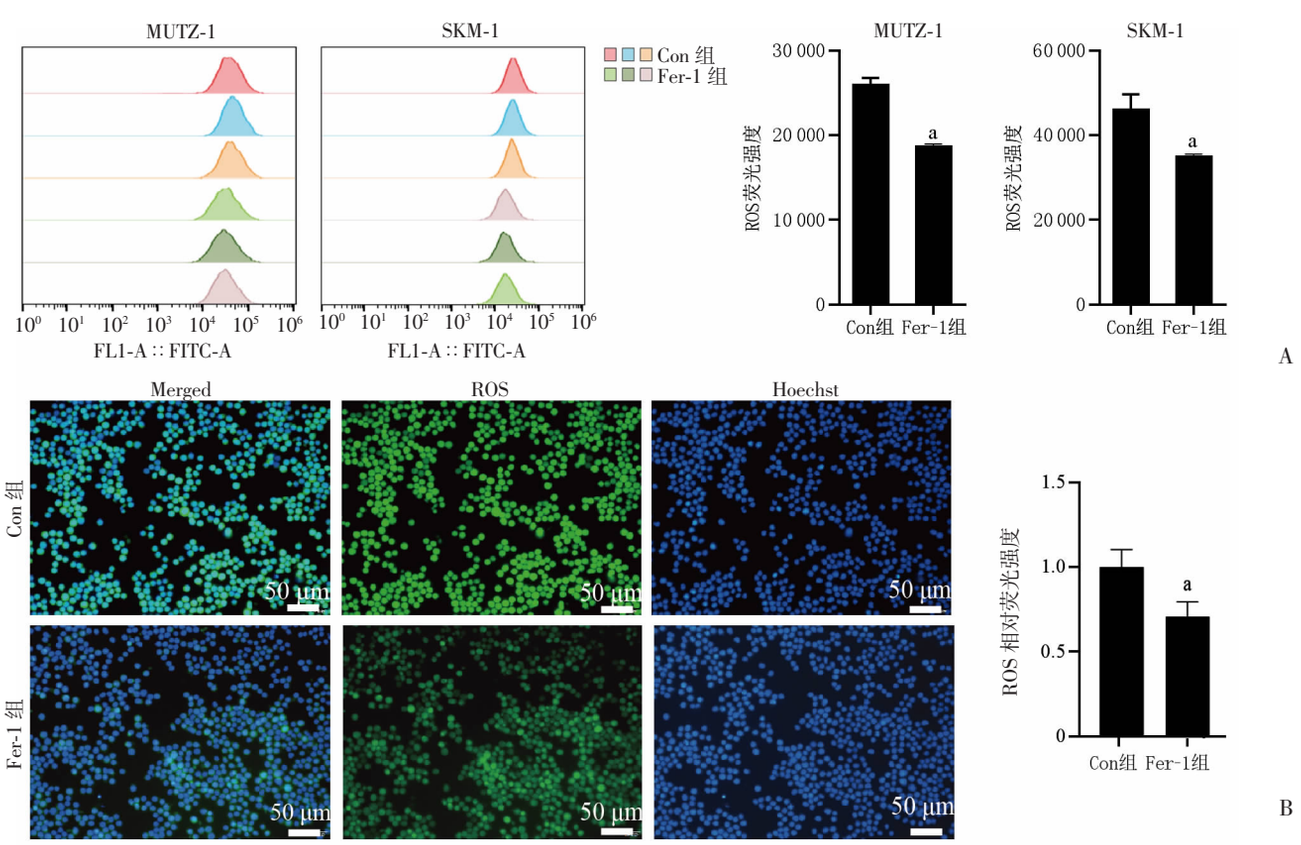
2.3　提高*SMAD7*的表达抑制MDS细胞系铁死亡促进细胞分化

构建了过表达质粒,通过脂质体转染至细胞内过表达*SMAD7*,Western blot与RT-qPCR实验结果显示,过表达*SMAD7*后,提高了MDS细胞*GPX4*与*FTH1*蛋白与mRNA的表达(P<0.05),但在mRNA水平*FTH1*表达差异没有统计学意义,同时减低了*TFRC*的表达(图4)。

检测氧化指标的变化,过表达*SMAD7*降低了MDS细胞的ROS水平(图5A、B),提高了GSH含量与SOD活性,降低MDA的含量(P<0.05,图5C),提示过表达*SMAD7*提高MDS细胞系的抗氧化能力。同时过表达*SMAD7*也提高了CD11b$^+$的表达促进了细胞分化(图5D)。

2.4　AC通过提高*SMAD7*改善MDS细胞系铁死亡促进细胞分化

为了进一步探究*SMAD7*与铁死亡的关系,给予MDS细胞系*SMAD7*激动剂AC处理(AC组)。结果发现,AC浓度分别为80 μmol/L和20 μmol/L时显著影响

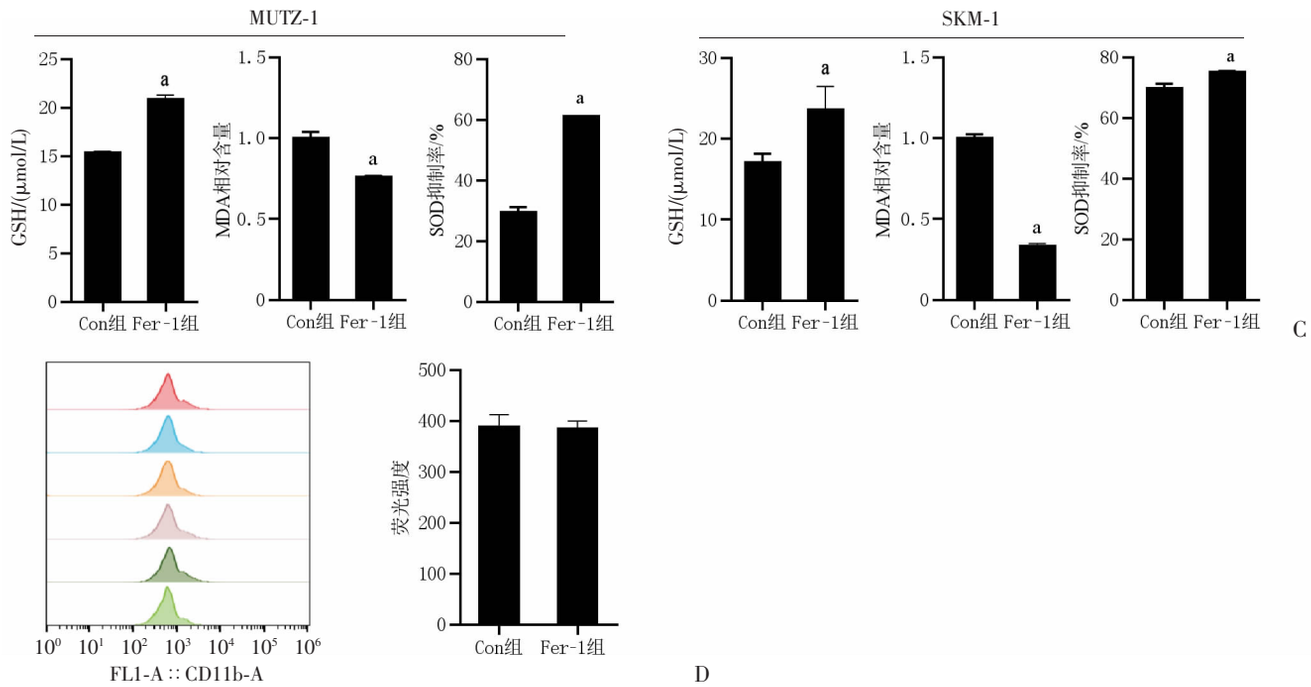


a:P<0.05,与Con组比较

A:流式细胞术测定细胞ROS水平;B:荧光显微镜测定细胞ROS水平

图3　Fer-1降低MDS细胞系的氧化应激水平(n=3,$\bar{x}\pm s$)

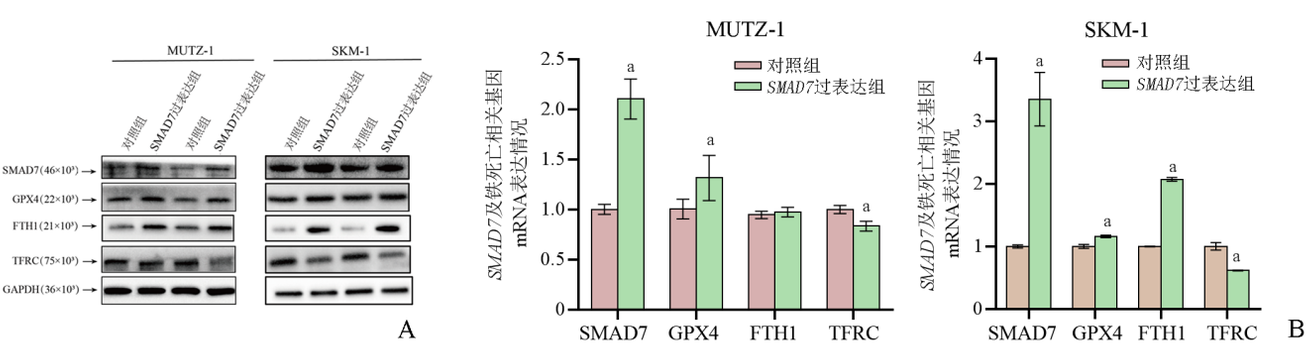
(图3C~D续下页)



a:P<0.05,与Con组比较

C:试剂盒测定细胞GSH、MDA、SOD的水平;D:流式细胞术测定细胞$CD11b^+$水平

图3 Fer-1降低MDS细胞系的氧化应激水平(n=3,$\bar{x}\pm s$)



a:P<0.05,与对照组比较

A:Western blot检测过表达*SMAD7*后铁死亡相关蛋白的表达;B:RT-qPCR检测过表达*SMAD7*后铁死亡相关基因的表达

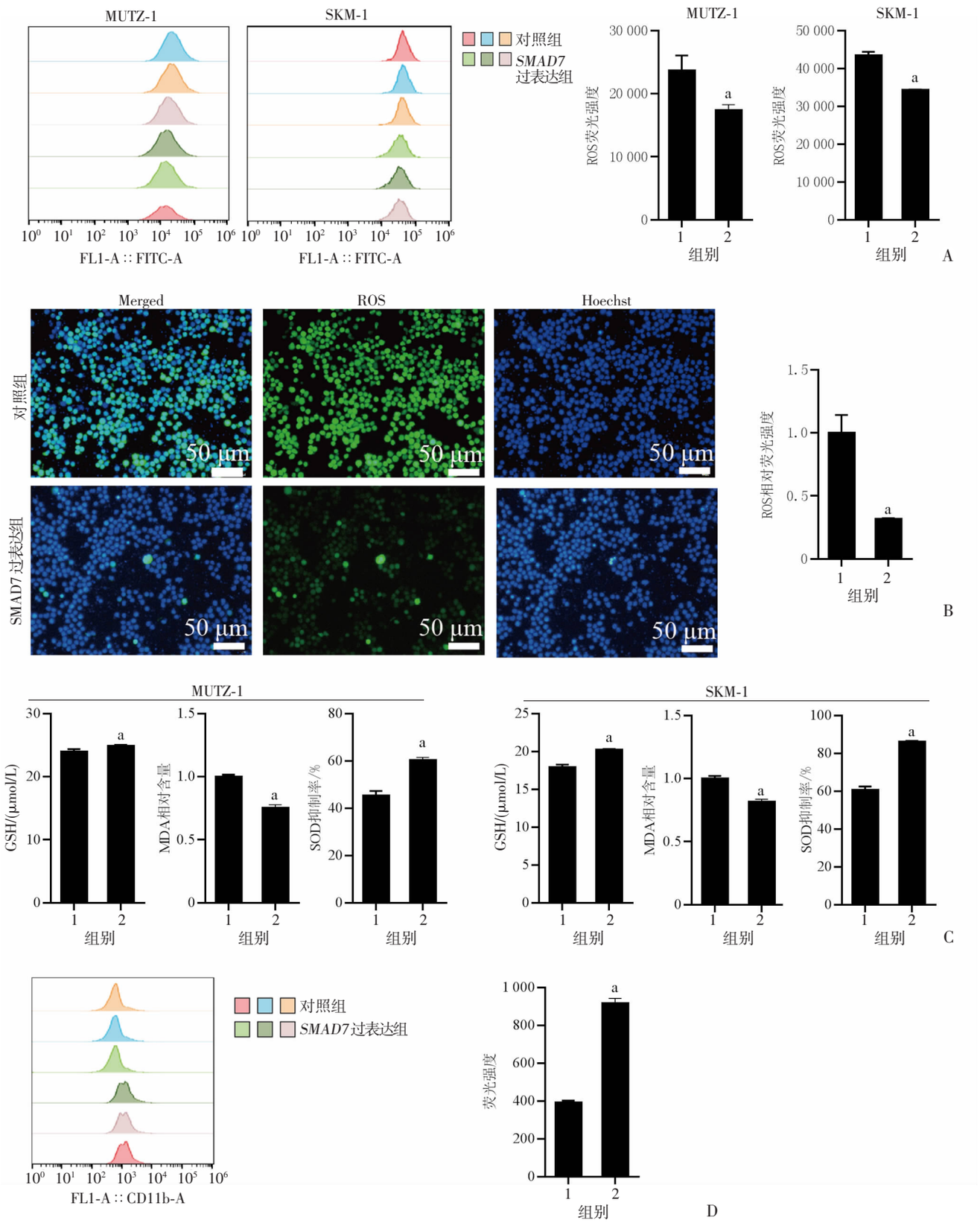
图4 *SMAD7*过表达抑制了MDS细胞系铁死亡(n=3,$\bar{x}\pm s$)

MUTZ-1和SKM-1的细胞活力(图6A)。分别给予MUTZ-1与SKM-1细胞0、10、20、40 μmol/L和0、2.5、5.0、10.0 μmol/L 4种不同浓度梯度的AC,Western blot与RT-qPCR检测结果显示与0 μmol/L组相比,AC提高了*SMAD7*的表达,同时提高了*GPX4*与*FTH1*的水平(P<0.05),降低了*TFRC*的水平,但TFRC在RNA水平降低差异无统计学意义(图6B)。

通过流式细胞术与荧光显微镜,发现AC降低了MDS细胞系的ROS水平,同时提高了GSH含量与SOD活性,降低了MDA含量(图7A~C)。同时通过流式细胞术检测分化标记物$CD11b^+$表达,结果显示AC提高了$CD11b^+$的表达(P<0.05,图7D),促进了细胞分化。

3 讨论

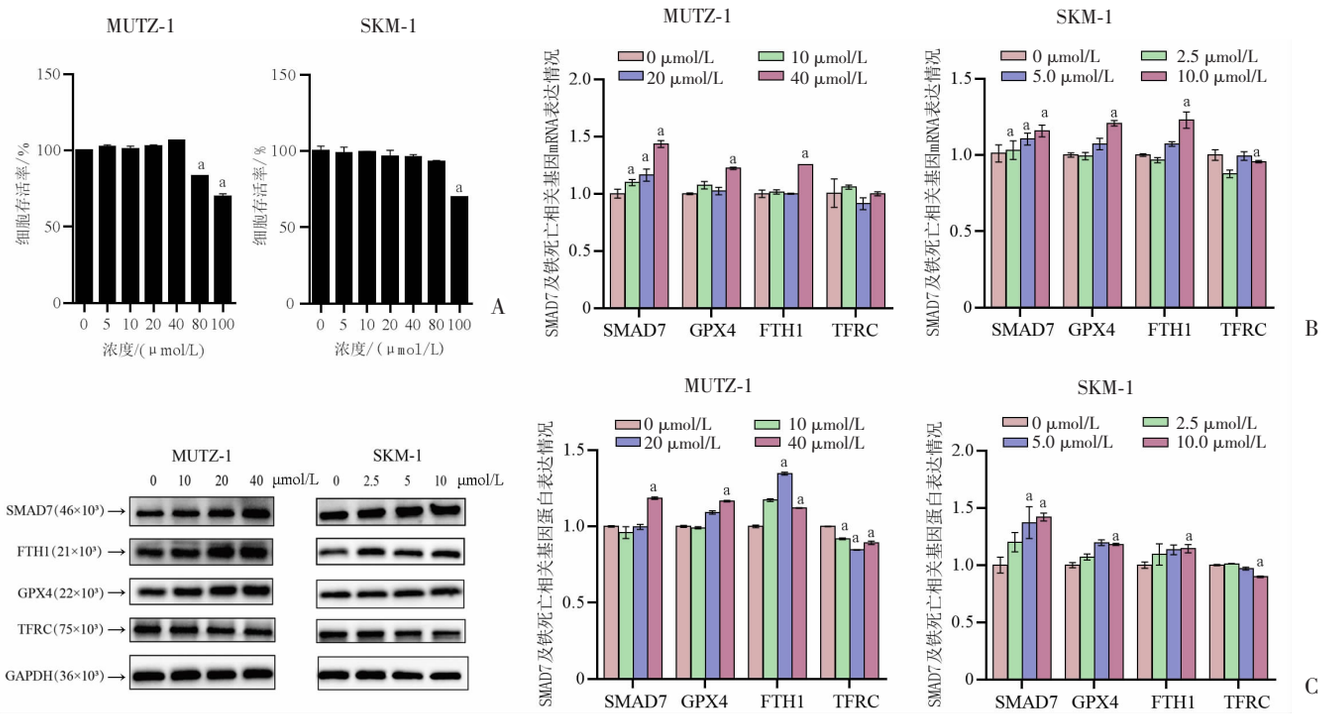
MDS作为一种血液系统肿瘤,其主要特点为各系血细胞无效造血,幼稚细胞成熟异常,细胞形态异常并且易进展为急性髓系白血病[10]。本研究基于GEO数据库与FerrDb筛选出差异表达基因*SMAD7*。结果表明,*SMAD7*在MDS患者中低表达。同时MDS患者$CD33^+$细胞铁死亡水平升高,同样在MDS细胞系中*SMAD7*低表达,铁死亡水平升高并且可以被Fer-1抑制,随后给予MDS细胞系*SMAD7*激动剂AC后发现铁死亡被抑制,同时促进了细胞分化。表明AC通过调节*SMAD7*可能是治疗MDS的潜在靶点。



1：对照组；2：*SMAD7*过表达组；a：$P<0.05$，与对照组比较

A：流式细胞术检测细胞ROS水平；B：荧光显微镜测定细胞ROS水平；C：试剂盒测定细胞GSH、MDA、SOD的水平；D：流式细胞术检测细胞$CD11b^+$水平

图5 SMAD7过表达降低了MDS细胞系的氧化应激水平（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）



a:P<0.05,与0 μmol/L组比较

A:用不同浓度的AC处理MDS细胞系对其活力影响;B、C:用0、10、20、40 μmol/L的AC处理MUTZ-1,0、2.5、5.0、10.0 μmol/L的AC处理SKM-1后*SMAD7*与铁死亡相关基因表达情况

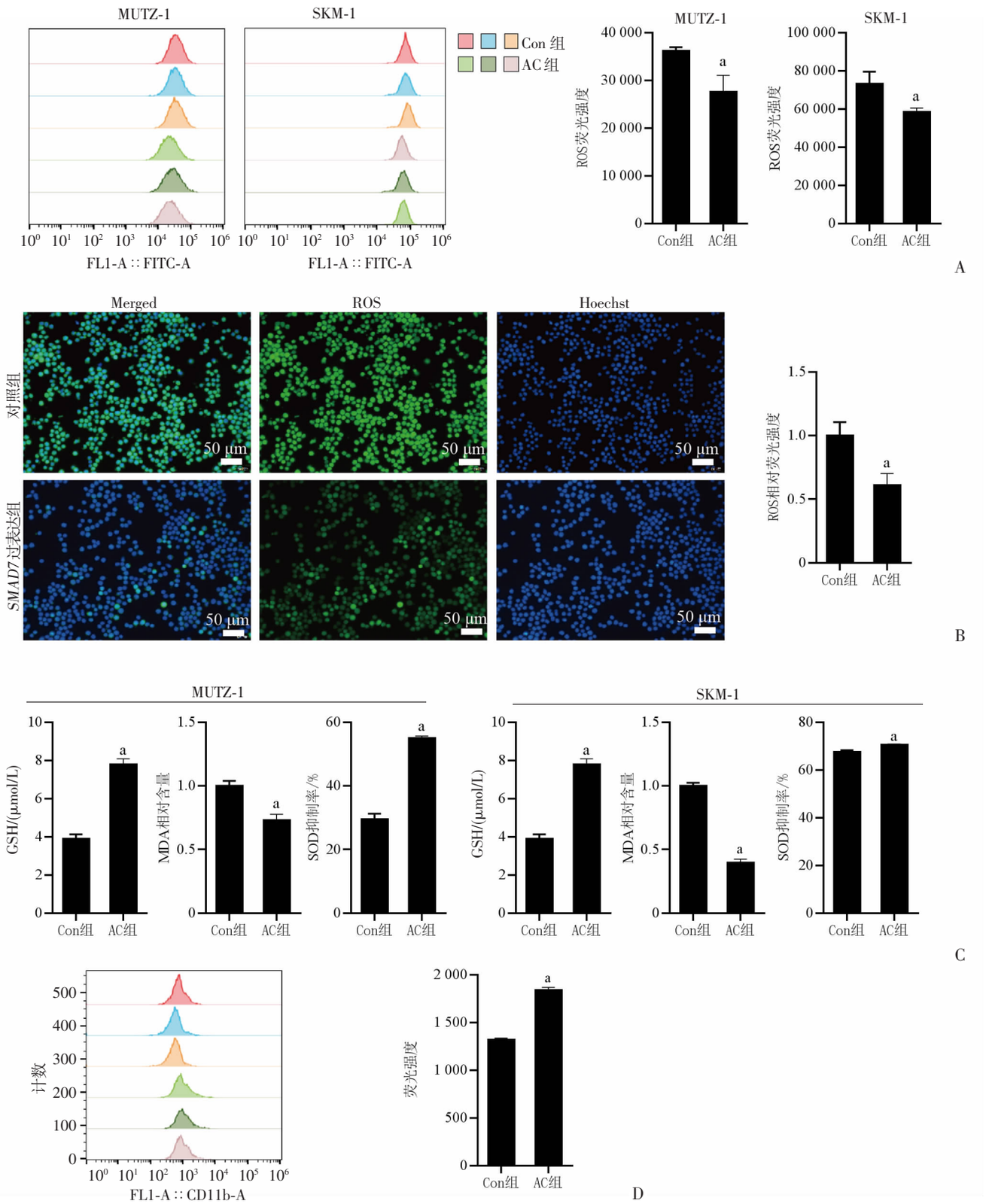
图6 AC提高SMAD7的表达同时抑制MDS细胞系铁死亡(n=3,$\bar{x}\pm s$)

3.1 *SMAD7*可能通过调控铁死亡在治疗MDS中发挥关键作用

目前,对于MDS较高危患者的治疗通常使用去甲基化药物阿扎胞苷和地西他滨[11]。然而,去甲基化药物对不同患者的疗效有较大的差异,MDS患者易对去甲基化药物耐药造成复发[12]。因此,探究更加安全、有效的治疗方案是十分必要的。研究表明[13],MDS患者CD235a$^+$细胞铁死亡水平升高可能与MDS患者贫血有关,用Fer-1处理有效逆转了CD235a$^+$细胞的铁死亡,缓解了MDS患者的贫血。也有研究表明[14],铁死亡诱导剂RSL3可以通过MYB/Bcl-2途径发挥抗肿瘤的作用,且与地西他滨在治疗MDS方面表现出协同效应;同时地西他滨也可以升高MDS细胞系ROS,降低GSH水平和*GPX4*活性,导致MDS细胞系发生铁死亡,从而抑制肿瘤的进展[15]。目前针对铁死亡在MDS中发病机制的探索有待进一步深入研究。因此本研究利用GEO数据库筛选差异表达基因,再结合FerrDb,结果发现*SMAD7*被富集到。然后在临床MDS患者骨髓标本中验证,结果表明,MDS患者*SMAD7*低表达。*SMAD7*作为*TGF-β*信号通路的关键负调控分子,在造血过程中发挥着调节造血干细胞静止与自我更新的作用[16]。同样也有报道表明[17],MDS患者*SMAD7*的表达显著减少导致*SMAD2/3*下游介质被组成性激活和过度表达,导致终末红细胞分化受损和随后的贫血。而在MDS中*SMAD7*表达降低是否影响铁死亡的发生进而影响细胞成熟分化还未见报道。

3.2 Fer-1可以缓解骨髓增生异常综合征铁死亡的发生

铁死亡作为一种新型的细胞程序性死亡,其发生主要与铁过载、脂质过氧化和抗氧化系统失衡有关[18]。铁调节蛋白通过调控铁储存蛋白*FTH1*和铁摄取相关基因*TFRC*的表达来维持铁稳态,当铁稳态失衡时可致铁过载。在抗氧化系统中,GSH是*GPX4*发挥催化作用所必需的辅助因子,其减少会直接导致*GPX4*活性下降,抗氧化能力降低[19]。Fer-1是一种铁死亡抑制剂,可通过有效抑制脂质过氧化物的积累,进而抑制铁死亡[20]。本研究通过分离MDS患者BMMNC发现MDS患者的*GPX4*与*FTH1*表达下降,*TFRC*表达升高。用免疫磁珠分选CD33$^+$细胞后,同样发现*GPX4*低表达,*TFRC*高表达,提示铁死亡水平升高。用Fer-1处理MDS细胞后*GPX4*与*FTH1*表达升高,同时ROS水平下降,表明细胞氧化应激降低,铁死



a:P<0.05,与Con组比较

A:流式细胞术检测细胞ROS水平;B:荧光显微镜测定MUTZ-1细胞ROS水平;C:试剂盒测定细胞GSH、MDA、SOD的水平;D:流式细胞术检测SKM-1细胞$CD11b^+$水平

图7 AC降低MDS细胞系的氧化应激水平(n=3,$\bar{x}\pm s$)

亡被抑制,提示铁死亡可能作为MDS新的病理机制发挥作用。

3.3 *SMAD7*可能通过多种通路调控铁死亡的发生

*SMAD7*是一种抑制性SMAD蛋白,可能通过多个信号通路影响铁死亡的发生。铁调素是维持机体全身铁稳态的关键激素,已发现铁调素表达升高会阻碍铁从细胞中释放,导致铁在局部区域积累,会进一步加剧氧化应激损伤[21]。MDS患者由于输血等原因存在铁过载现象。有大量研究表明[22],输血依赖型MDS患者血清铁调素水平升高,会进一步加重机体铁稳态的失衡。*SMAD7*作为铁调素的关键抑制因子,可以通过铁调素影响铁死亡的发生。有研究表明[23],阿托伐他汀通过激活*SMAD7*表达从而下调铁调素/*FPN1*通路改善缺血再灌注大鼠心肌的铁死亡。因此,*SMAD7*可能通过抑制铁调素改善MDS铁死亡的发生。

同时*SMAD7*作为*TGF-β*信号通路关键负调控分子,可通过阻断受体激活的*SMAD2/3*的磷酸化,从而抑制*TGF-β*信号传导。利福昔明通过调节*SMAD7*所调控*TGF-β*途径,减少铁死亡引起的损伤来控制肝纤维化[8]。有研究发现[24],*TGF-β*可抑制肝星形细胞*NRF2*和*GPX4*表达,且七叶苷通过激活*NRF2/GPX4*信号通路并抑制肝细胞铁死亡,从而来抑制*TGF-β*诱导的肝星形细胞活化,改善肝纤维化。还有研究发现[25],在胎儿肺成纤维细胞中,*TGF-β*可通过调控*FTH1*水平、Fe^{2+}和脂质过氧化标志物4-HNE含量来影响铁稳态,调控铁死亡进而影响成纤维细胞分化。同时,也有多项研究发现[26],*TGF-β/SMAD7*信号通路与*Hippo/YAP*信号通路存在串扰,从而影响多种疾病的发生发展。*SMAD7*可以抑制肝癌细胞中Yes1相关的转录调节因子(Yes1 associated transcriptional regulator,*YAP1*)的表达,进而发挥抗肿瘤的作用。*SMAD7*也可以促进*YAP1*蛋白泛素化来抑制*YAP1*表达减轻小鼠的动脉粥样硬化的发生[27]。*YAP1*作为*Hippo*信号通路的关键调节因子,可以靶向铁死亡调节因子*TFRC*和*ACSL4*[28]。因此推测*SMAD7*可能通过多个途径间接铁死亡进而影响疾病进展。

3.4 *SMAD7*激动剂AC减少铁死亡的发生并促进了细胞分化

AC是从积雪草中分到的三萜皂苷化合物,可以活化*SMAD7*,具有抗氧化、保护神经、抑炎等药理作用[29]。本研究通过使用*SMAD7*激动剂AC和构建过表达质粒提高MDS细胞系*SMAD7*的表达,发现*SMAD7*提高了*GPX4*和*FTH1*的表达,降低*TFRC*的表达,同时降低ROS的水平,提高了GSH含量与SOD的活性,提高了细胞的抗氧化能力,提示*SMAD7*可以减少铁死亡的发生。$CD11b^+$作为一种粒单核分化的分子标志物,随着细胞向成熟分化而表达增多,本研究发现使用AC处理或过表达*SMAD7*后,MDS细胞系$CD11b^+$表达增多,提示*SMAD7*具有调控细胞分化的作用。

综上所述,*SMAD7*在调控MDS铁死亡中发挥着重要作用,本研究结果显示,MDS患者*SMAD7*表达下降,铁死亡水平升高。AC作用于MDS细胞系提高*SMAD7*的表达后,MDS细胞系的铁死亡受抑制,细胞分化程度升高,提示*SMAD7*可能通过影响MDS铁死亡进而影响其进展,为MDS病理机制提供新见解,也为MDS治疗新方向提供一定理论基础。但本研究仍有不足之处,临床样本量较少可能对相关结果统计分析产生影响,接下来将进一步扩大临床样本量,并通过细胞和动物实验进一步验证*SMAD7*对MDS铁死亡的调控机制。

利益冲突 本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献:

[1] MA J, AI X F, WANG J H, *et al*. Multiplex ligation-dependent probe amplification identifies copy number changes in normal and undetectable karyotype MDS patients[J]. Ann Hematol, 2021, 100(9): 2207-2214. DOI: 10.1007/s00277-021-04550-8.

[2] ZHANG Y, XIAO C, LI J, *et al*. Comparative study on iron content detection by energy spectral CT and MRI in MDS patients[J]. Front Oncol, 2021, 11: 646946. DOI: 10.3389/fonc.2021.646946.

[3] RODRÍGUEZ-GARCÍA A, MORALES M L, GARRIDO-GARCÍA V, *et al*. Protein carbonylation in patients with myelodysplastic syndrome: an opportunity for deferasirox therapy[J]. Antioxidants, 2019, 8(11): 508. DOI: 10.3390/antiox8110508.

[4] 徐喆, 张芳, 姜俊. 铁死亡在肿瘤免疫微环境中的研究进展[J]. 空军军医大学学报, 2023, 44(9): 894-898. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2023.09.020.
XU Z, ZHANG F, JIANG J. Advances of ferroptosis in the tumor immune microenvironment[J]. J Air Force Med Univ, 2023, 44(9): 894-898. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2023.09.020.

[5] YANG L Y, ZHANG M Y, LIU M Y, *et al*. Loss of FTH1 induces ferritinophagy-mediated ferroptosis in anaemia of myelodysplastic syndromes[J]. J Cell Mol Med, 2025, 29(1): e70350. DOI: 10.1111/jcmm.70350.

[6] ZHANG Y, LU Y, ONG'ACHWA M J, *et al*. Resveratrol inhibits the TGF-β 1-induced proliferation of cardiac fibroblasts and collagen secretion by downregulating miR-17 in rat[J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 8730593. DOI: 10.1155/2018/8730593.

[7] RAMACHANDRA N, VEGIVINTI C T R, SAHU S, *et al*. Transforming growth factor beta receptor type I (TGF-βRI) kinase inhibitors IOA-359 and IOA-360 stimulate erythropoiesis in MDS[J]. Leuk Lymphoma, 2025, 66(5): 920-929. DOI:10.1080/10428194.2024.2444479.

[8] TANG B, ZHU B, LIANG Y Y, *et al*. Asiaticoside suppresses collagen expression and TGF-β/Smad signaling through inducing Smad7 and inhibiting TGF-βRI and TGF-βRII in keloid fibroblasts[J]. Arch Dermatol Res, 2011, 303(8): 563-572. DOI:10.1007/s00403-010-1114-8.

[9] JIANG H H, ZHOU X Y, CHEN L Q. Asiaticoside delays senescence and attenuate generation of ROS in UV-exposure cells through regulates TGF-β1/Smad pathway[J]. Exp Ther Med, 2022, 24(5): 667. DOI:10.3892/etm.2022.11603.

[10] HOFF F W, MADANAT Y F. Molecular drivers of myelodysplastic neoplasms (MDS) -classification and prognostic relevance[J]. Cells, 2023, 12(4): 627. DOI: 10.3390/cells12040627.

[11] RADAKOVICH N, SALLMAN D A, BUCKSTEIN R, *et al*. A machine learning model of response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndromes[J]. iScience, 2022, 25(10): 104931. DOI:10.1016/j.isci.2022.104931.

[12] WANG B, JIANG J P, ZHANG Y, *et al*. Combination of HDE and BIIB021 efficiently inhibits cell proliferation and induces apoptosis *via* downregulating hTERT in myelodysplastic syndromes[J]. Exp Ther Med, 2021, 21(5): 503. DOI:10.3892/etm.2021.9934.

[13] ZHANG M Y, LIU M Y, YANG L Y, *et al*. Increased ferroptosis of erythrocytes is associated with myelodysplastic syndromes[J]. Ann Hematol, 2024, 103(10): 4009-4020. DOI:10.1007/s00277-024-05946-y.

[14] PIMKOVÁ K, CHRASTINOVÁ L, SUTTNAR J, *et al*. Plasma levels of aminothiols, nitrite, nitrate, and malondialdehyde in myelodysplastic syndromes in the context of clinical outcomes and as a consequence of iron overload[J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014: 416028. DOI:10.1155/2014/416028.

[15] LV Q, NIU H Y, YUE L Z, *et al*. Abnormal ferroptosis in myelodysplastic syndrome[J]. Front Oncol, 2020, 10: 1656. DOI:10.3389/fonc.2020.01656.

[16] NAKA K, HIRAO A. Regulation of hematopoiesis and hematological disease by TGF-β family signaling molecules[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2017, 9(9): a027987. DOI:10.1101/cshperspect.a027987.

[17] ZHOU L, MCMAHON C, BHAGAT T, *et al*. Reduced SMAD7 leads to overactivation of TGF-beta signaling in MDS that can be reversed by a specific inhibitor of TGF-beta receptor I kinase[J]. Cancer Res, 2011, 71(3): 955-963. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-2933.

[18] CHEN J Y, LI X P, GE C D, *et al*. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease[J]. Cell Death Differ, 2022, 29(3): 467-480. DOI:10.1038/s41418-022-00941-0.

[19] XU W C, SUN T T, WANG J X, *et al*. GPX4 alleviates diabetes mellitus-induced erectile dysfunction by inhibiting ferroptosis[J]. Antioxidants, 2022, 11(10): 1896. DOI: 10.3390/antiox11101896.

[20] MIOTTO G, ROSSETTO M, DI PAOLO M L, *et al*. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1[J]. Redox Biol, 2020, 28: 101328. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101328.

[21] ZHAO Y S, ZHAO J N, MA H Y, *et al*. High hepcidin levels promote abnormal iron metabolism and ferroptosis in chronic atrophic gastritis[J]. Biomedicines, 2023, 11(9): 2338. DOI:10.3390/biomedicines11092338.

[22] SANTINI V, GIRELLI D, SANNA A, *et al*. Hepcidin levels and their determinants in different types of myelodysplastic syndromes[J]. PLoS One, 2011, 6(8): e23109. DOI:10.1371/journal.pone.0023109.

[23] PENG Y, LIAO B, ZHOU Y, *et al*. Atorvastatin inhibits ferroptosis of H9C2 cells by regulatingSMAD7/hepcidin expression to improve ischemia-reperfusion injury [J]. Cardiol Res Pract, 2022, 2022: 3972829. DOI: 10.1155/2022/3972829.

[24] XU S X, CHEN Y E, MIAO J D, *et al*. Esculin inhibits hepatic stellate cell activation and CCl_4-induced liver fibrosis by activating the Nrf2/GPX4 signaling pathway[J]. Phytomedicine, 2024, 128: 155465. DOI: 10.1016/j.phymed.2024.155465.

[25] YU N N, WANG N, ZHANG W Q, *et al*. Dihydroartemisinin (DHA) inhibits myofibroblast differentiation through inducing ferroptosis mediated by ferritinophagy[J]. Heliyon, 2024, 10(5): e27276. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e27276.

[26] MA L F, JIANG H Y, XU X, *et al*. Tanshinone IIA mediates SMAD7-YAP interaction to inhibit liver cancer growth by inactivating the transforming growth factor beta signaling pathway[J]. Aging, 2019, 11(21): 9719-9737. DOI:10.18632/aging.102420.

[27] LI W B, BAI P X, LI W. UHRF1 inhibition mitigates vascular endothelial cell injury and ameliorates atherosclerosis in mice *via* regulating the SMAD7/YAP1 axis[J]. Mol Immunol, 2024, 170: 119-130. DOI: 10.1016/j.molimm.2024.04.001.

[28] DAI C S, CHEN X, LI J B, *et al*. Transcription factors in ferroptotic cell death[J]. Cancer Gene Ther, 2020, 27(9): 645-656. DOI:10.1038/s41417-020-0170-2.

[29] HE X J, HUANG Y M, LIU Y, *et al*. Astrocyte-derived exosomal lncRNA 4933431K23Rik modulates microglial phenotype and improves post-traumatic recovery *via* SMAD7 regulation[J]. Mol Ther, 2023, 31(5): 1313-1331. DOI: 10.1016/j.ymthe.2023.01.031.

(收稿:2025-03-05;修回:2025-05-16)
(编辑 邓强庭)