

## 麦冬皂苷 D 通过铁死亡途径减轻麦冬皂苷 D' 所致心肌细胞损伤

林毅<sup>1</sup>, 杨春启<sup>1,2</sup>, 连闻雨<sup>1,3</sup>, 肖成荣<sup>1</sup>, 谭洪玲<sup>1</sup>, 高月<sup>1\*</sup>, 王宇光<sup>1\*</sup>

(1. 军事科学院, 军事医学研究院, 辐射医学研究所, 北京 100850; 2. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230032;  
3. 广东药科大学, 广东 广州 510006)

**摘要:** 本文研究麦冬皂苷 D (ophiopogonin D, OPD) 对麦冬皂苷 D' (ophiopogonin D', OPD') 诱导大鼠心肌细胞损伤的干预作用及可能机制, 为中药麦冬的临床使用提供相关的实验依据。采用 CCK-8 (cell counting kit-8) 法检测麦冬皂苷 D' 及麦冬皂苷 D 与麦冬皂苷 D' 共处理对大鼠心肌细胞存活率的影响; 流式细胞仪检测细胞内活性氧 (reaction oxygen species, ROS) 含量; FerroOrange 荧光探针检测细胞内 Fe<sup>2+</sup> 含量变化; 相应的试剂盒检测细胞内谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 含量的变化; Western blot 检测转铁蛋白受体 1 (transferrin receptor 1, TFR1)、环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, COX2)、NADPH 氧化酶 1 (NADPH oxidase 1, NOX1)、长链脂酰辅酶 A 合成酶 4 (long-chain acyl-CoA synthetase 4, ACSL4)、阳离子氨基酸转运蛋白 11 (cationic amino acid transporter 11, SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 及铁蛋白重链 1 (ferritin heavy chain 1, FTH1) 等铁死亡相关蛋白表达的变化, 探究麦冬皂苷 D 保护心肌细胞损伤的作用机制是否与铁死亡有关。实验结果显示, 1 μmol·L<sup>-1</sup> 的麦冬皂苷 D' 可显著诱导铁死亡相关蛋白的表达, 导致细胞 Fe<sup>2+</sup>、ROS 和 GSH-Px 含量明显升高, GSH 含量明显降低; 经不同浓度麦冬皂苷 D (0.5、1 和 2 μmol·L<sup>-1</sup>) 处理后在一定程度上逆转麦冬皂苷 D' 引起的心肌细胞损伤, 并且剂量在 1~2 μmol·L<sup>-1</sup> 时效果最佳。结果表明, 麦冬皂苷 D 可干预麦冬皂苷 D' 引起的铁死亡, 进而对大鼠心肌细胞产生保护作用。

**关键词:** 麦冬; 麦冬皂苷 D; 麦冬皂苷 D'; 心肌细胞; 铁死亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2021)08-2241-07

## Ophiopogonin D interferes with ferroptosis to reduce the damage of cardiomyocytes induced by ophiopogonin D'

LIN Yi<sup>1</sup>, YANG Chun-qi<sup>1,2</sup>, LIAN Wen-yu<sup>1,3</sup>, XIAO Cheng-rong<sup>1</sup>, TAN Hong-ling<sup>1</sup>, GAO Yue<sup>1\*</sup>,  
WANG Yu-guang<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100850, China; 2. Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 3. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** This study investigated the intervention effect and possible mechanism of ophiopogonin D (OPD) in protecting cardiomyocytes against ophiopogonin D' (OPD')-induced injury, and provided relevant experimental data for the clinical use of *Ophiopogon japonicus*. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to evaluate the effect of OPD and OPD' on H9c2 cell viability. The content of reaction oxygen species (ROS) in cells were detected by flow cytometry. The contents of Fe<sup>2+</sup> in cells were detected by FerroOrange's fluorescence imaging. The content of glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by kits. The expression of transferrin

收稿日期: 2021-03-24; 修回日期: 2021-04-30.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81873032).

\*通讯作者 Tel: 86-10-66932201, E-mail: wangyg@bmi.ac.cn;

Tel: 86-10-66931312, E-mail: gaoyue@bmi.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-0419

receptor 1 (TFR1), cyclooxygenase 2 (COX2), NADPH oxidase 1 (NOX1), long-chain acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4), cationic amino acid transporter 11 (SLC7A11), glutathione peroxidase 4 (GPX4), and ferritin heavy chain 1 (FTH1) was detected by Western blot. Results showed that OPD' ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significantly induced the expression of ferroptosis-related proteins, the contents of  $\text{Fe}^{2+}$ , ROS, and GSH-Px were increased, and the content of GSH were decreased. In addition, different concentrations of OPD (0.5, 1, and  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) could partially reverse the myocardial cell injury caused by OPD', and the best effect was obtained when the dose range was  $1\text{--}2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . The experimental results show that OPD can interfere with the ferroptosis caused by OPD', and then have a protective effect on H9c2 cells.

**Key words:** *Ophiopogon japonicas*; ophiopogonin D; ophiopogonin D'; cardiomyocyte; ferroptosis

麦冬中含有多种甾体皂苷类成分, 麦冬总皂苷具有保护消化系统、心血管系统、抗炎和抗肿瘤作用。其中麦冬皂苷 D (ophiopogonin D, OPD) 具有较强的生物活性, 能增强心血管功能、抗心肌损伤和抗炎。中药麦冬中的另一种皂苷类成分麦冬皂苷 D' (ophiopogonin D', OPD'), 是麦冬皂苷 D 的同分异构体, 但药理作用存在显著差异。本课题前期研究首次发现 OPD' 具有明显的心脏毒性<sup>[1]</sup>, 而 OPD 显示出良好的心肌保护作用, 对心脏表达的 CYP2J3 (鼠源) 和 CYP2J2 (人源) 均具有较强的诱导作用<sup>[2,3]</sup>。并且 OPD 能够干预内质网应激从而减轻 OPD' 所致的心肌细胞损伤<sup>[4]</sup>。铁死亡是一种新型的细胞程序死亡方式, 是由于细胞内铁依赖脂质活性氧积聚过多而发生的一种可调节性细胞死亡形式<sup>[5]</sup>。研究表明, 铁死亡参与了心血管疾病的发生发展, 是心肌细胞死亡的重要形式<sup>[6]</sup>。前期作者通过转录组分析发现 OPD' 可能会引起铁死亡相关通路变化, 本部分实验拟观察 OPD' 心肌细胞毒性是否与铁死亡密切相关, 以及 OPD 能否对 OPD' 所致的铁死亡具有逆转作用, 为中药麦冬的临床使用提供相关实验依据。

## 材料与方法

**药品与试剂** OPD 及 OPD' (上海一飞生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$ ); 铁离子比色法检测试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); FerroOrange 荧光探针 (上海东仁化学科技有限公司); ROS 检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); GSH-Px 检测试剂盒、GSH 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); FTH1 和 SLC7A11 一抗 (成都正能生物技术有限责任公司); ACSL4、TFR1、COX2、NOX1 和 GPX4 一抗 (Proteintech 公司); GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 一抗 (美国 CST 公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔和山羊抗小鼠 IgG 二抗 (美国 Santa Cruz 公司)。

**仪器** 恒温水浴锅 (北京市长风仪器仪表公司); 二氧化碳细胞培养箱 (美国 Thermo Fisher 公司); 低速离心机 (北京京立离心机有限公司); 超净工作台 (北京长

城空气净化设备公司); 精密分析天平 (德国 Sartorius 公司); 脱色摇床 (Kylin Bell Lab Instruments 公司); 涡旋混合器 (Kylin Bell Lab Instruments 公司); Microfuge 22RB 型离心机 (美国 Beckman 公司); 电泳仪、电泳槽 (美国 BIO-RAD 公司); ImageQuantLas 500 型显影仪 (美国 Cytiva 公司); VICTOR X 型多标记酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司); 细胞计数器 (深圳市瑞沃德生命科技有限公司); 超微量分光光度计 (NANODROP 8000); 激光扫描共聚焦显微镜 (德国 ZEISS 公司)。

**细胞培养及药物处理** 大鼠心肌细胞 H9c2 细胞 (北京协和细胞库中心), 用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 完全培养基培养。取对数生长期细胞进行后续实验。OPD 和 OPD' 用 DMSO 溶解配成  $20 \times 10^3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  储备液, 于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱保存备用。

**CCK-8 检测大鼠心肌细胞活力** 将对数生长期的 H9c2 细胞以每孔  $1 \times 10^4$  个的密度接种于 96 孔培养板, 分为对照组、给药组、空白组 (不种细胞)。待细胞密度至 80% 时, 给予不同浓度的 OPD' 及 OPD 和 OPD', 并培养 24 h。弃去培养基后, 用 PBS (phosphate buffer saline) 清洗 1 次, 向每孔中加入 100  $\mu\text{L}$  含有 CCK-8 的 DMEM 空白培养基。将 96 孔板放入培养箱中孵育至吸光度为 0.8~1, 用 VICTOR 型多标记酶标仪测定 490 nm 处吸光度 ( $A_{490}$ ) 值。

**铁离子比色法检测大鼠心肌细胞铁离子含量** 将对数生长期的细胞接种于 6 孔培养板中, 待细胞充分贴壁后, 分为对照组、OPD' ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组、OPD' + OPD 组 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} + 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 处理细胞 24 h, 收集细胞, 用 PBS 清洗 2 次 (下同)。加入 200  $\mu\text{L}$  裂解液, 于摇床裂解 2 h。12 000  $\times g$ , 10 min,  $4^\circ\text{C}$  离心, 留取上清液。按照试剂盒说明书加入相应试剂, 于 550 nm 处测得吸光度, 绘制标准曲线并计算铁离子浓度。

**激光共聚焦检测大鼠心肌细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  的含量** 将 H9c2 细胞接种于激光共聚焦小皿中, 在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养过夜。将不同浓度的 OPD 及 OPD' 加入

培养基中, 培养细胞 24 h。除去培养液, 并用 HBSS (hanks balanced salt solutions) 或无血清培养基洗涤细胞 3 次。加入 FerroOrange 工作液 ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 在  $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  培养箱中培养 30 min。在荧光显微镜下观察, 波长为  $561 \text{ nm}/570\sim 620 \text{ nm}$ 。

**流式细胞术检测细胞内活性氧的含量** 收集给药处理后的细胞, 加入  $500 \mu\text{L}$  DCEH-DA 稀释液 ( $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 于  $37^\circ\text{C}$  细胞培养箱中孵育 20 min。每隔 5 min 颠倒混匀 1 次, 共 4 次。用空白培养基洗涤细胞 3 次, 去除细胞外探针。活性氧阳性对照 (Rosup) 需孵育 20 min 以上。用流式细胞仪进行检测, 激发波长  $488 \text{ nm}$ , 发射波长  $525 \text{ nm}$ 。

**细胞内 GSH-Px 及 GSH 含量的检测** 收集给药处理后的细胞, 加入 PBS 清洗 2~3 次。GSH-Px 的检测按照试剂盒说明书进行, 于  $412 \text{ nm}$  检测 ( $1 \text{ cm}$  光径比色杯, 蒸馏水调零), 测各管吸光度  $A$  值。GSH 含量的检测按照试剂盒说明书进行, 于  $405 \text{ nm}$  处, 酶标仪测定各孔  $A$  值。

**Western blot 法检测铁死亡相关蛋白的表达变化** 收集给药处理后的细胞, 加入 PBS 清洗 2~3 次。加入含有  $1\%$  蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 于超声破碎仪中破碎细胞,  $4^\circ\text{C}$ 、 $12\ 000 \times g$ , 离心 15 min, 取上清进行 BCA (bicinchoninic acid) 定量, 加入上样缓冲液于  $100^\circ\text{C}$  金属浴中加热 10 min 进行变性。取  $30 \mu\text{g}$  总蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 将目的蛋白条带转印至 PVDF (polyvinylidene fluoride) 膜上, TBST (TBS + Tween) 配制的  $5\%$  脱脂奶粉室温封闭 3 h, 孵一抗过夜后, 加入二抗, 室温孵育 1 h 后显影。使用 Image J 软件进行光密度分析, 将目的蛋白与 GAPDH 蛋白的灰度值之比作为 1。

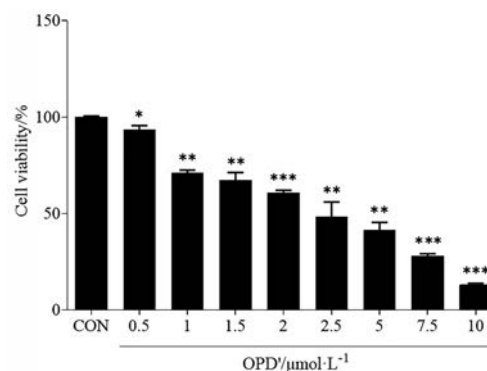
**统计学分析** 实验结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行分析。多组数据比较采用方差分析 (one-way ANOVA), 两组数据比较采用学生  $t$  检验 (student's  $t$  test);  $P < 0.05$  表明差异具有统计学意义。相关分析采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行。

## 结果

### 1 OPD'对H9c2细胞存活率的影响

不同浓度的 OPD' ( $0.5$ 、 $1$ 、 $1.5$ 、 $2$ 、 $2.5$ 、 $5$ 、 $7.5$  和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 处理 H9c2 细胞 24 h 后, CCK-8 测定 OPD' 对心肌细胞存活率的影响, 实验结果如图 1。OPD' 对 H9c2 细胞存活率有显著的毒性作用, 并呈一定浓度依赖性 ( $P < 0.05$ )。从实验结果可以看出, 当 OPD' 为  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, H9c2 细胞存活率显著下降至  $50\%$  左右, 显示出明确的心肌细胞毒性。与本研究之前发表的 OPD'

通过内质网应激途径造成心肌细胞毒性具有一致性<sup>[4]</sup>, 但本文所采用的 OPD' 浓度范围为 ( $0.5$ 、 $1$ 、 $1.5$ 、 $2$ 、 $2.5$ 、 $5$ 、 $7.5$  和  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 与本实验室之前发表文章的 OPD' 浓度范围 ( $1\sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 具有互补性, 主要是考察 OPD' 在更低浓度范围内是否对 H9c2 的细胞存活率有影响。



**Figure 1** Effect of ophiopogonin D' (OPD') on the survival rate of H9c2 cells. H9c2 cells were treated with OPD' ( $0.5$ ,  $1$ ,  $1.5$ ,  $2$ ,  $2.5$ ,  $5$ ,  $7.5$ , and  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h. Cell viability was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control (CON) group

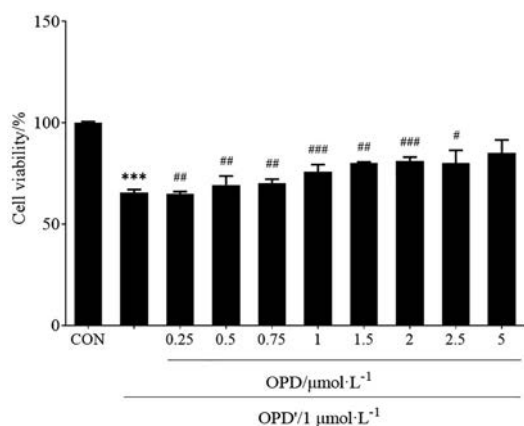
### 2 OPD'及OPD共处理对H9c2细胞存活率的影响

根据上面 CCK-8 细胞活力实验结果, 本部分实验选定  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 OPD' 与不同浓度的 OPD 共处理 H9c2 细胞 24 h, 通过 CCK-8 法观察 OPD 对 OPD' 所致的 H9c2 细胞毒性是否有干预作用, 实验结果如图 2。与对照组相比,  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 OPD' 可致 H9c2 细胞死亡, 细胞存活率下降至  $65\%$  左右 ( $P < 0.001$ ); 与 OPD' 组相比, OPD 与 OPD' 共处理时, 当  $\text{OPD} > 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 能够逆转 OPD' 所致的 H9c2 细胞损伤, 并呈一定的浓度依赖性 ( $P < 0.05$ )。

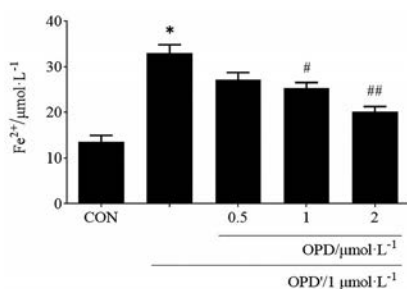
### 3 OPD'及OPD共处理对H9c2细胞Fe<sup>2+</sup>含量的影响

由于铁死亡主要表现为铁超载和氧化还原失衡, 所以这部分实验将检测细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  的含量。根据上述 CCK-8 实验结果, 选取  $0.5$ 、 $1$  和  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 OPD 预处理 H9c2 细胞 1 h, 再加入 OPD' 共处理 24 h, 检测细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  含量的变化, 实验结果如图 3 所示。与空白对照组相比, OPD' 处理组细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  含量有明显升高 ( $P < 0.05$ ); 而提前加入 OPD 预处理的细胞, 其细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  含量有所下降, 与 OPD' 处理组相比有显著差异 ( $P < 0.05$ )。

FerroOrange 是一种新型荧光探针, 可对活细胞内的  $\text{Fe}^{2+}$  进行荧光成像, 以此判断细胞内  $\text{Fe}^{2+}$  的含量变化, 实验结果如图 4。与对照组相比, OPD' 处理组的荧光强度明显增强; 而 OPD 和 OPD' 共处理组的细胞内荧光强度又有所减弱。实验结果证明, OPD' 能引起 H9c2 细胞



**Figure 2** Effects of OPD and OPD' on the survival rate of H9c2 cells. H9c2 cells were co-treated with OPD' ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and OPD (0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 2.5, and  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) for 24 h and determined by CCK-8 assay.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs CON group; # $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs OPD' group



**Figure 3** Effects of OPD' ( $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and OPD ( $0.5$ ,  $1$ , and  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) on the content of  $\text{Fe}^{2+}$  in H9c2 cells. The content of  $\text{Fe}^{2+}$  was detected in H9c2 cells by  $\text{Fe}^{2+}$  kit.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs CON group; # $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs OPD' group

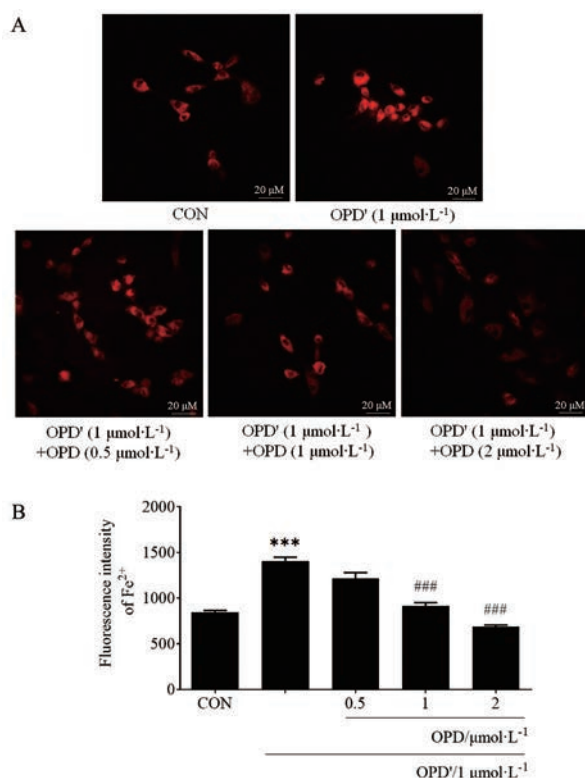
内铁超载, 而 OPD 则能部分逆转其引起的铁超载。

#### 4 OPD 对 OPD' 诱导 H9c2 细胞 ROS 产生的影响

ROS 是一种含氧的化学反应性化学物质, 其在细胞信号传导和体内平衡中具有重要作用, 能一定程度表明细胞的生长状态。利用 DCFH-DA 探针检测细胞内 ROS 的含量, 实验结果如图 5。与对照组相比, OPD' 处理 H9c2 细胞后可刺激细胞内 ROS 的产生 ( $P < 0.01$ ); 而经 OPD 干预后可部分抑制 ROS 的产生 ( $P < 0.05$ )。

#### 5 OPD' 及 OPD 共处理对 H9c2 细胞 GSH-Px 和 GSH 含量的影响

细胞内的总 GSH 中通常 90%~95% 为还原型谷胱甘肽, 而还原型的谷胱甘肽是细胞抗氧化防御的关键保护物质。GSH-Px 作为一种重要的过氧化物分解酶, 能够催化 GSH 转化为 GSSG [L-glutathione (oxidized)], 这有助于将有毒的过氧化物转化为无毒的羟基化合物, 从而保护细胞膜的结构和功能免受过氧化物的影响。实验结果如图 6 所示, 与对照组细胞相比, H9c2 细



**Figure 4** Effects of OPD' and OPD on the content of  $\text{Fe}^{2+}$  in H9c2 cells. A: The content of  $\text{Fe}^{2+}$  was detected in H9c2 cells by bioimaging of FerroOrange; B: Quantitative analysis of  $\text{Fe}^{2+}$  based on the cell images stained by FerroOrange.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs CON group; \*\*\* $P < 0.001$  vs OPD' group

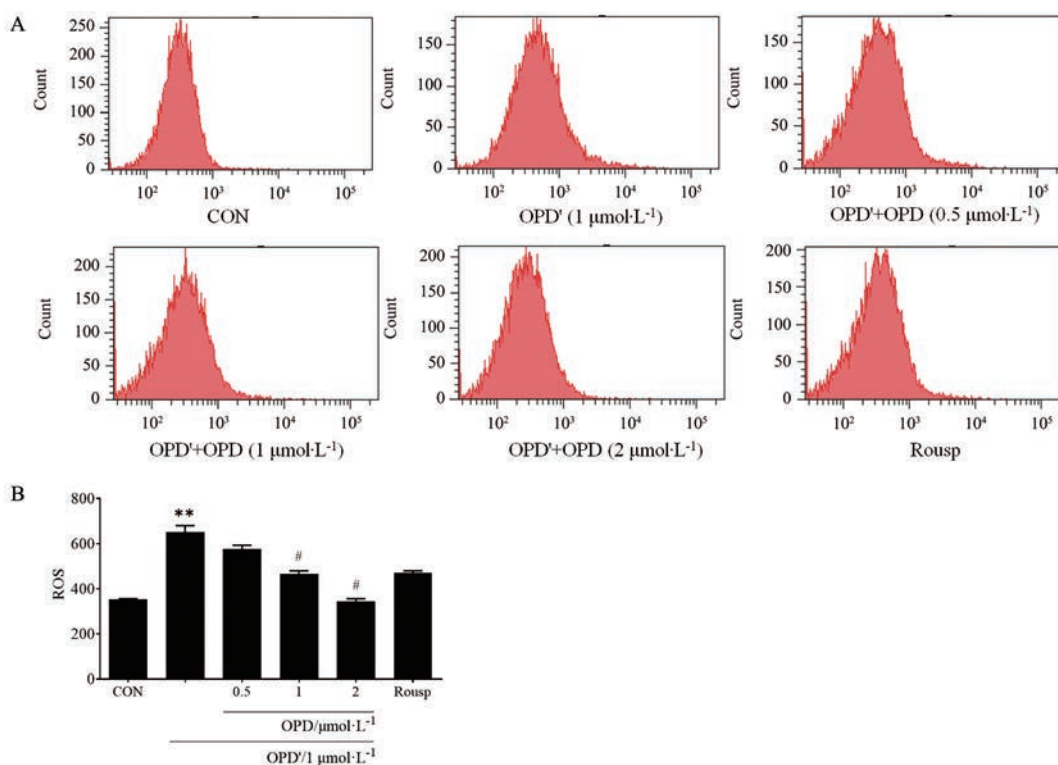
胞经 OPD' 处理后, 细胞内的 GSH-Px 含量上升, GSH 耗竭 ( $P < 0.01$ ); 而经 OPD 干预后, 细胞内的 GSH 含量有所上升, GSH-Px 大致恢复平衡状态, 并呈一定的浓度依赖性 ( $P < 0.05$ )。

#### 6 OPD 缓解 OPD' 诱导 H9c2 细胞的铁死亡

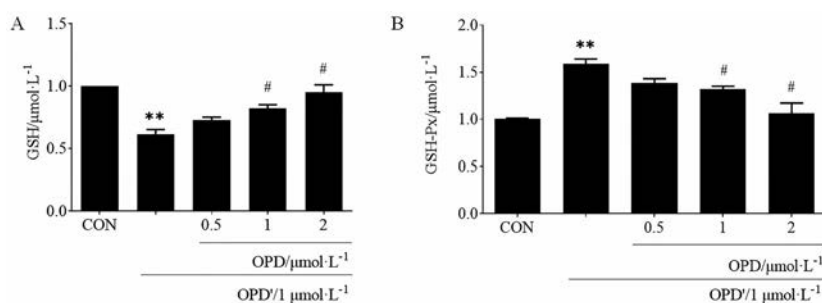
为了进一步确定 OPD' 是否通过引起心肌细胞的铁紊乱和氧化应激失衡而引起铁死亡, 以及 OPD 是否能干预 OPD' 所引起的铁死亡, 通过 Western blot 检测铁死亡相关蛋白的表达, 实验结果如图 7 所示。与对照组相比, OPD' 可明显诱导 TFR1、COX2、NOX1、ACSL4 以及 SLC7A11 的表达, 而使 GPX4 和 FTH1 表达有所下降 ( $P < 0.05$ ); 加入不同浓度 OPD 处理后可显著逆转 OPD' 所致的损伤, 使铁死亡相关蛋白 TFR1、COX2、NOX1、ACSL4 以及 SLC7A11 的表达有不同程度的下降, GPX4 和 FTH1 的蛋白表达有所上升 ( $P < 0.05$ )。

#### 讨论

中药麦冬作为传统大宗的中药材品种, 以往研究多集中于其心血管保护和相关药理机制, 而对相关皂苷成分的毒性作用研究较少。OPD' 作为 OPD 的同分异构



**Figure 5** Effects of OPD' and OPD on reaction oxygen species (ROS) in H9c2 cells. A and B: Expression of ROS in H9c2 cells was detected by DCFH-DA fluorescence probe.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs CON group; # $P < 0.05$  vs OPD' group

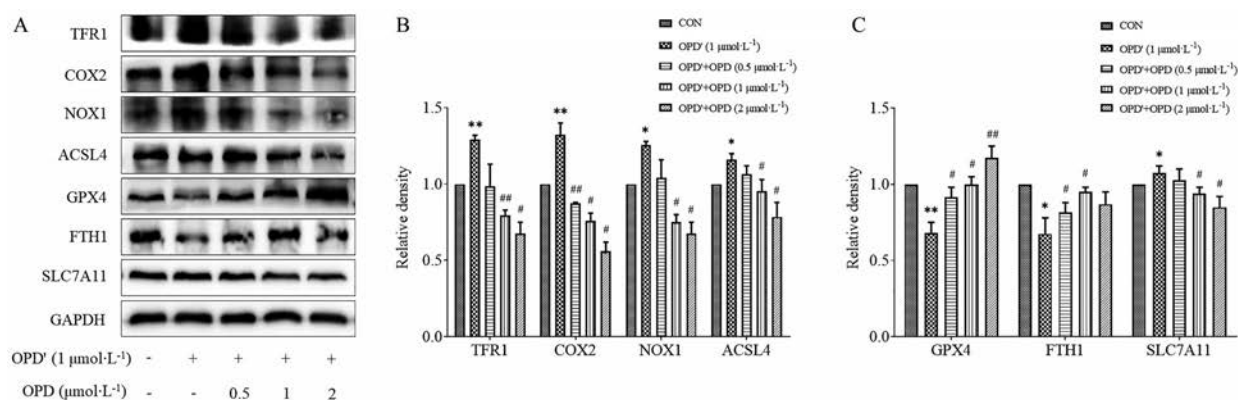


**Figure 6** Effects of OPD' and OPD on glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in H9c2 cells. A: Expression of GSH was detected in H9c2 cells by GSH kit; B: Expression of GSH-Px was detected in H9c2 cells by GSH-Px kit.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs CON group; # $P < 0.05$  vs OPD' group

体,关于其药理毒理作用研究也很少。本实验室前期研究首次发现,OPD'可能通过诱导H9c2细胞发生内质网应激反应而对H9c2细胞具有毒性作用,诱导细胞的凋亡,并且当OPD和OPD'共处理H9c2细胞时,OPD能够通过内质网应激途径减轻OPD'所致的H9c2细胞损伤<sup>[4]</sup>。内质网应激实验中OPD'作用浓度为 $6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,OPD的浓度范围为 $(1\sim 24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 。本文选定OPD'浓度为 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时探究其是否通过铁死亡通路对心肌细胞产生毒性,当OPD浓度为 $(0.5\sim 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 时对心肌细胞有一定的保护作用,提示不同作用途径其浓度存在明显差异。OPD'在较低浓度 $(1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 即可影响 $\text{Fe}^{2+}$ 浓度,从而可能通过铁死亡途径产生心肌

细胞毒性,且OPD在较低浓度范围 $(0.5\sim 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$ 即可产生逆转,显示出OPD'心肌细胞毒性的多途径和多浓度响应。OPD与OPD'为同分异构体,二者结构非常相似,侧链分别为吡喃木糖和鼠李糖,在糖链类型和游离羟基取代位置上有所差异,此差异是其药理作用存在如此大差异的关键信息,具体构效或构毒关系仍需在今后工作中进一步研究加以确证。

铁死亡是首次由Dixon等<sup>[7]</sup>于2012年新发现的一种细胞死亡方式,其与正常细胞凋亡和坏死不同,铁死亡的特征是细胞内伴随着脂质过氧化的铁超载,其涉及的机制主要与铁超载、脂质过氧化失衡以及半胱氨酸转运体受阻有关。



**Figure 7** Effect of OPD and OPD' on ferroptosis related proteins expression in H9c2 cells. A: Expression of TFR1, COX2, NOX1, ACSL4, GPX4, FTH1 and SLC7A11 protein was detected in H9c2 cells by Western blot; B: The protein gray scale analysis of TFR1, COX2, NOX1 and ACSL4 by Image J; C: The protein gray scale analysis of GPX4, FTH1 and SLC7A11 by Image J.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs CON group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs OPD' group. TFR1: Transferrin receptor 1; COX2: Cyclooxygenase 2; NOX1: NADPH oxidase 1; ACSL4: Long-chain acyl-CoA synthetases 4; GPX4: Glutathione peroxidase 4; FTH1: Ferritin heavy chain 1; SLC7A11: Cationic amino acid transporter 11; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

铁是人体重要的必需微量元素,正常人体内两分子 $\text{Fe}^{3+}$ 结合一分子转铁蛋白(Tf)形成复合物,细胞膜表面的转铁蛋白受体1(TFR1)作为细胞摄取铁所必需的细胞表面受体,可将机体内的 $\text{Fe}^{3+}$ 转运到细胞内,在二价金属转运蛋白(DMT1)的作用下可将 $\text{Fe}^{3+}$ 还原为 $\text{Fe}^{2+}$ ,此过程受到铁蛋白(FTH1和FTL)以及铁调素等多种蛋白的调节<sup>[8,9]</sup>。实验表明上调TFR1的表达可增加铁的摄取;FTH1和FTL的表达下调可减少铁的储存,释放大量的游离铁<sup>[10]</sup>,从而使细胞内的铁超载。当细胞内铁代谢失衡时会导致氧化以及抗氧化失衡。因为 $\text{Fe}^{2+}$ 通过氧化还原到 $\text{Fe}^{3+}$ 需要电子的转移,所以铁经常参与底物之间的电子迁移<sup>[11]</sup>;  $\text{Fe}^{2+}$ 可以与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 通过芬顿样反应产生羟基自由基,具有更强的氧化能力,从而使细胞内的ROS水平升高<sup>[12]</sup>,这是铁诱导氧化应激反应发生的机制。当ROS产量过多时,会破坏细胞的蛋白质、脂质以及DNA,对细胞和组织造成伤害<sup>[13]</sup>,引发铁死亡。因此,铁超载会加剧铁死亡的发生。

GSH具有抗氧化应激作用,能及时有效清除细胞内过多的ROS,并以此维持细胞的完整和稳态。此外,GSH也是GPX4发挥抗氧化功能所必需的辅助因子<sup>[14]</sup>。GSH的合成需要半胱氨酸参与,而半胱氨酸转运体(由SLC3A2和SLC7A11组成)是细胞摄取半胱氨酸的一条重要途径<sup>[15]</sup>。研究表明,当半胱氨酸转运体受阻时,细胞内的半胱氨酸含量减少,导致GSH合成减少,GPX4活性缺失,清除细胞内过多ROS的能力下降,使ROS堆积,从而加剧了细胞的铁死亡。

ROS在机体的新陈代谢中起重要作用。过量ROS与细胞膜的磷脂、酶和膜受体相关的多不饱和脂肪酸

的侧链以及核酸等大分子物质发生脂质过氧化反应,形成MDA和LPO等脂质过氧化产物,改变细胞膜的流动性和通透性,从而改变细胞结构和功能<sup>[16]</sup>。Doll等<sup>[17]</sup>研究发现,敲除ACSL4时,细胞铁死亡受到明显抑制,表明ACSL4通过氧化细胞膜磷脂驱动铁死亡。

一般来说,NOX1是细胞内超氧化物或过氧化氢的产生来源之一<sup>[18,19]</sup>,ROS的释放也可部分归因于NOX1的调节;COX2是前列腺素生物合成中的关键酶,参与炎症级联反应,也是参与铁死亡的一种过氧化物酶。二者表达增多会加剧细胞的铁死亡。

本实验结果表明,OPD'能诱导H9c2细胞发生铁死亡,具体表现包括:当 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的OPD'作用于细胞24 h后, $\text{Fe}^{2+}$ 含量增多,使细胞发生铁超载;ROS含量明显增多;GSH含量明显减少,GSH-Px含量增多;铁死亡相关蛋白TFR1、COX2、NOX1、ACSL4以及SLC7A11的表达增多,GPX4和FTH1的蛋白表达下降。加入不同浓度的OPD共处理后,细胞内的铁超载现象得到部分逆转;GSH含量明显增多,而过多的ROS含量有所下降;OPD浓度为 $0.5\sim 2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,TFR1、COX2、NOX1、ACSL4以及SLC7A11的表达减少,GPX4和FTH1的蛋白表达有所上升,并呈一定的浓度依赖性,从而减轻OPD'所致的铁死亡。

综上所述,OPD'的确诱导了大鼠心肌细胞的铁死亡,而OPD可能通过减轻细胞内的铁超载、脂质过氧化失衡以及半胱氨酸转运体受阻从而减轻OPD'诱导大鼠心肌细胞的铁死亡。麦冬作为我国传统的大宗中药材,是药典常用中药材大品种之一,其药材的安全性应受到足够重视,中药材内相关成分的毒性效应不应

简单作为判断中药材毒性的依据。从本研究看, OPD在麦冬中含量约为OPD'的1~3倍, 其能够明显通过干预内质网应激<sup>[4]</sup>和铁死亡途径降低OPD'的心脏毒性。因此对于中药整体毒性的研究远不应看某一种单体成分毒性效应, 应将中药毒性置于中药整体或方剂环境下进行考虑, 中药材内部成分间相互作用及不同中药材成分间的相互作用可能会对中药材整体质量产生综合作用, 这也体现了中医整体和配伍减毒增效的科学内涵。

**作者贡献:** 王宇光、高月负责提出研究选题及设计研究方案; 林毅、连闻雨、杨春启负责实施研究过程; 谭洪玲、肖成荣负责材料支持; 高月、王宇光负责技术指导和论文修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Ren SJ, Wang YG, Gao Y. Cytotoxicity of ophiopogonin D' for rat H9c2 cardiomyocytes [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2017, 31: 325-331.
- [2] You WT, Zhou T, Ma ZC, et al. Ophiopogonin D maintains Ca<sup>2+</sup> homeostasis in rat cardiomyocytes *in vitro* by upregulating CYP2J3/EETs and suppressing ER stress [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37: 368-381.
- [3] Huang XY, Wang YG, Zhang Z, et al. Ophiopogonin D and EETs ameliorate Ang II-induced inflammatory responses *via* activating PPAR $\alpha$  in HUVECs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490: 123-133.
- [4] Wang J, Wang NN, Tan HL, et al. Ophiopogonin D protects cardiomyocytes against ophiopogonin D'-induced injury through suppressing endoplasmic reticulum stress [J]. *China J Chin Mat Med* (中国中药杂志), 2019, 44: 154-159.
- [5] Li BW, Wang ZW. Ferroptosis is a new form of regulatory cell death [J]. *Basic Clin Med* (基础医学与临床), 2019, 39: 247-251.
- [6] Li WY, Xia ZY, Li W, et al. Role of ferroptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *J Chin Pract Diagn Ther* (中华实用诊断与治疗杂志), 2019, 33: 93-96.
- [7] Dixon S, Lemberg K, Lamprecht M, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149: 1060-1072.
- [8] Li PF, Wang QY. Mechanisms of ferroptosis and its involvement in ovarian cancer [J]. *J Int Obstet Gynecol* (国际妇产科学杂志), 2019, 46: 458-461.
- [9] Lei P, Bai T, Sun Y. Mechanisms of ferroptosis and relations with regulated cell death: a review [J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 139.
- [10] Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells [J]. *Chem Biol*, 2008, 15: 234-245.
- [11] Bennett BD, Gralnick JA. Mechanisms of toxicity by and resistance to ferrous iron in anaerobic systems [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 140: 167-171.
- [12] Zeng B, Zhang P, Zheng M, et al. Detection and identification of the oxidizing species generated from the physiologically important Fenton-like reaction of iron(II)-citrate with hydrogen peroxide [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 15: 39-45.
- [13] Valko M, Jomova K, Rhodes CJ, et al. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90: 1-37.
- [14] Latunde-Dada GO. Ferroptosis: role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy [J]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2017, 1861: 1893-1900.
- [15] Lewerenz J, Hewett SJ, Huang Y, et al. The cystine/glutamate antiporter system x(c)(-) in health and disease: from molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18: 522-555.
- [16] Jana T, Tzvetva S, Zlatina N, et al. Effect of endurance training on diurnal rhythms of superoxide dismutase activity, glutathione and lipid peroxidation in plasma of pinealectomized rats [J]. *Neurosci Lett*, 2020, 716: 134637.
- [17] Doll S, Proneth B, Tyurina YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition [J]. *Nat Chem Biol*, 2016, 13: 91-98.
- [18] Daiber A, Di Lisa F, Oelze M, et al. Crosstalk of mitochondria with NADPH oxidase *via* reactive oxygen and nitrogen species signalling and its role for vascular function [J]. *Br J Pharmacol*, 2017, 174: 1670-1689.
- [19] Youn JY, Zhou J, Cai H. Bone morphogenic protein 4 mediates NOX1-dependent eNOS uncoupling, endothelial dysfunction, and COX2 induction in type 2 diabetes mellitus [J]. *Mol Endocrinol*, 2015, 29: 1123-1133.