

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research红芪多糖通过 PERK - Nrf2 信号通路改善
脂肪变性肝细胞铁死亡的研究Research on the improvement of ferroptosis in hepatic steatosis cells by hedysarum
polybotrys polysacchcaide through the PERK - Nrf2 signaling pathway丁海军¹, 李 钦², 张 磊³,
李 芳²(1. 甘肃卫生职业学院 药学院, 甘肃 兰州
730000; 2. 湖南医药学院 药学院, 湖南 怀化
418000; 3. 甘肃中医药大学 基础医学院, 甘肃
兰州 730000)DING Hai-jun¹, LI Qin²,
ZHANG Lei³, LI Fang²(1. School of Pharmacy, Gansu Health
Vocational College, Lanzhou 730000,
Gansu Province, China; 2. School of
Pharmaceutical Sciences, Hunan
University of Medicine, Huaihua 418000,
Hunan Province, China; 3. School of
Basic Medicine, Gansu University of
Chinese Medicine, Lanzhou 730000,
Gansu Province, China)

基金项目: 2024 年甘肃省高校教师创新基金资助
项目(2024A-317), 2023 年度国家
自然科学基金地区基金资助项目
(82360914)

作者简介: 丁海军(1974-), 副教授, 主要从事
中药药理作用机制研究方面的研究

通信作者: 李芳, 副教授

MP: 13919959028

E-mail: 119232388@qq.com

摘要:目的 探讨红芪多糖(HPS)通过蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 - 对稳定抗氧化调节蛋白核因子 E2 相关因子 2(PERK - Nrf2) 信号通路改善脂肪变性肝细胞铁死亡的机制研究。方法 用 0.6 mmol · L⁻¹ 的脂肪酸进行体外诱导培养 LO-2 细胞, 构建非酒精性脂肪性肝病细胞模型。将细胞分为正常组(细胞正常培养)、模型组(0.6 mmol · L⁻¹ 脂肪酸干预 12 h 造模)、阳性对照组(造模后用 24 μmol · L⁻¹ liproxtain-1 处理)和实验组(造模后用 50 mg · L⁻¹ HPS 处理), 各组细胞均培养 24 h。用油红 O 染色法分析细胞脂质沉积阳性面积(% Area); 用酶联反应(ELISA)检测细胞脂质过氧化物(LPO)、谷胱甘肽(GSH)、4-羟基壬烯酸(4-HNE)和超氧化物歧化酶(SOD)的含量; 用蛋白质印迹(WB)法和反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝细胞 PERK - Nrf2 信号通路相关蛋白和 Messenger RNA(mRNA)的相对表达水平; 用免疫荧光法检测谷胱甘肽过氧化物 4(GPX4)及溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)蛋白相对表达水平。结果 正常组、模型组、对照组和实验组肝细胞脂质沉积阳性面积分别为 0.02 ± 0.01、0.26 ± 0.08、0.09 ± 0.02 和 0.15 ± 0.04; LPO 含量分别为 (2.62 ± 0.17)、(13.47 ± 1.55)、(6.31 ± 1.12) 和 (5.71 ± 1.50) nmol · mL⁻¹; 4-HNE 含量分别为 (8.06 ± 0.40)、(14.60 ± 2.02)、(9.40 ± 0.81) 和 (12.94 ± 0.56) ng · L⁻¹; GSH 含量分别为 (120.73 ± 7.75)、(34.60 ± 2.98)、(67.86 ± 2.08) 和 (59.33 ± 7.46) mg · L⁻¹; SOD 含量分别为 (7.25 ± 0.61)、(3.77 ± 0.44)、(5.22 ± 0.76) 和 (8.12 ± 0.78) U · mL⁻¹; 葡萄糖调节蛋白 78(GRP78) mRNA 相对表达水平分别为 1.01 ± 0.15、1.47 ± 0.11、1.41 ± 0.08 和 1.02 ± 0.05; 蛋白激酶 RNA 样内质网激酶(PERK) mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.09、1.85 ± 0.16、1.02 ± 0.27 和 1.16 ± 0.01; 核因子 E2 相关因子 2(Nrf2) mRNA 表达水平分别为 1.01 ± 0.12、0.26 ± 0.07、0.68 ± 0.09 和 0.66 ± 0.05; GPX4 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.05、0.79 ± 0.02、0.87 ± 0.17 和 0.83 ± 0.10; SLC7A11 mRNA 相对表达水平分别为 1.01 ± 0.17、0.50 ± 0.14、0.91 ± 0.09 和 0.98 ± 0.05; Grp78 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11、2.72 ± 0.07、1.83 ± 0.04 和 2.24 ± 0.06; PERK 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.06、1.21 ± 0.08、1.03 ± 0.07 和 0.95 ± 0.06; 磷酸化(p-)PERK 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.04、2.70 ± 0.08、1.40 ± 0.07 和 1.76 ± 0.06; PERK 蛋白磷酸化水平分别为 1.00 ± 0.09、2.24 ± 0.21、1.36 ± 0.03 和 1.85 ± 0.09; Nrf2 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.03、0.52 ± 0.01、0.73 ± 0.02 和 0.84 ± 0.02; GPX4 蛋白荧光强度分别为 24.34 ± 0.86、13.86 ± 1.65、18.01 ± 2.03 和 16.20 ± 1.55; SLC7A11 蛋白荧光强度分别为 69.58 ± 4.13、34.24 ± 6.73、60.75 ± 9.35 和 45.18 ± 6.46。模型组的上述指标与正常组比较、实验组的上述指标与模型组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结论 HPS 可能通过调控 PERK - Nrf2 信号通路, 减轻肝细胞脂质过氧化, 减轻铁死亡, 从而保护肝细胞。**关键词:** 红芪多糖; 非酒精性脂肪肝病; 蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 - 对稳定抗氧化调节蛋白核因子 E2 相关因子 2 信号通路; 脂质过氧化; 铁死亡

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.22.010

中图分类号:R28 文献标志码:A

文章编号:1001-6821(2025)22-3214-07

Abstract: Objective To explore the mechanism by which hedysarum polybotrys polysaccharide (HPS) improves iron death of steatotic hepatocytes through the protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase-nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (PERK-Nrf2) signaling pathway. **Methods** The cells were cultured with $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ fatty acids to replicate the non-alcoholic fatty liver disease cell model. The LO-2 cell were divided into normal group (complete medium), model group ($0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ fatty acid solution), positive control group ($0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ fatty acid solution + $24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ liproxtain-1) and experimental group ($0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ fatty acid solution + $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HPS), culture for 24 h. Stain with Oil Red O was used to analyze the positive area (% Area) of cell lipid deposition; the content of lipid peroxide (LPO), 4-hydroxynonenal (4-HNE), glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa) method; the relative expressions levels of PERK-Nrf2 signaling pathway protein in hepatocytes were detected by Western blot; immunofluorescence assay was used to detect the relative expression levels of GPX4 and SLC7A11 proteins. **Results** The % Area of cell lipid deposition in hepatocytes of normal group, model group, control group and experimental group were 0.02 ± 0.01 , 0.26 ± 0.08 , 0.09 ± 0.02 and 0.15 ± 0.04 ; the contents of LPO were (2.62 ± 0.17), (13.47 ± 1.55), (6.31 ± 1.12) and (5.71 ± 1.50) $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$; the contents of 4-HNE were (8.06 ± 0.40), (14.60 ± 2.02), (9.40 ± 0.81) and (12.94 ± 0.56) $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$; the contents of GSH were (120.73 ± 7.75), (34.60 ± 2.98), (67.86 ± 2.08) and (59.33 ± 7.46) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$; the contents of SOD were (7.25 ± 0.61), (3.77 ± 0.44), (5.22 ± 0.76) and (8.12 ± 0.78) $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$; the levels of *Grp78* mRNA were 1.01 ± 0.15 , 1.47 ± 0.11 , 1.41 ± 0.08 and 1.02 ± 0.05 ; the levels of *PERK* mRNA were 1.00 ± 0.09 , 1.85 ± 0.16 , 1.02 ± 0.27 and 1.16 ± 0.01 ; the levels of *Nrf2* mRNA were 1.01 ± 0.12 , 0.26 ± 0.07 , 0.68 ± 0.09 and 0.66 ± 0.05 ; the levels of *GPX4* mRNA were 1.00 ± 0.05 , 0.79 ± 0.02 , 0.87 ± 0.17 and 0.83 ± 0.10 ; the levels of *SLC7A11* mRNA were 1.01 ± 0.17 , 0.50 ± 0.14 , 0.91 ± 0.09 and 0.98 ± 0.05 ; the relative expression levels of *Grp78* protein were 1.00 ± 0.11 , 2.72 ± 0.07 , 1.83 ± 0.04 and 2.24 ± 0.06 ; the relative expression levels of PERK protein were 1.00 ± 0.06 , 1.21 ± 0.08 , 1.03 ± 0.07 and 0.95 ± 0.06 ; the relative expression levels of p-PERK protein were 1.00 ± 0.04 , 2.70 ± 0.08 , 1.40 ± 0.07 and 1.76 ± 0.06 ; the relative levels of PERK protein phosphorylation were 1.00 ± 0.09 , 2.24 ± 0.21 , 1.36 ± 0.03 and 1.85 ± 0.09 ; the relative expression levels of Nrf2 protein were 1.00 ± 0.03 , 0.52 ± 0.01 , 0.73 ± 0.02 and 0.84 ± 0.02 ; the protein fluorescence intensity of GPX4 were 24.34 ± 0.86 , 13.86 ± 1.65 , 18.01 ± 2.03 and 16.20 ± 1.55 ; the protein fluorescence intensity of SLC7A11 were 69.58 ± 4.13 , 34.24 ± 6.73 , 60.75 ± 9.35 and 45.18 ± 6.46 . Compared with the normal group, there were significant differences in the above indexes of model group (all $P < 0.05$); compared with the model group, there were significant differences in the above indexes of experimental group (all $P < 0.05$). **Conclusion** HPS may protect liver cells by regulating the PERK-Nrf2 signaling pathway, reducing lipid peroxidation and iron death in liver cells.

Key words: hedysarum polybotrys polysacchcaide; non-alcoholic fatty liver disease; protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase-nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 signaling pathway; lipid peroxidation; ferroptosis

非酒精性脂肪肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)以肝细胞脂质蓄积为主要病理表现,由此引发的脂质过氧化物堆积会导致抗氧化物耗竭,这为铁死亡的发生提供了必要条件^[1-3]。内质网是脂质过氧化发生的主要场所,内质网应激时蛋白激酶

RNA样内质网激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)激活对稳定抗氧化调节蛋白核因子E2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)表达是必须的。红芪多糖(hedysarum polybotrys polysacchcaide, HPS)是中药红

芪的主要成分,前期我们研究发现,HPS能够提高NAFLD模型小鼠Nrf2蛋白表达,减少肝细胞脂质沉积造成的肝细胞损伤^[4],本研究旨在通过体外实验,进一步探讨高脂环境下HPS对肝细胞PERK-Nrf2信号通路及铁死亡的影响。

材料与方法

1 材料

细胞 人正常肝细胞LO-2(HL-7702)细胞,购自苏州海星生物科技有限公司。

药品与试剂 红芪多糖,规格:100 mg/支,纯度:≥90%,批号:WP23080712,四川维克奇生物科技有限公司生产;铁死亡抑制剂(liproxstain-1),规格:2 mg,纯度:98.56%,批号:HY-12726,上海MCE公司生产;脂肪酸,规格:5 mL*2支,纯度:≥98%,批号:KC006,西安鲲鹏科技发展有限公司生产;胎牛血清,批号:12A050,太仓依科赛生物科技有限公司生产;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体、磷酸化蛋白激酶RNA样内质网激酶(phospho protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, p-PERK)抗兔单克隆抗体,均由美国ImmunoWay公司生产;谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗兔单克隆抗体、核因子E2相关因子2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2),均由武汉ABclonal公司生产;溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)抗兔单克隆抗体,美国Abcam公司生产;蛋白激酶RNA样内质网激酶(protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)抗兔单克隆抗体,美国GeneTex公司生产;葡萄糖调节蛋白78(glucose regulated protein 78, Grp78)抗兔单克隆抗体,美国Proteintech公司生产;4-羟基壬烯醛(4-hydroxynonenal, 4-HNE)试剂盒,江苏酶免实业有限公司生产;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒,均由南京建成生物工程研究所生产;脂质过氧化产物(lipid peroxide, LPO)试剂盒,北京索莱宝科技有限公司生产;油红O染色试剂盒,苏州海星生物科技有限公司生产。

仪器 WD-9423C全自动化学发光成像系统,北京六一生物科技有限公司产品;201901003实时荧光定量聚合酶链式反应仪,美国ThermoFisher科技公司。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[4]

LO-2细胞经复苏后,置于含10%胎牛血清的DMEM-F12培养基内,于37℃、5% CO₂环境下培养。待细胞融合达75%~85%时,常规消化、传代,冻存。

2.2 NAFLD细胞模型的建立^[5]

使用完全培养基将脂肪酸稀释为0.6 mmol·L⁻¹的脂肪酸造模液。

2.3 细胞分组与处理^[6]

参照课题组既往实验方法和步骤,用细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)和油红O染色法分别于脂肪酸干预12、24、48 h筛选建立脂肪变性细胞模型的浓度及时间,当脂肪酸浓度0.6 mmol·L⁻¹作用24 h时细胞变性明显且细胞增殖显著抑制。通过CCK-8实验检测不同浓度的HPS及阳性对照药物对LO-2细胞增殖活性的影响。各浓度梯度比较,细胞光密度(optical density, OD)值在统计学上差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),提示药物对LO-2细胞均无明显毒性作用,且HPS浓度为50 mg·L⁻¹,阳性对照组药物浓度为24 μmol·L⁻¹时细胞开始出现增殖表现,确定为后续干预浓度。将LO-2细胞分为正常组、模型组、阳性对照组和实验组。正常组细胞使用完全培养基培养;模型组细胞使用0.6 mmol·L⁻¹脂肪酸造模液培养;阳性对照组细胞使用0.6 mmol·L⁻¹脂肪酸造模液,并加入浓度为24 μmol·L⁻¹的liproxstain-1干预;实验组细胞使用0.6 mmol·L⁻¹脂肪酸造模液,加入浓度为50 mg·L⁻¹的HPS干预。各组均干预24 h后检测指标。

2.4 油红O染色法观察细胞脂肪变性^[7]

将LO-2细胞接种于6孔板中,贴壁后,弃去完全培养基,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗,加入不含胎牛血清的细胞培养液,使细胞同步分化12 h。吸弃培养液, PBS清洗后,按“2.3”方案分组处理24 h。移除培养基, PBS清洗,加入ORO Fixative固定20~30 min。弃固定液,蒸馏水清洗,60%异丙醇浸洗5 min。吸弃异丙醇,加入新配ORO Stain染色15 min。弃染液,蒸馏水洗至背景洁净, Mayer苏木素复染核1~2 min。弃苏木素液,蒸馏水洗, ORO Buffer平衡1 min,最后加适量蒸馏水覆盖,镜检。油红O阳性区域呈橙红至橘红色,细胞核呈蓝色。用Image J软件分析脂质沉积阳性面积百分比(% Area)。

2.5 酶联反应(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)法检测各组细胞MDA、LPO、SOD和GSH含量^[8]

药物干预24 h后制备细胞悬液,冰浴状态下超声

破碎(300 W, 3 ~ 5 s · time⁻¹, 间隔 30 s, 重复 3 ~ 5 次), 随后按照 BCA 试剂盒说明测定样本总蛋白浓度, 并用酶标法检测 TG 含量: 依次加入反应体系, 混匀孵育后, 于 510 nm 波长处测定各组 OD 值。TG 含量根据下式计算: TG 含量 (mmol · gprot⁻¹) = [(OD_{样本} - OD_{空白}) / (OD_{校准} - OD_{空白})] × 校准品浓度 (mmol · L⁻¹) / 待测样本蛋白浓度 (gprot · L⁻¹)。

2.6 逆转录定量聚合酶链反应检测细胞 Grp78、PERK、Nrf2、GPX4 和 SLC7A11 基因表达^[9]

药物干预 24 h 后, 细胞刷刮下培养瓶内细胞, 用核酸定量分析仪测定 RNA 浓度, 进行 cDNA 反转程序, PCR 扩增人 Grp78、PERK、Nrf2、GPX4 和 SLC7A11 基因片段。基因引物由博迈德生物科技公司合成。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s, 随后 40 个循环扩增(95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 34 s, 60 °C 延伸 34 s)。扩增过程中通过实时荧光监测系统记录扩增曲线, 并基于样点拟合法分析, 求得目的基因及内参 GAPDH 的 Ct 值, 用比较 Ct 值法计算相对表达水平: $\Delta\Delta Ct = (\text{测试组目的基因 } Ct \text{ 值} - \text{测试组内参基因 } Ct \text{ 值}) - (\text{对照组目的基因 } Ct \text{ 值} - \text{对照组内参基因 } Ct \text{ 值})$, 相对表达水平为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

2.7 蛋白质印迹法检测细胞 Grp78、PERK、p-PERK 和 Nrf2 蛋白表达^[10]

细胞经药物处理 24 h 后, 从培养瓶壁刮取并提取总蛋白, 用 BCA 法测定蛋白浓度。随后进行电泳、转膜及封闭, 膜先后在 4 °C 下与一抗(稀释比例 1:5 000)孵育过夜、室温下与二抗(PERK、p-PERK、Nrf2 稀释比例均为 1:2 000)孵育, 每次孵育后以 TBST 清洗 3 次。最后经化学发光法显影, 用 Bio-RAD Quantity One 采集图像, 并通过 Image J 软件计算目标蛋白与内参 GAPDH 的灰度比值, 得到 PERK、p-PERK 及 Nrf2 蛋白的相对表达水平。

2.8 免疫荧光法检测细胞 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达^[11]

细胞经 4% 多聚甲醛固定 15 min 及 PBS 漂洗 3 次后, 使用 3% BSA 溶液封闭 30 min。继而与一抗在 4 °C 下共孵育过夜, PBS 清洗后再与二抗于 37 °C 避光反应 1 h。此后, 经 PBS 洗涤并用 DAPI 进行核复染, 室温避光孵育后封片。在荧光显微镜下观察图像, 并用 Image J 软件进行定量分析。

3 统计学处理

本研究用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析(one-way ANOVA), 组间两两比较依据方差齐性检验结果, 方差齐通过 LSD - t 检验、不齐则通过 Tamhane T2 检验。

结 果

1 细胞脂质沉积阳性面积

红油 O 染色法显示: 正常组细胞呈圆形或椭圆形, 细胞间未见明显脂滴沉积, 细胞界限清楚, 大部分细胞核呈圆形居中。模型组细胞边缘呈现明显橘红染色, 细胞轮廓清楚, 细胞核圆形, 未见明显改变, 细胞内有脂滴形成, 细胞核偏移不明显, 阳性对照组与实验组细胞虽仍可见橘红色染色, 但其脂滴数量较模型组明显减少, 细胞形态清晰。正常组、模型组、阳性对照组和实验组细胞的 % Area 分别为 0.02 ± 0.01 、 0.26 ± 0.08 、 0.09 ± 0.02 和 0.15 ± 0.04 , 模型组的 % Area 与空白组比较; 阳性对照组和实验组细胞的 % Area 与模型组比较, 在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$), 见图 1。

2 HPS 对脂肪变性细胞模型 LPO、SOD、GSH 和 4-HNE 含量的影响

模型组细胞中的 MDA 和 LPO 含量与正常组相比

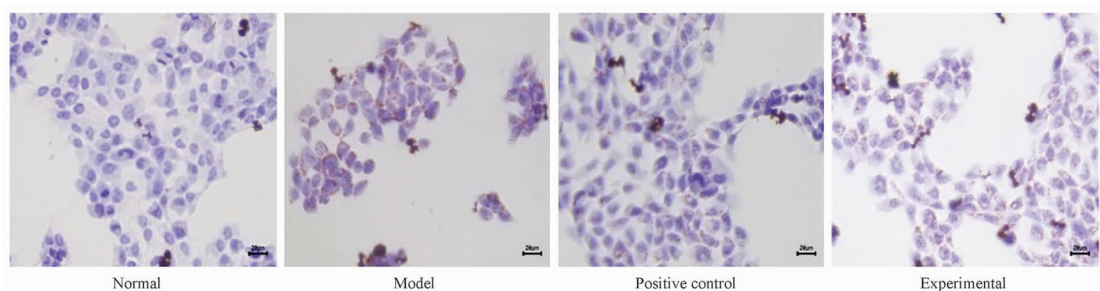


图 1 光学显微镜下观察各组油红 O 染色结果(×500)

Figure 1 Oil red O staining in each group under optical microscope(×500)

Normal group: Treated with DMEM - 12 for 24 h; Model group: Treated with $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ fatty acid solution for 24 h; Positive control group: Treated with $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ fatty acid solution and $24 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ liproxstain - 1 for 24 h; Experimental group: Treated with $0.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ fatty acid solution and $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ HPS for 24 h.

均显著上升,而 SOD 和 GSH 水平与正常组相比均明显下降,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。阳性对照组和实验组的 MDA 和 LPO 含量与模型组比较均显著降低,而 SOD 和 GSH 含量与模型组比较均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

3 HPS 对 NAFLD 细胞模型 Grp78、PERK、Nrf2、GPX4 和 SLC7A11 mRNA 相对表达水平的影响

模型组细胞的 *Nrf2*、*GPX4* 和 *SLC7A11* mRNA 相对表达水平与正常组比较均下降,*Grp78* 和 *PERK* mRNA 相对表达水平均升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);实验组细胞的 *Grp78* 和 *PERK* mRNA 相对表达水平与模型组比较均降低,*Nrf2* 和 *SLC7A11* mRNA 相对表达水平均升高,在统计

学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);对照组细胞的 *Grp78* mRNA 相对表达水平、对照组及实验组细胞的 *GPX4* mRNA 相对表达水平与模型组比较,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 2。

4 HPS 对 NAFLD 细胞模型 Grp78、PERK、p - PERK 和 Nrf2 蛋白相对表达水平的影响

模型组细胞的 Grp78、PERK 和 p - PERK 蛋白相对表达水平及 PERK 磷酸化水平较空白组显著上升,*Nrf2* 蛋白表达水平较空白组明显下降,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);对照组和实验组 Grp78、PERK、p - PERK 蛋白相对表达水平及 PERK 磷酸化水平较模型组均减少,*Nrf2* 蛋白相对表达水平较模型组增加,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 3。

表 1 红芪多糖(HPS)对细胞脂质过氧化物(LPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)和 4 - 羟基壬烯醛(4 - HNE)含量的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of hedysarum polybotrys polysacchcaide(HPS) on cellular lipid peroxide(LPO), superoxide dismutase(SOD), glutathione(GSH) and 4 - hydroxynonenal(4 - HNE) content ($\bar{x} \pm s$)

Group	Dose	n	LPO (nmol · mL ⁻¹)	SOD (U · mL ⁻¹)	GSH (mg · L ⁻¹)	4 - HNE (ng · L ⁻¹)
Normal	—	3	2.62 ± 0.17	7.25 ± 0.61	120.73 ± 7.75	8.06 ± 0.40
Model	—	3	13.47 ± 1.55 *	3.77 ± 0.44 *	34.60 ± 2.98 *	14.60 ± 2.02 *
Positive control	24 μmol · L ⁻¹	3	6.31 ± 1.12 [#]	5.22 ± 0.76	67.86 ± 2.08 [#]	9.40 ± 0.81 [#]
Experimental	50 mg · L ⁻¹	3	5.71 ± 1.50 [#]	8.12 ± 0.78 [#]	59.33 ± 7.46 [#]	12.94 ± 0.56

Compared with normal group, * $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$.

表 2 HPS 对细胞葡萄糖调节蛋白 78(Grp78)、蛋白激酶 RNA 样内质网激酶(PERK)、核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)和溶质载体家族 7 成员 11(SLC7A11)mRNA 相对表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of HPS on the relative expression of glucose regulated protein 78(Grp78), protein kinase RNA - like endoplasmic reticulum kinase(PERK), nuclear factor - erythroid 2 - related factor 2(Nrf2), glutathione peroxidase 4 and solute carrier family 7 member 11(SLC7A11) mRNA in cells($\bar{x} \pm s$)

Group	Grp78	PERK	Nrf2	GPX4	SLC7A11
Normal	1.01 ± 0.15	1.00 ± 0.09	1.01 ± 0.12	1.00 ± 0.05	1.01 ± 0.17
Model	1.47 ± 0.11 *	1.85 ± 0.16 *	0.26 ± 0.07 *	0.79 ± 0.02 *	0.50 ± 0.14 *
Positive control	1.41 ± 0.08	1.02 ± 0.27 [#]	0.68 ± 0.09 [#]	0.87 ± 0.17	0.91 ± 0.09 [#]
Experimental	1.02 ± 0.05 [#]	1.16 ± 0.01 [#]	0.66 ± 0.05 [#]	0.83 ± 0.10	0.98 ± 0.05 [#]

Compared with normal group, * $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$.

表 3 HPS 对细胞 Grp78、PERK、p - PERK 和 Nrf2 蛋白相对表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of HPS on the relative expression levels of Grp78、PERK、p - PERK and Nrf2 proteins in cells($\bar{x} \pm s$)

Group	Grp78	PERK	p - PERK	p - PERK/PERK	Nrf2
Normal	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.03
Model	2.72 ± 0.07 *	1.21 ± 0.08 *	2.70 ± 0.08 *	2.24 ± 0.21	0.52 ± 0.01
Positive control	1.83 ± 0.04 [#]	1.03 ± 0.07 [#]	1.40 ± 0.07 [#]	1.36 ± 0.03	0.73 ± 0.02
Experimental	2.24 ± 0.06 [#]	0.95 ± 0.06 [#]	1.76 ± 0.06 [#]	1.85 ± 0.09	0.84 ± 0.02

Compared with normal group, * $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$.

5 HPS 对 NAFLD 细胞模型 GPX4 和 SLC7A11 蛋白相对表达水平的影响

模型组细胞的 GPX4 和 SLC7A11 蛋白荧光强度与空白组比较均降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);对照组和实验组 GPX4 和 SLC7A11 蛋白荧光强度与模型组比较均增强,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 4。

表 4 HPS 对细胞 GPX4 和 SLC7A11 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of effects of HPS on the relative expression levels of GPX4 and SLC7A11 proteins in cells($\bar{x} \pm s$)

Group	GPX4	SLC7A11
Normal	24.34 $\pm$ 0.86	69.58 $\pm$ 4.13
Model	13.86 $\pm$ 1.65 *	34.24 $\pm$ 6.73 *
Positive control	18.01 $\pm$ 2.03 #	60.75 $\pm$ 9.35 #
Experimental	16.20 $\pm$ 1.55 #	45.18 $\pm$ 6.46 #

Compared with normal group, * $P < 0.05$; Compared with model group, # $P < 0.05$.

讨 论

肝细胞内脂质异常积聚可引发过氧化物酶体和内质网中的脂质过氧化反应,进而产生多种具有生物活性的醛类化合物,包括 MDA 和 4-HNE。其中,MDA 是脂质过氧化最具诱变性的产物,而 4-HNE 表现出更强的细胞毒性,并被普遍认为是脂质过氧化程度的关键生物标志物及调控细胞信号转导的重要活性分子。GPX4 作为一种 GSH 依赖性抗氧化酶,能够促使 GSH 转化为 GSSG。GSH 作为关键辅助因子,通过其还原作用将具有细胞毒性的脂质过氧化物转化为无毒的脂质醇,降低了细胞内活性脂质过氧化产物的水平,进而维持细胞膜结构的完整性,使其免遭过氧化损伤^[12]。脂质过氧化物的增加导致抗氧化物 SOD、GSH 耗竭,其中 GSH 含量降低会导致 GPX4 失活和脂质过氧化积累,且 GSH 耗竭及 GPX4 活性降低是铁死亡的主要特征之一^[2-3]。GPX4 可特异性清除铁过载诱导的细胞内 H_2O_2 及其他过氧化小分子,抑制 ROS 过量积累,有效减少铁死亡^[13]。当 GPX4 功能失活或合成受到抑制时,细胞对铁过载诱导的过氧化物清除能力显著下降,导致 ROS 大量蓄积,进而触发铁死亡。肝脏单纯性脂肪变性不仅存在 GPX4 的表达下降,同时伴随着铁死亡的发生,增加 GPX4 的表达不仅可以负向调节铁死亡,对 NAFLD 的发展也具有

有效的抑制作用。研究发现,黄连素可通过调控 GPX4 介导的铁死亡途径,减轻 NAFLD 小鼠脂肪肝和肝脏脂质沉积,改善其肝功能^[14]。高脂饮食诱导的 NAFLD 模型或棕榈酸/油酸诱导的肝细胞脂肪变性模型中均显示 GPX4 表达降低,且发生铁死亡^[15],特异性抑制脂质过氧化反应可抑制铁死亡的发生,减缓肝脏损伤。

Nrf2 是调控抗氧化反应的关键转录因子,能够激活 GPX4 等靶基因的转录。在多种细胞中,沉默 Nrf2 均可降低 GPX4 的表达^[16]。除了直接调控 GPX4 转录外,Nrf2 还可以通过调控 GSH 的转录来调节 GPX4 的活性。SLC7A11 是 GPX4 的上游调节因子,主要用于合成胞内抗氧化蛋白 GSH,协同 GPX4 发挥抗氧化作用,且 SLC7A11/GPX4 途径被认为是调控铁死亡的重要通路^[17]。GPX4 能够利用 GSH 特异性催化脂质氢过氧化物转化为脂质醇,降低细胞内毒性代谢产物积累,减轻组织的脂质过氧化,进而增强细胞对铁死亡的抵抗能力^[18]。Nrf2 的过度激活能够直接结合其启动子区域诱导 SLC7A11 表达,使 GSH 合成减少,削弱 GPX4 控制 GSH 解毒的能力,降低脂质过氧化水平和相关的铁死亡特征。研究发现,通过调控 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路,当归芍药散能够抑制脂质过氧化和铁死亡,进而延缓 NAFLD 疾病进展^[19]。

内质网应激与铁死亡密切相关。Grp78 是内质网应激发生的标志蛋白,可通过与内质网跨膜蛋白解离发挥生物学功能,进而助力维持细胞稳态。在细胞遭遇内质网应激条件下,未折叠蛋白反应通路被激活,进而调控细胞内蛋白质的折叠平衡以维持其稳态。PERK 作为未折叠蛋白反应的关键分支通路,是 Nrf2 的上游蛋白,与细胞抗氧化防御系统的调控密切相关^[20]。内质网应激过程中伴随大量 ROS 生成,而 PERK 能够磷酸化 Nrf2,使其从 Nrf2/Keap1 复合物上解离,进入细胞核,启动核心抗氧化酶的转录表达,从而增强细胞对 ROS 的清除能力,缓解氧化损伤。前期研究中我们发现,NAFLD 模型小鼠 ob/ob 鼠肝组织存在明显的内质网应激,其中 PERK 通过磷酸化激活,其对 Nrf2 激活和核移位是必须的,HPS 干预 NAFLD 模型小鼠后能够改善肝组织内质网应激,促进 Nrf2 的表达,通过增强 NAFLD 模型动物抗氧化能力,发挥对肝细胞的保护作用^[4]。

本研究提示:HPS 能够减少高脂状态下肝细胞 LPO、4-HEN 的含量,并能够增加 SOD、GSH 抗氧化物含量,保护肝细胞,其作用机制可能是通过激

活 PERK - Nrf2 信号通路,减少肝细胞脂质过氧化物生成,促进 GXP4 和 SLC7A11 表达,减轻铁死亡实现的。

参考文献:

- [1] URSINI F, MAIORINO M, VALENTE M, *et al.* Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 710(2): 197—211.
- [2] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1—2): 317—331.
- [3] FRIEDMANN ANGELI J P, SCHNEIDER M, PRONETH B, *et al.* Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1180—1191.
- [4] 张磊,金智生,万生芳,等. 红芪多糖对 ob/ob 小鼠肝蛋白激酶 R 样内质网激酶 - 转录因子 NF - E2 相关因子 2 信号通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2022,38(17):2034—2038.
- [5] 袁育珺,杨秀玲,胡志坚,等. MDCK 细胞外基质对 HK - 2 细胞的增殖和迁移的影响[J]. 安徽医科大学学报,2019,54(2): 216—219.
- [6] 张磊. 基于氧化/内质网应激探讨红芪多糖对 NAFLD 模型脂代谢关键因子和 PERK - Nrf2 信号通路的影响[D]. 甘肃兰州:甘肃中医药大学,2021.
- [7] RICCHI M, ODOARDI M R, CARULLI L, *et al.* Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(5): 830—840.
- [8] 刘军,叶玉涛,饶佳月,等. 卡介苗诱导 RAW264.7 巨噬细胞泡沫化与上调 CD36 表达有关[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2019,35(8):733—737.
- [9] HARDISARI R, KOIRIYAH B. Gambaran kadar trigliserida (metode gpo - pap) pada sampel serum dan plasma EDTA[J]. *J Teknol*, 2016,5(1):27—31.
- [8] 吉福玲,金智生,何流,等. 红芪多糖对糖尿病周围神经病小鼠的神经组织纤维化的改善作用及其机制[J]. 中国临床药理学杂志, 2019,35(7):661—663.
- [10] KERSTEN S, STIENSTRA R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver[J]. *Biochimie*, 2017,5(136):75—84.
- [11] 谢友琴,高振,张亮. 阿美替尼对非小细胞肺癌细胞增殖、侵袭、上皮间质转化和干性的作用[J]. 中国临床药理学杂志, 2025,41(5):660—664.
- [12] 孙孟艳,秦合伟,李彦杰,等. 血管软化丸调控 Nrf2/xCT/GPX4 通路抑制血管内皮细胞铁死亡改善动脉粥样硬化的作用机制[J]. 北京中医药大学学报, 2024, 47(3): 383—393.
- [13] HUANG B, WANG H, LIU S, *et al.* Palmitoylation - dependent regulation of GPX4 suppresses ferroptosis[J]. *Nat Commun*, 2025, 16(1):867.
- [14] 钱玲玲,吴卫明,金超. 黄连素调节 GPX4 干预非酒精性脂肪肝机制研究[J]. 药物生物技术, 2025, 32(2): 156—160.
- [15] GAO G, XIE Z, LI E W, *et al.* Dehydroabietic acid improves nonalcoholic fatty liver disease through activating the Keap1/Nrf2 - ARE signaling pathway to reduce ferroptosis[J]. *J Nat Med*, 2021, 75(3): 540—552.
- [16] YANG W, WANG Y, ZHANG C, *et al.* Maresin1 protect against ferroptosis - induced liver injury through ROS inhibition and Nrf2/HO - 1/GPX4 activation[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 865689. 2022 - 02 - 04 [2025 - 03 - 12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35444546/>.
- [17] QIAO Y Y, SU M, ZHAO H F, *et al.* Targeting FTO induces colorectal cancer ferroptotic cell death by decreasing SLC7A11/GPX4 expression[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 108.
- [18] ZHANG H R, SHAN G S, LIU M Y, *et al.* Harnessing ROS amplification and GSH depletion using a carrier - free nanodrug to enhance ferroptosis - based cancer therapy[J/OL]. *Small*, 2025, 21(6): e2409250. 2024 - 12 - 26 [2025 - 03 - 12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/397236771/>.
- [19] 储心乔,彪雅宁,顾颖,等. 当归芍药散调节 Nrf2/SLC7A11/GPX4 信号通路干预非酒精性脂肪性肝病大鼠铁死亡的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(16): 35—42.
- [20] JI X, CHEN Z, LIN W, *et al.* Esculin induces endoplasmic reticulum stress and drives apoptosis and ferroptosis in colorectal cancer via PERK regulating eIF2 α /CHOP and Nrf2/HO - 1 cascades[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 328:118—139. 2024 - 06 - 03 [2025 - 03 - 12]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38561058/>.

(收稿日期 2025 - 05 - 12)