

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research灵孢多糖通过调控 Nrf2/HO-1 信号途径减轻
H₂O₂ 诱导小鼠海马神经元细胞铁死亡的研究Research on GLPS alleviated H₂O₂ - induced ferroptosis in mouse hippocampal neurons by regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway李彦青¹, 杨智超¹, 宋丽娟¹,
王青¹, 王翰斌², 杨立志²,
肖保国³, 马存根¹

(1. 山西中医药大学 神经生物学研究中心, 国家中医药管理局多发性硬化益气活血重点研究室, 山西晋中 030619; 2. 山西国润制药有限公司, 山西大同 038100; 3. 复旦大学 附属华山医院 神经内科 医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200025)

LI Yan-qing¹, YANG Zhi-chao¹,
SONG Li-juan¹, WANG Qing¹,
WANG Han-bin², YANG Li-zhi²,
XIAO Bao-guo³, MA Cun-gen¹

(1. The Key Research Laboratory of Benefiting Qi for Acting Blood Circulation Method to Treat Multiple Sclerosis of State Administration of Traditional Chinese Medicine/Research Center of Neurobiology, Shanxi University of Chinese Medicine, Jinzhong 030619, Shanxi Province, China; 2. Shanxi Guorun Pharmaceutical Co., Ltd, Datong 038100, Shanxi Province, China; 3. State Key Laboratory of Neurobiology, Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200025, China)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82304752); 山西省横向课题资助项目 (2022HX-GR-01); 山西省基础研究计划 (自由探索类) 青年基金资助项目 (20210302123312); 山西省卫生健康科研课题资助项目 (2022127); 山西省卫健委医学科技领军团队基金资助项目 (2020TD05); 优秀博士毕业生来晋工作奖励经费科研启动基金资助项目 (2021BKS01); 山西中医药大学博士科研启动基金资助项目 (2022BK15); 山西中医药大学科技创新能力培育计划“基础研究专项”基金资助项目 (2021PY-JC-15); 山西中医药大学学科建设经费资助项目 (030200117)

作者简介: 李彦青 (1988-), 女, 博士, 讲师, 主要从事神经药理学方面的研究

通信作者: 马存根, 教授
MP: 18203515288

E-mail: macungen@sxtcm.edu.cn

摘要: 目的 探讨灵孢多糖 (GLPS) 对过氧化氢 (H₂O₂) 诱导的小鼠海马神经元 (HT22) 细胞铁死亡的影响及其机制。方法 通过 H₂O₂ 诱导建立细胞损伤模型。将 HT22 细胞分为正常组 (常规培养)、H₂O₂ 组 (200 μmol · L⁻¹ H₂O₂)、GLPS 组 (200 μmol · L⁻¹ H₂O₂ + 100 μg · mL⁻¹ GLPS)、H₂O₂ + Fin56 组 (200 μmol · L⁻¹ H₂O₂ + 5 μmol · L⁻¹ Fin56)、H₂O₂ + Fin56 + GLPS 组 (200 μmol · L⁻¹ H₂O₂ + 5 μmol · L⁻¹ Fin56 + 100 μg · mL⁻¹ GLPS)。用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测氧化应激标志物水平, 用蛋白质印迹法检测铁死亡标志物和核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶-1 (HO-1) 的蛋白相对表达水平。结果 正常组、H₂O₂ 组、GLPS 组、H₂O₂ + Fin56 组和 H₂O₂ + Fin56 + GLPS 组中丙二醛 (MDA) 含量分别为 (5.56 ± 0.61)、(15.53 ± 0.83)、(6.51 ± 0.29)、(20.92 ± 1.03) 和 (13.65 ± 0.70) nmol · mL⁻¹, 超氧化物歧化酶 (SOD) 含量分别为 (37.93 ± 1.37)、(22.48 ± 0.59)、(37.81 ± 2.56)、(16.10 ± 2.28) 和 (22.21 ± 2.99) μg · mL⁻¹, Ferritin 蛋白相对表达水平分别为 1.52 ± 0.03、1.22 ± 0.07、1.42 ± 0.06、0.64 ± 0.02 和 0.93 ± 0.13, GPX4 蛋白相对表达水平分别为 3.29 ± 0.34、1.91 ± 0.18、2.99 ± 0.22、1.13 ± 0.07 和 2.45 ± 0.05, Nrf2 蛋白相对表达水平分别为 0.90 ± 0.01、2.24 ± 0.02、2.97 ± 0.07、2.45 ± 0.07 和 2.76 ± 0.11, HO-1 蛋白相对表达水平分别为 1.58 ± 0.02、1.76 ± 0.04、2.29 ± 0.06、1.67 ± 0.02 和 2.03 ± 0.06。H₂O₂ 组的上述指标与正常组、H₂O₂ + Fin56 组比较, GLPS 组的上述指标与 H₂O₂ 组比较, H₂O₂ + Fin56 + GLPS 组的上述指标与 H₂O₂ + Fin56 组、GLPS 组比较, 在统计学上差异均有统计学意义 (P < 0.05, P < 0.01)。结论 GLPS 能够通过激活 Nrf2/HO-1 途径来改善 H₂O₂ 诱导的 HT22 细胞脂质过氧化物积累和铁代谢紊乱, 从而抑制铁死亡的发生。

关键词: 灵孢多糖; 小鼠海马神经元细胞; 过氧化氢; 铁死亡; 脂质过氧化; 核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 通路

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.06.011

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821 (2025) 06-0805-06

Abstract: Objective To investigate the effect of ganoderma lucidum polysaccharides (GLPS) on ferroptosis of hippocampal neuronal (HT22) cell lines induced by hydrogen peroxide (H₂O₂) and its mechanism.

Methods The H₂O₂ - induced HT22 cell injury model was first established *in vitro*. HT22 cells were divided into normal group (conventional culture), H₂O₂ group (200 μmol · L⁻¹ H₂O₂), GLPS group (200 μmol · L⁻¹ H₂O₂ + 100 μg · mL⁻¹ GLPS), H₂O₂ + Fin56 group (200 μmol · L⁻¹ H₂O₂ + 5 μmol · L⁻¹ Fin56), H₂O₂ + Fin56 +

GLPS group ($200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{O}_2 + 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Fin56} + 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} \text{GLPS}$). The oxidative stress markers were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the protein expression levels of iron death markers, nuclear factor erythroid2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) were detected by Western blot.

Results The contents of malondialdehyde (MDA) in normal group, H_2O_2 group, GLPS group, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fin56}$ group and $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fin56} + \text{GLPS}$ group were (5.56 ± 0.61), (15.53 ± 0.83), (6.51 ± 0.29), (20.92 ± 1.03) and (13.65 ± 0.70) $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$; the contents of superoxide dismutase (SOD) were (37.93 ± 1.37), (22.48 ± 0.59), (37.81 ± 2.56), (16.10 ± 2.28) and (22.21 ± 2.99) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; Ferritin protein expression levels were 1.52 ± 0.03 , 1.22 ± 0.07 , 1.42 ± 0.06 , 0.64 ± 0.02 and 0.93 ± 0.13 ; GPX4 protein expression levels were 3.29 ± 0.34 , 1.91 ± 0.18 , 2.99 ± 0.22 , 1.13 ± 0.07 and 2.45 ± 0.05 ; Nrf2 protein expression levels were 0.90 ± 0.01 , 2.24 ± 0.02 , 2.97 ± 0.07 , 2.45 ± 0.07 and 2.76 ± 0.11 ; HO-1 protein expression levels were 1.58 ± 0.02 , 1.76 ± 0.04 , 2.29 ± 0.06 , 1.67 ± 0.02 and 2.03 ± 0.06 , respectively. H_2O_2 group was compared with normal group and $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fin56}$ group, GLPS group was compared with H_2O_2 group, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fin56} + \text{GLPS}$ group was compared with $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fin56}$ group and GLPS group, the differences were statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$).

Conclusion GLPS can improve lipid peroxide accumulation and iron metabolism disorder induced by H_2O_2 in HT22 cells by activating Nrf2/HO-1 pathway, thereby inhibiting the occurrence of ferroptosis.

Key words: ganoderma lucidum polysaccharides; hippocampal neuronal cell line; hydrogen peroxide; ferroptosis; lipid peroxidation; nuclear factor erythroid2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway

铁死亡是一种铁依赖性调节型细胞死亡形式,其特征是线粒体萎缩和脂质过氧化物堆积^[1]。中枢神经系统(central nervous system, CNS)需要铁作为氧化还原金属产生能量并保持高水平的新陈代谢,这一过程伴随大量自由基的产生,此时大量游离铁和脂质过氧化物的积累能够引发炎症激活、神经元变性乃至死亡等一系列事件^[2]。铁死亡是CNS疾病的重要驱动因素。灵孢多糖(ganoderma lucidum polysaccharides, GLPS)作为灵芝的主要有效成分,具有抗氧化、抗炎、神经保护和免疫调节等作用^[3]。研究发现,GLPS能够保护神经元免受体外缺氧/复氧的损伤^[4-5]。本研究通过体外构建过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)诱导的小鼠海马神经元细胞(hippocampal neuronal, HT22)细胞铁死亡模型,旨在探讨GLPS对神经元铁死亡的影响及作用机制。

材料与方法

1 材料

细胞 HT22细胞,购于武汉普诺赛生物公司。

药品与试剂 GLPS注射液,规格:每支2 mL/4.5 mg,批号:211201,批准文号:国药准字H20003510,山西国润制药有限公司生产;铁死亡诱导药Fin56,批号:26083,规格:每支25 mg,纯度:98.03%,购于美国Med Chemexpress生物科技有限公司。细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8),购于上海碧云天生物

技术有限公司; H_2O_2 溶液,购于南京化学试剂股份有限公司;聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,购于美国Millopre公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒,均购于上海凡科维生物有限公司;细胞 Fe^{2+} 比色法测试盒、细胞总铁比色法测试盒,均购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒,均购于北京索莱宝科技有限公司;转铁蛋白受体(transferrin receptor 1, TfR1)抗体,购于武汉Abconal公司;核受体辅活化子4(nuclear receptor coactivator 4, NCOA4)抗体,购于江苏亲科生物研究中心有限公司;铁蛋白(Ferritin),购于美国Abcam公司;核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1),均购于美国CST公司;二价金属离子转运体(divalent metal-ion transporter-1, DMT1)抗体、谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体,均购于武汉三鹰生物技术有限公司;M5 HiPer Universal RNA Mini Kit组织/细胞RNA快速提取试剂盒、2X M5 HiPer SYBR Premix EsTaq,均购于北京聚合美生物科技有限公司。引物,由上海生工生物工程有限公司合成。

仪器 CFX96 Optics Module 实时定量聚合酶链

反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)仪,美国 Bio-Rad 公司产品;Accuri C6 流式细胞仪,美国 BD 公司产品;Forma 3111 CO₂细胞培养箱,美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;JB-13 加热磁力搅拌器,上海仪电科学仪器股份有限公司产品;165-8004 电泳仪,美国 Bio-Rad 公司产品;Multiskan SkyHigh 多功能酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品。

2 实验方法

2.1 模型构建、细胞分组与处置方法^[6-9]

将 HT22 细胞加入 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 H₂O₂ 并放置于恒温 CO₂ 细胞培养箱孵育 24 h 建立细胞损伤模型。

将生长状态良好的 HT22 细胞分为正常组、H₂O₂ 组、GLPS 组、H₂O₂ + Fin56 组、H₂O₂ + Fin56 + GLPS 组。正常组细胞进行常规培养;H₂O₂ 组用 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 处理;GLPS 组用 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 和 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GLPS 处理^[9];H₂O₂ + Fin56 组用 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 处理后,加入 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fin56 干预 10 h^[6];H₂O₂ + Fin56 + GLPS 组用 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ 处理后,5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fin56 + 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GLPS 进行处理。

2.2 铁试剂盒测定细胞内铁含量^[10-11]

各组 HT22 细胞处理 24 h 后,收集细胞,按照细胞数量加入适量的缓冲液,混匀后放置在冰盒上裂解 10 min,以 $1.2 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液加入铁离子显色液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min(测定总铁孵育 40 min),在 593 nm 处测定各孔光密度值,计算细胞铁含量。

2.3 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法检测氧化应激标志物的改变^[12-13]

各组 HT22 细胞处理 24 h 后,收集细胞以 3 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,按照相应的说明书检测细胞上清液中 SOD、CAT、MDA、GSH-Px 的含量,计算各组氧化应激标志物的浓度。

2.4 透射电子显微镜观察细胞线粒体形态变化^[14]

各组 HT22 细胞(细胞密度不超过 70%)弃去培养基,加入 0.25% 含 EDTA 胰酶消化,以 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 3~5 min 后,弃去上清液,加入电镜固定液吹散重悬细胞,固定并用乙醇梯度脱水后,将样品包埋并制备成 50~100 nm 的超薄切片,通过透射电子显微镜观察线粒体的形态变化。

2.5 流式细胞术测定细胞内 ROS 含量^[15]

各组 HT22 细胞处理 24 h 后,去除细胞培养基,加入用无血清培养液稀释后的 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DCFH-DA,置于恒温 CO₂ 细胞培养箱孵育 20~30 min,用无血清

培养液洗涤细胞 3 次,收集各组细胞,用流式细胞仪检测 ROS 水平,并计算平均荧光强度。

2.6 qRT-PCR 法检测各组细胞 Nrf2、HO-1、TfR1、DMT1、Ferritin、NCOA4 和 GPX4 mRNA 的表达情况^[16]

将各组 HT22 细胞处理 24 h 后,用 M5 HiPer Universal RNA Mini Kit 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒提取细胞总 RNA,测定 RNA 浓度。根据制造商的说明书,用 PrimeScriptTM RT 预混液将提取后的总 RNA 反向转录合成 cDNA,在 qRT-PCR 系统上进行 PCR 扩增,以 β -actin 作为内参,用 2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 方法计算基因相对表达水平。

2.7 蛋白质印迹法检测各组细胞 Nrf2、HO-1、TfR1、DMT1、Ferritin、NCOA4 和 GPX4 蛋白的表达情况^[17]

各组 HT22 处理 24 h 后,收集细胞加入 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制药以及磷酸化蛋白酶抑制药,置于冰上裂解 20~30 min,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下,以 $1.5 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min 收取上清液,测定并统一蛋白浓度后制胶上样,通过凝胶电泳分离蛋白并转膜至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 1~2 h,加入稀释好的 Nrf2、HO-1、TfR1、DMT1、Ferritin、NCOA4 和 GPX4 一抗,放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱摇床缓慢孵育 12 h。次日 TBST 洗涤 3 次后加入二抗,室温摇床孵育 2 h,用 ECL 超敏发光液和化学成像发光系统检测目标条带。

3 统计学处理

用 GraphPad Prism 8.0 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,组间两两比较用多重 t 检验。

结 果

1 GLPS 对 H₂O₂ 诱导的 HT22 细胞内铁含量和相关蛋白相对表达水平的影响

正常组给予常规培养;H₂O₂ 组给予 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂;GLPS 组给予 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ + 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GLPS;H₂O₂ + Fin56 组给予 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fin56;H₂O₂ + Fin56 + GLPS 组给予 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H₂O₂ + 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fin56 + 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ GLPS。

H₂O₂ 组与正常组比较,GLPS 组与 H₂O₂ 组比较,Fe²⁺、总铁含量和 TfR1、DMT1、NCOA4、Ferritin、GPX4 蛋白相对表达水平在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

表1 灵孢多糖(GLPS)对H₂O₂诱导的HT22细胞内铁含量和铁死亡标志物蛋白相对表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of ganoderma lucidum polysaccharides (GLPS) on the expression level of iron content and iron death marker protein in HT22 cells induced by H₂O₂ ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Fe ²⁺ (nmol · 10 ⁻⁶)	Fe (nmol · 10 ⁻⁶)	TfR1	DMT1	Ferritin	NCOA4	GPX4
Normal	6	0.18 ± 0.01	0.48 ± 0.02	0.55 ± 0.01	0.57 ± 0.00	1.13 ± 0.01	1.06 ± 0.03	1.26 ± 0.06
H ₂ O ₂	6	0.30 ± 0.01**	0.84 ± 0.01**	0.79 ± 0.03**	0.84 ± 0.02**	0.88 ± 0.02**	1.34 ± 0.05**	0.93 ± 0.01**
GLPS	6	0.23 ± 0.03##	0.57 ± 0.01##	0.65 ± 0.04##	0.62 ± 0.03##	1.14 ± 0.04##	0.99 ± 0.03##	1.19 ± 0.04##

Normal group: Conventional culture; H₂O₂ group: 200 μmol · L⁻¹ H₂O₂; GLPS group: 100 μg · mL⁻¹ GLPS; TfR1: Transferrin receptor 1; DMT1: Divalentmetal - iontransporter - 1; NCOA4: Nuclear receptor coactivator 4; GPX4: Glutathione peroxidase 4; Compared with normal group, *P < 0.05, **P < 0.01; Compared with H₂O₂ group, #P < 0.05, ##P < 0.01.

2 GLPS对H₂O₂诱导的HT22细胞线粒体形态结构变化的影响

H₂O₂组与正常组比较,细胞线粒体双层膜密度增加、线粒体嵴断裂,部分外膜破裂;GLPS组与H₂O₂组比较,线粒体形态损伤得到明显改善,双层膜密度降低、嵴增加,内外膜较完整;而H₂O₂ + Fin56组相较于H₂O₂组线粒体结构损伤进一步加重,出现嵴消失和外膜塌陷现象;H₂O₂ + Fin56 + GLPS组与H₂O₂ + Fin56组比较,线粒体结构损伤得到轻微改善,但相比于GLPS组双层膜密度依然较厚且嵴断裂消失显著,见图1。

3 GLPS对H₂O₂诱导的HT22细胞氧化应激水平的影响

H₂O₂组与正常组比较,GLPS组、H₂O₂ + Fin56组

与H₂O₂组比较,H₂O₂ + Fin56 + GLPS组与GLPS组比较,细胞内SOD、CAT、MDA含量和GSH - Px活性,在统计学上差异均有统计学意义(P < 0.01, P < 0.05); H₂O₂ + Fin56 + GLPS组与H₂O₂ + Fin56组比较,细胞内SOD、CAT、MDA含量,在统计学上差异均有统计学意义(P < 0.01, P < 0.05),见表2。

4 GLPS对H₂O₂诱导的HT22细胞ROS水平的影响

正常组、H₂O₂组、GLPS组、H₂O₂ + Fin56组、H₂O₂ + Fin56 + GLPS组的细胞内ROS水平分别为11.28 ± 3.11、34.98 ± 1.56、12.60 ± 2.16、48.73 ± 0.59和23.45 ± 3.88, H₂O₂组与正常组比较, GLPS组、H₂O₂ + Fin56组与H₂O₂组比较, H₂O₂ + Fin56 + GLPS组与H₂O₂ + Fin56组、GLPS组比较,在统计学上差异均有

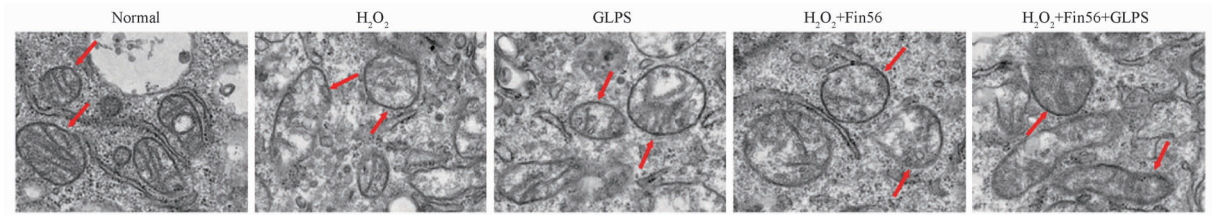


图1 用透射电子显微镜观察各组细胞线粒体结构形态的变化(×2.0 × 10⁴)

Figure 1 Transmission electron microscopy was used to observe the changes of mitochondrial structure and morphology in each group (×2.0 × 10⁴)

Red arrow: The morphological and structural changes of mitochondria in HT22 cells; H₂O₂ + Fin56 group: 200 μmol · L⁻¹ H₂O₂ + 5 μmol · L⁻¹ Fin56; H₂O₂ + Fin56 + GLPS group: 200 μmol · L⁻¹ H₂O₂ + 5 μmol · L⁻¹ Fin56 + 100 μg · mL⁻¹ GLPS.

表2 GLPS对各组细胞氧化应激水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of GLPS on oxidative stress of cells in each group($\bar{x} \pm s$)

Group	n	SOD (μg · mL ⁻¹)	CAT (pg · mL ⁻¹)	MDA (nmol · mL ⁻¹)	GSH - Px (ng · mL ⁻¹)
Normal	6	37.93 ± 1.37	4 156.01 ± 126.35	5.56 ± 0.61	107.70 ± 3.07
H ₂ O ₂	6	22.48 ± 0.59**	3 184.35 ± 296.92**	15.53 ± 0.83**	83.87 ± 1.14**
GLPS	6	37.81 ± 2.56##	4 249.77 ± 220.55##	6.51 ± 0.29##	101.30 ± 3.50##
H ₂ O ₂ + Fin56	6	16.10 ± 2.28#	2 450.29 ± 115.55#	20.92 ± 1.03##	57.91 ± 4.73##
H ₂ O ₂ + Fin56 + GLPS	6	22.21 ± 2.99@@&	3 228.19 ± 228.02@@&&	13.65 ± 0.70@@&&	65.00 ± 4.43@@

Dose refer to figure 1; SOD: Superoxide dismutase; CAT: Catalase; MDA: Malondialdehyde; GSH - Px: Glutathione peroxidase; Compared with normal group, **P < 0.01; Compared with H₂O₂ group, #P < 0.05, ##P < 0.01; Compared with GLPS group, @@P < 0.01; Compared with H₂O₂ + Fin56 group, &P < 0.05, &&P < 0.01.

表3 GLPS 对各组细胞中核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶-1 (Nrf2/HO-1) 信号途径及铁死亡相关标志物的 mRNA 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of GLPS on mRNA expression levels of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway and iron death related markers in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	TfR1	DMT1	Ferritin	NCOA4	GPX4	Nrf2	HO-1
Normal	1.01 ± 0.21	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.03	1.01 ± 0.08	1.01 ± 0.09
H ₂ O ₂	3.10 ± 0.07**	2.43 ± 0.14**	0.42 ± 0.04**	4.12 ± 0.62**	0.49 ± 0.02**	1.22 ± 0.07*	1.32 ± 0.09*
GLPS	1.27 ± 0.08###	1.08 ± 0.05###	0.88 ± 0.03###	1.34 ± 0.06###	0.90 ± 0.06###	2.29 ± 0.18###	1.81 ± 0.05###
H ₂ O ₂ + Fin56	6.76 ± 0.53###	3.94 ± 0.25###	0.28 ± 0.01###	5.65 ± 0.37#	0.16 ± 0.00###	1.54 ± 0.12#	1.36 ± 0.08
H ₂ O ₂ + Fin56 + GLPS	4.57 ± 0.27@@&&	2.44 ± 0.15@@&&	0.51 ± 0.02@@&&	4.09 ± 0.21@@&&	0.28 ± 0.01@@&&	1.87 ± 0.03@@&	1.57 ± 0.04@@&

Dose and *n* refer to tablet 2; Compared with normal group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01; Compared with H₂O₂ group, #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01; Compared with GLPS group, @*P* < 0.05, @@*P* < 0.01; Compared with H₂O₂ + Fin56 group, &*P* < 0.05, &&*P* < 0.01.

表4 GLPS 对各组细胞中 Nrf2/HO-1 信号途径及铁死亡相关标志物的蛋白相对表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of GLPS on Nrf2/HO-1 signaling pathway and protein expression levels of iron death related markers in cells of each group($\bar{x} \pm s$)

Group	TfR1	DMT1	Ferritin	NCOA4	GPX4	Nrf2	HO-1
Normal	0.50 ± 0.02	0.47 ± 0.02	1.52 ± 0.03	1.17 ± 0.04	3.29 ± 0.34	0.90 ± 0.01	1.58 ± 0.02
H ₂ O ₂	1.13 ± 0.03**	0.88 ± 0.04**	1.22 ± 0.07**	1.34 ± 0.05*	1.91 ± 0.18**	2.24 ± 0.02**	1.76 ± 0.04**
GLPS	0.44 ± 0.01###	0.69 ± 0.03###	1.42 ± 0.06#	1.17 ± 0.02#	2.99 ± 0.22###	2.97 ± 0.07###	2.29 ± 0.06###
H ₂ O ₂ + Fin56	1.59 ± 0.14###	1.14 ± 0.05###	0.64 ± 0.02###	1.67 ± 0.04###	1.13 ± 0.07###	2.45 ± 0.07#	1.67 ± 0.02
H ₂ O ₂ + Fin56 + GLPS	1.09 ± 0.05@@&&	0.93 ± 0.04@@&&	0.93 ± 0.13@@&&	1.44 ± 0.08@@&&	2.45 ± 0.05@@&&	2.76 ± 0.11@@&&	2.03 ± 0.06@@&&

Dose and *n* refer to tablet 2; Compared with normal group, **P* < 0.05, ***P* < 0.01; Compared with H₂O₂ group, #*P* < 0.05, ###*P* < 0.01; Compared with GLPS group, @*P* < 0.05, @@*P* < 0.01; Compared with H₂O₂ + Fin56 group, &*P* < 0.05, &&*P* < 0.01.

统计学意义(均 *P* < 0.05)。

5 GLPS 对 H₂O₂ 诱导的 HT22 细胞中 Nrf2/HO-1 信号途径及铁死亡相关标志物的 mRNA 和蛋白相对表达水平的影响

H₂O₂ 组与正常组比较, GLPS 组、H₂O₂ + Fin56 组与 H₂O₂ 组比较, H₂O₂ + Fin56 + GLPS 组与 H₂O₂ + Fin56 组、GLPS 组比较, 细胞内 TfR1、DMT1、Ferritin、NCOA4、GPX4、Nrf2、HO-1 mRNA 和蛋白相对表达水平, 在统计学上差异均有统计学意义 (*P* < 0.01, *P* < 0.05), 见表 3 和表 4。

讨 论

研究表明, 神经元铁过载可能是导致神经元损伤不可逆的关键事件^[18]。针对这种现象, 以改善氧化应激诱导的细胞铁死亡为切入点, 揭示 CNS 疾病的机制并寻找有效的干预措施已成为当前的研究热点。

本研究用 H₂O₂ 诱导 HT22 细胞, 结果发现, H₂O₂ 组细胞存活率较正常组明显降低, Fe²⁺ 和总铁含量明显增加, 铁代谢相关蛋白平衡稳态被打破, 提示 H₂O₂ 能够诱导 HT22 细胞发生铁死亡, 经 GLPS 处理后能够有效改善 HT22 细胞的铁死亡。Fin56 是一种特异

性的铁死亡诱导药, 能够通过诱导 GPX4 降解来引发铁死亡。因此, 为进一步明确 GLPS 在治疗铁死亡中发挥的作用及分子机制, 本研究用 Fin56 干预 HT22 细胞进行了探索。

铁死亡作为一种独特的氧化应激诱导的细胞死亡途径, 线粒体结构异常被认为是其典型形态特征, 铁过载和氧化应激能够触发细胞铁死亡^[19]。在本研究中, H₂O₂ 组较正常组铁含量明显增加, 铁代谢平衡稳态被打破, 线粒体结构受损严重, 氧化应激水平显著升高, 抗氧化酶活力显著降低; 经 GLPS 处理后, 有效逆转了这一改变; 而经 Fin56 干预后, 细胞线粒体结构和氧化应激反应进一步加重; 加入 GLPS 轻微改善了上述现象。

细胞具有内源性抗氧化防御系统, 能够维持机体氧化还原动态平衡。研究发现, 激活细胞内源性抗氧化途径是防治铁死亡的有效方法^[20]。最具代表性的就是 Nrf2/HO-1 信号通路, 对于维持细胞内氧化还原平衡至关重要, 其中 Nrf2 是通过上调抗氧化基因来对抗组织氧化应激的主要调节因子, 活化的 Nrf2 能够易位到细胞核, 激活抗氧化基因的转录, 而 HO-1 作为 Nrf2 的下游靶激酶, 通过降解细胞内促氧化血红素, 产生胆红素的前体胆绿素来发挥抗氧化和细胞保

护作用,但 Nrf2 在神经元中的表达较弱,往往缺乏足够的抗氧化蛋白对抗氧化应激反应^[21-22]。在本研究中,H₂O₂组的 Nrf2/HO-1 表达水平较正常组显著升高;经 Fin56 干预后被进一步激活;而在 Fin56 干预前后,GLPS 都能有效地激活 Nrf2/HO-1 信号通路。这说明 GLPS 能够激活 Nrf2/HO-1 信号途径,增强细胞内源性抗氧化能力,改善细胞铁死亡。

本研究提示,GLPS 能够通过减轻氧化应激反应,平衡铁稳态和改善线粒体结构损伤来改善 H₂O₂ 诱导的 HT22 细胞铁死亡,其作用机制可能与 Nrf2/HO-1 通路的激活有关。

参考文献:

- [1] LI J, JIA B, CHENG Y, et al. Targeting molecular mediators of ferroptosis and oxidative stress for neurological disorders [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 3999083. 2022-07-20 [2024-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35910843/>.
- [2] REICHERT C O, DE FREITAS F A, SAMPAIO - SILVA J, et al. Ferroptosis mechanisms involved in neurodegenerative diseases [J]. *Int J Mol Sc*, 2020, 21(22): 8765.
- [3] GUO C, GUO D, FANG L, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide modulates gut microbiota and immune cell function to inhibit inflammation and tumorigenesis in colon [J/OL]. *Carbohydr Polym*, 2021, 267: 118231. 2021-05-20 [2024-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34119183/>.
- [4] WANG C, SHI S, CHEN Q, et al. Antitumor and immunomodulatory activities of ganoderma lucidum polysaccharides in glioma-bearing rats [J]. *Integr Cancer Ther*, 2018, 17(3): 674-683.
- [5] HUANG S, MAO J, DING K, et al. Polysaccharides from ganoderma lucidum promote cognitive function and neural progenitor proliferation in mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Stem Cell Reports*, 2017, 8(1): 84-94.
- [6] 苑舒文, 司建超, 陈雪, 等. 原花青素 B2 对 H₂O₂ 诱导的 HT22 细胞铁死亡的影响及机制研究 [J/OL]. *中药药理与临床*, 2024; 1-21. 2024-07-23 [2024-08-24]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyl.20240723.002>.
- [7] GASCHLER M M, ANDIA A A, LIU H, et al. FINO2 initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation [J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(5): 507-515.
- [8] 王赛, 高静. 富马酸二甲酯对过氧化氢诱导心脏微血管内皮细胞铁死亡的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2023, 9(12): 1494-1499.
- [9] SUN X Z, LIAO Y, LI W, et al. Neuroprotective effects of ganoderma lucidum polysaccharides against oxidative stress-induced neuronal apoptosis [J]. *Neural Regen Res*, 2017, 12(6): 953-958.
- [10] ZHOU C, YU T, ZHU R, et al. Timosaponin A III promotes non-small-cell lung cancer ferroptosis through targeting and facilitating HSP90 mediated GPX4 ubiquitination and degradation [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(5): 1471-1489.
- [11] ZHANG Y, ZHANG J, FENG D, et al. IRF1/ZNF350/GPX4-mediated ferroptosis of renal tubular epithelial cells promote chronic renal allograft interstitial fibrosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 193(Pt 2): 579-594.
- [12] 沈哲, 蓝涛, 郭伟壮. 1,25(OH)₂D₃ 调控维生素 D 受体表达对 H₂O₂ 诱导的髓核细胞氧化应激损伤的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(3): 373-377.
- [13] 董伟, 王娟, 赵伟, 等. 右美托咪定调控铁代谢对氧糖剥夺/再灌注心肌细胞损伤的保护作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(3): 354-357.
- [14] LI Z, HE D, GUO B, et al. Self-promoted electroactive biomimetic mineralized scaffolds for bacteria-infected bone regeneration [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6963.
- [15] ZHOU X, AI S, CHEN Z, et al. Probucol promotes high glucose-induced proliferation and inhibits apoptosis by reducing reactive oxygen species generation in Müller cells [J]. *Int Ophthalmol*, 2019, 39(12): 2833-2842.
- [16] 金莹莹, 时乐, 郝永熙, 等. 芍药苷对雷西莫特诱导的巨噬细胞有氧糖酵解的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(5): 683-687.
- [17] MISHRA M, TIWAARI S, GOMES A V. Protein purification and analysis: Next generation western blotting techniques [J]. *Expert Rev Proteomics*, 2017, 14(11): 1037-1053.
- [18] HANKE N, RAMI A. Inhibition of autophagy rescues HT22 hippocampal neurons from erastin-induced ferroptosis [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(7): 1548-1552.
- [19] XU S, HE Y, LIN L, et al. The emerging role of ferroptosis in intestinal disease [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4): 289.
- [20] YUAN C, DONG X, XU S, et al. AKBA alleviates experimental pancreatitis by inhibiting oxidative stress in Macrophages through the Nrf2/HO-1 pathway [J/OL]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 121: 110501. 2023-01-24 [2024-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37364326/>.
- [21] FENG Y, JU Y, YAN Z, et al. Protective role of wogonin following traumatic brain injury by reducing oxidative stress and apoptosis via the PI3K/Nrf2/HO1 pathway [J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(4): 53.
- [22] LEVINGS D C, PATHAK S S, YANG Y M, et al. Limited expression of Nrf2 in neurons across the central nervous system [J/OL]. *Redox Biol*, 2023, 65: 102830. 2023-07-26 [2024-08-23]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37544245/>.

(收稿日期 2024-10-10)