

肿瘤坏死因子 α 通过抑制Nrf2/GPX4信号通路促进H9c2心肌细胞铁死亡的作用机制研究

张宗丽^{1,2,3} 席世兵^{1,2,3} 姚莉⁴ 王小莉⁵ 薛莉莎² 李丹³ 全佳^{1,2} 李涛^{1,2,3*}

(¹十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)儿童疾病研究所, 十堰 442000; ²十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)儿科, 十堰 442000; ³湖北医药学院儿童疾病研究所, 十堰 442000; ⁴十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)病理科, 十堰 442000; ⁵胚胎干细胞研究湖北省重点实验室(湖北医药学院), 十堰 442000)

摘要 该研究旨在探讨肿瘤坏死因子 α (TNF α)诱导H9c2心肌细胞铁死亡的作用及Nrf2/GPX4信号通路在此过程中的调控作用。以TNF α 刺激H9c2心肌细胞构建损伤模型, 采用Western blot和免疫荧光法检测相关蛋白表达情况; 显微镜下观察亚铁离子(Fe^{2+})蓄积、活性氧(ROS)产生以及线粒体膜电位变化情况; qRT-PCR检测铁死亡抑制剂(Fer-1)对TNF α 诱导的Nrf2、GPX4和PTGS2 mRNA水平的影响; 利用siRNA技术沉默Nrf2基因, 分析Nrf2对GPX4、PTGS2和ACSL4 mRNA转录水平的调控作用, 以及对细胞ROS和 Fe^{2+} 含量的影响。TNF α 处理显著下调H9c2细胞中GPX4蛋白表达水平($P<0.05$), 伴随ROS水平显著增加、 Fe^{2+} 染色阳性率升高和线粒体膜电位下降; 机制研究表明, TNF α 可显著抑制H9c2细胞中GPX4蛋白表达, 同时下调Nrf2及其下游抗氧化蛋白HO-1、NQO1的表达水平, 并上调ACSL4蛋白水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。TNF α 显著上调Nrf2、GPX4和PTGS2的mRNA水平, Fer-1能够有效抑制TNF α 诱导的这些基因的表达上调。沉默Nrf2抑制GPX4 mRNA转录, 同时显著上调ACSL4和PTGS2的mRNA水平($P<0.001$ 或 $P<0.0001$), 加剧细胞内ROS蓄积和 Fe^{2+} 过载, 最终促进铁死亡。TNF α 通过抑制Nrf2/GPX4信号通路, 打破抗氧化防御与脂质过氧化平衡, 诱导H9c2心肌细胞发生铁死亡。

关键词 肿瘤坏死因子 α ; 铁死亡; Nrf2/GPX4信号通路; H9c2心肌细胞

Study on the Mechanism of Tumor Necrosis Factor α Promoting Ferroptosis of H9c2 Cardiomyocytes through Inhibiting the Nrf2/GPX4 Signaling Pathway

ZHANG Zongli^{1,2,3}, XI Shibing^{1,2,3}, YAO Li⁴, WANG Xiaoli⁵, XUE Lisha², LI Dan³, QUAN Jia^{1,2}, LI Tao^{1,2,3*}

(¹Institute of Pediatric Disease, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

²Pediatric Department, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

³Institute of Pediatric Diseases, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

⁴Department of Pathology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China;

⁵Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

收稿日期: 2025-04-22

接受日期: 2025-07-04

湖北省自然科学基金联合创新项目(批准号: 2025AFD223)、湖北省儿科联盟医学科研项目(批准号: HPAMRP202405)、湖北省教育厅中青年人才项目(批准号: D20222113)和十堰市科技局引导性项目(批准号: 24Y040)资助的课题

*通信作者。Tel: 0719-8801415, E-mail: a20990755@hbmh.edu.cn

Received: April 22, 2025

Accepted: July 4, 2025

This work was supported by the Joint Innovation Project of Hubei Provincial Natural Science Foundation (Grant No.2025AFD223), the Medical Research Project of Hubei Pediatric Alliance (Grant No.HPAMRP202405), the Young and Middle-Aged Talents Program of the Department of Education of Hubei Province (Grant No.D20222113), and the Shiyan Science and Technology Bureau's Guiding Project (Grant No.24Y040)

*Corresponding author. Tel: +86-719-8801415, E-mail: a20990755@hbmh.edu.cn

Abstract This study aims to investigate the role of TNF α (tumor necrosis factor α) in inducing ferroptosis in H9c2 cardiomyocytes and the regulatory role of the Nrf2/GPX4 signaling pathway in this process. A damage model of H9c2 cardiomyocytes was established by TNF α stimulation. The expression of related proteins was detected by Western blot and immunofluorescence. The accumulation of ferrous ions, production of ROS (reactive oxygen species), and changes in mitochondrial membrane potential were observed under a microscope. qRT-PCR was performed to examine the effects of the ferroptosis inhibitor on the mRNA levels of *Nrf2*, *GPX4*, and *PTGS2* induced by TNF α . The regulatory effects of *Nrf2* gene silencing on the transcription levels of *GPX4*, *PTGS2*, and *ACSL4* mRNA, as well as the effects on cellular ROS and ferrous ion content, were analyzed using siRNA technology. TNF α treatment significantly downregulated the expression of GPX4 protein in H9c2 cells ($P < 0.05$), which was accompanied by elevated ROS levels, significantly increased positive staining rate of ferrous ions, and decreased mitochondrial membrane potential. Mechanistic studies showed that TNF α significantly inhibited GPX4 expression in H9c2 cells; meanwhile, it suppressed the Nrf2-driven antioxidant proteins HO-1 and NQO1, and concomitantly up-regulated ACSL4 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). TNF α significantly upregulated the mRNA levels of *Nrf2*, *GPX4*, and *PTGS2*, and Fer-1 effectively inhibited the TNF α -induced upregulation of these genes. Silencing Nrf2 inhibited the transcription of *GPX4* mRNA and significantly upregulated the mRNA levels of *ACSL4* and *PTGS2* ($P < 0.001$ or $P < 0.0001$), which exacerbated the accumulation of ROS and ferrous iron overload in cells, ultimately promoting the ferroptosis process. TNF α induces ferroptosis in H9c2 cardiomyocytes by inhibiting the Nrf2/GPX4 signaling pathway, disrupting the balance between antioxidant defense and lipid peroxidation.

Keywords tumor necrosis factor α ; ferroptosis; Nrf2/GPX4 signaling pathway; H9c2 cardiomyocytes

心血管疾病 (cardiovascular disease, CVD) 已成为全球范围内威胁人类健康的首要死因^[1], 其核心病理机制涉及心肌细胞的损伤与死亡^[2]。心肌细胞死亡不仅会直接削弱心脏泵血功能, 还会释放损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 如高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box 1, HMGB1) 等, 进而激活巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞, 触发局部炎症乃至全身免疫应答^[3]。这种炎症级联反应可通过促进成纤维细胞活化加剧心肌纤维化, 并诱导基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的表达与活化, 降解细胞外基质, 最终导致心脏组织重塑和功能恶化^[4]。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α) 作为促炎细胞因子网络的核心介质, 其血清水平与冠心病患者的斑块负荷、急性心梗 (acute myocardial infarction, AMI) 后的心肌损伤面积及慢性心力衰竭 (chronic heart failure, CHF) 的纽约心功能分级呈显著正相关^[5-6]。机制上, TNF α 可通过与细胞膜表面 TNF 受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1) 结合, 激活 NF- κ B 信号通路, 促进白细胞黏附分子 (如 ICAM-1) 和促炎因子 (如 IL-6) 的表达, 这些分子进一步放大炎症级联反应^[7-8]。

尽管 TNF α 通过炎症信号通路在心血管疾病中

的作用已被广泛研究, 但其调控心肌细胞死亡方式的具体机制, 目前仍存在研究空白。传统观点认为, 凋亡和坏死是心肌细胞死亡的主要方式。然而, 近年来的研究发现, 铁死亡 (ferroptosis)——一种依赖铁离子的脂质过氧化性细胞死亡方式——在心肌细胞死亡中也扮演着关键角色^[9]。作为一种铁依赖性的程序性细胞死亡方式, 铁死亡在形态学、生物化学和基因调控等方面与坏死、凋亡、自噬和焦亡等其他细胞死亡方式有显著不同^[10]。其特征包括谷胱甘肽耗竭、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 失活以及多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 衍生的磷脂过氧化物过度积累。越来越多的研究表明, 铁死亡在心血管疾病 (例如缺血/再灌注损伤、心力衰竭、心肌病和动脉粥样硬化) 中扮演着重要作用。因此, 通过靶向铁死亡来预防心血管疾病, 正成为一种有前景的治疗策略^[9]。

目前, 铁死亡在心肌细胞损伤中的作用机制研究尚处于探索阶段, TNF α 与心肌细胞铁死亡之间的内在联系以及二者间可能存在的调控机制, 尚需进一步阐明。已有研究表明, 在心肌梗死大鼠模型中, 铁死亡与 TNF α 等炎症因子的表达水平呈正相关^[11]。

然而, TNF α 是否直接参与心肌细胞铁死亡的调控, 及其具体作用机制仍不明确。

鉴于此, 本研究聚焦于探究TNF α 对H9c2心肌细胞铁死亡的影响及其潜在机制, 本研究不仅有助于阐明TNF α 在心肌细胞死亡中的作用, 也为基于铁死亡机制的抗心血管疾病治疗策略提供了新的理论依据和实验基础。

1 材料和方法

1.1 材料

材料包括: 心肌细胞(H9c2细胞)(武汉普诺赛生命科技有限公司); HyClone DMEM高糖液体培养基[思拓凡生物科技(杭州)有限公司]; 人肿瘤坏死因子 α 蛋白(南京优爱生物科技有限公司); Cy3标记山羊抗兔IgG(H+L)、Cy3标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、FITC标记山羊抗兔IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠IgG(H+L)、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L)、活性氧检测试剂盒、增强型线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、Lipo 8000转染试剂(上海碧云天生物技术公司); GPX4、脂酰辅酶A合成酶4(acyl-CoA synthetase 4, ACSL4)、Nrf2、HO-1、NQO1抗体(武汉三鹰生物技术有限公司); FerroOrange(Fe^{2+} indicator)(上海懋康生物科技有限公司); 蓝色通用型染料法qPCR检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 将H9c2细胞接种于含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基, 置于37℃、5%CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。当H9c2细胞密度达到70%~80%时, 将细胞分为空白组(不做任何处理)以及不同浓度(12.5 ng/mL、25 ng/mL和50 ng/mL)的TNF α 组。经36 h处理后收集细胞用于下一步实验, 以确立TNF α 的最佳作用浓度。在确定TNF α 最佳作用浓度为50 ng/mL后, 将细胞分为以下3组。对照组(Con): 常规培养; TNF α 组: 用50 ng/mL TNF α 处理36 h; TNF α +Fer-1组: 先以10 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1(ferrostatin-1, 铁死亡抑制剂, 溶于DMSO)预处理2 h, 再加入50 ng/mL TNF α 处理36 h。对照组和TNF α 组均加入等体积DMSO, 排除溶剂干扰。另外设计2组细胞, 分别为siNC和siNrf2组, 采用转染试剂将siNC和siNrf2转染至细胞后进行后续实验。

1.2.2 蛋白质印迹法(Western blot)检测蛋白表达情况 将H9c2细胞培养板中加入含有蛋白磷酸酶

抑制剂的RIPA裂解液, 在冰上进行30 min裂解。经超声波处理充分裂解蛋白质, 将样本置于金属浴中加热8 min以使蛋白质变性。随后采用BCA蛋白定量试剂盒测定样本总蛋白浓度, 调整上样缓冲液体积使每个泳道上样量为30~50 μg 总蛋白, 进行SDS-PAGE电泳: 浓缩胶(浓度为5%)在80 V电压下电泳30 min, 分离胶(浓度为10%)在120 V电压下电泳60 min。电泳结束后采用半干转移法将蛋白转移到PVDF膜上。使用TBST溶液洗涤膜, 用快速封闭液在室温下封闭10 min, 再用TBST溶液洗涤膜3次(每次10 min)。分别加入GPX4、ACSL4、Nrf2、NQO1、HO-1和GAPDH的抗体(GAPDH抗体稀释比例为1:10 000, 其余均为1:1 000), 在4℃下孵育过夜。再次用TBST溶液洗涤膜, 加入相应种属的二抗(稀释比例为1:2 000), 室温下孵育1 h。最后使用超高灵敏度化学发光成像系统进行显影, 并通过ImageJ软件进行灰度分析, 统计蛋白的相对表达量。

1.2.3 免疫荧光法(immunofluorescence)检测蛋白表达情况 将H9c2细胞以 5×10^4 /孔的密度接种于24孔板, 按前述条件培养后进行相应处理, 处理结束后用常温PBS润洗3次, 每孔加500 μL 4%多聚甲醛, 室温固定15~20 min; 弃固定液, PBS润洗3次(每次5 min), 再向每孔加入500 μL Triton X-100, 室温孵育10 min。弃去Triton X-100, PBS润洗3次后, 每孔加500 μL 5%牛血清白蛋白室温封闭1 h; 分别加入稀释比例为1:200的GPX4、ACSL4、Nrf2抗体, 4℃孵育过夜, 润洗后再加入稀释比例为1:500的相应种属荧光标记二抗, 室温避光孵育1 h, 最后经避光洗涤后在孔内滴加DAPI染色液, 直接在倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.4 细胞内ROS、 Fe^{2+} 水平和线粒体膜电位检测 待H9c2细胞经各组处理达到预设时间后, 弃去孔内培养基[Fe^{2+} 检测无需后续润洗, 活性氧(reactive oxygen species, ROS)及线粒体膜电位检测需用PBS润洗3次]。随后分别使用活性氧检测试剂盒、FerroOrange(Fe^{2+} indicator)及线粒体膜电位检测试剂盒进行检测, 具体操作步骤参照各试剂盒说明书执行。

1.2.5 qRT-PCR法检测铁死亡相关mRNA的表达情况 运用TRIzol试剂提取总RNA, 随后采用cDNA合成试剂盒对1 μg 总RNA实施逆转录反应。利用CFX96实时荧光定量PCR仪(Bio-Rad公司)和SYBR qPCR预混液进行实时荧光定量PCR分析, 以大鼠肌

表1 引物信息表
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')	产物长度/bp Product length /bp
ACTB	Forward: AGA TGT GGA TCA GCA AGC AGG AGT A Reverse: TCA GTA ACA GTC CGC CTA GAA GCA T	83
GPX4	Forward: TAA GTA CAG GGG TGC GTG TG Reverse: CAA GGG AAG GCC AGG ATT CG	134
Nrf2	Forward: ATG CCT TCC TCT GCT GCC ATT AGT C Reverse: AGT CAT TGA ACT CCA CCG TGC CTT C	130
PTGS2	Forward: ATC CTT GCT GTT CCA ACC CA Reverse: TCT TAG CAA ATC AGG CGT A	128
ACSL4	Forward: CTA CTC TTA CTG CTG CTT CCG TTA CT Reverse: AGG CTT CTA CTA TGG TGC TTA TAT GCT	96

动蛋白(*ACTB*)作为内参对照(相关引物信息见表1),检测铁死亡相关基因的mRNA的表达水平。

1.2.6 siRNA实验 针对大鼠 *Nrf2* 基因的3组特定 siRNA 由上海生工生物工程股份有限公司合成。siRNA 序列如下: RNfe2l2-150-s 正义链序列为 5'-GCA GGA CAU GGA UUU GAU UTT-3', 对应反义链 RNfe2l2-150-a 为 5'-AAU CAA AUC CAU GUC CUG CTT-3'; RNfe2l2-660-s 正义链序列为 5'-GCA AGU UUG GCA GGA GCU ATT-3', 对应反义链 RNfe2l2-660-a 为 5'-UAG CUC CUG CCA AAC UUG CTT-3'; RNfe2l2-1610-s 正义链序列为 5'-GCA GGA GAG GGA AGA AUA ATT-3', 对应反义链 RNfe2l2-1610-a 为 5'-UUA UUC UUC CCU CUC CUG CTT-3'。H9c2 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基中,按照 Lipo8000 转染试剂提供的说明,将三种针对 *Nrf2* 的 siRNA 进行组合转染。以一个不针对目标基因的 siRNA 序列作为阴性对照。分别以 Western blot 检测 Nrf2 蛋白表达水平, qRT-PCR 法检测其 mRNA 表达水平,据此判断 *Nrf2* 基因抑制效果。

1.2.7 统计学分析 数据经正态分布检验后,采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行分析。数据以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组比较使用独立样本 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 *P*<0.05 被认定为在统计学上有显著差异。

2 结果

2.1 TNFα诱导H9c2细胞中GPX4的蛋白表达下调
为探究 TNFα 对铁死亡相关关键蛋白——谷胱

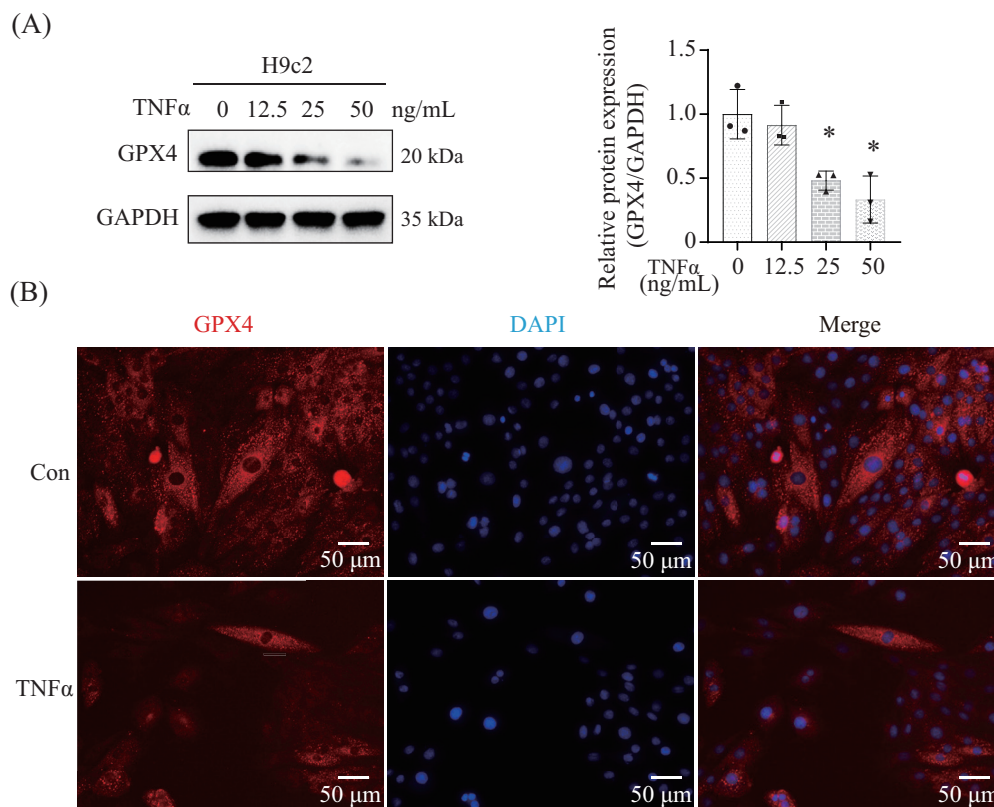
甘肽过氧化物酶4(GPX4)的影响,采用 Western blot 检测其表达水平。结果显示, H9c2 细胞经 12.5 ng/mL、25 ng/mL 和 50 ng/mL 的 TNFα 处理 36 h 后, GPX4 的蛋白表达水平均显著下降(图 1A)。其中, 12.5 ng/mL 浓度组的 GPX4 表达水平已呈现下降趋势, 而 25 ng/mL 和 50 ng/mL 浓度组的下降更为显著(*P*<0.05)。基于上述结果, 后续实验中选择 50 ng/mL 的 TNFα 处理 H9c2 细胞 36 h。免疫荧光检测进一步证实了 TNFα 对 GPX4 蛋白表达的显著抑制作用(图 1B)。

2.2 TNFα诱导H9c2细胞中氧化应激水平和Fe²⁺含量升高

由于 GPX4 下调可能削弱细胞抗氧化能力, 我们进一步检测了 TNFα 处理后的氧化应激指标。荧光显微镜观察发现, TNFα 诱导 H9c2 细胞内 ROS 和 Fe²⁺ 含量异常升高(图 2A 和图 2B), 同时发现 TNFα 刺激导致 H9c2 细胞线粒体内红色荧光强度显著降低, 而绿色荧光显著增强, 表明线粒体膜电位降低(图 2C)。

2.3 TNFα上调H9c2细胞ACSL4表达, 抑制Nrf2及下游蛋白表达

TNFα 对 GPX4 的抑制作用可能触发细胞内复杂的氧化应激调控网络, 我们进一步探究了其他铁死亡相关蛋白及抗氧化信号通路关键分子的变化。Western blot 实验结果显示, TNFα 刺激后, H9c2 细胞中 GPX4 蛋白表达水平显著下降, 同时 ACSL4 蛋白水平升高, 且 Nrf2、HO-1 及 NQO1 的蛋白水平均降低 (*P*<0.05)(图 3A); 免疫荧光结果进一步证实, TNFα 可显著促进 ACSL4 的蛋白表达, 同时降低 Nrf2 的蛋白水平(图 3B 和图 3C)。



A: Western blot检测各组细胞中GPX4的蛋白含量; B: GPX4蛋白的细胞免疫荧光定位。* P < 0.05, 与对照组(TNF α 0 ng/mL)相比。

A: detect the protein expression of GPX4 in cells of each group by Western blot; B: cellular immunofluorescence localization of GPX4 protein. * P < 0.05 compared with the Con group (TNF α 0 ng/mL).

图1 TNF α 对GPX4蛋白的影响
Fig.1 The effect of TNF α on GPX4 protein

2.4 Fer-1抑制TNF α 诱导的Nrf2和铁死亡相关基因的转录激活

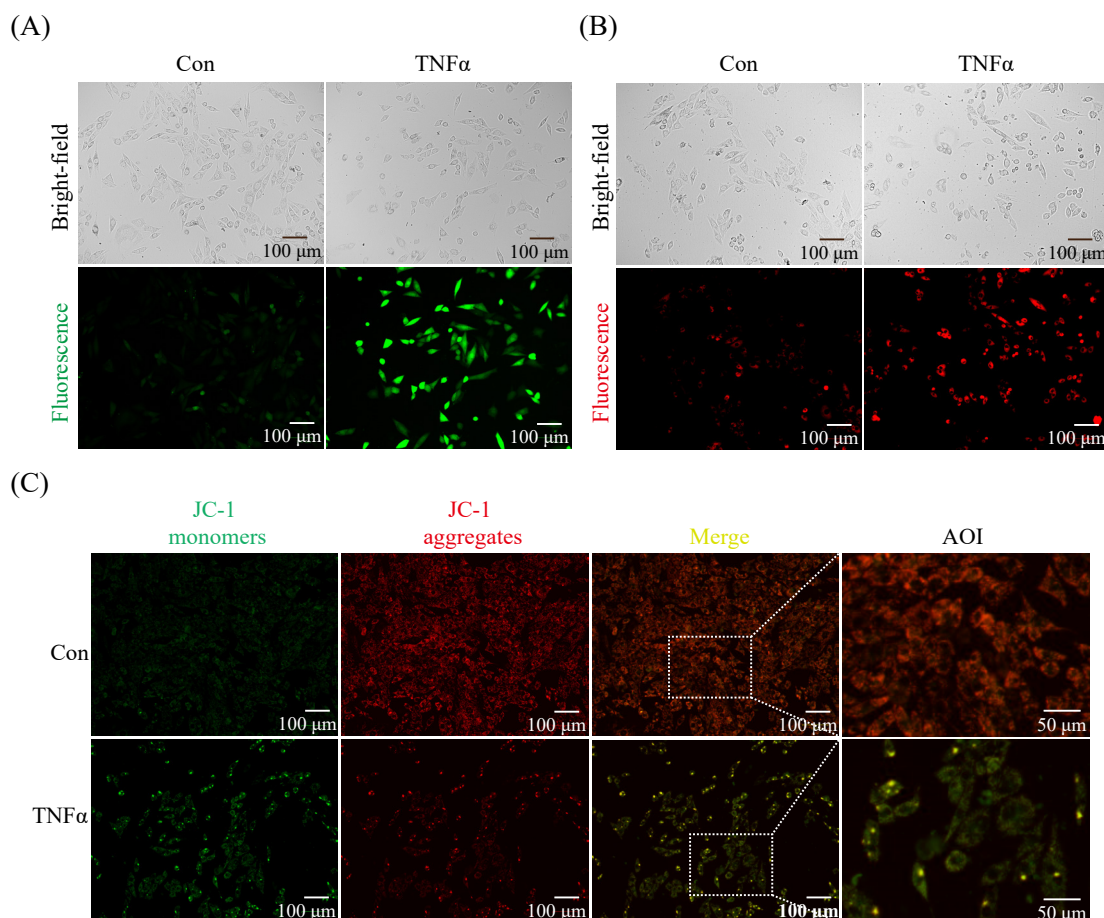
结合TNF α 处理后细胞氧化应激指标异常,以及铁死亡关键调控蛋白Nrf2、GPX4水平下调的现象,我们推测这些表型改变可能受转录水平调控;为明确Fer-1是否通过干预该转录过程影响铁死亡,我们通过qRT-PCR检测了Nrf2、GPX4和前列腺素内过氧化物合成酶2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)的mRNA水平。结果显示:TNF α 处理后铁死亡的标记物PTGS2的mRNA表达水平升高(P < 0.000 1),这与我们的预期一致。然而,出乎意料的是,Nrf2和GPX4的mRNA表达水平也显著上调(P < 0.000 1)。结合前期观察到的TNF α 诱导细胞中Nrf2和GPX4蛋白水平的下调,我们推测在TNF α 刺激下,细胞通过上调Nrf2和GPX4转录补偿蛋白功能缺失。为了进一步明确这些转录水平变化与铁死亡之间的关联,使用Fer-1对细胞进行预处理。结果显示,Fer-1能够显著抑制TNF α 诱导的Nrf2、GPX4和PTGS2 mRNA水平的升高(图4)。

2.5 沉默Nrf2导致H9c2细胞中铁死亡基因水平变化

基于上述实验发现TNF α 可抑制Nrf2信号通路并诱导铁死亡,我们进一步探究Nrf2在铁死亡调控中的直接作用。使用siRNA沉默Nrf2后,通过Western blot和qRT-PCR实验对沉默效率进行检测,结果表明siNrf2显著降低了Nrf2的蛋白和mRNA水平(P < 0.05),同时显著下调了其下游分子NQO1和HO-1的蛋白水平(P < 0.05),下调了GPX4的mRNA水平(P < 0.000 1),上调了PTGS2和ACSL4的mRNA水平(P < 0.001)(图5)。

2.6 沉默Nrf2诱导H9c2细胞发生铁死亡

铁死亡相关基因表达的显著变化可能会影响细胞的铁死亡状态。为了进一步验证细胞是否实际发生铁死亡,我们利用荧光显微镜对沉默Nrf2的H9c2细胞进行了观察。结果发现,沉默Nrf2的H9c2细胞中,ROS含量和Fe²⁺含量均显著升高(图6),表明沉默Nrf2促进H9c2细胞发生铁死亡。



A: TNF α 对H9c2细胞中ROS含量的影响; B: TNF α 对H9c2细胞中Fe²⁺含量的影响; C: TNF α 对H9c2细胞中线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)的影响。

A: the effect of TNF α on the content of ROS in H9c2 cells; B: the effect of TNF α on the content of ferrous ions in H9c2 cells; C: the effect of TNF α on the mitochondrial membrane potential in H9c2 cells.

图2 TNF α 对H9c2细胞氧化应激和Fe²⁺的影响

Fig.2 The effects of TNF α on oxidative stress and ferrous ion levels in H9c2 cells

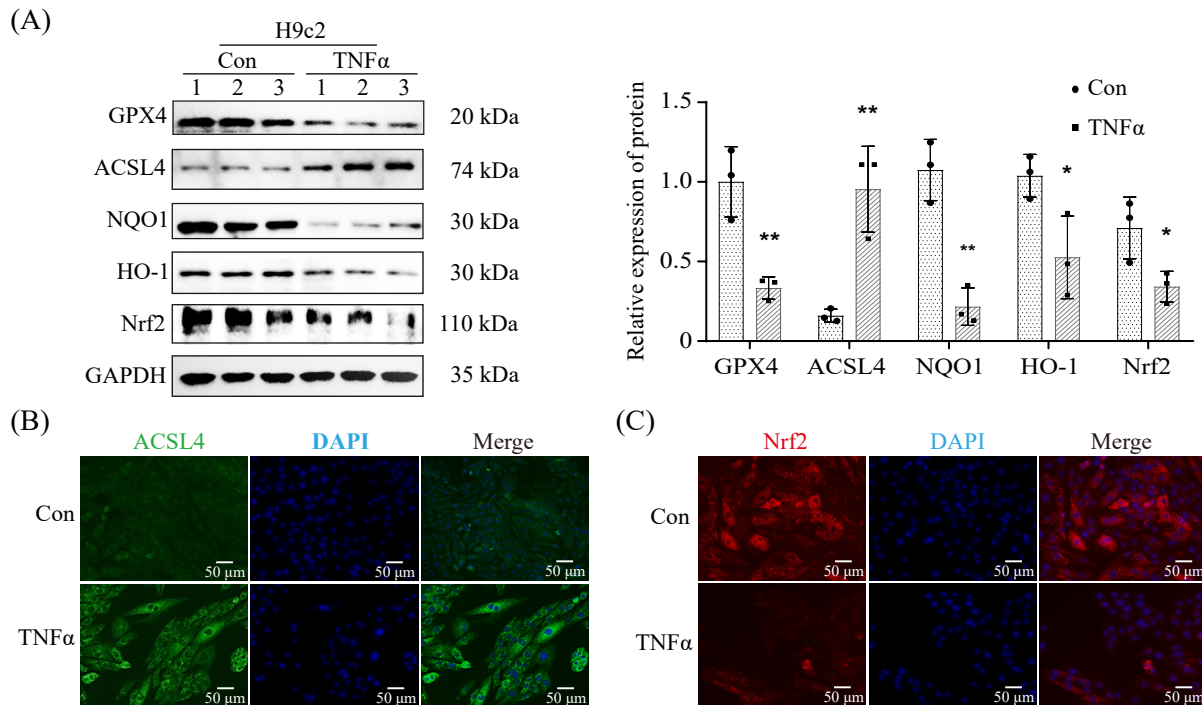
3 讨论

本研究初步揭示了炎症因子TNF α 通过调控铁死亡关键分子网络诱导心肌细胞损伤的新机制。研究结果显示, TNF α 通过抑制Nrf2/GPX4信号通路, 破坏细胞内氧化还原平衡, 推动铁死亡进程, 这为理解心血管疾病中心肌细胞损伤的机制提供了新的视角。

TNF α 作为一种关键的炎症因子, 在多种心血管疾病中表达水平显著升高, 并与疾病的严重程度及不良预后密切相关^[12-13]。GPX4作为铁死亡调控的“分子开关”, 其催化活性直接决定细胞对脂质过氧化的抵抗能力^[14]。在正常心肌细胞中, GPX4通过谷胱甘肽(glutathione, GSH)依赖的抗氧化通路, 将毒性磷脂过氧化氢还原为无害的磷脂醇, 从而维持细胞膜稳定性。然而, 当GPX4表达下调时, 脂质过氧化产物(如4-HNE)大量蓄积, 引发膜结构破坏和细胞死亡^[15]。

本研究证实, TNF α 刺激可使H9c2细胞中GPX4蛋白表达显著下调, 同时, 细胞内Fe²⁺含量升高、ROS水平增加, 线粒体膜电位($\Delta\psi_m$)下降, 这些变化与铁死亡特征性的脂质过氧化损伤一致。

Nrf2是细胞内抗氧化防御系统的核心转录因子, 调控包括HO-1和NQO1在内的众多抗氧化基因的转录, 从而维持细胞的氧化还原平衡^[16]。本研究发现, TNF α 处理显著抑制了Nrf2及其下游抗氧化蛋白HO-1和NQO1的表达, 尽管Nrf2和GPX4的mRNA水平实际上有所增加。这种蛋白表达的下调可能与转录后调控机制有关。此外, 铁死亡抑制剂Fer-1能够抑制TNF α 诱导的Nrf2、GPX4和PTGS2 mRNA水平的升高, 沉默Nrf2会降低GPX4的mRNA转录水平, 进而加剧细胞内ROS的积累和Fe²⁺的过载, 最终促进铁死亡的发生。这表明Nrf2/GPX4信号通路在TNF α 诱导的铁死亡中起着关键的调控作用。TNF α 通过

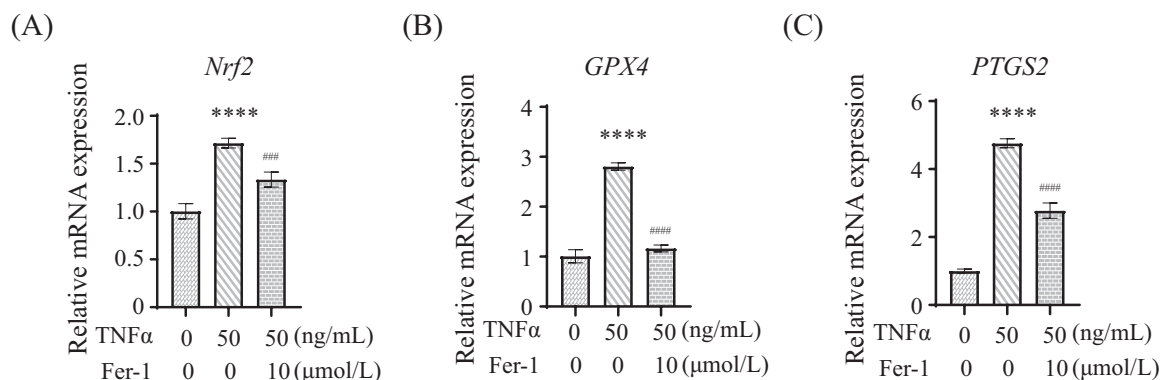


A: Western blot检测TNF α 对H9c2细胞中ACSL4和Nrf2等蛋白含量的影响; B: ACSL4蛋白的细胞免疫荧光定位; C: Nrf2蛋白的细胞免疫荧光定位。* P <0.05, ** P <0.01, 与对照组相比。

A: analysis of TNF α 's impact on ACSL4 and Nrf2 protein levels in H9c2 cells by Western blot; B: immunofluorescence localization of ACSL4 protein in cells; C: immunofluorescence localization of Nrf2 protein in cells. * P <0.05, ** P <0.01 compared with the Con group.

图3 Western blot检测铁死亡相关蛋白和Nrf2及其下游分子的蛋白表达情况

Fig.3 Detection of the expression of ferroptosis-related proteins, Nrf2 and its downstream molecules by Western blot



A~C: qRT-PCR检测TNF α 和Fer-1对H9c2细胞Nrf2、GPX4和PTGS2 mRNA水平的影响。**** P <0.000 1, 与对照组相比; ### P <0.001, #### P <0.000 1, 与TNF α 组相比。

A~C: qRT-PCR analysis of the effects of TNF α and Fer-1 on the mRNA levels of Nrf2, GPX4, and PTGS2 in H9c2 cells. **** P <0.000 1 compared with the control group; ### P <0.001, #### P <0.000 1 compared with the TNF α group.

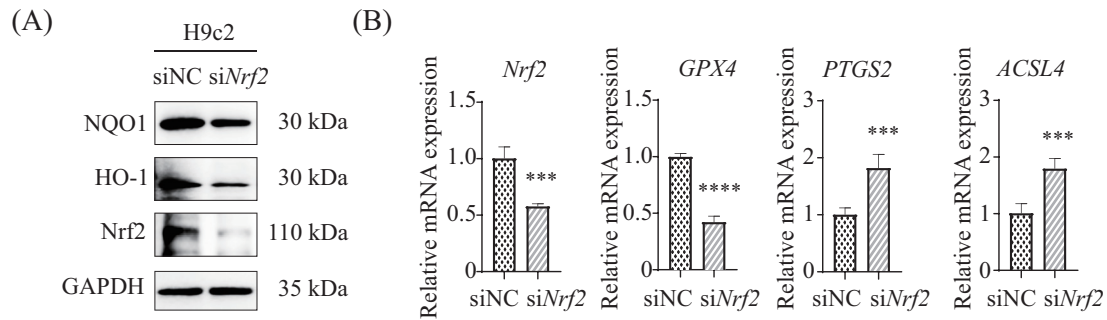
图4 qRT-PCR检测Nrf2和铁死亡相关基因的转录情况

Fig.4 Detection of the mRNA expression of Nrf2 and ferroptosis-related genes by qRT-PCR

降低Nrf2蛋白水平,一方面削弱其对下游GPX4的转录激活功能,另一方面下调HO-1、NQO1等Nrf2靶蛋白的表达,最终打破细胞氧化还原平衡,形成“炎症-抗氧化失衡”的恶性循环。这种失衡导致了GPX4下调与Nrf2通路抑制产生显著的协同效应,进

一步加剧了细胞的氧化应激和铁死亡。本研究首次发现,在心肌细胞中,炎症-抗氧化通路的交叉对话机制下调GPX4蛋白表达,这可能是心血管炎症状态下心肌细胞损伤的关键环节。

ACSL4作为脂酰辅酶A合成酶家族成员,通过

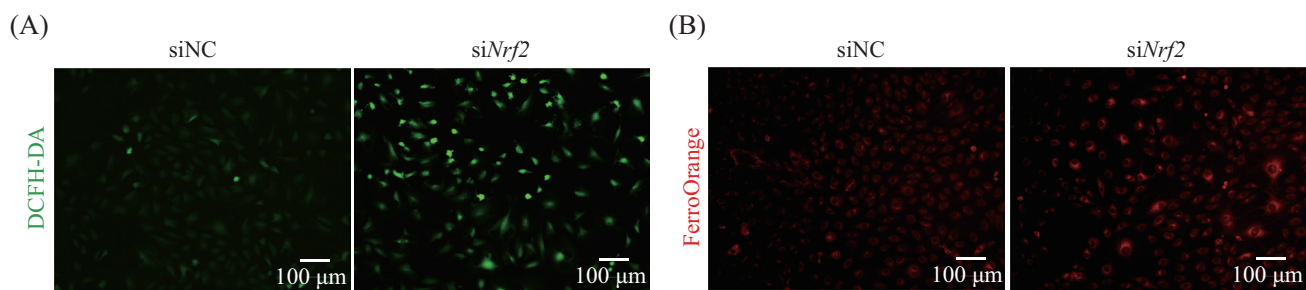


A: Western blot检测siNrf2的沉默效果; B: qRT-PCR检测沉默Nrf2对铁死亡相关基因的影响。*** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与siNC组相比。

A: detection of the silencing effect of siNrf2 by Western blot; B: detection of the impact of Nrf2 silencing on ferroptosis-related genes via qRT-PCR. *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ compared with the siNC group.

图5 沉默Nrf2对铁死亡相关基因的影响

Fig.5 The effect of Nrf2 silencing on ferroptosis-related genes



A: 显微镜下观察H9c2细胞沉默Nrf2后ROS含量变化; B: 显微镜下观察H9c2细胞沉默Nrf2后Fe²⁺含量变化。

A: changes in ROS levels in H9c2 cells after Nrf2 knockdown, as visualized by microscopy; B: changes in ferrous ion levels in H9c2 cells after Nrf2 knockdown, as visualized by microscopy.

图6 沉默Nrf2对H9c2细胞氧化应激和Fe²⁺的影响

Fig.6 The effects of Nrf2 silencing on oxidative stress and ferrous ion levels in H9c2 cells

催化花生四烯酸(arachidonic acid, AA)和肾上腺酸等多不饱和脂肪酸(PUFA)转化为脂酰辅酶A,为脂质过氧化提供底物,是铁死亡特异性代谢通路的关键调控因子^[17]。本研究发现, TNF α 处理可显著上调H9c2细胞中ACSL4蛋白水平,同时下调GPX4的表达——二者的动态平衡直接决定细胞对铁死亡的敏感性^[18]。ACSL4催化PUFA转化为脂酰辅酶A,促进脂质过氧化底物蓄积,而GPX4介导的GSH依赖性过氧化清除能力不足,导致氧化还原稳态失衡。这种代谢紊乱协同铁依赖的脂质过氧化,放大炎症反应(如TNF α 、IL-6水平升高),加剧细胞损伤与炎症^[19-20]。值得注意的是,沉默Nrf2后观察到ACSL4的mRNA水平显著上调,提示Nrf2通路可能通过转录调控抑制ACSL4表达。这一发现表明, Nrf2不仅通过调控GPX4维持抗氧化能力,还可通过下调ACSL4表达从“底物生成源头”阻断脂质过氧化的底物供给,从而在铁死亡调控中发挥核心枢纽作用。TNF α 通过抑制Nrf2,触发“抗氧化能力下降+脂质过氧化增强”的

双重机制。该机制的阐明,揭示了炎症信号协同调控铁死亡的多轴交互网络,并为靶向Nrf2/GPX4通路的干预策略提供了理论依据。

本研究主要基于体外细胞实验,揭示了TNF α 诱导H9c2心肌细胞铁死亡的机制,强调了Nrf2在调控铁死亡中的核心作用。然而,本研究缺乏体内动物模型的验证。未来的研究需在动物模型中进一步验证TNF α 对心肌细胞铁死亡的影响及机制,并深入探索Nrf2/GPX4信号通路在心血管疾病中的作用。基于本研究的发现,未来研究将着重验证Nrf2激活剂在心血管疾病防治中的潜在应用价值,为开发新的治疗策略提供理论支持。

参考文献 (References)

- [1] TIMMIS A, TOWNSEND N, GALE C P, et al. European society of cardiology: cardiovascular disease statistics 2019 [J]. Eur Heart J, 2020, 41(1): 12-85.
- [2] CAI K, JIANG H, ZOU Y, et al. Programmed death of cardiomyocytes in cardiovascular disease and new therapeutic approaches

- [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 206: 107281.
- [3] TORP M, VAAGE J, STENSLØKKEN K. Mitochondria-derived damage-associated molecular patterns and inflammation in the ischemic-reperfused heart [J]. *Acta Physiol*, 2023, 237(3): 13.
- [4] 陈海璇, 陈业群, 朱金秀. 急性心肌梗死后关键炎症因子的调控作用及意义[J]. 实用心电学杂志(CHEN H X, CHEN Y Q, ZHU J X. Regulatory roles and significance of key inflammatory factors in post-acute myocardial infarction [J]. *Practical Electrocardiology and Clinical*), 2022, 31: 13-7.
- [5] SCHUMACHER S M, NAGA PRASAD S V. Tumor necrosis factor- α in heart failure: an updated review [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2018, 20(11): 117.
- [6] ROLSKI F, BŁYSZCZUK P. Complexity of TNF- α signaling in heart disease [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(10): 3267.
- [7] REDDY A, LAKSHMI S, PRASAD E, et al. Epigallocatechin gallate suppresses inflammation in human coronary artery endothelial cells by inhibiting NF- κ B [J]. *Life Sci*, 2020, 258: 118136.
- [8] VAN LOO G, BERTRAND M. Death by TNF: a road to inflammation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2023, 23(5): 289-303.
- [9] FANG X, ARDEHALI H, MIN J X, et al. The molecular and metabolic landscape of iron and ferroptosis in cardiovascular disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2023, 20: 7-23.
- [10] STOCKWELL B R. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401-21.
- [11] 原景, 万梅绪, 张燕欣, 等. 近5年中药成分及制剂调控铁死亡治疗心血管疾病药理作用研究进展[J]. 药物评价研究(YUAN J, WAN M X, ZHANG Y X, et al. Research progress on pharmacological effects of Chinese medicine components and preparations on regulating ferroptosis in treatment of cardiovascular diseases in past five years [J]. *Drug Evaluation Research*), 2025, 48: 285-95.
- [12] GALEONE A, GRANO M, BRUNETTI G. Tumor necrosis factor family members and myocardial ischemia-reperfusion injury: state of the art and therapeutic implications [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5): 4606.
- [13] XIE L, XUE F, CHENG C, et al. Cardiomyocyte-specific knock-out of ADAM17 alleviates doxorubicin-induced cardiomyopathy via inhibiting TNF α -TRAF3-TAK1-MAPK axis [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 273.
- [14] CHEN F, KANG R, TANG D, et al. Ferroptosis: principles and significance in health and disease [J]. *J Hematol Oncol*, 2024, 17(1): 41.
- [15] 杨昕彤, 张悦, 刘思夏, 等. GPX4在心血管疾病中的作用及中药干预研究进展[J]. 天津中医药(YANG X T, ZHANG Y, LIU S X, et al. Role of GPX4 in cardiovascular disease and research progress of traditional Chinese medicine intervention [J]. *Tianjin Journal of Traditional Chinese Medicine*), 2023, 40: 258-64.
- [16] XU Y, LI Y, LI J, et al. Ethyl carbamate triggers ferroptosis in liver through inhibiting GSH synthesis and suppressing Nrf2 activation [J]. *Redox Biol*, 2022, 53: 102349.
- [17] ZHANG H L, HU B X, LI Z L, et al. PKC β II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 88-98.
- [18] LU Y, SHAO Y, CUI W, et al. Excessive lipid peroxidation in uterine epithelium causes implantation failure and pregnancy loss [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(4): e2302887.
- [19] GAN B. ACSL4, PUFA, and ferroptosis: new arsenal in anti-tumor immunity [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 128.
- [20] CUI Y, ZHANG Y, ZHAO X, et al. ACSL4 exacerbates ischemic stroke by promoting ferroptosis-induced brain injury and neuro-inflammation [J]. *Brain Behav Immun*, 2021, 93: 312-21.