

网络出版时间: 2023-12-28 11:37:54 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0755.011>

# 类风湿关节炎患者外周血单个核细胞 System Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4 铁死亡通路的表达及其对炎症因子分泌的影响

刘 灿<sup>1,2</sup>, 马武开<sup>2</sup>, 陈昌明<sup>2</sup>, 安 阳<sup>2</sup>, 蒋 总<sup>2</sup>, 黄 海<sup>1,3</sup>

**摘要** 目的 探讨类风湿关节炎(RA)患者外周血单个核细胞(PBMC)胱氨酸/谷氨酸逆转运体(System Xc<sup>-</sup>)/谷胱甘肽(GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)铁死亡通路中相关基因与蛋白的表达及其对炎症因子分泌的影响。方法 纳入RA患者及同期健康体检者各30例,采用Ficoll-hypaque密度梯度离心法分离PBMC,将细胞分为健康对照、RA、铁死亡抑制剂、铁死亡诱导剂组。采用细胞计数试剂盒8(CCK-8)检测细胞活力,流式细胞术FerroOrange荧光探针检测细胞内Fe<sup>2+</sup>相对荧光强度、DHE荧光探针检测细胞内活性氧(ROS)阳性细胞比例,蛋白免疫印迹及实时荧光定量PCR(qPCR)检测核转录因子红系2相关因子(Nrf2)、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)、GPX4蛋白与mRNA的表达,流式细胞术检测细胞上清液中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1、IL-6的含量。结果 与健康对照组比较,RA组PBMC内Fe<sup>2+</sup>浓度和ROS水平升高,Nrf2、SLC7A11、GPX4蛋白和mRNA的表达降低,PBMC上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6的含量升高,差异均有统计学意义。与RA组比较,铁死亡抑制剂组PBMC内Fe<sup>2+</sup>浓度和ROS水平降低,SLC7A11、GPX4蛋白和mRNA的表达升高,Nrf2蛋白的表达升高,PBMC上清液中IL-6的含量降低、TNF- $\alpha$ 的含量升高,差异均有统计学意义。与RA组比较,铁死亡诱导剂组PBMC内ROS水平升高,SLC7A11蛋白和mRNA的表达降低,Nrf2蛋白的表达降低、GPX4蛋白的表达升高,PBMC上清液中TNF- $\alpha$ 、IL-1的含量升高,差异有统计学意义。与铁死亡诱导剂组比较,RA患者PBMC细胞活力降低,差异有统计学意义( $P < 0.0001$ )。结论 RA患者PBMC中存在铁死亡,

抑制或诱导RA患者PBMC铁死亡,将抑制或促进炎症因子分泌。抑制RA患者PBMC铁死亡可能有助于治疗RA。

**关键词** 类风湿关节炎;外周血单个核细胞;铁死亡;System Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4

中图分类号 R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0064-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.011

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种以慢性进行性侵蚀性滑膜炎为主要特征的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>,关节腔内炎症细胞释放炎症因子,以及骨和软骨破坏,最终导致关节退行性变、功能丧失。目前RA的发病机制仍不清楚。2012年,Dixon et al<sup>[2]</sup>首次报道铁死亡是一种Fe<sup>2+</sup>和活性氧(reactive oxygen species, ROS)依赖性的程序性细胞死亡。研究<sup>[3-4]</sup>表明,铁死亡与关节退行性变之间存在联系,当修复导致细胞铁死亡的过氧化脂质时,关节退行性变得以改善。RA患者软骨细胞内Fe<sup>2+</sup>累积可诱发芬顿(Fenton)反应,导致ROS水平升高,形成氧化应激状态,促进炎症因子产生,导致RA滑膜炎和关节破坏过程<sup>[5]</sup>。该研究通过分析RA患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)胱氨酸/谷氨酸逆转运体(cystine/glutamate antiporter system, System Xc<sup>-</sup>)/谷胱甘肽(glutathione, GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)铁死亡通路中相关基因与蛋白表达的变化及其对炎症因子分泌的影响,为探讨铁死亡机制在RA进展中的作用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 病例资料** 研究中RA组来自2022年12月—2023年8月贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科住院或门诊患者,健康对照组来自同期体检的健康人群,两组各30例,并且满足年龄在18~60岁,性别不限,两组人群特征差异无统计学意义。RA诊断标准参照2010年美国风湿病学会和欧洲抗风湿病联盟修订的RA诊断标准<sup>[6]</sup>:年龄在18~60

2023-10-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82274678);贵州省中医风湿免疫病临床研究中心项目(编号:黔科合平台人才(2020)2202);贵州省高等学校中西医结合防治疾病转化医学重点实验室(编号:黔教技(2023)017号);贵州省大学生创新创业训练计划项目(编号:贵中医大创合字(2022)121号)

作者单位:<sup>1</sup> 贵州医科大学医学检验学院临床生物化学与分子生物学教研室,贵阳 550004

<sup>2</sup> 贵州中医药大学第二附属医院风湿免疫科,贵阳 550004

<sup>3</sup> 贵州医科大学附属医院临床检验中心,贵阳 550004

作者简介:刘 灿,女,硕士研究生;

黄 海,男,博士,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: huanghai828@gmc.edu.cn

岁, 疾病活动度 DAS28 评分大于 3.2, 近 3 个月未应用免疫抑制剂或糖皮质激素等可能影响结果的药物, 无合并严重心肝肾疾病、恶性肿瘤、糖尿病等疾病。研究经贵州中医药大学第二附属医院伦理审查(编号: KYW2022032), 患者均签署知情同意书。

**1.1.2 主要试剂**  $\text{Fe}^{2+}$  检测探针—FerroOrange 购自北京同仁生物公司(货号: F374); ROS 检测荧光探针—二氢乙啶(Dihydroethidium, DHE) 购自江苏凯基生物公司(货号: KGAF019); Ficoll 外周血淋巴细胞分离液购自北京索莱宝公司(货号: P8900); 细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自美国 APEXBIO 公司(货号: K101821133); 兔抗人 GPX4 抗体(货号: 381958)、兔抗人核转录因子红系 2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 抗体(货号: 380773) 与兔抗人溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 抗体(货号: 382036) 均购自成都正能生物公司; 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗兔 IgG (Goat anti-Rabbit IgG) 购自武汉普美克公司(货号: PMK-014-090M); PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser(货号: MF949)、Hieff UNICON® Universal Blue qPCR SYBR Green Master Mix(货号: MF013) 与 RNA 提取试剂盒(货号: MF036) 均购自北京聚合美公司; 细胞因子检测试剂盒肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(interleukin, IL) -1、IL-6 购自青岛瑞斯凯尔生物公司(货号: 20230301); 铁抑素-1(ferrostatin-1) (货号: A4371) 和铁死亡诱导剂 Erastin(货号: B1524) 均购自美国 APEXBIO 公司; RPMI-1640 培养基购自美国 GBICO 公司(货号: C11875500BT); 青链霉素双抗购自上海 BI/VivaCell 公司(货号: C3420)。

**1.1.3 主要仪器**  $\text{CO}_2$  细胞培养箱(型号: 3111) 购自美国赛默飞世尔科技有限公司; 超净工作台(型号: SJ-CJ-2D) 购自苏州苏洁净化设备有限公司; 蛋白印迹仪(型号: ChemiDoc™ XRS+)、流式细胞仪(型号: BD FACSCanto II) 购自美国 BD 公司; 酶标仪(型号: 22460iMark)、实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 仪(型号: CFX96TM) 均购自美国 BIO RAD 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本采集及分组** 所有研究对象均空腹静脉抽血 10 ml, 置于 20 IU/ml 的肝素钠抗凝管中。取 5 ml 静脉血用生理盐水 1:1 稀释, 将 10 ml 稀释

的全血缓慢加于 10 ml Ficoll 液面上, 注意保持清晰的界面, 2 000 r/min 离心 20 min, 吸取白膜层加 3 倍体积的生理盐水后再以 1 500 r/min 离心 3 次, 每次 5 min。细胞计数制成  $5 \times 10^5$  个/ml 的细胞悬液, 取 1 ml 细胞悬液接种于 T25 培养瓶, 细胞培养基按照 89% RPMI-1640 培养基 + 10% 胎牛血清 + 1% 青链霉素双抗的比例加入 5 ml 完全培养基。将 PBMC 分为 4 组培养: 健康对照组、RA 组、抑制剂组和诱导剂组。其中, 健康对照组为健康体检人群, 部分 RA 患者构成 RA 组, 两组直接培养 48 h; 抑制剂组为 RA 患者 PBMC 加入  $1 \mu\text{mol/L}$  ferrostatin-1 培养 48 h, 诱导剂组为 RA 患者 PBMC 加入  $10 \mu\text{mol/L}$  Erastin<sup>[7]</sup> 培养 48 h。

**1.2.2 CCK-8 检测细胞活力** 将 4 组细胞浓度调整为  $6 \times 10^4$  /ml 细胞悬液(100  $\mu\text{l}$ /孔) 接种在 96 孔板中, 显微镜下观察使得铺板均匀。在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后, 向板内每个孔中加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 溶液。将 96 孔板放在培养箱中孵育 2 h。使用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度(absorbance, A) 值, 计算细胞活力。细胞活力(%) =  $(A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

**1.2.3 FerroOrange 荧光探针检测细胞内  $\text{Fe}^{2+}$**  将 4 组细胞浓度调整为  $5 \times 10^4$  个/ml, 接种于荧光培养皿中, 在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中过夜培养 24 h 后, 加入浓度为  $1 \mu\text{mol/L}$  的 FerroOrange 工作液  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  过夜培养, 培养后直接进行流式细胞仪检测。利用 FSC 与 SSC 对单个核细胞进行设门, 根据荧光探针激发(EX) 光谱 = 561 nm、发射(EM) 光谱 = 570 ~ 620 nm 选择橙红色荧光通道分析 10 000 个事件数细胞内相对荧光强度。

**1.2.4 DHE 荧光探针检测细胞内 ROS** 将 4 组培养瓶中培养基全部吸取到 15 ml 的无菌离心刻度管中, 加入 3 ml 胰酶将培养瓶中的贴壁细胞消化 5 min 左右, 取出用枪头慢慢吹打, 待贴壁细胞完全消化后吸出 1 500 r/min 离心 10 min, 留取沉淀细胞, 吸弃上清液。用流式管将消化好的细胞用生理盐水重悬为  $5 \times 10^4$  /ml, 1 ml 单个核细胞重悬液加入 20  $\mu\text{l}$  0.5 mmol/L DHE, 使其终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$ , 避光、室温孵育 60 min 后进行流式细胞仪检测。利用 FSC 与 SSC 对单个核细胞进行设门, 分析橙红色荧光通道内 10 000 个事件数阳性细胞比例。

**1.2.5 蛋白免疫印迹检测 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达** 经不同组别培养基干预细胞 48 h 后裂解细胞, 按试剂说明书提取总蛋白, 利用蛋白质定量试

剂盒定量各组蛋白浓度,归一各组总蛋白质量为 30 μg,10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,400 mA 转膜,室温脱脂奶粉封闭 1 h,分别与 Nrf2 (1 : 500)、SLC7A11 (1 : 500)、GPX4 (1 : 500) 和 GAPDH (1 : 500) 在 4 ℃ 下孵育过夜。随后,HRP 标记的二抗(1 : 5 000) 在室温下孵育 1 h,化学发光超敏显色试剂盒显影观察并分析蛋白质条带的灰度值。以 GAPDH 作为内参,Image J 软件量化目标蛋白的表达。

**1.2.6 qPCR 检测 Nrf2、SLC7A11、GPX4 的 mRNA 表达** 将 4 组细胞用胰酶消化后,离心后弃去上清液,按照 RNA 提取步骤提取 RNA,检测其浓度和纯度后,按 RNA 反转录试剂盒的进程逆转录,随后将 cDNA 样品在 95 ℃ 下初始变性 30 s,然后:95 ℃、15 s、60 ℃、15 s 和 72 ℃、60 s,进行 40 个循环。使用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法评估 mRNA 的相对表达水平。以 GAPDH 作为内部对照。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 目的基因的引物

目的基因	引物序列(5'-3')
Nrf2	F: TTCCCGGTCACATCGAGAG
	R: TCCTGTTGCATACCGTCTAAATC
SLC7A11	F: GGTCCATTACCAGCTTTTGTACG
	R: AATGTAGCGTCCAAATGCCAG
GPX4	F: AGGTTGCCACATTCCCAA
	R: ACTGACTGAAACGTAGCCGA
GAPDH	F: GGAGCGAGATCCCTCCAAAT
	R: GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

**1.2.7 流式细胞仪检测细胞上清液中 TNF-α、IL-1、IL-6 的表达** 将经各组别培养基干预,浓度为 5 × 10<sup>5</sup>/ml 单个核细胞细胞接种于 6 孔板中培养 24 h 后,收集细胞上清液。严格按照细胞因子检测试剂盒说明书进行操作,将 6 个浓度的校准品,根据 PE 荧光强度与浓度呈正相关关系制作标准曲线,样本中细胞因子荧光强度通过标准曲线给赋值,转化为浓度从而得到样品中的细胞因子含量。

**1.3 统计学处理** 利用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,图片使用 GraphPad Prism6.01 软件制作。所有数据进行方差齐性和正态分布检验,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间的比较采用 One-way ANOVA,其中两两比较采用 LSD 法或 Tamhane'T2 法,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 PBMC 活力检测结果** 使用 CCK-8 法检测细

胞活力,RA 组与健康对照组、抑制剂组比较,细胞活力差异无统计学意义;诱导剂组细胞活力高于健康对照组、RA 组、抑制剂组,差异有统计学意义( $P < 0.000 1$ )。见图 1。

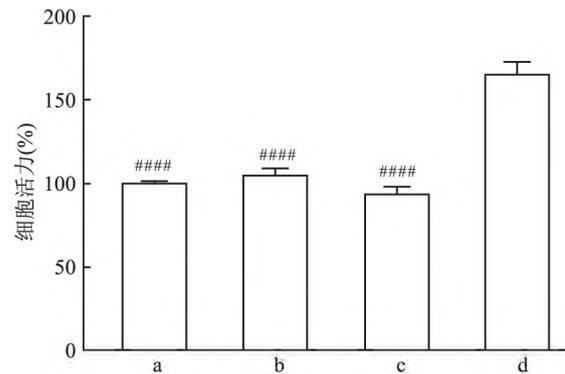


图 1 CCK-8 法检测各组细胞活力结果(n=5)

a: 健康对照组; b: RA 组; c: 抑制剂组; d: 诱导剂组; 与诱导剂组比较: ####  $P < 0.000 1$

**2.2 PBMC 内 Fe<sup>2+</sup> 浓度** 流式细胞术检测结果显示:与健康对照组比较,RA 组 PBMC 内 Fe<sup>2+</sup> 浓度升高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );与 RA 组比较,抑制剂组 PBMC 内 Fe<sup>2+</sup> 浓度降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );诱导剂组与 RA 组比较,差异无统计学意义。见图 2。

**2.3 PBMC 内 ROS 水平** 流式细胞术检测结果显示:与健康对照组比较,RA 组 PBMC 内的 ROS 水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.000 1$ );与 RA 组比较,抑制剂组 ROS 水平降低,诱导剂组 ROS 水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.000 1$ );与抑制剂组比较,诱导剂组 ROS 水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.000 1$ )。见图 3。

**2.4 PBMC 内 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达情况** 蛋白免疫印迹检测结果显示:与健康对照组比较,RA 组 PBMC 内 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白的表达降低,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.000 1, P < 0.000 1$ );与 RA 组比较,抑制剂组 PBMC 内 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白的表达都升高,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.05, P < 0.01$ );与 RA 组比较,诱导剂组 PBMC 内 Nrf2、SLC7A11 蛋白的表达降低,GPX4 蛋白的表达升高,差异有统计学意义( $P < 0.001, P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 4。

**2.5 细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA 表达情况** qPCR 检测结果显示,与健康对照组比较,RA 组 PBMC 内 Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA 的表达降低,差异有统计学意义( $P < 0.05, P < 0.000 1, P < 0.01$ );

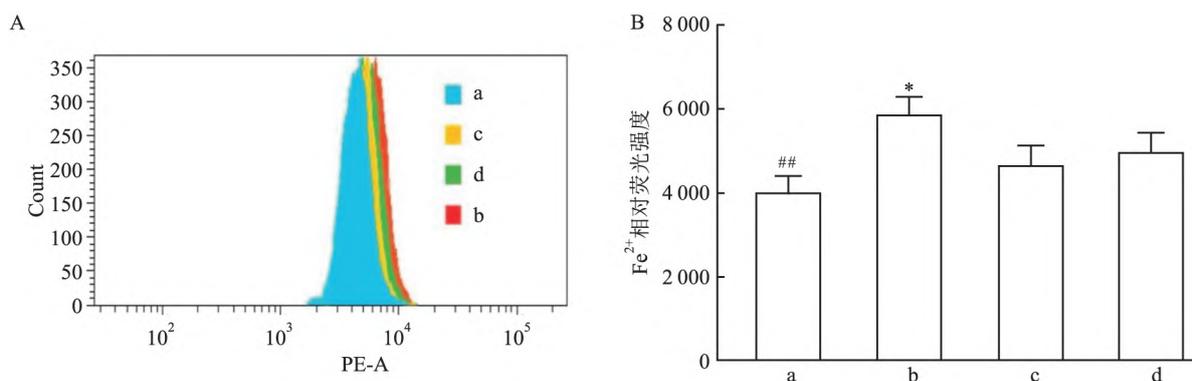


图2 流式细胞术检测各组细胞内 Fe<sup>2+</sup> 相对荧光强度( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

A: 流式细胞术定量分析; B: 各组细胞内 Fe<sup>2+</sup> 相对荧光强度; a: 健康对照组; b: RA 组; c: 抑制剂组; d: 诱导剂组; 与 RA 组比较: ##  $P < 0.01$ ; 与抑制剂组比较: \*  $P < 0.05$

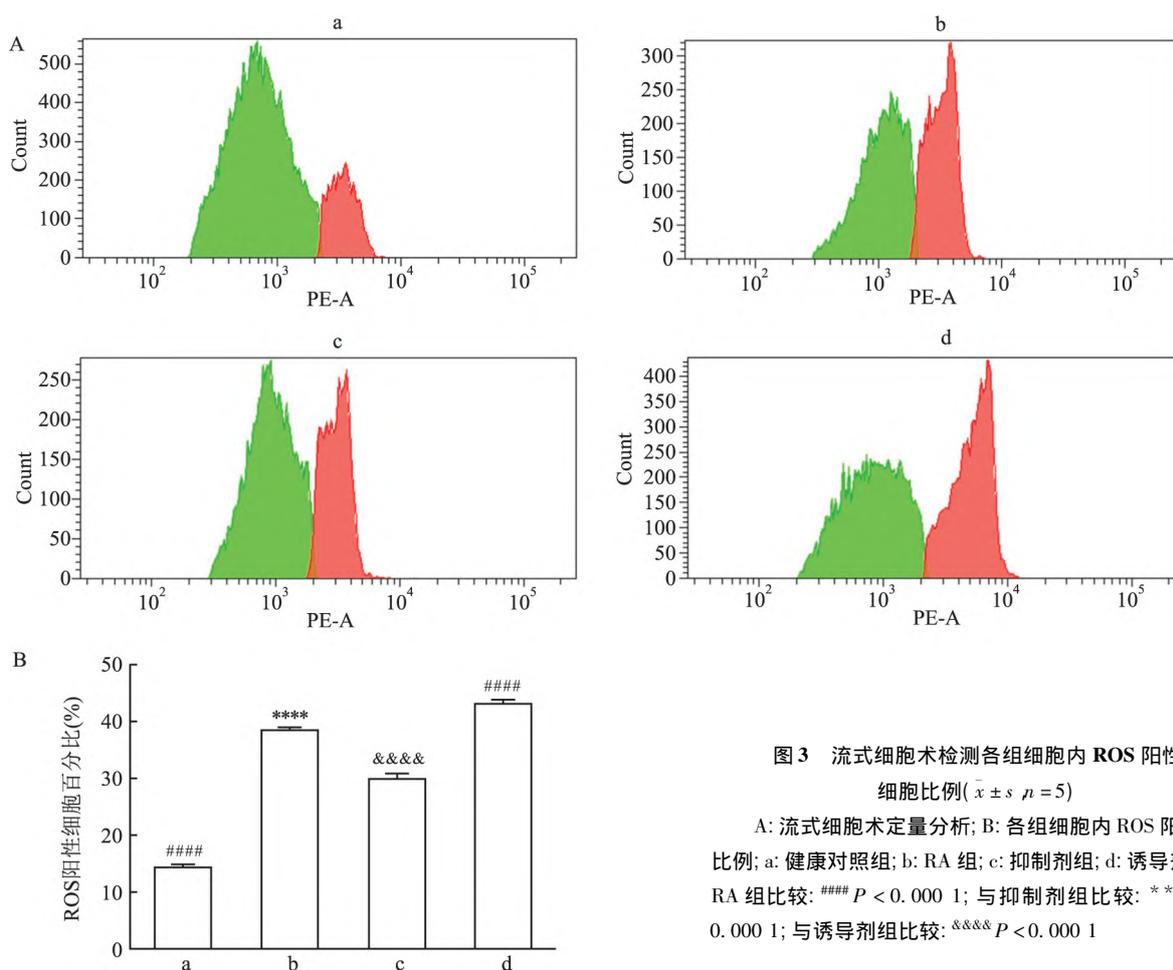


图3 流式细胞术检测各组细胞内 ROS 阳性细胞比例( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

A: 流式细胞术定量分析; B: 各组细胞内 ROS 阳性细胞比例; a: 健康对照组; b: RA 组; c: 抑制剂组; d: 诱导剂组; 与 RA 组比较: ####  $P < 0.0001$ ; 与抑制剂组比较: \*\*\*\*\*  $P < 0.0001$ ; 与诱导剂组比较: &&&&  $P < 0.0001$

与 RA 组比较,抑制剂组 PBMC 内 *SLC7A11*、*GPX4* mRNA 的表达明显升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),而 *Nrf2* mRNA 表达差异无统计学意义;与 RA 组比较,诱导剂组 PBMC 内 *SLC7A11* mRNA 的表达降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),*Nrf2*、*GPX4* mRNA 表达差异无统计学意义。见图 5。

**2.6 细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 分泌情况**  
流式细胞术检测结果显示:与健康对照组比较,RA 组、抑制剂组、诱导剂组 PBMC 上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 的含量都升高,差异有统计学意义 ( $P < 0.0001$ )。与 RA 组比较,抑制剂组 PBMC 上清液中 IL-6 的含量降低、TNF- $\alpha$  的含量升高,差异有统

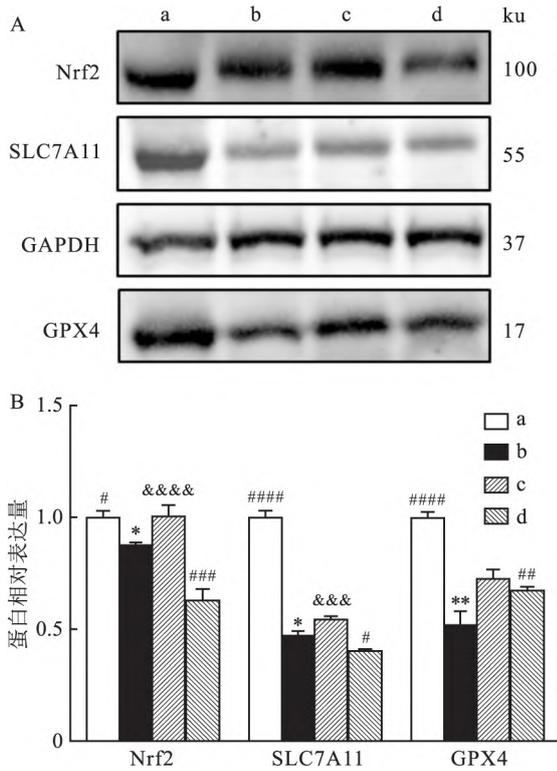


图4 蛋白免疫印迹检测各组细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

A: 各指标条带图; B: Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白相对表达量; a: 健康对照组; b: RA 组; c: 抑制剂组; d: 诱导剂组; 与 RA 组比较: # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , #### $P < 0.0001$ ; 与抑制剂组比较: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与诱导剂组比较: &&& $P < 0.001$ , &&&& $P < 0.0001$

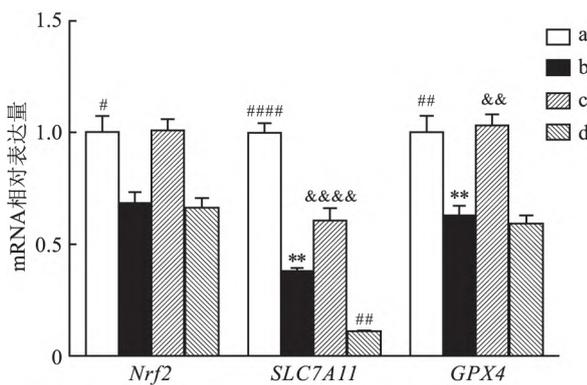


图5 qPCR 检测各组细胞 Nrf2、SLC7A11、GPX4 mRNA 表达( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

a: 健康对照组; b: RA 组; c: 抑制剂组; d: 诱导剂组; 与 RA 组比较: # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.0001$ ; 与抑制剂组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与诱导剂组比较: && $P < 0.01$ , &&&& $P < 0.0001$

计学意义( $P < 0.0001, P < 0.01$ ) ,但 IL-1 的含量差异无统计学意义。与 RA 组比较,诱导剂组 PBMC 上清液中仅 TNF- $\alpha$ 、IL-1 的含量升高,差异有统计学意义( $P < 0.0001$ )。见图 6。

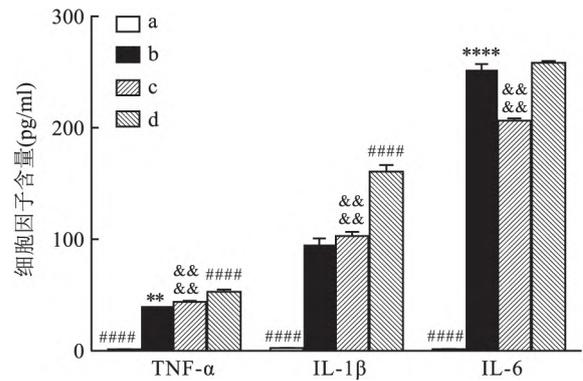


图6 流式细胞术检测各组细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 含量( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

a: 健康对照组; b: RA 组; c: 抑制剂组; d: 诱导剂组; 与 RA 组比较: #### $P < 0.0001$ ; 与诱导剂组比较: &&&& $P < 0.0001$ ; 与抑制剂组比较: \*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$

### 3 讨论

RA 是一种常见的以慢性滑膜增生、炎症因子浸润为特点的慢性炎症性自身免疫性疾病。目前认为 RA 是由于不明抗原介导的免疫反应启动,产生趋化因子诱导 RA 患者 PBMC 向滑膜浸润<sup>[8]</sup>。PBMC 是一群包含多种免疫细胞的混合物,并具有在生理和病理条件下分化为各种类型免疫细胞的潜力<sup>[9]</sup>。而 RA 疾病发展过程中炎症细胞分泌促炎因子发挥着非常重要的作用,因此,对 PBMC 的研究或许更能反映 RA 患者的整体病理状况。

铁死亡是一种铁依赖的新型细胞死亡形式<sup>[10]</sup>,在形态学、生物化学和遗传学上均与其他类型的细胞程序性死亡如凋亡、自噬等有明显差别。研究<sup>[11]</sup>表明,RA 患者滑膜成纤维细胞的异常激活,可能是通过 PI3K-AKT-mTOR 信号传导来抑制滑膜成纤维细胞铁死亡,可通过诱导滑膜成纤维细胞铁死亡寻找治疗 RA 的策略;在软骨细胞方面,研究<sup>[5]</sup>表明,RA 患者关节软骨的破坏可能与软骨细胞发生铁死亡有关,由此揭示了铁死亡在 RA 患者不同细胞中扮演的作用不尽相同。目前,铁死亡与免疫细胞之间的关系报道甚少,该研究分析铁死亡相关基因与蛋白在 PBMC 中的表达及其对炎症因子的影响,以探讨铁死亡在 RA 发生发展过程中的作用。

铁死亡可诱导炎症因子的表达增加<sup>[12]</sup>,而炎症因子在 RA 患者体内表达增加可导致疾病的进展。例如,IL-1 是破坏 RA 关节软骨最重要的促炎细胞因子之一<sup>[13]</sup>,能刺激人滑膜细胞中磷脂酶 A2

(PLA2) 和环氧酶-2(COX-2) 的表达, 分解卵磷脂膜产生花生四烯酸, 导致前列腺素(PGE2) 和胶原酶的合成和释放, 引发滑膜炎和软骨基质崩解。IL-1 $\beta$  是 IL1 家族中重要的成员, 可诱导多种促炎因子与趋化因子的表达, 如 IL-6 等; IL-6 是一种重要的促炎因子, 是一类具有广泛作用的炎症细胞因子, 它对适应性和先天性免疫细胞都有影响<sup>[14]</sup>; 此外, TNF- $\alpha$  刺激滑膜细胞和软骨细胞, 减少破骨细胞的糖蛋白合成, 增加糖蛋白降解, 并产生胶原酶和其他中性蛋白酶释放骨钙, 导致骨和软骨的破坏<sup>[15]</sup>。

System Xc-/GSH/GPX4 铁死亡通路为铁死亡的经典途径, System Xc-是由二硫键连接的轻链亚基(xCT、SLC7A11) 和重链亚基(CD98hc、SLC3A2) 组成, 是细胞内重要的抗氧化体系。System Xc-可将细胞外胱氨酸转移至细胞内用于 GSH 合成, GSH 是脂质过氧化物清除剂, GPX4 生成的主要底物, GSH 缺乏会导致 GPX4 失活<sup>[16]</sup>, 而 GPX4 是细胞内唯一用于脂质过氧化物还原的谷胱甘肽过氧化物酶; Nrf2 是一种主要的转录因子, 与铁死亡相关的酶和蛋白质均受 Nrf2 的转录调节, 上调 Nrf2 的表达可维持细胞内 GSH 水平和上调 GPX4 的活性, 抑制细胞铁死亡<sup>[17]</sup>。Fe<sup>2+</sup> 在铁死亡中扮演着关键性的角色<sup>[3]</sup>, 由于 Fe<sup>2+</sup> 的不稳定性和高反应活性, Fe<sup>2+</sup> 通过芬顿反应产生羟基(-OH) 或烷氧基(RO-) 自由基与细胞膜、质膜中的多不饱和脂肪酸反应导致细胞膨胀/起泡, 产生大量的细胞内 ROS, ROS 可促进基质金属蛋白酶 13(MMP-13) 的活化, 抑制软骨蛋白多糖的合成, 促进软骨细胞凋亡<sup>[18]</sup>, 最终导致软骨破坏和骨侵蚀。本研究结果显示, 与健康对照组比较, RA 患者 PBMC 内具有 Fe<sup>2+</sup> 沉积, ROS 水平升高, Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白和 mRNA 的表达降低, 说明细胞内产生致死性脂质过氧化物和 ROS 增加而抵御和清除其能力降低, 并促进了炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 的分泌; 加入铁死亡诱导剂干预 RA 患者 PBMC, 结果显示, TNF- $\alpha$ 、IL-1 的分泌明显升高, Nrf2、SLC7A11 蛋白表达减少但 GPX4 蛋白表达升高, 说明促进铁死亡细胞内抗氧化物质表达减少, 炎症因子分泌增加; 而加入铁死亡抑制剂后 IL-6 的分泌明显降低, Nrf2、SLC7A11、GPX4 蛋白表达都升高, 但 TNF- $\alpha$  的分泌升高, 说明抑制铁死亡细胞内抗氧化物质表达增加, 炎症因子分泌减少。其中, 抑制剂组 TNF- $\alpha$  升高可能是由于分析例数不够、实验误差亦或是 ferrostatin-1 作用机制导致, 有待下一步验证; 而诱导剂组 GPX4 蛋白表达升高可能是因

为 ROS 水平升高, 细胞发挥防御机制应激性使具有抗氧化作用的 GPX4 蛋白表达升高。研究<sup>[7]</sup>指出, Erastin 诱导的脂质过氧化通过抑制骨形态发生蛋白(BMPs) 信号传导可促进 PBMC 增殖, 而不是抑制其增殖, 本研究也证实了这点, 其他铁死亡诱导剂是否具有类似的功能, 及其具体机制有待下一步验证。可在增大分析例数的同时加做动物实验, 进一步观察在 RA 模型体内不同细胞与铁死亡的联系, 以及如何靶向平衡不同细胞需诱导和抑制铁死亡的挑战。

## 参考文献

- [1] Otón T, Carmona L. The epidemiology of established rheumatoid arthritis[J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2019, 33( 5): 101477.
- [2] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149( 5): 1060-72.
- [3] Balogh E, Paragh G, Jeney V. Influence of iron on bone homeostasis[J]. *Pharmaceuticals ( Basel)*, 2018, 11( 4): 107.
- [4] Yao X, Sun K, Yu S, et al. Chondrocyte ferroptosis contribute to the progression of osteoarthritis[J]. *J Orthop Translat*, 2021, 27: 33-43.
- [5] Zhou R, Chen Y, Li S, et al. TRPM7 channel inhibition attenuates rheumatoid arthritis articular chondrocyte ferroptosis by suppression of the PKC $\alpha$ -NOX4 axis[J]. *Redox Biol*, 2022, 55: 102411.
- [6] Kay J, Upchurch K S. ACR/EULAR 2010 rheumatoid arthritis classification criteria[J]. *Rheumatology ( Oxford)*, 2012, 51 Suppl 6: vi5-9.
- [7] Wang D, Xie N, Gao W, et al. The ferroptosis inducer erastin promotes proliferation and differentiation in human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503( 3): 1689-95.
- [8] 孙文武. NF- $\kappa$ B 反义核苷酸抑制 RA 患者外周血单个核细胞趋化作用研究[D]. 大连: 大连医科大学, 2004.
- [9] Zhang M, Huang B. The multi-differentiation potential of peripheral blood mononuclear cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2012, 3( 6): 48.
- [10] 王灿雨, 刘晓龙, 孙玉, 等. 铁死亡及其在神经退行性疾病中的研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58( 10): 1801-6.
- [11] Cheng Q, Chen M, Liu M, et al. Semaphorin 5A suppresses ferroptosis through activation of PI3K-AKT-mTOR signaling in rheumatoid arthritis[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13( 7): 608.
- [12] Chang S, Tang M, Zhang B, et al. Ferroptosis in inflammatory arthritis: a promising future[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 955069.
- [13] 李梅, 蒋锦梅, 欧大明, 等. 白术多糖对类风湿性关节炎大鼠的抗炎作用及 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. *安徽医科*

- 大学学报, 2022, 57(4): 552-7.
- [14] Pandolfi F, Franza L, Carusi V, et al. Interleukin-6 in rheumatoid arthritis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5238.
- [15] Szondy Z, Pallai A. Transmembrane TNF-alpha reverse signaling leading to TGF-beta production is selectively activated by TNF targeting molecules: therapeutic implications [J]. *Pharmacol Res*, 2017, 115: 124-32.
- [16] Basit F, Van Oppen L M, Schöckel L, et al. Mitochondrial complex I inhibition triggers a mitophagy-dependent ROS increase leading to necroptosis and ferroptosis in melanoma cells [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2716.
- [17] Alcaraz M J, Ferrándiz M L. Relevance of Nrf2 and heme oxygenase-1 in articular diseases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 157: 83-93.
- [18] Bolduc J A, Collins J A, Loeser R F. Reactive oxygen species, aging and articular cartilage homeostasis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 132: 73-82.

## The expression of System Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4 ferroptosis pathway in peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients and its effect on the secretion of inflammatory factors

Liu Can<sup>1,2</sup>, Ma Wukai<sup>2</sup>, Chen Changming<sup>2</sup>, An Yang<sup>2</sup>, Jiang Zong<sup>2</sup>, Huang Hai<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Clinical Biochemistry and Molecular Biology, School of Clinical Laboratory Science, Guizhou Medical University, Guiyang 550004; <sup>2</sup>Dept of Rheumatology and Immunology, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Chinese Medicine, Guiyang 550004; <sup>3</sup>Center for Clinical Laboratory, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

**Abstract Objective** To investigate the expression of genes and proteins in the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cystine/glutamate antiporter system (System Xc<sup>-</sup>)/glutathione (GSH)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) ferroptosis pathway and its influence on inflammatory factors in patients with rheumatoid arthritis (RA). **Methods** 30 patients with RA and 30 healthy participants were enrolled. PBMCs were isolated using Ficoll-hypaque density gradient centrifugation. The cells were categorized into the healthy control, RA, ferroptosis inhibitor, ferroptosis inducer group. The cell viability was checked using the cell counting kit-8 (CCK-8) method. Intracellular Fe<sup>2+</sup> relative fluorescence intensity and reactive oxygen species (ROS) levels were detected using the FerroOrange and Dihydroethidium (DHE) fluorescent probes, respectively. Western blot and real-time quantitative PCR (qPCR) detected the expression of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), GPX4 proteins and mRNA. And the flow cytometry quantified the levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin (IL)-1, and IL-6 in the supernatant of each cell group. **Results** Compared to the healthy control group, the RA group showed a significantly increased Fe<sup>2+</sup> concentration and elevated ROS levels, reduced expression of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 proteins and mRNA, and increased contents of TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6 in PBMC supernatant, and the differences were statistically significant. The concentration of Fe<sup>2+</sup> and ROS levels in the inhibitor group were lower than those in the RA group, the proteins expressions of Nrf2, SLC7A11 and GPX4 increased, the mRNA expressions of SLC7A11 and GPX4 increased, the content of IL-6 in the PBMC supernatant decreased but the content of TNF- $\alpha$  increased, and the differences were statistically significant. In contrast, the inducer group, when compared to the RA group, displayed increased ROS levels, reduced expression of SLC7A11 protein and mRNA and decreased expression of Nrf2 protein, and the contents of TNF- $\alpha$  and IL-1 in the PBMC supernatant increased, but the expression of GPX4 protein increased, and the differences were statistically significant. The inducer group, compared to the RA group, showed increased cell viability, and the difference was statistically significant ( $P < 0.0001$ ). **Conclusion** The presence of ferroptosis in PBMC in RA patients, inhibiting or inducing PBMC ferroptosis in RA patients, will inhibit or promote the secretion of inflammatory factors. Inhibition of PBMC ferroptosis in RA patients may be helpful in the treatment of RA.

**Key words** rheumatoid arthritis; peripheral blood mononuclear cells; ferroptosis; System Xc<sup>-</sup>/GSH/GPX4