

Erastin 通过 MAPK 介导的氧化应激信号通路诱导肺成纤维细胞铁死亡

王沂然¹, 张诗捷¹, 关予博², 李渺渺², 蔡汝忆³, 武琦¹

摘要 目的 探究 Erastin 对肺成纤维细胞铁死亡的作用机制。方法 向小鼠肺成纤维细胞(C57/B6-L)中加入不同浓度的铁死亡诱导剂 Erastin,通过细胞计数试剂(CCK-8)检测细胞活性、荧光显微镜观察氧化应激水平,蛋白质印迹法(Western blot)检测丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路相关蛋白表达,之后分别加入 p38 和人细胞外信号调节激酶(ERK)的抑制剂 SB203580 和 U0126,进一步验证 Erastin 诱导肺成纤维细胞铁死亡的作用机制。结果 Erastin 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 药物浓度时,能够明显诱导肺成纤维细胞铁死亡,同时伴有氧化应激表达增强,此外 MAPK 通路中的 p38 和 ERK 蛋白磷酸化水平升高($P < 0.05$)。而在加入 SB203580、U0126 抑制剂后,肺成纤维细胞氧化应激水平明显下降,同时细胞的活性明显升高($P < 0.05$)。结论 Erastin 能够诱导肺成纤维细胞铁死亡,其作用机制可能与 MAPK 信号通路介导的氧化应激有关。

关键词 肺纤维化;肺成纤维细胞;铁死亡;活性氧;MAPK

信号通路

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)05-0820-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.05.012

肺纤维化是一种由于肺泡外基质蛋白过度沉积导致的肺部不可逆的结构和功能改变的疾病,表现为纤维化重构和肺泡破坏^[1]。在肺泡和内皮细胞损伤后,可释放多种细胞因子,在这些细胞因子刺激下,肺成纤维细胞可被激活增殖并分化为肌成纤维细胞,这可进一步导致肺纤维化的加重^[2]。通过各种方式诱导肺成纤维细胞死亡,可能为肺纤维化的治疗带来新的突破。

铁死亡是一种新发现的调节细胞死亡类型,主要机制为铁积聚过多导致氧化应激水平增加,进而引起细胞死亡。目前研究^[3]表明铁死亡与肺纤维化疾病息息相关。铁死亡在肺纤维化中的作用也逐渐得到了证实,有研究^[4]表明,肺纤维化患者肺组织切片和博来霉素诱导的肺纤维化小鼠肺组织中的铁积累均显著增加,铁的沉积程度与肺纤维化严重程度呈明显正相关。目前针对诱导肺成纤维细胞铁死亡的研究较少,且其作用机制仍不明确。因此,该实验探究 Erastin 诱导肺成纤维细胞铁死亡的作用机制,以期对肺纤维化发病机制和药物开发的探索

2024-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82104624);江苏省高等学校自然科学基金面上项目(编号:21KJB320003);江苏省高校大学生创新创业重点项目(编号:202210313048Z)

作者单位:¹徐州医科大学生理学教研室,徐州 221004

²徐州医科大学病理生理学教研室,徐州 221004

³徐州医科大学第一临床医学院,徐州 221004

作者简介:王沂然,男,硕士研究生;

武琦,男,博士,硕士生导师,责任作者,E-mail:wuqi@xzhmu.edu.cn

(GRP78) were detected by Western blot. **Results** miR-34a-5p targeted Notch1 ($P < 0.05$); compared with Control group, the expression level of miR-34a-5p, apoptosis rate and protein expressions of ATF6, IRE1, PERK and GRP78 in H/R group increased, while the cell survival rate and Notch1 mRNA and protein expressions decreased ($P < 0.05$). Compared with H/R group and mimic NC group, miR-34a-5p expression, apoptosis rate, and protein expressions of ATF6, IRE1, PERK and GRP78 in mimic group increased, while cell survival rate and Notch1 mRNA and protein expressions decreased ($P < 0.05$). Compared with H/R group and inhibitor NC group, the expression of miR-34a-5p, apoptosis rate and protein expressions of ATF6, IRE1, PERK and GRP78 decreased in inhibitor group, while cell survival rate and Notch1 mRNA and protein expressions increased ($P < 0.05$). **Conclusion** miR-34a-5p can inhibit the apoptosis of H/R human cardiomyocytes, possibly through the targeted inhibition of Notch1-mediated endoplasmic reticulum stress.

Key words hypoxia/reoxygenation; endoplasmic reticulum stress; myocardial cells; miR-34a-5p; Notch1

带来新的突破。

1 材料与方法

1.1 细胞来源 小鼠肺成纤维细胞(C57/B6-L)购自哈尔滨丰润生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂 胎牛血清(货号 1600046)购自美国 Gibco 公司;DMEM 培养基(货号 D5796)及 U0126 抑制剂(货号 662005)购自美国 Sigma 公司、N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteinamide, NAC)(货号 A7250)、胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA) 消化液(货号 C0201)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(货号 S0033)、二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)超氧化物阴离子荧光探针(货号 S0063)及蛋白免疫印迹试验(Western blot)相关试剂均购自上海碧云天生物有限公司;细胞计数试剂盒(cell counting Kit-8, CCK-8)(货号 MA0218-10)购自大连美仑生物技术有限公司;Erastin 铁死亡诱导剂(货号 571203-78-6)及 SB 203580 抑制剂(货号 HY-10256)购自美国 MCE 公司;一抗 Phospho-p44/42 p-ERK(Thr202/Tyr204, 货号 4370)、p44/42 细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)(137F5, 货号 4695)、Phospho-p38(Thr180/Tyr182, 货号 4511)、p38(D13E1, 货号 54470)、Phospho-JNK c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)(Thr183/Tyr185, 货号 4695)、JNK(货号 9252)、内参 β -actin(13E5, 货号 4970)均购自美国 CST 公司。

1.3 细胞培养 采用 C57/B6-L 细胞,使用 1% 的双抗溶液和 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基培养细胞,将细胞置于温度 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度的细胞培养箱中,间隔 2~3 d 进行传带,传代比例为 1:2。

1.4 CCK-8 细胞活性检测 使用细胞活性检测试剂盒(CCK-8)检测细胞活性。将肺成纤维细胞按 6×10^4 个/ml 的密度接种在 96 孔板中,继续孵育 24 h。然后将细胞按照实验设计分组,给与不同浓度的 Erastin 孵育或 Erastin 与 SB 203580、U0126 共同孵育 24 h。使用 10% 的 CCK-8 工作液孵育 1.5 h,通过酶标仪(Thermo)检测在 450 nm 处的吸光度值。

1.5 活性氧检测 通过 Reactive Oxygen Species Assay Kithe 和 Dihydroethidium 染色试剂盒检测细胞内 ROS/O₂⁻ 的变化。将肺成纤维细胞密度调整至 6×10^4 个/ml,按照 2 ml/孔接种在 6 孔板,继续培养

24 h。然后将细胞按照实验设计分组,给与不同浓度的 Erastin 孵育或 Erastin 与 SB 203580、U0126 共同孵育 4 h。将荧光探针按照 1:1 000 比例稀释后,加入到细胞中,避光孵育 30 min,弃去培养基,PBS 清洗 3 次后,通过倒置荧光显微镜(Olympus IX73*)拍照,绿色 480 nm,红色 550 nm。

1.6 Western blot 实验 细胞经过不同的药物孵育后,使用含有蛋白酶抑制剂的冰冷 RIPA 裂解缓冲液进行裂解,提取总蛋白。使用 BCA 蛋白质检测试剂盒测定蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白进行电泳,转膜,将蛋白转印到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜,然后用 5% 脱脂牛奶封闭 45 min。一抗(1:1 000)4 °C 下孵育过夜, TBST 清洗后,二抗(1:2 000)室温孵育 2 h 后再次清洗,化学曝光。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异的比较采用 *t* 检验,多组之间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Erastin 对肺成纤维细胞铁死亡的影响 将不同浓度的 Erastin 加入到肺成纤维细胞中,结果显示细胞出现了不同程度的死亡。如图 1 所示,通过 CCK-8 实验所得数据以及根据半数抑制,Erastin 诱导肺成纤维细胞铁死亡的最适浓度为 100 μ mol/L ($P < 0.01$, $F = 207.14$),此浓度为后续实验提供了基础。

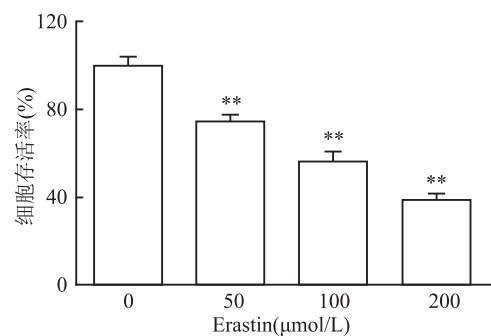


图1 CCK-8 检测 Erastin 诱导肺成纤维细胞铁死亡与 Erastin 0 μ mol/L 组比较: ** $P < 0.01$

2.2 Erastin 对肺成纤维细胞氧化应激的影响 目前研究认为,氧化应激可能参与到细胞铁死亡的过程。为确定 Erastin 诱导肺成纤维细胞铁死亡是否与氧化应激有关,加入 ROS/O₂⁻ 荧光探针检测细胞氧化应激水平。如图 2 所示,分别在 0、1、2、4 h 加

入 100 μmol/L 的 Erastin 后,绿色荧光显示的 ROS ($P < 0.01, F = 165.95$)和红色荧光显示的 O_2^- ($P < 0.01, F = 31.54$)荧光强度明显增强,这表明 Erastin 诱导肺成纤维细胞铁死亡可能与氧化应激有关。

2.3 Erastin 对肺成纤维细胞 MAPK 信号通路的影响 目前研究表明,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路在调节氧化应激方面发挥着重要作用。为验证这一结论,在加入 Erastin 后在不同时间段观察 MAPK 通路中的关键蛋白 p38、ERK、JNK 表达。如图 3 所示,MAPK 通路中 p38 蛋白($P < 0.05$ 或 $P < 0.01, F = 6.20$)和 ERK 蛋白磷酸化水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01, F = 3.51$)显著升高,而 JNK 则无明显的变化。这表明 Erastin 诱导肺成纤维细胞氧化应激损伤可能与 MAPK 通路中 p38 信号通路和 ERK 信号通路。

2.4 SB203580 和 NAC 对 Erastin 效果的影响 为进一步明确 p38 的作用机制,加入了 p38 的抑制剂 SB203580 进行验证。如图 4A 所示,镜下可见加入 Erastin 肺成纤维细胞出现了大量的死亡,而在此基础上加入 SB203580 后细胞的活性明显增加,图

4B 的 CCK-8 实验也验证这一结果($P < 0.01, F = 47.46$)。为验证 p38 的抑制剂 SB203580 的作用,使用 Western blot 方法进行验证,如图 4C 所示加入 p38 抑制剂后,p38 蛋白磷酸化水平降低,表明该抑制剂可能通过 p38 信号通路逆转肺成纤维细胞铁死亡。为验证 SB203580 是否通过氧化应激发挥作用,在此基础上加入了经典抗氧化剂 NAC 作为对照,图 4D-F 结果显示 p38 抑制剂和经典抗氧化剂 NAC 抑制了 Erastin 诱导的 ROS ($P < 0.01, F = 50.00$)和 O_2^- ($P < 0.01, F = 40.26$)在肺成纤维细胞中的表达。以上研究表明 p38 在 Erastin 诱导的肺成纤维细胞中发挥着重要的作用,其作用机制可能是与调节氧化应激水平有关。

2.5 U0126 和 NAC 对 Erastin 效果的影响 如图 5A 和 5B 所示,当加入了 ERK 的抑制剂 U0126 之后,Erastin 诱导的肺成纤维细胞铁死亡的水平明显降低,细胞活性显著升高($P < 0.01, F = 50.59$)。此外,图 5C 所示,Western blot 结果显示加入 U0126 后,ERK 蛋白磷酸化水平降低,表明该抑制剂可能通过 ERK 信号通路逆转肺成纤维细胞铁死亡。

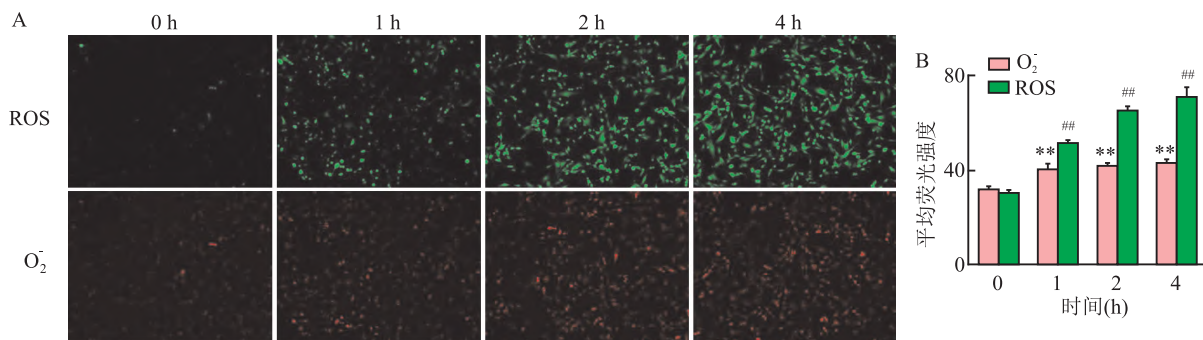


图 2 Erastin 对肺成纤维细胞氧化应激的影响

A: ROS/O₂⁻ 荧光探针检测细胞氧化应激水平 ×100; B: 荧光强度统计结果; 与 0 h O₂⁻ 组比较: ** $P < 0.01$; 与 0 h ROS 组比较: ## $P < 0.01$

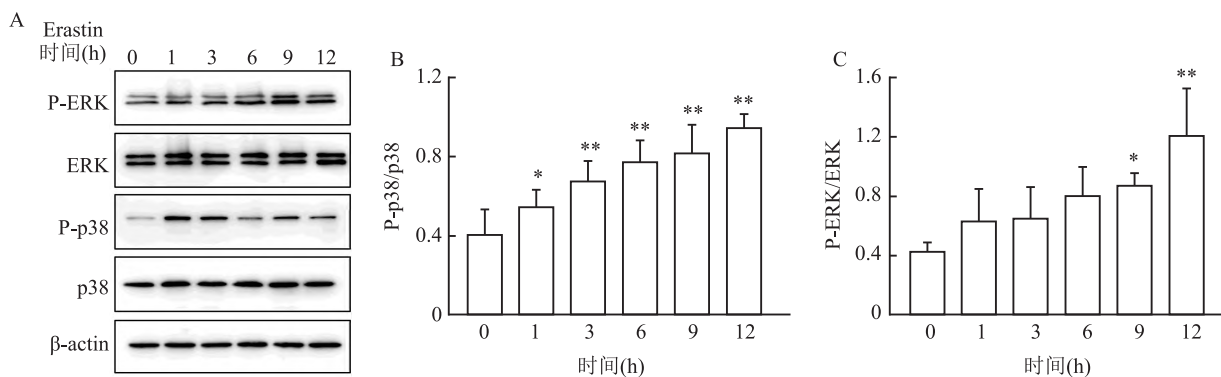


图 3 MAPK 相关蛋白表达

A: Western blot 检测 MAPK 相关蛋白的表达; B: P-p38 蛋白相对表达量; C: P-ERK 蛋白相对表达量; 与 0 h 比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

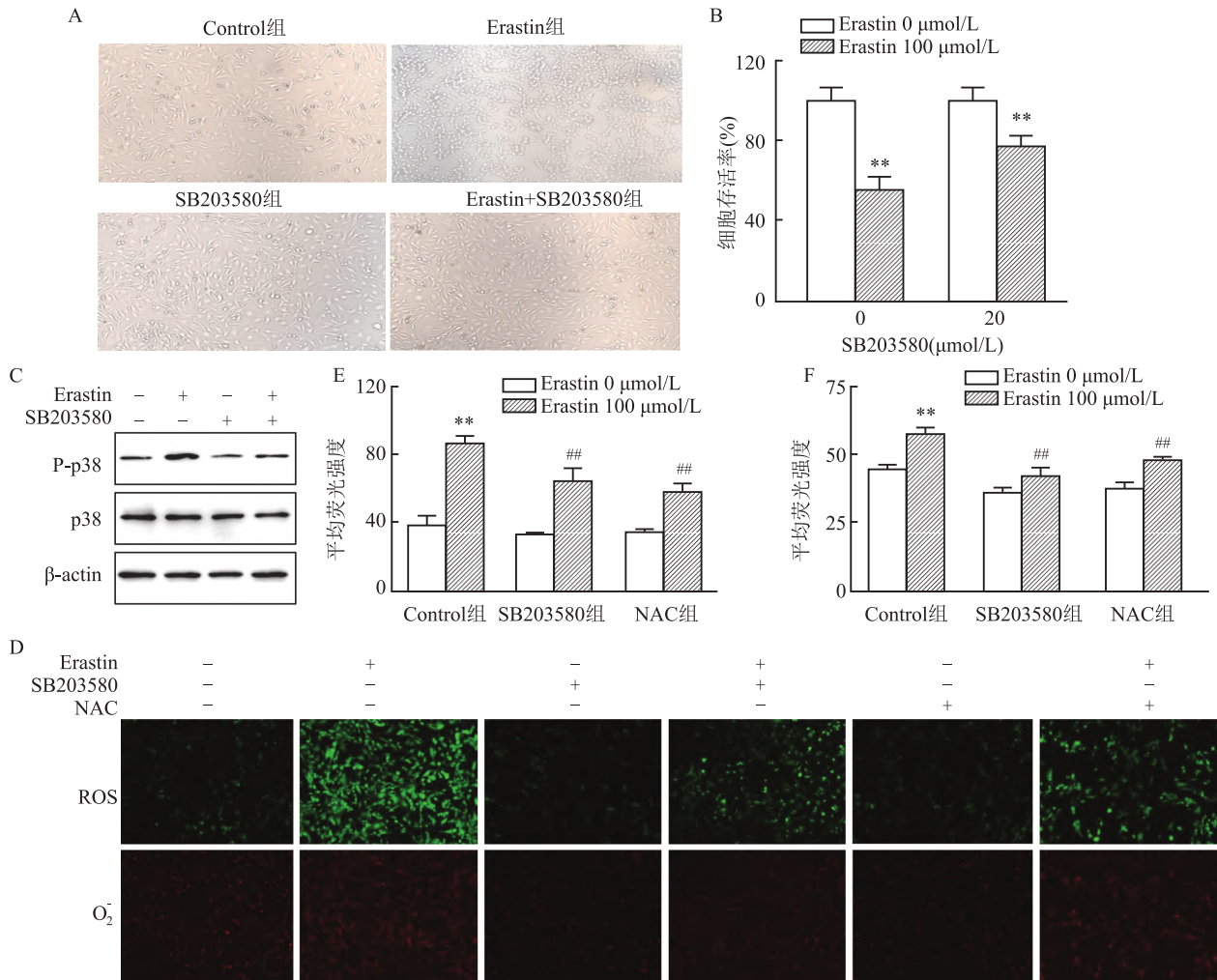


图4 SB203580和NAC对Erastin效果的影响

A: 电镜下观察细胞形态 $\times 100$; B: CCK-8 检测细胞活性; C: Western blot 检测 P-p38 的表达; D: ROS/O₂⁻ 荧光探针检测细胞氧化应激水平 $\times 100$; E: ROS 荧光强度统计结果; F: O₂⁻ 荧光强度统计结果; 与 Erastin 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: * $P < 0.01$; 与 Control 组的 Erastin 100 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: ## $P < 0.01$

为明确 ERK 是否通过调节氧化应激水平发挥作用, 同样加入 NAC 进行对照研究。图 5D-F 结果显示与 NAC 结果相似, U0126 能够抑制 Erastin 诱导肺成纤维细胞氧化应激损伤 ($P < 0.01$, $F = 12.42$; $P < 0.01$, $F = 16.37$)。

3 讨论

近年来, 肺纤维化的发病率呈明显升高的趋势, 可导致患者出现呼吸困难, 甚至危及生命^[5-6]。此外, 多种呼吸系统疾病, 包括哮喘、慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 等都常常伴随肺纤维化同时出现^[7-9]。然而, 目前除肺移植之外, 尚无有效的药物治疗方法^[10]。随着研究的深入, 铁死亡在肺纤维化中的作用作为潜在的

治疗靶点引起了越来越多的关注^[11]。

Erastin 是一种常用的铁死亡诱导剂, 目前在诱导细胞铁死亡的研究上被广泛使用^[12-13]。该研究通过向肺成纤维细胞中加入不同浓度的 Erastin, 结果显示, Erastin 可明显的抑制肺成纤维细胞生长并可诱导其出现铁死亡。目前研究表明, 铁死亡与氧化应激也存在着密切的关系。铁过载通常与氧化应激有关, 氧化应激反映了活性氧的产生与生物系统消除促氧化剂之间的失衡, 氧化应激过强会导致细胞铁死亡。Chen et al^[14] 研究表明, 氧化应激能够通过激活 Bach1-HO-1 信号通路诱导铁过载从而致使细胞凋亡。该研究也同样表明, ROS 和 O₂⁻ 在 Erastin 处理后荧光强度增加, 这为明确铁死亡与氧化应激的关系提供了一些依据。

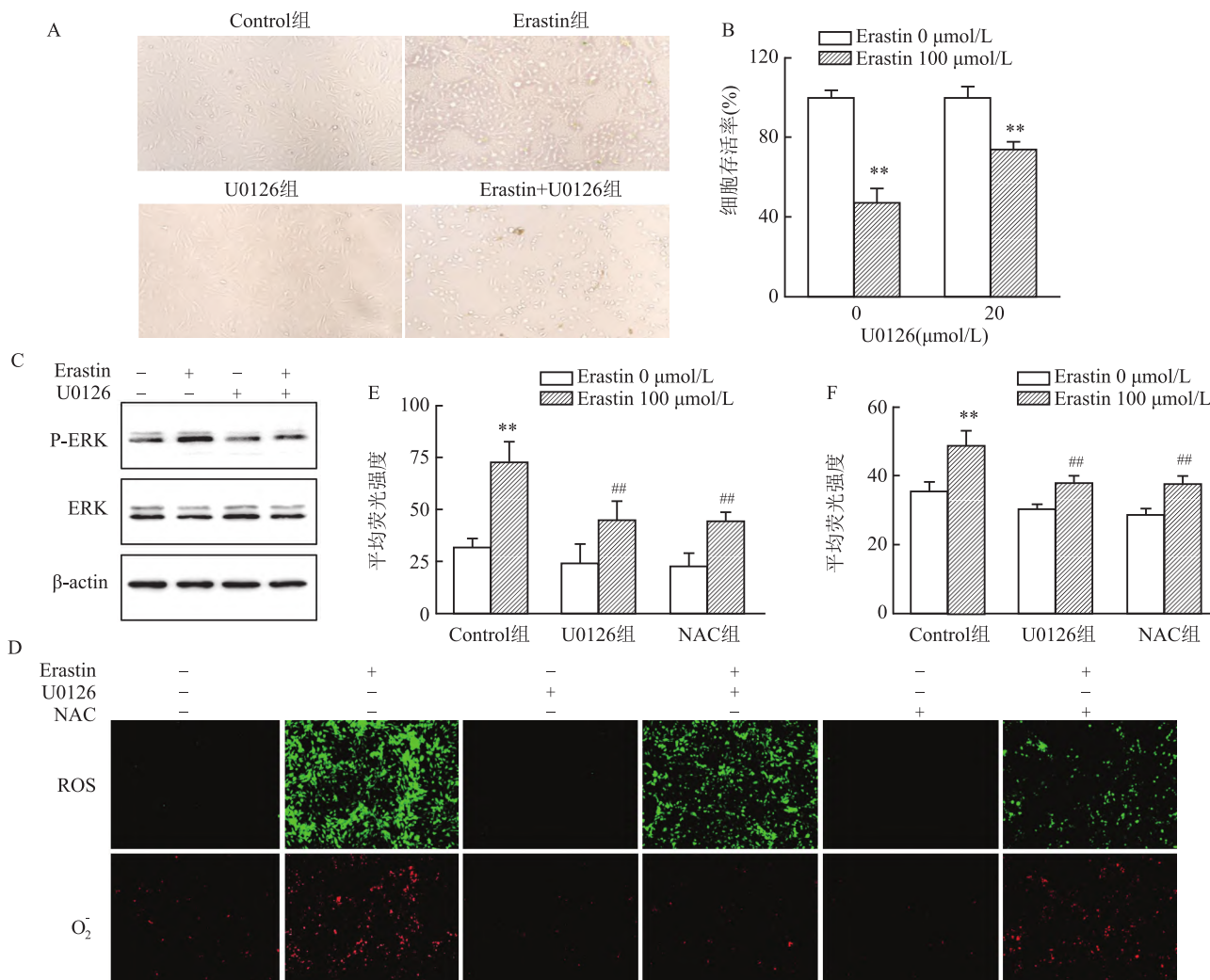


图5 U0126和NAC对Erastin效果的影响

A: 电镜下观察细胞形态 ×100; B: CCK-8 检测细胞活性; C: Western blot 检测 P-ERK 的表达; D: ROS/O₂⁻ 荧光探针检测细胞氧化应激水平 ×100; E: ROS 荧光强度统计结果; F: O₂⁻ 荧光强度统计结果; 与 Erastin 0 μmol/L 组比较: ** P < 0.01; 与 Control 组的 Erastin 100 μmol/L 组比较: ## P < 0.01

参与调解氧化应激的信号通路有多条。目前研究表明, MAPK 信号通路可能在其中起着关键作用。Ma et al^[15]等研究表明利多卡因通过调节 MAPK 信号通路来减轻缺氧复氧导致的肺上皮细胞铁死亡。Wanas et al^[16]等联合氯硝柳胺和吡非尼酮用药通过抑制氧化应激及下调 MAPK 信号通路来减轻肺纤维化。然而, 目前针对 MAPK 调解氧化应激的研究多集中在癌症领域, 针对肺成纤维细胞的研究较少。该研究通过 Western blot 验证了 MAPK 通路中的 p38 和 ERK 蛋白磷酸化水平升高, 表明 MAPK 通路可能与氧化应激有关。为进一步验证这一结果, 该实验分别加入了 p38 和 ERK 的抑制剂 SB 203580、U0126, 结果显示明显缓解了磷酸化水平以及氧化应激, 这更明确了 MAPK 信号通路在调节肺

成纤维细胞氧化应激中的作用。

该研究可为肺纤维化的发病机制和药物研发提供一定的参考。如果能够开发一种药物以 MAPK 信号通路为靶点, 特异性的诱导肺成纤维细胞出现铁死亡, 可能会为肺纤维化的治疗带来一定的突破。然而, 该研究仅为细胞层面的实验, 未涉及动物实验及临床实验, 未来该课题组会进行更深入地研究。

参考文献

[1] Wijsenbeek M. Progress in the treatment of pulmonary fibrosis [J]. Lancet Respir Med, 2020, 8(5):424-5.
 [2] Piñero-Hermida S, Martínez P, Bosso G, et al. Consequences of telomere dysfunction in fibroblasts, club and basal cells for lung fibrosis development[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 5656.
 [3] Cheng H, Feng D, Li X, et al. Iron deposition-induced ferroptosis

- in alveolar type II cells promotes the development of pulmonary fibrosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(12): 166204.
- [4] Pei Z, Qin Y, Fu X, et al. Inhibition of ferroptosis and iron accumulation alleviates pulmonary fibrosis in a bleomycin model[J]. *Redox Biology*, 2022, 57:102509.
- [5] Maher T M, Bendstrup E, Dron L, et al. Global incidence and prevalence of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Respir Res*, 2021, 22(1): 197.
- [6] Wijsenbeek M, Suzuki A, Maher T M. Interstitial lung diseases [J]. *Lancet*, 2022, 400(10354): 769–86.
- [7] Savin I A, Markov A V, Zenkova M A, et al. Asthma and post-asthmatic fibrosis: A search for new promising molecular markers of transition from acute inflammation to pulmonary fibrosis[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(5): 1017.
- [8] Siddhuraj P, Jönsson J, Alyamani M, et al. Dynamically upregulated mast cell CPA3 patterns in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 924244.
- [9] Chanda D, Otoupalova E, Smith S R, et al. Lung fibrosis and fibrosis in the lungs: Is it all about myofibroblasts? [J] *Biomedicines*, 2022, 10(6): 1423.
- [10] Glass D S, Grossfeld D, Renna H A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: Current and future treatment [J]. *Clin Respir J*, 2022, 16(2): 84–96.
- [11] Yu S, Jia J, Zheng J, et al. Recent progress of ferroptosis in lung diseases [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 789517.
- [12] 赵雅姿, 史港晴, 谭 晖, 等. Erastin 在肿瘤细胞铁死亡中的研究进展 [J]. *中南医学科学杂志*, 2023, 51(3): 453–5.
- [13] 甘雨灵, 梁 鹏, 李廷栋, 等. 皮质酮对 Erastin 诱导黑色素瘤细胞铁死亡的促进作用 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(5): 818–21.
- [14] Chen Y, Guo X, Zeng Y, et al. Oxidative stress induces mitochondrial iron overload and ferroptotic cell death [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 15515.
- [15] Ma X, Yan W, He N. Lidocaine attenuates hypoxia/reoxygenation induced inflammation, apoptosis and ferroptosis in lung epithelial cells by regulating the p38 MAPK pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(5): 150.
- [16] Wanas H, Elbadawy H M, Almikhlafl M A, et al. Combination of niclosamide and pirfenidone alleviates pulmonary fibrosis by inhibiting oxidative stress and MAPK/Nf-kappaB and STATs regulated genes [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2023, 16(5): 697.

Erastin induces ferroptosis in lung fibroblasts through MAPK mediated oxidative stress signaling pathway

Wang Yiran¹, Zhang Shijie¹, Guan Yubo², Li Miaomiao², Cai Ruyi³, Wu Qi¹

(¹Dept of Physiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004; ²Dept of Pathophysiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004; ³The First School of Clinical Medicine, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004)

Abstract Objective To investigate the mechanism by which Erastin affects ferroptosis in lung fibroblasts. **Methods** Mouse lung fibroblasts (C57/B6-L) were treated with varying concentrations of the iron death inducer Erastin. Cell viability was assessed using the cell counting Kit-8 (CCK-8) assay. Oxidative stress levels were visualized using a fluorescence microscope, and the expression of proteins related to the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway was analyzed using Western blot. Additionally, the p38 and extracellular regulated protein kinase (ERK) inhibitors SB203580 and U0126 were employed to further elucidate the mechanism by which Erastin induces iron death in lung fibroblasts. **Results** At a concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$, Erastin effectively induced ferroptosis in lung fibroblasts, leading to an upregulation of oxidative stress. Furthermore, the phosphorylation levels of p38 and ERK proteins in the MAPK pathway were elevated ($P < 0.05$). The addition of SB203580 and U0126 inhibitors resulted in a significant reduction in oxidative stress levels and a notable increase in cell activity in lung fibroblasts ($P < 0.05$). **Conclusion** It can be concluded that Erastin induces ferroptosis in lung fibroblasts, potentially through the mediation of oxidative stress *via* the MAPK signaling pathway.

Key words pulmonary fibrosis; lung fibroblasts; ferroptosis; reactive oxygen species; MAPK signaling pathway