

DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0283

文章编号 1671-8852(2026)04-0435-09

基于 ATF4/ACSL4 信号通路探讨高盐诱导高血压 血管内皮细胞铁死亡的机制

卢寨瑶 程静屏 罗 妮

华润武钢总医院综合医疗科 湖北 武汉 430080

摘要 目的:基于激活转录因子 4(ATF4)/酰基辅酶 A 合成酶 4(ACSL4)信号通路探讨高盐(HS)诱导高血压血管内皮细胞铁死亡的机制。方法:雄性 C57/BL6 小鼠随机分为 4 组:对照组、HS 组、HS+铁抑制素-1(Fer-1)组和 HS+甲磺酸去铁胺(DFO)组,每组 12 只。除对照组外,其余组喂养 8% 氯化钠 12 周。HS+Fer-1 组和 HS+DFO 组从第 5 周开始分别每日腹腔注射 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Fer-1 或 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DFO,连续治疗 8 周。评估小鼠心血管功能参数。分离小鼠心脏微血管内皮细胞(CMVECs)和心肌细胞(CMs),进行 RNA 序列分析。制备 ATF4 siRNA (si-ATF4)及其对照 siRNA (si-NC)转染 CMVECs 的条件培养基,用于 CMs 的培养。分别对处理过的 CMs 进行 DHE 染色、罗丹明标记鬼笔环肽染色和 CCK-8 试验,以考察氧化应激、细胞肥大和增殖情况。结果:与对照组相比,HS 组血清生物标志物 CK-MB、ANP、BNP 水平、心脏质量/体质量、左心室后壁厚度和左心室内径显著增加 ($P<0.05$),射血分数和缩短分数显著降低 ($P<0.05$)。HS+Fer-1 组和 HS+DFO 组显著逆转了 HS 诱导的心脏功能障碍参数和心肌肥厚 ($P<0.05$)。RNA 测序结果显示,内质网应激和 ATF4 表达在 HS 诱导的 CMVECs 中被显著激活。与对照组相比,HS 组心脏组织中 GPX4 和 xCT 蛋白表达显著上调 ($P<0.05$),ACSL4 蛋白表达显著下调 ($P<0.05$)。HS+Fer-1 组和 HS+DFO 组显著逆转了 HS 诱导的这些蛋白变化 ($P<0.05$)。来自 si-ATF4 转染的 CMVECs 的条件培养基显著促进了 CMs 的增殖、增加了 CMs 的大小和 ROS 生成 ($P<0.05$)。结论:铁死亡参与 HS 诱导的心脏毒性。CMVECs 中 ATF4 具有心脏保护作用,其通过调节 GPX4/ACSL4 信号通路减轻脂质过氧化和铁死亡。

关键词 激活转录因子 4;酰基辅酶 A 合成酶 4;高盐诱导高血压;血管内皮细胞;铁死亡

中图分类号 R285.5

文献标志码 A

Mechanism of high salt induced ferroptosis in hypertensive vascular endothelial cells based on ATF4/ACSL4 signal pathway

LU Zhaiyao, CHENG Jingping, LUO Ni

Department of General Medicine, China Resources & WISCO General Hospital, Wuhan 430080, Hubei, China

Abstract

Objective: To explore the mechanism of high salt (HS) induced ferroptosis in hypertensive vascular endothelial cells based on the activation of transcription factor 4 (ATF4)/acyl coenzyme A synthetase 4 (ACSL4) signal pathway. **Methods:** Male C57/BL6 mice were randomly divided into four groups: control group, HS group, HS+Fer-1 group and HS+DFO group, with 12 mice in each group. Except the control group, the other groups were fed with 8% sodium chloride for 12 weeks. HS+Fer-1 group and HS+DFO group received intraperitoneal injection of $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of ferrostatin-1

课题来源:湖北省卫生健康委员会科研项目(编号:20221731)。

作者简介:卢寨瑶,女,1978—,主治医师,主要从事神经内科研究,E-mail:tuci8492@163.com。

(Fer-1) or 100 mg·kg⁻¹ of deferoxamine mesylate (DFO) for 8 consecutive weeks from the 5th week. The cardiovascular function parameters of mice were evaluated. The mouse cardiac microvascular endothelial cells (CMVECs) and myocardial cells (CMs) were isolated and RNA sequencing was performed. The conditional medium for transfection of CMVECs with ATF4 siRNA (si-ATF4) and its control siRNA (si-NC) was prepared for the culture of CMs. DHE staining, rhodamine labeled ghost pen cyclic peptide staining and CCK-8 test were performed on the treated CMs to investigate oxidative stress, cell size and proliferation. **Results:** Compared with the control group, the levels of serum biomarkers CK-MB, ANP, BNP, heart weight/body weight, left ventricular posterior wall thickness and left ventricular inner diameter in the HS group increased significantly ($P<0.05$), and ejection fraction and shortening fraction decreased significantly ($P<0.05$). HS+Fer-1 group and HS+DFO group significantly reversed the parameters of HS induced cardiac dysfunction and myocardial hypertrophy ($P<0.05$). RNA sequencing results showed that ER stress and ATF4 expression were significantly activated in HS induced CMVECs. Compared with the control group, the expression of GPX4 and xCT protein in the heart tissue of HS group was significantly increased ($P<0.05$), and the expression of ACSL4 protein was significantly decreased ($P<0.05$). HS+Fer-1 group and HS+DFO group significantly reversed these protein changes induced by HS ($P<0.05$). The conditioned medium of CMVECs transfected with si-ATF4 significantly promoted the proliferation of CMs, increased the size of CMs and ROS production ($P<0.05$). **Conclusion:** Ferroptosis is involved in HS induced cardiotoxicity. ATF4 in CMVECs has a cardioprotective effect, which can reduce lipid peroxidation and ferroptosis by regulating GPX4/ACSL4 signaling pathway.

Key Words Activating Transcription Factor 4; Acyl CoA Synthetase 4; High Salt Induced Hypertension; Vascular Endothelial Cells; Ferroptosis

高血压是许多心血管疾病的主要危险因素。慢性压力过载导致心肌肥厚和细胞外基质产生过多,最终表现为心脏顺应性降低和心力衰竭^[1]。导致病理性心脏重构易感性的潜在基因和途径在很大程度上仍不清楚,因此,进一步研究高血压性心脏病发病机制中涉及的新分子靶点非常必要。心脏微血管内皮细胞(cardiac microvascular endothelial cells, CMVECs)的炎症和功能障碍被认为是导致心脏重构的重要机制^[2]。此外,CMVECs分泌的因子可调节心脏功能,并对心脏重塑产生积极或消极的影响^[3]。铁死亡是一种铁依赖性、脂质过氧化驱动的细胞死亡级联反应,已成为心血管疾病发展的关键机制^[4]。抑制铁死亡可通过减轻小鼠主动脉内皮细胞的脂质过氧化和内皮功能障碍来缓解动脉粥样硬化^[5]。这些结果提示,铁死亡可能是导致CMVECs炎症和功能障碍的关键机制。因此,负调控CMVECs铁死亡有利于高血压心脏重构的治疗。激活转录因子4(activating transcription factor 4, ATF4)是CREB/ATF家族的一员,在人体器官中广泛表达,可被激活以响应各种应激信号,如缺

氧、内质网应激和氧化应激,从而调节细胞的适应功能^[6]。最近研究^[7-8]发现,ATF4基因敲低使细胞对Erasin和RSL3诱导的铁死亡敏感。此外,还有研究^[9]报道ATF4可以防止血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)诱导的大鼠主动脉外膜成纤维细胞的凋亡和炎症,然而,ATF4在CMVECs铁死亡中的调节作用尚未明确。在本研究中,我们拟探讨ATF4在高盐(high salt, HS)诱导高血压条件下CMVECs铁死亡和心脏损伤中的作用和潜在机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 雄性C57/BL6小鼠(8周, 20~22 g)购自北京维通达生物技术有限公司。所有小鼠均在标准化条件下饲养(12 h光/暗循环,温度22~24℃,湿度35%~60%),可自由饮用食物和水。喂养1周后,将小鼠随机分为4组:对照组、HS组、HS+Fer-1组和HS+DFO组,每组12只。对照组接受标准啮齿动物食物正常喂养12周,其余组喂养标准啮齿动物食物和8%氯化钠12周。从第5周开始,HS+Fer-1组和HS+DFO组小鼠分别每日

腹腔注射 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 铁抑制素-1(Fer-1, 购自美国 Selleck 公司, 溶解在二甲基亚砜中, 用 0.9% 氯化钠稀释至所需浓度) 或 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 甲磺酸去铁胺 [DFO, 购自陶术(上海)生化科技有限公司, 用 0.9% 氯化钠稀释至所需浓度], 连续治疗 8 周。对照组和 HS 组则在相同时间注射等体积 0.9% 氯化钠。研究期间采用尾袖法无创测量小鼠收缩压 (SBP) 水平。

1.2 超声心动图 如前所述, 给药前后, 使用 Vevo 2100 系统(加拿大 VisualSonics 公司)对轻度麻醉的小鼠进行超声心动图检查^[10]。M 型图像测量的相关参数包括收缩期左室后壁厚度(LVPWs)、收缩期左室前壁厚度(LVAWs)、左室舒张内径(LVIDd)、舒张期左室后壁厚度(LVPWd)、舒张期左室前壁厚度(LVAWd)、射血分数(EF)、缩短分数(FS)、每搏输出量(SV)、心输出量(CO)和左室质量。

1.3 血清心血管生物标志物的测定 给药后, 从麻醉状态下的小鼠眼眶后静脉丛采集血样, 通过离心分离(1000 g 、 15 min 、 4°C)。所有血清都存储在 -80°C , 直到分析。根据制造商的说明, 分别使用心房钠尿肽(ANP)、脑钠肽(BNP) ELISA 试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司)和心肌肌酸激酶 MB 形式(CK-MB) ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司)测量 CK-MB、ANP 和 BNP 水平。

1.4 心脏质量/体质量比值(HW/BW)和组织学测量 在超声心动图检查和采血后, 在深度麻醉下处死颈椎脱位的小鼠。切除心脏, 用 10% 氯化钾溶液阻止舒张末期, 修剪多余的组织, 轻轻擦拭心脏并称重, 然后计算 HW/BW。接下来, 将心脏固定在 4% 多聚甲醛中, 然后根据标准组织学方案进行脱水和石蜡包埋。切割 $5 \mu\text{m}$ 切片并用 HE 染色。每个心脏约测量 100~200 个心肌细胞, 使用 Image J 计算平均心肌细胞面积。

1.5 CMVECs 和心肌细胞(cardiomyocytes, CMs)的分离和培养 从小鼠的心脏中分离和培养 CMVECs^[11]。在 37°C 下, 将小鼠心脏切除、切碎, 并在 0.1% 胶原酶 II (美国 Gibco 公司) 和 0.125% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)的混合溶液中消化 5 min, 共 6 次。将消化后的产物收集在离心管中, 用含有 10% 胎牛血清(FBS; 美国 HyClone 公司)的 Dulbecco 改良 Eagle's 培养基(DMEM; 美国 HyClone 公司)停止消化, 然后通过 $70 \mu\text{m}$ 尼龙细胞过滤器过滤。收集细胞并将其置于含有 10% FBS 的内皮细胞培

养基(美国 Sciencell 公司)培养瓶上, 于 37°C 含 5% CO_2 的增湿培养箱中培养。从小鼠心脏中分离出 CMs^[11]。第 3~5 代的 CMVECs 和 CMs 细胞均被剥夺血清 24 h。然后, 在 Ang II ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 美国 Sigma-Aldrich 公司)暴露前 24 h, 对 CMVECs 分别进行 ATF4 过表达质粒(美国 MedChemExpress 公司)转染 24 h、 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Fer-1 处理 1 h 和 $50 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 重组人 ACSL4(rhACSL4; 美国 MedChemExpress 公司)处理 1 h。

1.6 RNA 测序和数据分析 分别从对照组和 HS 组小鼠心脏中分离 CMVECs, 采用 TRIzol 试剂[天根生化科技(北京)有限公司]提取总 RNA。由上海吉凯基因医学科技股份有限公司进行 RNA 测序(RNA-seq)。在生物分析仪 2100(美国 Agilent Technologies 公司)评估 RNA 的质量和数量。使用 NEBNext®Ultra 生成序列库, 为 Illumina®(美国 NEB 公司)提供 RNA 库准备工具包。修复 DNA 末端, 并添加“A”碱基。通过 AMPure XP 系统(美国 Beckman Coulter 公司)选择 250~300 bp cDNA 并纯化 PCR 产物。在 Illumina Novaseq 平台上对文库制剂进行测序。参考基因组和基因信息从 NCBI 数据库下载。Hisat2 v2.0.5 用于将读数与参考基因组对齐。FeatureCounts v1.5.0-p3 用于计算映射到每个基因的读取数。然后根据基因长度计算每千碱基外显子每百万碱基序列的片段数(FPKM), 并读取映射到该基因的计数, fold change(FC)表示为 FPKM 组间的倍变比率。使用带有原始计数的 DESeq2 R 包(1.16.1)进行差异表达分析。基因的 P 值通过 Benjamini 和 Hochberg 的方法进行调整, 选择调整 P 值($P_{\text{adj.}}$) < 0.05 和绝对 $\log_2 \text{FC} > 0$ 作为差异表达基因(DEG), 用于创建热图和火山图以及 KEGG 本体富集分析。对于 KEGG 富集分析, 以 $P_{\text{adj.}} < 0.05$ 为阈值来确定基因集的显著富集。

1.7 逆转录定量聚合酶链反应(RT-qPCR) 使用 TRNzol 试剂提取细胞 RNA。使用 NanoDrop2000 测试总 RNA 的纯度和浓度。然后使用 GoScript Reverse 逆转录试剂盒[普洛麦格(北京)生物技术有限公司]将总 RNA 反转录为 cDNA。使用 SYBR Green 荧光试剂[普洛麦格(北京)生物技术有限公司]在 Roche 480 系统中进行实时 PCR。GAPDH 作为内参进行基因 mRNA 表达水平的相对定量分析。目标基因的引物对如下: ATF4, 正向 5'-ATGAGCTCCTGAACAGCGAA-3' 和 反向 5'-CTTGTCGTGGAACCCAT-3'; GAPDH, 正向

5'-GAGCATTCAGGGCTAA-3' , 反 向 5'-ACAGTGACGTTACAAACGAC-3'; Grp78, 正向 5'-CACCTTATTCCTGCGGT-3'和反向 5'-GT-GAAGGCCACATACGACGG-3' ; ANP, 正 向 5'-CTTCTCCATCACCCCTG-3'和反向 5'-CCTGT-CAATCCTACCC-3' ; BNP, 正 向 5'-ACAAAAGAACACCCAA-3' 和 反 向 5'-TA-CAGCCCAAACGACT-3'。

1.8 ATF4 siRNA 转染 CMVECs 条件培养基的制备 分离的小鼠 CMVECs 在 Opti MEM 培养基(美国 Gibco 公司)中培养,并使用 Lipofectamine 3000 转染试剂(美国 Invitrogen 公司)转染。为了抑制 ATF4 的表达,将针对 ATF4 的特异性小干扰 RNA (si-ATF4, 正义: CUUCGAUAAGAAGUAAUA-GA; 反义: UAUUAUAUCUCUUAUCGAAGAA) 和 阴 性 对 照 siRNAs (si-NC) 转 染 到 CMVECs 中 48 h, 浓 度 为 $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。si-ATF4 和 si-NC 均购自上海吉玛制药技术有限公司。进行 PCR 以确认 siRNA 敲除的效率。将 si-ATF4 和 si-NC 转染的 CMVECs 用 Ang II 处理 24 h 后,从中收集条件培养基,用于 CMs 的培养。分别对处理过的 CMs 进行二氢乙锭(DHE)、罗丹明标记鬼笔环肽染色和 CCK-8 试验。

1.9 CCK-8 分析和铁分析 使用 CCK-8 试剂盒(上海 Beyotime 公司)测量 CMVECs 和 CMs 的细胞活力。在含有 10% FBS 的 96 孔培养板中,每孔加入 1 000 个细胞(体积为 $100 \mu\text{L}$)。处理后,将 CCK-8 试剂($10 \mu\text{L}$)添加到每个孔中,并在暗处培养 2 h,然后使用多功能微孔板阅读器测量 450 nm 处的吸光度。使用铁分析试剂盒(英国 Abcam 公司)测量小鼠 CMVECs 的铁水平。收集样品并用冷 PBS 洗涤,然后在铁分析缓冲液中均质并离心。添加铁探针,并在黑暗中培养 1 h。在多功能微孔板阅读器测量 593 nm 处的吸光度。

1.10 罗丹明标记鬼笔环肽染色 为了评估肥大变化,CMs 用 4% 多聚甲醛固定,用 0.1% Triton X-100 渗透,并用浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的罗丹明标记鬼笔环肽(美国 Phalloidin Rho 公司)染色 30 min。细胞核在室温下用 DAPI 染色。使用 IX51 显微镜(日本 Olympus 公司)采集荧光图像。

1.11 Western Blot 检测铁死亡标记蛋白谷胱甘肽过氧化酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)、xCT、酰基辅酶 A 合成酶 4 (long chain fatty acid CoA ligase 4, ACSL4) 的表达。将心脏组织和细胞

在 RIPA 裂解缓冲液(上海 Beyotime 公司)裂解 30 min,然后将蛋白质与负载缓冲液混合并煮沸 10 min。用 SDS-PAGE 凝胶分离等量提取物($50 \mu\text{g}$)并转移到硝化纤维素膜(美国 Bio-Rad 公司)。用 5% 的脱脂奶粉封闭细胞膜 2 h,然后在 4°C 下与抗 GPX4 (1:1 000)、xCT (1:1 000)、ACSL4 (1:1 000) 和 GAPDH (1:1 000, 均购自美国 Proteintech 公司)孵育过夜。第 2 日,用适当的辣根过氧化物酶结合二级抗体(1:10 000, 美国 Proteintech 公司)在室温下孵育 1 h。通过 ChemiDoc XRS(美国 Bio-Rad 公司)对斑点进行可视化和定量。用 Image J 软件分析斑点强度。

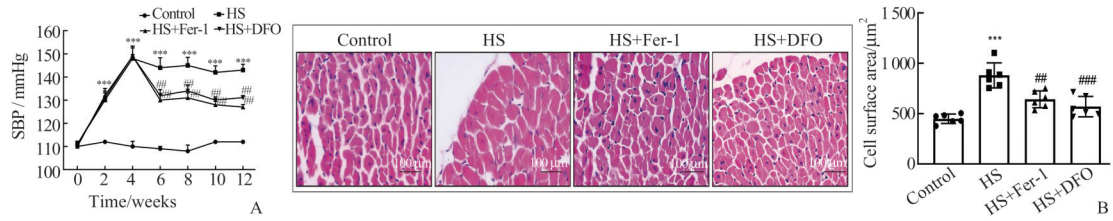
1.12 DHE 染色 DHE 荧光染色(上海 Beyotime 公司)用于检测细胞中活性氧(ROS)的水平。细胞在 37°C 的 DHE ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 中培养 30 min,然后使用 IX51 显微镜(日本 Olympus 公司)采集荧光图像,并使用 Image J 软件计算探针的荧光强度。

1.13 数据处理 通过 SPSS 25.0 进行统计分析。数据表示为均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。使用单向方差分析(ANOVA)和 Tukey 事后检验进行多组比较。当 $P < 0.05$ 时,认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 铁死亡参与 HS 诱导的心肌病 HS 饮食后尾动脉压力的纵向变化如图 1A 所示。在所有组中观察到的基础收缩压水平具有可比性。与对照组相比,HS 组每日给予 HS 饮食 12 周后,SBP 明显增加($P < 0.01$)。与 HS 组相比,HS+Fer-1 组和 HS+DFO 组的收缩压分别从 148.24 mmHg、146.77 mmHg 降至 130.96 mmHg、125.57 mmHg。与对照组相比,HS 组血清 CK-MB、ANP、BNP 水平、HW/BW、左心室后壁厚度和左心室内径均显著增加($P < 0.05$),心脏功能指标 EF 和 FS 显著降低($P < 0.05$)。HS+Fer-1 组和 HS+DFO 组显著逆转了 HS 诱导的心脏功能障碍参数(表 1)。HE 染色心脏切片的组织学分析证实了上述发现,HS 组诱导心脏组织肥厚性改变,而 Fer-1、DFO 显著降低了 HS 诱导的心肌肥厚(图 1B)。综上所述,Fer-1、DFO 治疗对 HS 诱导的小鼠心脏功能障碍和肥大具有显著的保护作用,表明铁死亡参与了 HS 诱导的心肌病。

2.2 内质网应激和 ATF4 表达在 HS 诱导的 CMVECs 中显著激活 为了进一步明确潜在的分子



A. 无创尾袖压力分析系统测定的周期性收缩压(SBP)测量;B. 小鼠心肌组织HE染色的代表性横向切片图像(比例尺=100 μm)和心肌细胞面积的定量分析。与Control组相比,*** $P<0.001$;与HS组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

图1 Fer-1、DFO可减轻HS诱导的小鼠心脏功能障碍和心肌肥厚

表1 实验小鼠的心血管功能参数 (n=6; $\bar{x}\pm s$)

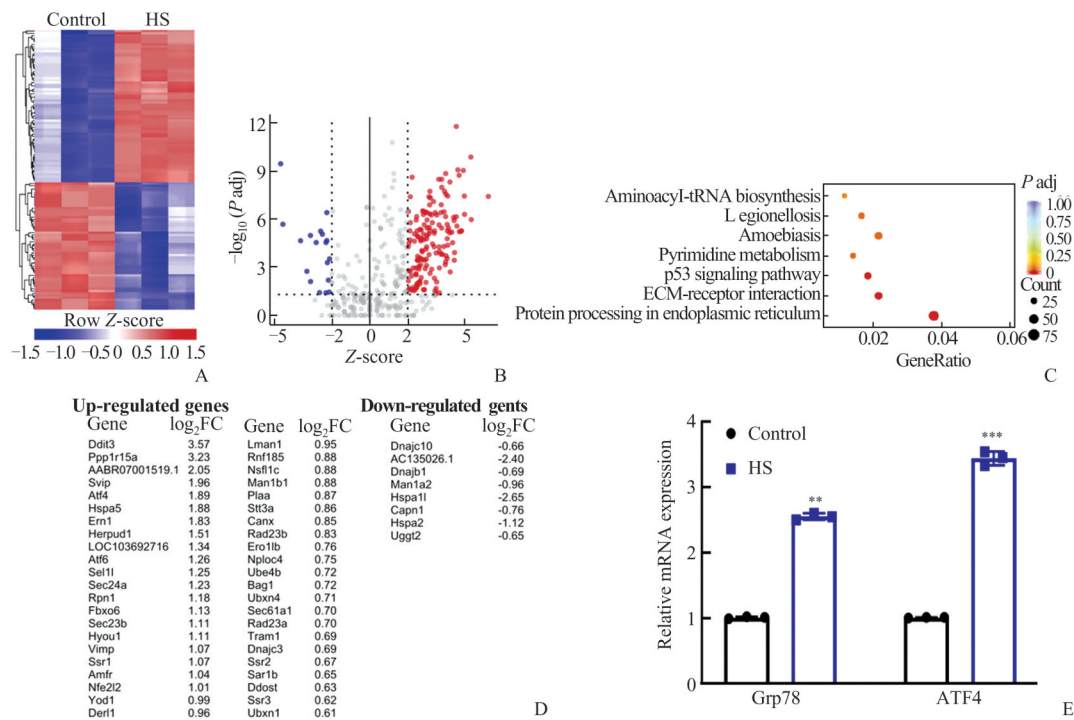
变量	Control	HS	HS+Fer-1	HS+DFO
CK-MB/U·L ⁻¹	98.44±3.26	226.70±3.53***	154.26±2.92 [#]	133.67±3.15 ^{##}
HW/BW/mg·g ⁻¹	4.62±0.24	6.28±0.36***	5.57±0.31 [#]	5.35±0.28 ^{##}
BNP/pg·mL ⁻¹	88.46±2.81	189.53±5.66***	140.26±4.15 [#]	126.74±5.72 ^{##}
ANP/pg·mL ⁻¹	81.53±2.45	181.29±4.05***	132.70±2.62 [#]	116.59±2.17 ^{##}
HR/次·min ⁻¹	464.63±2.14	460.40±3.07	461.54±3.65	454.95±4.10
EF/%	63.76±1.25	47.67±0.73***	56.93±2.30 [#]	62.34±1.62 ^{##}
FS/%	35.95±1.58	22.81±0.60***	27.50±1.34 [#]	32.93±1.12 ^{##}
LVIDd/mm	3.55±0.08	3.91±0.03**	3.66±0.10 [#]	3.35±0.05 ^{##}
LVAWd/mm	0.69±0.03	1.25±0.06***	1.04±0.04 [#]	0.99±0.06 ^{##}
LVPWd/mm	0.57±0.05	0.95±0.03***	0.78±0.03 [#]	0.68±0.04 ^{##}
舒张容积/μL	47.64±2.04	65.52±1.18**	53.06±5.60 [#]	51.56±3.80 [#]
LVAWs/mm	1.05±0.02	1.42±0.04***	1.28±0.03 [#]	1.16±0.03 ^{##}
LVPWs/mm	0.91±0.03	1.31±0.03***	1.14±0.06 [#]	1.08±0.04 ^{##}
收缩体积/μL	18.76±1.84	32.20±1.26**	22.49±3.78 [#]	18.38±1.49 ^{##}
左室质量/mg	76.02±6.42	101.23±3.73**	81.226±4.06 [#]	75.71±5.93 ^{##}
SV/μL	37.10±1.36	30.07±0.89***	34.33±0.90 [#]	35.16±0.86 ^{##}
CO/mL·min ⁻¹	17.02±0.51	12.27±0.49***	15.07±0.46 [#]	15.38±0.54 ^{##}

注:与Control组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与HS组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$,^{###} $P<0.001$ 。

机制,我们分别从对照组和HS组心脏中分离CMVECs,然后进行了RNA测序分析,火山图结果显示HS处理的CMVECs中有410个基因上调和137个基因下调(图2A~2B)。KEGG富集分析表明,内质网中的蛋白质加工(rno04141)是DEG最显著富集的途径(图2C)。在图2D中,我们列出了显著上调和下调基因(log₂FC>0.585),并发现ATF4是最显著的上调基因之一。为了验证RNA测序数据,研究对CMVECs进行qRT-PCR分析,并确认HS处理显著上调了Grp78(内质网应激的常用标记)mRNA水平和ATF4 mRNA水平($P<0.01$)(图2E)。

2.3 ATF4过表达通过调节GPX4/ACSL4信号传导阻断Ang II介导的CMVECs的铁死亡、氧化应激和增殖 ATF4过表达和Fer-1显著逆转了Ang II诱导的培养CMVECs中细胞增殖水平(图3A)、MDA水平(图3B)和铁水平(图3C)的升高,而ATF4的保护作用部分被rhACSL4逆转。DHE测

量结果显示,在Ang II的作用下,CMVECs中的ROS显著增加,这分别被ATF4和Fer-1逆转(图3D)。此外,ATF4对ROS作用部分被rhACSL4的共治阻断。在Ang II刺激的CMVECs中,ATF4介导的GPX4和xCT蛋白表达显著下调($P<0.05$),ACSL4蛋白表达显著上调($P<0.05$),这分别被ATF4和Fer-1逆转。与Ang II+ATF4组相比,Ang II+ATF4+rhACSL4组中GPX4和xCT蛋白表达显著上调($P<0.05$),ACSL4蛋白表达显著下调($P<0.05$)(图3E)。此外,体内结果显示,与对照组相比,HS组心脏组织中GPX4和xCT蛋白表达显著上调($P<0.05$),ACSL4蛋白表达显著下调($P<0.05$)。HS+Fer-1组和HS+DFO组显著逆转了HS诱导的这些蛋白变化(图3F)。总之,这些数据表明,ATF4通过下调xCT、GPX4和ACSL4的表达水平,在减轻脂质过氧化和铁死亡方面起着重要作用。



A. 从对照组和HS组心脏中分离CMVECs之间差异表达基因的热图。低表达用蓝色表示,高表达用红色表示;B. 对照组和HS组CMVECs之间的DEG火山图。 $P<0.05$ 和绝对 $\log_2FC>0$ 被认为是显著的。红点代表上调基因,蓝点代表下调基因,灰点代表没有显著差异表达的基因;C. RNA测序数据的KEGG通路富集分析;D. 未折叠蛋白反应中显著上调和下调的基因列表,显示绝对 $\log_2FC>0.585$ (相当于绝对 $FC>1.5$)和 $P<0.05$;E. 通过RT-qPCR测定对照组和HS组小鼠CMVECs中Grp78和ATF4 mRNA水平($n=3$)。与Control组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图2 内质网应激和ATF4表达在HS诱导的CMVECs中显著激活

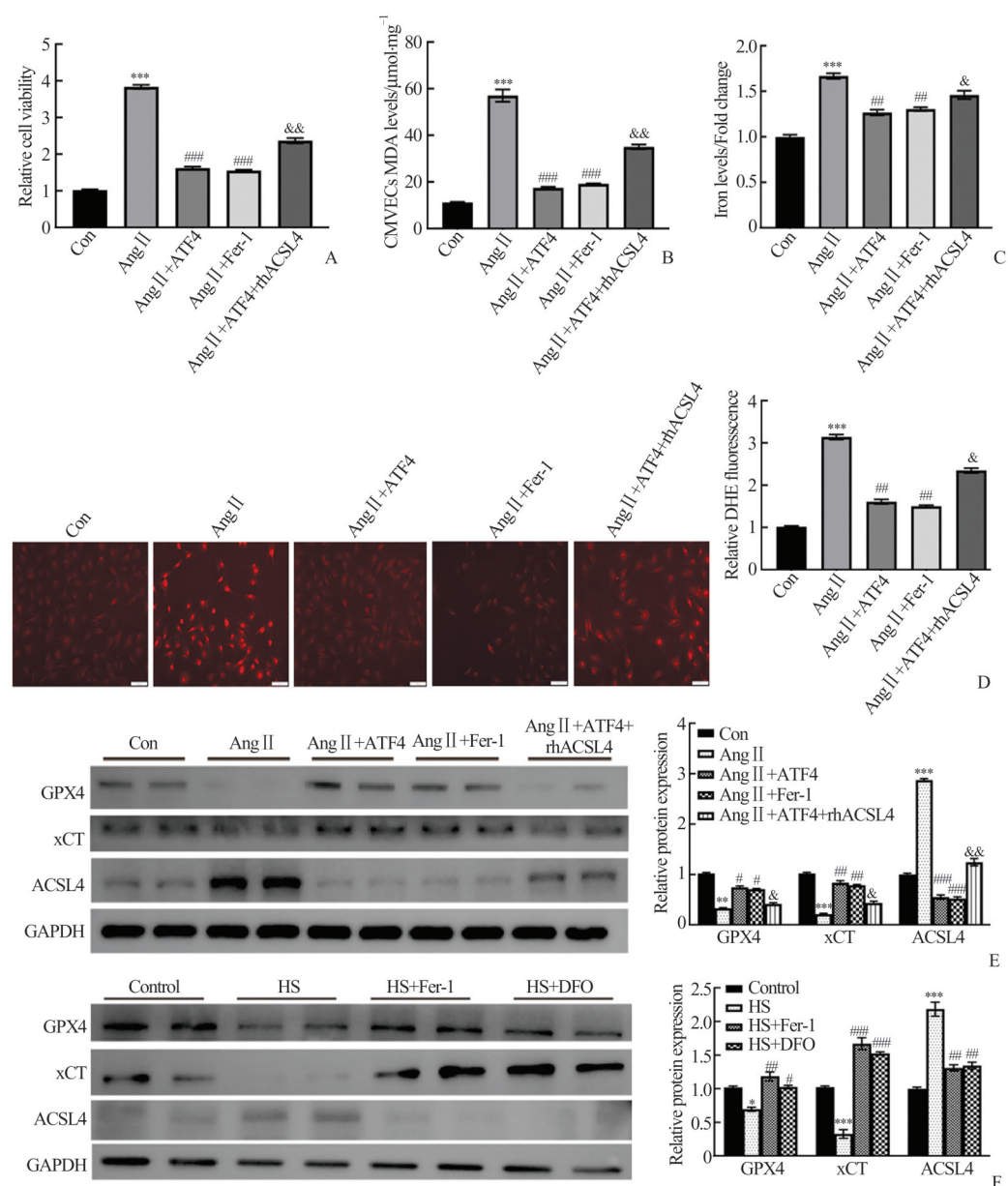
2.4 ATF4基因敲除加重Ang II诱导的CMs增殖和氧化损伤 为了研究CMVECs中ATF4下调对CMs在Ang II刺激下的影响,我们使用从ATF4体外沉默CMVECs获得的条件培养基处理CMs。通过逆转录PCR证实siRNA成功介导CMVECs中的ATF4敲低(图4A)。CCK-8分析显示,来自si-ATF4转染的CMVECs的条件培养基显著促进了CMs的增殖(图4B)。此外,来自si-ATF4转染的CMVECs的条件培养基显著促进肥大基因ANP、BNP的表达,增加了CMs大小和ROS生成($P<0.05$)(图4C~4E)。这些结果表明,内皮细胞ATF4可能通过与CMs的相互作用抑制病理性心肌肥厚和ROS水平。

3 讨论

高盐饮食是导致心血管疾病的主要原因之一。约50%的高血压患者因盐敏感性而血压升高^[12]。在本研究中,小鼠长期服用8%的高盐饮食后,血压继续升高,这与之前的研究^[12]一致。众所周知,铁死亡是一种以铁超载为特征的受调节的细胞死亡

形式,其特征在于脂质过氧化物的致死水平积累^[13]。高铁饮食导致严重的心脏损伤和肥厚性心肌病,Fer-1可逆转这些疾病进展^[13]。此外,铁超载增加了Ang II诱导的心脏纤维化并促进新生内膜的形成^[14]。本研究表明,在高血压小鼠中,Fer-1和DFO可以抑制心脏损伤,提示铁螯合治疗在预防或减少高血压相关的心脏毒性方面可能发挥作用。

心脏是一个高度结构化的器官,主要由心肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞和炎症细胞组成^[15]。越来越多的证据^[15]表明,自分泌和旁分泌机制在成人正常和衰竭心脏中起着重要的调节作用。CMVECs是成人心肌中最丰富的细胞类型^[2]。内质网(ER)含有细胞内最大的脂质库,YUAN等^[16]报道了脂质过氧化氢的积累主要发生在CMVECs的ER室。之前的一项研究^[17]发现,降铁抑制因子铁抑制素在ER中积累。我们的RNA测序数据显示,HS饮食激活CMVECs中内质网应激和未折叠蛋白反应。所观察到的铁中毒性心肌细胞的细胞质空泡化可能归因于内质网的广泛扩张,内质网体积的增加可被视为一种适应性细胞反应,旨在通过降低错误折叠蛋白的浓度并促进其利用,使细胞在



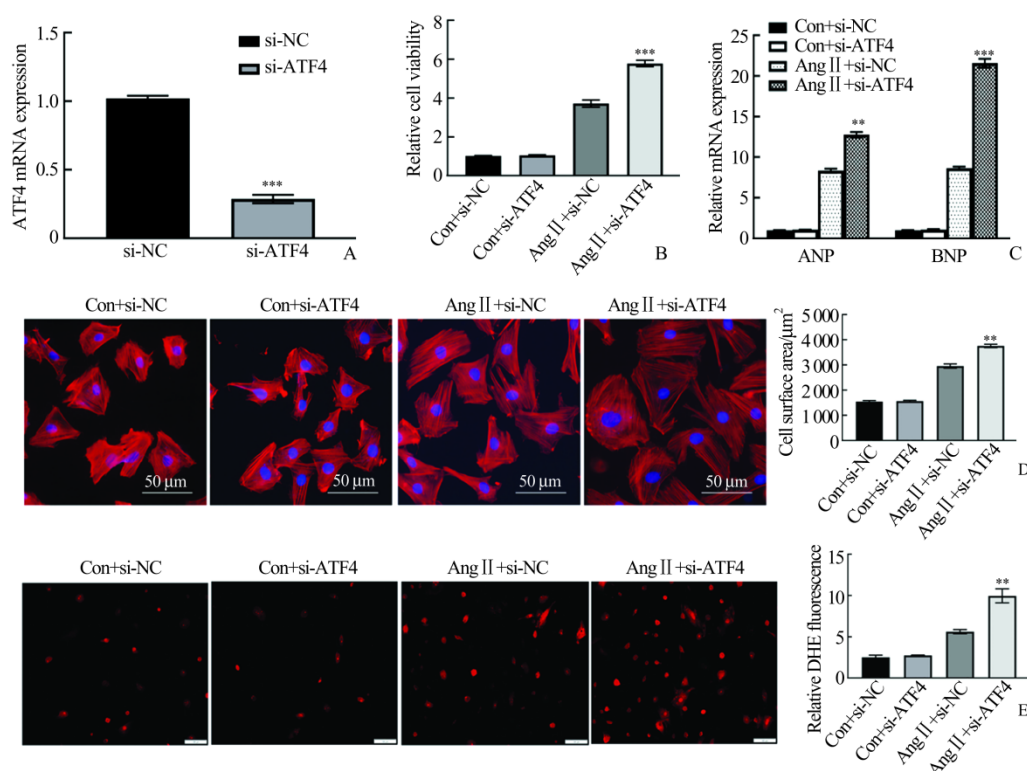
A~C. CCK-8分析(A)、MDA分析(B)和铁分析(C)CMVECs中细胞增殖水平、MDA水平和铁水平;D. DHE染色分析CMVECs中的ROS生成(比例尺=100 μm);E. CMVECs中GPX4、xCT、ACSL4蛋白过表达和定量分析。与Control组相比,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与Ang II组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与Ang II + ATF4组相比,& $P<0.05$,&& $P<0.01$;F. 小鼠心肌组织中GPX4、xCT、ACSL4蛋白表达和定量分析。与Control组相比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;与HS组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图3 ATF4可逆转Ang II诱导的培养的CMVECs中的铁死亡、细胞增殖和氧化应激增加

压力下存活。与DODSON等^[18]的假设一致,我们推测内质网可能是脂质ROS的主要靶点,也是HS诱导的铁死亡的关键亚细胞位置,内质网也可能是治疗HS诱导铁死亡的一个有希望的靶点。

ATF4是未折叠蛋白反应的主要转录调控因子,负责应激补救和细胞存活^[19]。ATF4已被报道^[20]在调节肿瘤细胞敏感性方面发挥双重作用,而ATF4在CMVECs中的功能尚未阐明。在目前的

研究中,我们发现ATF4表达是CMVECs中最显著上调的基因之一,ATF4保护CMVECs免受Ang II诱导的铁死亡,CMVECs中ATF4的下调促进了Ang II诱导的CMs的增殖和氧化应激的过度产生。ATF4表达下调与CMVECs的铁死亡相关,我们证实CMVECs中ATF4的下调加剧了Ang II诱导的CMs肥大和氧化应激。ATF4敲除对对照组无影响,这是一种非应激状态,因此证实了ATF4的经典



A. PCR证实 siRNA 转染后 ATF4 下调; B. CCK-8 分析 ATF4 沉默的 CMVECs 条件培养基对 CMs 细胞增殖的影响; C. PCR 检测 ATF4 沉默的 CMVECs 条件培养基对 CMs 促肥因子 ANP mRNA 和 BNP mRNA 表达的影响; D. 罗丹明鬼笔环肽检测 ATF4 沉默的 CMVECs 条件培养基对 CMs 细胞肥大影响 (比例尺=50 μm); E. DHE 染色检测 ATF4 沉默的 CMVECs 条件培养基对 CMs 细胞 ROS 生成的影响 (比例尺=100 μm)。与 Ang II + si-NC 组相比, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 4 CMVECs 中 ATF4 的敲除促进 Ang II 诱导的 CMs 增殖和氧化应激

作用,它是综合应激反应的调节剂^[20]。然而,本研究没有体内数据探讨 CMVECs 中 ATF4 下调对 CMs 的调节作用。未来需要更多的研究来探讨 CMVECs 中 ATF4 的特异性功能丧失是否会导致病理性心肌肥厚和纤维化。

我们进一步探讨了 ATF4 抑制铁死亡的机制。GPX4 作为铁死亡的关键蛋白,其表达的缺陷被认为是铁沉积症的生物标志物^[21]。GPX4 利用谷胱甘肽通过减少磷脂过氧化氢来抑制脂氧合酶介导的脂质过氧化。xCT 是一种胱氨酸葡萄糖酯反转运蛋白,负责调节谷胱甘肽的产生^[22]。ACSL4 通过优先催化多不饱和脂肪酸代谢和形成细胞脂质组成,参与调节铁敏感性^[23]。据报道^[24],ACSL4 的激活有助于肠和脑 I/R 中的铁死亡介导的组织损伤。本研究结果表明,ATF4 通过逆转 Ang II 介导的 xCT、GPX4 的下调和 ACSL4 上调而发挥其抗铁死亡作用。此外,ATF4 对 Ang II 刺激的 CMVECs 表现出抗铁中毒和抗氧化作用,可被 rhACSL4 部分阻断。这些数据表明,CMVECs 中 ATF4 通过调节 GPX4/ACSL4 信号通路减轻脂质过氧化和铁死亡。

综上所述,本研究揭示了铁死亡在 HS 诱导的心脏毒性中的关键作用,并确立了 ATF4 的心脏保护作用,其作用机制与调节 GPX4/ACSL4 信号通路介导的脂质过氧化和铁死亡有关。这些发现可以更好地理解 HS 诱导高血压心脏损伤的病理生理学基础,并为其预防或缓解提供新的线索。

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



参考文献

- [1] 黄菁菁, 黄灿霞, 张杰, 等. H 型高血压患者 HDL 亚组分的改变及对内皮细胞抗炎功能的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2022, 30(3): 192-197.
HUANG J J, HUANG C X, ZHANG J, et al. Changes of HDL subclasses and its effect on anti-inflammatory function of endothelial cells in H-type hypertension patients[J]. Chin J Arterioscler, 2022, 30(3): 192-197.
- [2] MONE P, VARZIDEH F, JANKAUSKAS S S, et al. SGLT2 inhibition via empagliflozin improves endothelial function and reduces mitochondrial oxidative

- stress: Insights from frail hypertensive and diabetic patients[J]. *Hypertension*, 2022, 79(8): 1633-1643.
- [3] SHI P L, SONG C, QI H P, et al. Up-regulation of IRF3 is required for docosa-hexaenoic acid suppressing ferroptosis of cardiac microvascular endothelial cells in cardiac hypertrophy rat[J]. *J Nutr Biochem*, 2022, 104: 108972.
- [4] 赵锦华, 吴青青, 唐其柱. 铁死亡在心血管疾病中的作用[J]. *中华心血管病杂志*, 2021, 49(4): 397-400.
ZHAO J H, WU Q Q, TANG Q Z. The role of ferroptosis in cardiovascular diseases[J]. *Chin J Cardiol*, 2021, 49(4): 397-400.
- [5] BAI T, LI M X, LIU Y F, et al. Inhibition of ferroptosis alleviates atherosclerosis through attenuating lipid peroxidation and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cell[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 160: 92-102.
- [6] GONG Y C, LI Q F, MA Z T, et al. Downregulation of activating transcription factor 4 attenuates lysophosphatidylcholine-induced inflammation *via* the NF- κ B pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 911: 174457.
- [7] DAI C S, CHEN X, LI J B, et al. Transcription factors in ferroptotic cell death[J]. *Cancer Gene Ther*, 2020, 27(9): 645-656.
- [8] BAI T, LIANG R P, ZHU R T, et al. microRNA-214-3p enhances erastin-induced ferroptosis by targeting ATF4 in hepatoma cells[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(7/8): 5637-5648.
- [9] TAO K, LI M, GU X F, et al. Activating transcription factor 4 aggravates angiotensin II-induced cell dysfunction in human vascular aortic smooth muscle cells *via* transcriptionally activating fibroblast growth factor 21[J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2022, 26(5): 347-355.
- [10] TIAN M, JIANG X X, LI X Y, et al. LKB1IP promotes pathological cardiac hypertrophy by targeting PTEN/Akt signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(5): 2517-2529.
- [11] FAN L L, ZHOU W, ZHANG L R, et al. Sitagliptin protects against hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced cardiac microvascular endothelial cell injury[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2099-2107.
- [12] MIURA T, SAKUYAMA A, XU L S, et al. Febuxostat ameliorates high salt intake-induced hypertension and renal damage in Dahl salt-sensitive rats[J]. *J Hypertens*, 2022, 40(2): 327-337.
- [13] FANG X X, CAI Z X, WANG H, et al. Loss of cardiac ferritin H facilitates cardiomyopathy *via* Slc7a11-mediated ferroptosis[J]. *Circ Res*, 2020, 127(4): 486-501.
- [14] DOS SANTOS L, BERTOLI S R, ÁVILA R A, et al. Iron overload, oxidative stress and vascular dysfunction: Evidences from clinical studies and animal models[J]. *Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj*, 2022, 1866(9): 130172.
- [15] IBRAHIM W S, AHMED H M S, MAHMOUD A A A, et al. Propranolol and low-dose isoproterenol ameliorate insulin resistance, enhance β -arrestin2 signaling, and reduce cardiac remodeling in high-fructose, high-fat diet-fed mice: Comparative study with metformin[J]. *Life Sci*, 2021, 286: 120055.
- [16] YUAN H S, PRATTE J, GIARDINA C. Ferroptosis and its potential as a therapeutic target[J]. *Biochem Pharmacol*, 2021, 186: 114486.
- [17] GASCHLER M M, HU F H, FENG H Z, et al. Determination of the subcellular localization and mechanism of action of ferrostatins in suppressing ferroptosis[J]. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(4): 1013-1020.
- [18] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG D D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2019, 23: 101107.
- [19] 李彪, 台勇, 迟正锁, 等. 基于内质网应激 PERK-ATF4-CHOP 信号通路探讨白藜芦醇对 AD 大鼠脑神经细胞凋亡的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(20): 2443-2446.
LI B, TAI Y, CHI Z S, et al. Effect of resveratrol on apoptosis of cerebral nerve cells in AD rats based on endoplasmic reticulum stress PERK-ATF4-CHOP signaling pathway[J]. *Chin J Immunol*, 2020, 36(20): 2443-2446.
- [20] MOECKEL S, LAFRANCE K, WETSCH J, et al. ATF4 contributes to autophagy and survival in sunitinib treated brain tumor initiating cells (BTICs)[J]. *Oncotarget*, 2019, 10(3): 368-382.
- [21] FORCINA G C, DIXON S J. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis[J]. *Proteomics*, 2019, 19(18): e1800311.
- [22] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B Y. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: Ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8): 599-620.
- [23] GUO N. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Transl Cancer Res*, 2022, 11(8): 2688-2699.
- [24] YUAN H, LI X M, ZHANG X Y, et al. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(3): 1338-1343.