

铁死亡与动脉粥样硬化

王 曼, 丁家望*, 汪心安, 朱胜奎, 万剑桥

(三峡大学第一临床医学院, 宜昌市中心人民医院心血管内科, 宜昌 443003)

摘要: 铁死亡是一种铁依赖性的脂质过氧化物水平积累所致的新的细胞死亡形式。铁死亡已被证明参与了多种疾病的发生与进展, 如神经系统疾病、肝脏疾病以及血液系统疾病等。铁死亡在心血管疾病中也发挥着重要作用。动脉粥样硬化是心血管疾病的主要发病基础, 动脉粥样硬化中内皮细胞、巨噬细胞及血管平滑肌细胞铁死亡参与了动脉粥样硬化的发生与进展。本文主要总结了铁死亡在动脉粥样硬化过程中的作用, 旨在为临床上治疗动脉粥样硬化提供潜在的治疗方向和药物。

关键词: 铁死亡; 动脉粥样硬化; 脂质代谢; 脂质过氧化; 炎症反应

Ferroptosis and atherosclerosis

WANG Man, DING Jiawang*, WANG Xin'an, ZHU Shengkui, WAN Jianqiao

(Department of Cardiology, the First Clinical Medical College of Three Gorges University,
Yichang Central People's Hospital, Yichang 443003, China)

Abstract: Ferroptosis is a new form of cell death that is iron-dependent and characterized by lipid peroxidation. Ferroptosis has been proved to be involved in the occurrence and progression of many diseases, such as nervous diseases, liver diseases, blood system diseases and tumors. In recent years, a large number of experimental studies have found that ferroptosis also plays an important role in cardiovascular diseases. Atherosclerosis is the main pathogenesis of cardiovascular diseases. The ferroptosis of endothelial cells, macrophages vascular smooth muscle cell in atherosclerosis may promote the occurrence and progression of atherosclerosis. Therefore, this review mainly summarizes the role of ferroptosis in the process of atherosclerosis, in order to provide potential therapeutic directions and drugs for the clinical treatment of atherosclerosis.

Key Words: ferroptosis; atherosclerosis; lipid metabolism; lipid peroxidation; inflammation.

铁死亡(ferroptosis)是一种不同于凋亡、坏死、焦亡的新型细胞死亡方式, 它与铁过载和脂质过氧化(lipid peroxidation, LPO)有密切的关系, 有不同于其他细胞死亡形式的特征性形态学改变。铁死亡在心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)中已经进行了一些研究, 如铁死亡与动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)、主动脉瘤和夹层、心

肌病、心力衰竭、心肌梗死以及心肌缺血-再灌注等疾病的关系。动脉粥样硬化是心血管疾病的主要发病机制, 在心血管疾病中具有重要的研究地位。已有的一些实验研究可直接或间接证明细胞铁死亡存在于动脉粥样硬化病变中, 并且发挥了重要作用。许多研究者对动脉粥样硬化病变中是否出现了细胞铁死亡现象有浓厚的兴趣, 对与动

收稿日期: 2021-10-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81770456)

第一作者: E-mail: 735962875@qq.com

*通信作者: E-mail: 2915337748@qq.com

脉粥样硬化密切相关的细胞,如血管内皮细胞、巨噬细胞和泡沫细胞等是否会发生铁死亡现象及其潜在机制进行了进一步的探索。本文旨在简要阐述铁死亡对动脉粥样硬化的发生和进展产生的影响。

1 铁死亡

1.1 铁死亡的发现

铁死亡是在2012年被提出的,用来描述由小分子erastin诱导的细胞死亡形式,这种独特的细胞死亡方式具有与其他类型的调节性细胞死亡不同的形态学特征,即线粒体体积缩小、线粒体嵴减少或消失、线粒体膜密度浓缩等细胞器形态学改变^[1,2]。Erastin是研究人员筛选出来的一种对致癌ras突变细胞系具有选择性致死作用的小分子化合物,可作为特异性铁死亡诱导剂。核浓缩和染色质边集是细胞凋亡的关键特征,而经过erastin处理的癌细胞中没有观察到特属于凋亡的这些特征。铁螯合剂或抗氧化剂可以抑制erastin诱导的细胞死亡,但凋亡和坏死抑制剂不能有效抑制这种特殊的细胞死亡。因此,这种细胞死亡方式被认定为是一种不同于坏死、凋亡和焦亡的新的细胞死亡类型^[2]。

1.2 铁死亡的相关机制

铁死亡发生的关键在于细胞内氧化和抗氧化系统失去平衡。抗氧化剂的耗竭和有害的氧化物质如脂质过氧化物生成过多均可引起铁死亡的发生。

首先,细胞内氧化物质产生增多,会引起细胞内氧化还原状态失去平衡。细胞内游离铁过量是引起铁死亡细胞内活性氧簇及脂质过氧化物产生过多的一个重要原因。铁代谢过程即铁被生物体吸收、储存及转化排泄的过程。胞外的 Fe^{3+} 或血红素铁被还原成 Fe^{2+} 并吸收进入小肠上皮细胞内,由二价金属转运体1(divalent metal transporter 1, DMT1)将进入细胞内的 Fe^{2+} 转运至铁蛋白中储存或转运至铁排出蛋白(FPN)处,再由FPN将其排出细胞外。FPN是目前已知唯一的铁排泄途径, Fe^{2+} 被氧化为 Fe^{3+} 并被转运出细胞,进入血浆中的 Fe^{3+} 立即与转铁蛋白(transferrin, Tf)结合,由存在于巨噬细胞和肝细胞表面的转铁蛋白受体(transferrin

receptor, TfR)通过受体介导的内吞作用将 Fe^{3+} 转移至细胞内涵体中, Fe^{3+} 在内涵体酸性环境中被还原为 Fe^{2+} ,再次被DMT1转运至细胞质中利用^[3]。铁以铁蛋白的形式储存在细胞内。在铁代谢过程中,任何一个环节出现异常均会引起铁代谢异常。铁代谢途径紊乱是铁死亡过程启动的核心。铁吸收增加和排泄减少会引起体内或细胞内铁超载(iron overload)。尤其是当细胞内游离铁水平升高时,细胞内游离铁通过芬顿反应产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),ROS攻击细胞膜中的不饱和脂肪酸链(PUFAs),形成大量有害的脂质过氧化物,从而引起铁死亡。芬顿反应是 Fe^{2+} 和 H_2O_2 之间的链反应催化生成羟基自由基、醇、酯类等常见有机化合物的过程。

脂质及相关酶代谢异常会引起脂质过氧化物产生过多。含有多不饱和脂肪酸链(polyunsaturated fatty acid, PUFAs)的脂质容易受到ROS的攻击,从而发生脂质过氧化作用,这一过程与铁死亡密切相关^[4]。酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(acyl-coA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)和溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶3(lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3)是将PUFAs酯化为磷脂的关键酶^[5,6],ACSL4更倾向于催化长链PUFAs与辅酶A链接,LPCAT3催化其产物酯化为磷脂,如此便引起细胞膜中PUFAs含量上升,使该细胞膜更容易受到ROS的攻击,产生更多的脂质过氧化物。细胞内与铁死亡密切相关的还有脂氧合酶(lipoxygenase, LOXs),该酶可催化各类脂质氧化物的形成,对发生铁死亡的细胞进行脂质组学分析,可检测到该酶的多种氧化产物的积累^[7]。进一步分析发现,多不饱和脂肪酸链如花生四烯酸(arachidonic acid, AA)和肾上腺酸(adrenic acid, AdA)是通过过氧化作用促进铁死亡的关键磷脂^[8]。上述脂质及脂质相关酶代谢发生紊乱时,亦可引起铁死亡的发生。

当有害的脂质过氧化物产生后,细胞内抗氧化系统对其进行清除,抗氧化系统被削弱时,脂质过氧化物未能及时得到清除,便会引起细胞铁死亡。作为特异的铁死亡诱导剂,erastin抑制胱氨酸-谷氨酸反转运体(System Xc-),从而阻止胱氨酸进入细胞^[9]。胱氨酸是体内抗氧化剂谷胱甘肽

(glutathione, GSH)的合成原料之一。GSH作为细胞中最重要的抗氧化剂之一,在平衡细胞氧化还原状态中起关键作用。在System Xc-中,谷氨酸和胱氨酸以1:1的比例交换,胱氨酸进入细胞后转化为半胱氨酸,半胱氨酸与谷氨酸、甘氨酸在酶的催化下形成GSH。故当System Xc-被抑制,GSH合成受阻,造成GSH耗竭,在细胞内重要的抗氧化剂缺失的情况下,清除细胞内过量的氧化物质如活性簇的能力下降,可引起细胞膜发生致死性的脂质过氧化过程^[10]。谷胱甘肽过氧化物酶4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)是一种利用GSH作为底物的酶,GPX4可以直接还原细胞膜中由ROS攻击而产生的脂质过氧化物,当GPX4失活时,会使细胞内有害的氧化物质无法及时被清除,尤其是细胞内逐渐累积的脂质过氧化物^[2]。GSH缺乏并非GPX4失活的必需条件,有些物质能够直接抑制GPX4活性,如RSL3。RSL3是一种能够特异性抑制铁死亡的小分子化合物^[11]。

多年来,Cyst(e)ine/GSH/GPX4轴一直被认为是调节铁死亡的唯一机制,然而近些年的研究发现,铁死亡抑制蛋白1(ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)具有独立于GPX4的抗铁死亡机制。辅酶Q10(coenzyme Q10, CoQ10)存在两种状态,完全氧化态(泛醌CoQ)和完全还原态(泛醇CoQH₂),泛醇CoQH₂是亲脂性抗氧化剂,可诱捕脂质过氧自由基,而FSP1通过NADPH将完全氧化态泛醌CoQ不断还原为具有还原活性的泛醇CoQH₂,从而抑制脂质过氧化。此外,还存在一种非GPX4依赖性的抗铁死亡调控机制:GCH1-BH4-DHFR轴。表达三磷酸尿苷环化水解酶1(GTP cyclohydrolase 1, GCH1)的细胞合成的BH4(四氢生物蝶呤)/BH2(二氢生物蝶呤)引起脂质重塑,即选择性抑制含有两个多不饱和脂肪酸酰基尾部的磷脂被消耗,从而抑制铁死亡^[12]。最近一项研究发现了位于线粒体中的铁死亡防御系统中的可以通过不依赖Cyst(e)ine/GSH/GPX4轴调控铁死亡的新机制,即二氢乳清酸脱氢酶(dihydroorotate dehydrogenase, DHODH)^[13]。DHODH是位于线粒体内膜的黄素依赖酶,其主要功能是催化嘧啶核苷酸合成途径的第四步反应,即将二氢乳清酸氧化为乳清酸,与此同时将电子传递给线粒体内膜中的泛醌,使其

被还原为泛醇CoQH₂。前文已提到,CoQH₂可抑制脂质过氧化,因此,DHODH通过调控线粒体内膜中的CoQH₂生成进而发挥抗铁死亡作用^[13]。

铁死亡细胞内出现线粒体体积缩小、线粒体嵴减少或消失、线粒体膜密度浓缩等形态学改变。目前对于线粒体在铁死亡中的作用有很大的争议,甚至对于线粒体是否直接参与铁死亡都未达成一致意见。Gao等^[14]通过体外实验证明,在GSH缺乏的条件下,线粒体代谢明显促进LPO的产生和铁死亡,因此线粒体参与GSH缺乏或抑制胱氨酸-谷氨酸转运体诱导的铁死亡,而不参与GPX4失活引起的铁死亡。Sun等^[15]研究发现,erastin或GSH合成抑制剂丁硫氨酸-亚砷亚胺(L-Buthionine-sulfoximine, BSO)能够抑制细胞活力,增加LPO的生成,但没有改变线粒体质量或诱导线粒体超氧化物的形成。Gaschler等^[16]却证明,线粒体缺失的细胞仍然对一组铁死亡诱导剂敏感。线粒体功能紊乱及损伤到底是铁死亡过程中的启动因素还是终末过程,有待进一步的研究。

2 铁死亡与炎症

铁死亡与炎症有密切的联系。铁死亡的发生与氧化应激和脂质及相关酶代谢紊乱相关,而炎症恰巧也与二者有密不可分的关系。如上文中提到的AA可通过过氧化作用促进铁死亡的发生,而AA在此前已被证实可被环氧合酶(cyclooxygenase, COX)、脂氧合酶和细胞色素P450代谢合成具有生物活性的炎症介质,如前列腺素、白三烯、环氧二十碳三烯酸和羟基二十碳三烯酸^[17],这些物质在炎症反应过程中发挥了重要作用。GSH和GPX4被证实在细胞死亡和炎症反应中起关键作用^[18]。抑制GPX4在人癌细胞中的表达可以上调12-脂氧合酶(12-LOX)和环氧合酶-1(COX-1)的表达,从而引发炎症反应。相反,激活GPX4可以抑制AA的氧化,通过NF-κB通路抑制铁死亡和炎症反应,并伴有ROS生成减少。ROS诱导的氧化应激会加剧脂质过氧化物(LPO)的产生,LPO诱导的铁死亡引起细胞释放损伤相关分子模式(DAMPs),可能通过晚期糖基化终产物受体(the receptor of advanced glycation endproducts, RAGE)激活NF-κB通路促进无菌性炎症^[19]。Li等^[20]发现,铁死亡特异性抑制剂

Ferrostatin-1(Fer-1)能够抑制星形胶质细胞中炎症反应和铁死亡的发生。乙酰化高迁移率族蛋白B1(high mobility group protein B1, HMGB1)与GPX4相互作用,通过抑制GPX4活性介导脂多糖诱导的结直肠癌细胞发生炎症反应^[21]。另一方面,氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)诱导的脂质过氧化物通过巨噬细胞极化部分促进炎症活化^[22]。铁可以通过调节M1巨噬细胞的极化参与免疫系统的调控^[23]。巨噬细胞内的铁积累会促进巨噬细胞向促炎方向极化,以及通过促进TNF- α 等促炎因子的表达^[24]。上述大量证据表明,铁死亡的关键调节因子对炎症反应的影响与其对铁死亡的调控是同步的,因此推测铁死亡与炎症之间存在正相关的关系。

3 铁死亡与动脉粥样硬化

Bai等^[25]研究表明,铁死亡抑制剂Fer-1通过降低小鼠主动脉内皮细胞中的LPO水平,缓解高脂饮食诱导的*ApoE*基因敲除小鼠的动脉粥样硬化病变。*ApoE*基因敲除小鼠是动脉粥样硬化研究的常用小鼠模型,总血浆胆固醇水平较野生型小鼠显著提高,更容易自发形成动脉粥样硬化病变。不饱和脂肪酸的过氧化产物是LPO的主要来源,可以触发内皮细胞中ROS升高、一氧化氮减少、巨噬细胞慢性炎症、泡沫细胞形成,最终促进动脉粥样硬化病变的形成与发展。此外,与铁死亡相关的低密度脂蛋白的过氧化能够引起内皮细胞的功能障碍和巨噬细胞的活化。在发现铁死亡之前,就已经有实验证明,GPX4的过表达可以清除过量的ROS和磷脂过氧化物,显著减轻*ApoE*基因敲除小鼠的动脉粥样硬化的进展^[25]。另有研究发现,GPX4激活剂可减少脂质过氧化物的产生并抑制炎症,因此GPX4激活剂有望成为治疗炎症和其他脂质过氧化介导的疾病的潜在治疗药物,如动脉粥样硬化^[26]。另外,铁通过促进细胞内LPO的生成从而参与动脉粥样硬化病变的发展,细胞内具有还原活性的游离铁催化自由基反应导致内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞中的LDL发生氧化,这可能是铁参与动脉粥样硬化病变发生发展的大致方向^[27]。Priya等^[22]实验发现,经柠檬酸铁铵处理的巨噬细胞向M1型巨噬细胞转化,即检测到CD68、

TNF- α 和IL-6等促炎因子表达增加,铁螯合剂处理则可以抑制促炎因子水平的上升。因此,铁过载可以促进巨噬细胞极化为促炎症表型。因而我们有理由推断,在各种因素的作用下,内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞发生铁死亡可能促进了动脉粥样硬化病变的发生发展。

3.1 铁死亡细胞诱导内皮功能障碍加重AS

内皮细胞功能障碍是动脉粥样硬化的起始事件。Marques等^[28]用右旋糖酐铁注射野生型小鼠,用扫描电镜可发现微小的内皮细胞结构损伤,而这一损伤在经相同处理后的*ApoE*基因敲除小鼠中进一步恶化,与对照组相比,只有*ApoE*基因敲除小鼠组出现了内皮功能障碍。作者进一步研究发现,内皮功能障碍的发生与乙酰胆碱介导的血管内皮舒张功能受损及一氧化氮减少相关的去氧肾上腺素高反应性有关。与野生型小鼠相比,铁螯合剂在*ApoE*基因敲除小鼠的主动脉中能够更大幅度地降低去氧肾上腺素的高反应性。最后的研究结果也证实,经右旋糖酐铁处理后的*ApoE*基因敲除小鼠主动脉内皮细胞中发现触发炎症反应的关键调节因子环氧合酶-2(COX-2)的表达增加。铁转运体(ferroportin, FPN)是细胞内铁排泄的唯一途径,若FPN缺失会造成细胞内甚至体内铁超载。Vinci等^[29]将小鼠的*ApoE*和FPN双基因敲除,与*ApoE*单基因敲除小鼠组相比,*ApoE*^{-/-}FPN^{-/-}小鼠动脉粥样硬化病变明显加重,且斑块不稳定性明显增加,提示铁过载能够促进动脉粥样硬化病变的进展。进一步研究发现,非转铁蛋白结合铁的形成损害了内皮细胞和平滑肌细胞的活力和功能,使动脉粥样硬化病变进一步恶化。铁超载加重的动脉粥样硬化病变表现为血管平滑肌细胞和内皮细胞活力与功能障碍,铁沉积在血管平滑肌中层会导致高度易损的斑块形成。我们推测,铁超载引起了血管内皮细胞中的自由基反应,自由基诱导的氧化应激启动炎症反应,并耗竭抗氧化系统,引起有害的脂质过氧化物积累,最终引起铁死亡,促进动脉粥样硬化病变的发生与进展。此外,Bai等^[25]的实验中,首次在动脉粥样硬化病变组织中检测到了铁死亡相关性指标,如GPX4、GSH、ROS、LPO以及LPO的代谢产物丙二醛等,直接证明在血管内皮细胞中ROS介导脂质过氧化过

程引起铁死亡, 导致内皮功能障碍, 从而促进动脉粥样硬化病变。ox-LDL可诱导内皮细胞功能障碍, 作者推测这一过程也与铁死亡密切相关。用ox-LDL和erastin分别处理过的小鼠主动脉内皮细胞中均可发现受损的线粒体内ROS、脂质过氧化物和丙二醛水平升高, 而铁死亡抑制剂Fer-1可抑制这些过氧化产物的产生。这强烈暗示ox-LDL和erastin一样, 可以诱导主动脉内皮细胞发生铁死亡, 而抑制铁死亡可改善ox-LDL诱导的内皮细胞损伤和脂质过氧化物的产生。

有研究提出, 转录激活因子3(activating transcription 3, ATF3)可能参与了血管内皮细胞铁死亡过程。ATF3过表达被证实可以通过抑制System Xc-, 使细胞内抗氧化剂GSH耗竭, 无法清除过量的LPO, 而引起铁死亡^[30]。而此前的另一项研究证明, ATF3在人动脉粥样硬化病变的血管内皮细胞和巨噬细胞中表达, 且在溶血磷脂酰胆碱、ox-LDL诱导的死亡细胞中高表达, 而在正常人群血管内皮细胞中几乎不表达。该实验提供的体外证据表明, ATF3参与了致动脉粥样硬化因子诱导的内皮细胞死亡^[31]。而另一项研究发现, ATF3在小鼠动脉粥样硬化斑块的巨噬细胞中高表达, 而在血管内皮细胞中几乎不表达, 且在小鼠动脉粥样硬化斑块发生破裂的巨噬细胞中表达水平低于稳定动脉粥样硬化斑块, 因此该实验研究者认为, ATF3表达与动脉粥样硬化斑块稳定性有关^[32]。综上所述, 可以肯定的是, ATF3参与了动脉粥样硬化斑块的形成与进展, 但具体机制是否与铁死亡相关仍有待进一步研究。

关于动脉粥样硬化病变中内皮细胞发生铁死亡的研究尚不多, 但一些体外实验证实了人脐静脉内皮细胞铁死亡的过程。Wang等^[33]提出, PM2.5通过铁超载和氧化还原失衡引起人内皮细胞铁死亡。在体外实验中, 经PM2.5处理的人脐静脉内皮细胞出现活力降低, 铁死亡特异性抑制剂Fer-1和铁螯合剂处理可以逆转细胞活力的降低, 表明铁死亡在PM2.5诱导的内皮细胞功能障碍和血管毒性中发挥了重要作用。进一步检测生化指标发现, 经PM2.5处理的内皮细胞中出现铁超载、GSH耗竭、脂质过氧化和还原产物失衡。与对照组相比, 经PM2.5处理的内皮细胞中铁死亡相关基因差

异性表达, 作为炎症级联反应的核心, 同时是铁死亡的标志物的COX-2表达显著增强, 氧化应激相关基因如溶脂载体家族7成员11(solute carrier family 7, member 11, SLC7A11)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶1(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 1, NOX1)、醌氧化还原酶1[NAD(P)H quinone dehydrogenase 1, NQO1]表达上调。综上表明, PM2.5诱导内皮细胞发生了铁死亡, 且与内皮细胞中铁超载、氧化还原状态失衡密切相关。MiRNA17-92(miR-17-92)是一个多功能的致癌miRNA簇, 在肿瘤血管生成和组织发育中发挥重要作用。锌指蛋白A20(miR-17-92的有效靶点)被鉴定为一种新的内皮细胞铁死亡的调节因子, Xiao等^[34]提出, miR-17-92靶向A20-ASCL4轴抑制erastin诱导的内皮细胞铁死亡。

3.2 巨噬细胞铁死亡与AS的关系

AS是发生在大中型动脉内膜中的一种慢性炎症, 浸润的炎症细胞被细胞因子和氧化应激所激活。巨噬细胞在动脉粥样硬化各个阶段释放炎症因子调节炎症反应, 还可以吞噬有害的ox-LDL形成泡沫细胞。因此, 巨噬细胞在动脉粥样硬化的发生和进展中发挥着举足轻重的作用。动脉粥样硬化中的巨噬细胞有3种亚型: M1型巨噬细胞, 具有促炎功能; M2型巨噬细胞, 能够分泌抗炎因子^[35]; M(Hb)型巨噬细胞, 由血红蛋白-触珠蛋白复合体诱导, 能够分泌抗炎因子^[36]。脂质摄入是M1巨噬细胞在斑块中分化的主要刺激因素, 从而诱导炎症因子和泡沫细胞的形成, 被认为是促动脉粥样硬化的。此外, M1巨噬细胞释放金属蛋白酶1、金属蛋白酶3和金属蛋白酶9, 可以水解纤维帽内的胶原纤维, 导致斑块不稳定。而M2巨噬细胞受Th2型细胞因子(IL-4、IL-10、IL-13)的刺激, 产生抗炎细胞因子, 被认为可以平衡炎症, 促进炎症消退和组织修复^[37]。

一项关于石棉的研究中出现了巨噬细胞铁死亡这一过程: 暴露于石棉的巨噬细胞在经过额外的铁处理之后, 发现巨噬细胞的活力显著下降, 并加重了巨噬细胞的死亡现象。实验中使用透射电镜观察到, 暴露于石棉的巨噬细胞中的线粒体发生了皱缩, 这正是铁死亡的特征性形态学表型, 且检测到铁死亡所特有的指标变化, 如GPX4

和转铁蛋白受体(TfR1)下降、铁蛋白上升。因此,推测铁死亡参与了石棉诱导的巨噬细胞死亡过程^[38]。在结核分枝杆菌(*M.tuberculosis*, Mtb)与铁死亡相关的一项研究中,也存在巨噬细胞铁死亡现象。研究者发现, Mtb诱导的巨噬细胞坏死与GPX4水平降低有关,同时游离铁、线粒体超氧化物和脂质过氧化物水平升高,而这些都是铁死亡的典型特征。此外,在Mtb感染的巨噬细胞培养过程中,细胞死亡能够被铁死亡抑制剂Fer-1和铁螯合剂抑制。这些实验结果强烈提示, Mtb感染的巨噬细胞发生了铁死亡,铁死亡参与了结核分枝杆菌感染引起的细胞死亡和组织坏死^[39]。铁超载是铁死亡启动的核心环节,且动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞内存在丰富的脂质,据此可以提出合理假设:在动脉粥样硬化斑块的巨噬细胞中,铁过载引起大量脂质过氧化物的产生,继而导致巨噬细胞铁死亡。目前已有研究结果支持这一假设。铁和维生素C共处理能够使巨噬细胞内脂质过氧化水平增高,表现为低水平的PUFAs、高水平的丙二醛以及GSSG/GSH比值升高^[40]。

刘洋等^[41]在高脂饮食喂养的*ApoE*^{-/-}小鼠主动脉组织中检测到p53的mRNA表达明显上升, GPX4和SLC7A11的mRNA表达呈降低趋势,证实高脂饮食诱导的*ApoE*^{-/-}小鼠AS中铁死亡的发生。在体外实验中,经ox-LDL处理的巨噬细胞p53的mRNA及蛋白质表达水平明显升高,GPX4与SLC7A11的mRNA及蛋白质表达水平显著降低。这说明, ox-LDL诱导的巨噬细胞源性的泡沫细胞有铁死亡发生。有研究证实, SIRT1是治疗AS的新靶点,它调节许多非组蛋白,并发挥抗动脉粥样硬化作用^[42]。Su等^[43]通过实验研究发现,经柠檬酸铁铵(ferric citrate, FAC)处理的巨噬细胞源性的泡沫细胞发生铁死亡,在坏死抑制剂、自噬抑制剂及铁死亡抑制剂中,只有铁死亡抑制剂能够抑制FAC诱导的泡沫细胞铁死亡。沉默调节蛋白1(sirtuin 1, SIRT1)是Sirtuins家族成员,与细胞增殖、分化、衰老和代谢相关。Su等^[43]的实验结果证明, SIRT1抑制剂参与了FAC诱导的泡沫细胞铁死亡,激活SIRT3会减轻泡沫细胞铁死亡^[43]。因此,有理由认为,巨噬细胞铁死亡这一过程也参与了动脉粥样

硬化斑块的形成与进展。

综上所述,巨噬细胞铁死亡加重动脉粥样硬化的可能机制如下:在炎症调节或其他病理情况下,巨噬细胞内铁水平增高,细胞内过量的游离铁通过芬顿反应产生大量的活性氧自由基(ROS), ROS攻击细胞膜,发生脂质过氧化过程,脂质过氧化物水平急剧升高,脂质过氧化终产物丙二醛水平随之升高;或巨噬细胞吞噬大量脂质,氧化应激诱导产生的ROS攻击氧化的脂质,产生过量有害的脂质过氧化物;细胞内过量的氧化物质使抗氧化物质耗尽,或在某些情况下抗氧化系统中的关键物质缺乏,或关键酶活性降低,使细胞氧化还原状态改变,最终引起巨噬细胞发生铁死亡,加重动脉粥样硬化病变。

3.3 铁死亡对血管平滑肌(vascular smooth muscle, VSMCs)的影响

血管平滑肌向血管内膜的迁移参与了动脉粥样硬化斑块的形成^[44]。在一项研究中发现,丁酸盐可以上调VSMCs中GPX4的表达,丁酸盐处理后的VSMCs中的GPX4可能通过阻断氧化应激、清除ROS来下调ROS介导的信号通路,从而抑制VSMCs的增殖,减轻动脉粥样硬化,保护动脉^[45]。吸烟是动脉粥样硬化的独立危险因素。有研究发现,香烟提取物(cigarette smoke extract, CSE)能够诱导大鼠VSMCs发生细胞死亡^[46]。这一过程几乎可被铁死亡抑制剂完全抑制,而凋亡抑制剂、坏死抑制剂及焦亡抑制剂对这一过程无明显影响。因此研究者认为, CSE诱导大鼠VSMCs发生了铁死亡,进一步探索发现,经CSE处理过的VSMCs中脂质过氧化物水平显著上升、GSH水平显著下降,这些变化不出意料地被铁死亡抑制剂逆转,而GPX4过表达则对CSE诱导的铁死亡没有显著影响^[46]。这些结果表明, CSE诱导了VSMCs中的GSH消耗和脂质过氧化作用,从而引起铁死亡^[46]。杨茜等^[47]研究发现,花生四烯酸15-脂氧合酶(LOX-15)过表达明显促进erastin诱导的人主动脉血管平滑肌细胞铁死亡,为抑制动脉粥样硬化中血管平滑肌细胞铁死亡提供了潜在靶点。我们推测,与内皮细胞相比, VSMCs有不同的触发铁死亡的机制,可能通过不同的途径产生脂质过氧化物。

4 讨论

铁死亡是一种归因于细胞器和细胞质膜损伤的程序性细胞死亡, 其中关键枢纽是ROS诱导的脂质过氧化物的过量产生和清除。铁死亡与动脉粥样硬化的发生机制存在诸多交点, 如铁及脂质代谢紊乱、氧化应激、脂质过氧化作用及炎症。涉及二者发生机制的环节错综复杂, 目前已有一些实验研究提示, 动脉粥样硬化中有相关细胞发生了铁死亡, 具体机制有待进一步研究。铁死亡作为一种存在于多种疾病病理过程中的细胞死亡方式, 在不同的疾病中扮演着不同的角色。铁死亡调控靶点众多, 虽然许多动物及细胞实验已证明通过抑制或激活相应的靶点抑制铁死亡可以减轻许多疾病的病变程度, 但是落实到临床应用方面, 则需要更全面的考虑: 该靶点是否在其余的代谢通路中起关键作用, 抑制或激活该靶点会带来较大甚至致命的副作用吗? 铁死亡在肿瘤治疗中起积极正向的作用, 因此比较关注的是铁死亡抑制剂用于临床治疗能否增加患者发生肿瘤的风险。如前所述, LOX-15酶抑制剂有望作为针对长期吸烟的冠心病患者的特异性治疗手段, 但需要结合LOX-15在其他生理或病理过程中的作用, 需要进一步的预测及验证其副作用, 权衡利弊之后再行取舍。无论如何, 未来需要更进一步地探索铁死亡的具体机制, 这些机制的阐明必然在不久的将来为预防和治疗心血管疾病提供新的生物标志物和前瞻性靶点, 为临床治疗创造更多的可能性。

参考文献

- [1] Xie Y, Hou W, Song X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ*, 2016, 23(3): 369-379
- [2] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072
- [3] Conrad M, Pratt DA. The chemical basis of ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(12): 1137-1147
- [4] Zhong S, Li L, Shen X, et al. An update on lipid oxidation and inflammation in cardiovascular diseases. *Free Radical Biol Med*, 2019, 144: 266-278
- [5] Yuan H, Li X, Zhang X, et al. Identification of ACSL4 as a biomarker and contributor of ferroptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(3): 1338-1343
- [6] Bayr H, Anthonymuthu TS, Tyurina YY, et al. Achieving life through death: redox biology of lipid peroxidation in ferroptosis. *Cell Chem Biol*, 2020, 27(4): 387-408
- [7] Zhou Y, Zhou H, Hua L, et al. Verification of ferroptosis and pyroptosis and identification of PTGS2 as the hub gene in human coronary artery atherosclerosis. *Free Radical Biol Med*, 2021, 171: 55-68
- [8] Chu B, Kon N, Chen D, et al. ALOX12 is required for p53-mediated tumour suppression through a distinct ferroptosis pathway. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(5): 579-591
- [9] Zhao Y, Li Y, Zhang R, et al. The role of erastin in ferroptosis and its prospects in cancer therapy. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 5429-5441
- [10] Dixon SJ, Winter GE, Musavi LS, et al. Human haploid cell genetics reveals roles for lipid metabolism genes in nonapoptotic cell death. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(7): 1604-1609
- [11] Sui X, Zhang R, Liu S, et al. RSL3 drives ferroptosis through GPX4 inactivation and ROS production in colorectal cancer. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1371
- [12] Kraft VAN, Bezjian CT, Pfeiffer S, et al. GTP cyclohydrolase 1/tetrahydrobiopterin counteract ferroptosis through lipid remodeling. *ACS Cent Sci*, 2020, 6(1): 41-53
- [13] Mao C, Liu X, Zhang Y, et al. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer. *Nature*, 2021, 593(7860): 586-590
- [14] Gao M, Yi J, Zhu J, et al. Role of mitochondria in ferroptosis. *Mol Cell*, 2019, 73(2): 354-363.e3
- [15] Sun Y, Zheng Y, Wang C, et al. Glutathione depletion induces ferroptosis, autophagy, and premature cell senescence in retinal pigment epithelial cells. *Cell Death Dis*, 2018, 9(7): 753
- [16] Gaschler MM, Hu F, Feng H, et al. Determination of the subcellular localization and mechanism of action of ferrostatins in suppressing ferroptosis. *ACS Chem Biol*, 2018, 13(4): 1013-1020
- [17] Kagan VE, Mao G, Qu F, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 81-90
- [18] Mayr L, Grabherr F, Schwärzler J, et al. Dietary lipids fuel GPX4-restricted enteritis resembling Crohn's disease. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 1775
- [19] Yu Y, Yan Y, Niu F, et al. Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 193
- [20] Li S, Zhou C, Zhu Y, et al. Ferrostatin-1 alleviates angiotensin II (Ang II)-induced inflammation and ferroptosis in astrocytes. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107179
- [21] Yang Y, Yang L, Jiang S, et al. HMGB1 mediates

- lipopolysaccharide-induced inflammation via interacting with GPX4 in colon cancer cells. *Cancer Cell Int*, 2020, 20(1): 205
- [22] Handa P, Thomas S, Morgan-Stevenson V, et al. Iron alters macrophage polarization status and leads to steatohepatitis and fibrogenesis. *J Leukoc Biol*, 2019, 105(5): 1015-1026
- [23] Wunderer F, Traeger L, Sigurslid HH, et al. The role of hepcidin and iron homeostasis in atherosclerosis. *Pharmacol Res*, 2020, 153: 104664
- [24] Wang L, Harrington L, Trebicka E, et al. Selective modulation of TLR4-activated inflammatory responses by altered iron homeostasis in mice. *J Clin Invest*, 2009, 119(11): 3322
- [25] Bai T, Li M, Liu Y, et al. Inhibition of ferroptosis alleviates atherosclerosis through attenuating lipid peroxidation and endothelial dysfunction in mouse aortic endothelial cell. *Free Radical Biol Med*, 2020, 160: 92-102
- [26] Sun Y, Chen P, Zhai B, et al. The emerging role of ferroptosis in inflammation. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110108
- [27] Ouyang S, You J, Zhi C, et al. Ferroptosis: the potential value target in atherosclerosis. *Cell Death Dis*, 2021, 12(8): 782
- [28] Marques VB, Leal MAS, Mageski JGA, et al. Chronic iron overload intensifies atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice: role of oxidative stress and endothelial dysfunction. *Life Sci*, 2019, 233: 116702
- [29] Vinchi F, Porto G, Simmelbauer A, et al. Atherosclerosis is aggravated by iron overload and ameliorated by dietary and pharmacological iron restriction. *Eur Heart J*, 2020, 41(28): 2681-2695
- [30] Wang L, Liu Y, Du T, et al. ATF3 promotes erastin-induced ferroptosis by suppressing system Xc⁻. *Cell Death Differ*, 2020, 27(2): 662-675
- [31] Nawa T, Nawa MT, Adachi MT, et al. Expression of transcriptional repressor ATF3/LRF1 in human atherosclerosis: colocalization and possible involvement in cell death of vascular endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2002, 161(2): 281-291
- [32] Qin W, Yang H, Liu G, et al. Activating transcription factor 3 is a potential target and a new biomarker for the prognosis of atherosclerosis. *Hum Cell*, 2021, 34(1): 49-59
- [33] Wang Y, Tang M. PM2.5 induces ferroptosis in human endothelial cells through iron overload and redox imbalance. *Environ Pollut*, 2019, 254: 112937
- [34] Xiao FJ, Zhang D, Wu Y, et al. miRNA-17-92 protects endothelial cells from erastin-induced ferroptosis through targeting the A20-ACSL4 axis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 515(3): 448-454
- [35] Ocaña-Guzman R, Vázquez-Bolaños L, Sada-Ovalle I. Receptors that inhibit macrophage activation: mechanisms and signals of regulation and tolerance. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 1-14
- [36] Finn AV, Nakano M, Polavarapu R, et al. Hemoglobin directs macrophage differentiation and prevents foam cell formation in human atherosclerotic plaques. *J Am College Cardiol*, 2012, 59(2): 166-177
- [37] Martinet W, Coornaert I, Puylaert P, et al. Macrophage death as a pharmacological target in atherosclerosis. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 306
- [38] Ito F, Yanatori I, Maeda Y, et al. Asbestos conceives Fe(II)-dependent mutagenic stromal milieu through ceaseless macrophage ferroptosis and β -catenin induction in mesothelium. *Redox Biol*, 2020, 36: 101616
- [39] Amaral EP, Costa DL, Namasivayam S, et al. A major role for ferroptosis in Mycobacterium tuberculosis-induced cell death and tissue necrosis. *J Exp Med*, 2019, 216(3): 556-570
- [40] Marcil V, Lavoie JC, Emonnot L, et al. Analysis of the effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage, antioxidant response and inflammation in THP-1 macrophages. *Clin Biochem*, 2011, 44(10-11): 873-883
- [41] 刘洋, 孙岳, 杨安宁, 等. 铁死亡参与高脂饮食诱导的 ApoE(-/-)小鼠动脉粥样硬化及 ox-LDL 诱导的泡沫细胞形成过程. *实用医学杂志*, 2021, 37(5): 585-590
- [42] D'Onofrio N, Servillo L, Balestrieri ML. SIRT1 and SIRT6 signaling pathways in cardiovascular disease protection. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28(8): 711-732
- [43] Su G, Yang W, Wang S, et al. SIRT1-autophagy axis inhibits excess iron-induced ferroptosis of foam cells and subsequently increases IL-1 β and IL-18. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 561: 33-39
- [44] Zhao X, Tan F, Cao X, et al. PKM2-dependent glycolysis promotes the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells during atherosclerosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2020, 52(1): 9-17
- [45] Mathew OP, Ranganna K, Milton SG. Involvement of the antioxidant effect and anti-inflammatory response in butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation. *Pharmaceuticals*, 2014, 7(11): 1008-1027
- [46] Sampilvanjil A, Karasawa T, Yamada N, et al. Cigarette smoke extract induces ferroptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circulatory Physiol*, 2020, 318(3): H508-H518
- [47] 杨茜, 郑宪鑫, 朱亮, 等. ALOX15对血管平滑肌细胞铁死亡的影响. *青岛大学学报(医学版)*, 2021, 57(6): 912-914