

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1481-10

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240601

## 香叶木素对RSL3诱导小鼠精母细胞GC-2铁死亡的抑制作用及其机制

马宝莲, 胡晓雪, 艾霄文, 张永兰

(重庆理工大学药学与生物工程学院药理学教研室, 重庆 400054)

**[摘要]** **目的:** 探讨香叶木素(DIO)对谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)抑制剂(1S, 3R)-RSL3(RSL3)诱导小鼠精母细胞GC-2铁死亡的抑制作用, 并阐明相关作用机制。**方法:** GC-2细胞分为对照组、RSL3组、RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组和RSL3+铁死亡抑制剂Ferrostatin-1(Fer-1)组(200 nmol·L<sup>-1</sup> Fer-1)。分别采用0、1、5、10、50、100、500和1 000 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3溶液及0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0和50.0 μmol·L<sup>-1</sup> DIO溶液处理细胞。另取GC-2细胞, 分为空白组、模型组和给药组, 给药组GC-2细胞按照处理方式分为0.8、4.0和20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组及RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组和RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组。噻唑蓝(MTT)法检测各组GC-2细胞存活率。采用100 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3分别作用GC-2细胞0、6、12、24、36和48 h, Western blotting法检测各组GC-2细胞中铁死亡相关蛋白表达水平。试剂盒检测各组GC-2细胞中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)水平及谷胱甘肽(GSH)/氧化型谷胱甘肽(GSSG)比值, 免疫荧光法观察各组GC-2细胞中酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(ACSL4)蛋白荧光强度。**结果:** MTT法检测, 与0 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3组比较, 50、100、500和1 000 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3组GC-2细胞存活率均明显降低( $P<0.01$ ); 与0 μmol·L<sup>-1</sup> DIO组比较, 0.5、1.0、5.0、10.0和50.0 μmol·L<sup>-1</sup> DIO组GC-2细胞存活率均明显降低( $P<0.01$ ), 后续实验中选择100 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3作用GC-2细胞, DIO作用浓度<0.1 μmol·L<sup>-1</sup>。与空白组比较, 模型组GC-2细胞存活率明显降低( $P<0.01$ ); 与模型组比较, RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组细胞存活率明显升高( $P<0.01$ )。Western blotting法检测, 与0 h比较, RSL3作用6 h时GC-2细胞中GPX4蛋白表达水平明显降低( $P<0.01$ ), RSL3作用12 h时GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平明显升高( $P<0.05$ ), GPX4和FTH1蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), RSL3作用24 h时GC-2细胞中GPX4和HO-1蛋白表达水平明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), RSL3作用36和48 h时GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平均明显降低( $P<0.01$ ); 将100 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3作用GC-2细胞12 h作为后续实验条件。与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中MDA水平明显升高( $P<0.01$ ), SOD活性和GSH/GSSG比值均明显降低( $P<0.05$ ); 与RSL3组比较, RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中SOD活性均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中MDA水平均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中GSH/GSSG比值均明显升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。免疫荧光法观察, 与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中ACSL4蛋白荧光强度明显增强; 与RSL3组比较, RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中ACSL4蛋白荧光强度均明显减弱。Western blotting法检测, 与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平升高( $P<0.05$ ), GPX4和FTH1蛋白表达水平均明显降低( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ); 与

[收稿日期] 2023-11-28

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81803800); 重庆市科技局自然科学基金项目(CSTC2018jcyjAX0529, CSTB2023NSCQ-MSX0469)

[作者简介] 马宝莲(1998—), 女, 重庆市人, 在读硕士研究生, 主要从事分子药理学方面的研究。

[通信作者] 张永兰, 副教授, 硕士研究生导师(E-mail: lany2015@cqut.edu.cn)

RSL3组比较, RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平均明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), GPX4和FTH1蛋白表达水平均明显升高 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。结论: DOI能够减轻RSL3诱导的小鼠精母细胞GC-2铁死亡, 其机制可能与抑制HO-1蛋白表达, 上调GPX4和FTH1蛋白表达有关。

[关键词] 铁死亡; 香叶木素; 小鼠精母细胞GC-2; 谷胱甘肽过氧化酶4; 铁蛋白重链1; 酰基辅酶A合成酶长链家族成员4

[中图分类号] R966 [文献标志码] A

## Inhibitory effect of diosmetin on ferroptosis of GC-2 spermatocytes induced by RSL3 in mice and its mechanism

MA Baolian, HU Xiaoxue, AI Xiaowen, ZHANG Yonglan

(Department of Pharmacology, School of pharmacy and Bioengineering, Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China)

**ABSTRACT Objective:** To discuss the inhibitory effect of diosmetin (DIO) on the ferroptosis induced by the glutathione peroxidase (GSH-Px) inhibitor (1S, 3R)-RSL3 (RSL3) in spermatocytes GC-2 of the mice, and to clarify the mechanism. **Methods:** The GC-2 cells were divided into control group, RSL3 group, RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group, RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group, RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group, and RSL3+ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1 (Fer-1) group (200 nmol·L<sup>-1</sup> Fer-1). The cells were treated with 0, 1, 5, 10, 50, 100, 500, and 1 000 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3 solutions, and 0, 0.5, 0.1, 1.0, 5.0, 10.0, and 50.0 μmol·L<sup>-1</sup> DIO solutions, respectively. Additionally, the GC-2 cells were divided into blank group, model group, and treatment group. The GC-2 cells in treatment group were further divided into 0.8, 4.0, and 20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO groups, as well as RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group, RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group, and RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group. MTT method was used to detect the survival rates of the GC-2 cells in various groups. The GC-2 cells were treated with 100 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3 for 0, 6, 12, 24, 36, and 48 h; Western blotting method was used to detect the expression levels of ferroptosis-related proteins in the GC-2 cells in various groups; kits were used to detect the activities of superoxide dismutase (SOD), levels of malondialdehyde (MDA), and ratios of glutathione (GSH) to glutathione disulfide (GSSG) in the GC-2 cells in various groups; immunofluorescence method was used to detect the fluorescence intensities of acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4) protein in the GC-2 cells in various groups. **Results:** The MTT method results showed that compared with 0 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3 group, the survival rates of the GC-2 cells in 50, 100, 500, and 1 000 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3 groups were significantly decreased ( $P<0.01$ ); compared with 0 μmol·L<sup>-1</sup> DIO group, the survival rates of the GC-2 cells in 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, and 50.0 μmol·L<sup>-1</sup> DIO groups were significantly decreased ( $P<0.01$ ), and 100 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3 with DIO concentration < 0.1 μmol·L<sup>-1</sup> were selected for the subsequent experiments. Compared with blank group, the survival rates of the GC-2 cells in model group was significantly decreased ( $P<0.01$ ); compared with model group, the survival rates of the GC-2 cells in RSL3 + 20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group was significantly increased ( $P<0.01$ ). The Western blotting results showed that compared with 0 h, the expression level of GPX4 protein in the GC-2 cells was significantly decreased after treated with RSL3 for 6 h ( $P<0.01$ ), and the expression level of HO-1 protein was significantly increased after treated with RSL3 for 12 h ( $P<0.05$ ); after treated with RSL3 for 12 h, the expression levels of GPX4 and FTH1 proteins were significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); after treated with RSL3 for 24 h, the expression levels of GPX4 and HO-1 proteins were

significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); after treated with RSL3 for 36 and 48 h, the expression levels of HO-1 protein were significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Therefore,  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  RSL3 and for 12 h were selected as the experimental condition for the subsequent experiments. Compared with control group, the MDA level in the GC-2 cells in RSL3 group was significantly increased ( $P < 0.01$ ), and the SOD activity and GSH/GSSG ratio were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with RSL3 group, the SOD activities in the cells in RSL3+ $0.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, RSL3+ $4.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, RSL3+ $20.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, and RSL3+Fer-1 group were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The MDA levels in the cells in RSL3+ $20.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group and RSL3+Fer-1 group were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the GSH/GSSG ratio in the cells in RSL3+ $4.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, RSL3+ $20.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, and RSL3+Fer-1 group were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The immunofluorescence observation results showed that compared with control group, the fluorescence intensity of ACSL4 protein in the GC-2 cells in RSL3 group was significantly increased; compared with RSL3 group, the fluorescence intensities of ACSL4 protein in the cells in RSL3+ $0.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, RSL3+ $4.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, RSL3+ $20.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, and RSL3+Fer-1 group were significantly decreased. The Western blotting results showed that compared with control group, the expression level of HO-1 protein in the cells in RSL3 group was increased ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of GPX4 and FTH1 proteins were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); compared with RSL3 group, the expression levels of HO-1 protein in the cells in RSL3+ $0.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, RSL3+ $4.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, RSL3+ $20.0 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO group, and RSL3+Fer-1 group were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the expression levels of GPX4 and FTH1 proteins were significantly increased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** DIO can alleviate the RSL3-induced ferroptosis in the GC-2 spermatocytes of the mice, and its mechanism may be related to the inhibition of HO-1 protein expression and the upregulation of expressions of GPX4 and FTH1 proteins.

**KEYWORDS** Ferroptosis; Diosmetin; Mouse spermatocyte GC-2; Glutathione peroxidase 4; Ferritin heavy chain 1; Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4

男性不育是全球范围内普遍存在的现象, 近年来其发病率呈上升趋势。精子的生成和发育是男性生殖能力的重要组成部分, 精母细胞作为精子的祖细胞在精子发生过程中发挥重要作用, 主要负责生殖细胞的生成和发育<sup>[1]</sup>。研究<sup>[2]</sup>显示: 邻苯二甲酸单2乙基己酯通过与转铁蛋白受体 (transferrin receptor protein, TFR) 1作用介导睾丸支持细胞出现谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 代谢紊乱、氧化应激和脂质过氧化, 从而引起铁死亡, 最终导致血睾屏障受损, 并产生雄性生殖毒性。由于铁对雄性生殖能力具有重要作用, 因此, 探讨铁死亡对生殖活性的影响为当前研究的热点。铁死亡是一种由于铁离子在细胞内积累过多而导致的细胞死亡方式<sup>[3]</sup>。血红素加氧酶1 (hemeoxygenase-1, HO-1) 是细胞中铁的重要来源之一, 可以诱导脂质过氧化反应从而导致铁死亡的发生<sup>[4]</sup>。除此之外, 转铁蛋白通过TFR介导铁摄取, 铁蛋白重链1 (ferritin heavy chain 1, FTH1) /铁蛋白轻链 (ferritin light chain,

FTL) 通过自噬降解可以升高细胞内铁水平, 从而促进铁死亡发生<sup>[5]</sup>。谷胱甘肽过氧化物酶4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 是细胞中唯一能够将脂质过氧化物还原成脂质的酶, 也在铁死亡中发挥关键作用<sup>[6]</sup>。在小鼠精母细胞中, 适量的铁是必需的, 但过量的铁会导致细胞中氧化应激反应增加, 从而损伤细胞结构和功能<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>发现: 铁离子平衡失调和铁离子过载可能与男性不育有关。过量的铁离子会引发精子发生过程中的氧化损伤, 导致精子形态异常、运动能力降低和DNA损伤, 从而影响精子质量和生育能力<sup>[9]</sup>。提示小鼠精母细胞铁死亡可能与男性不育有关, 但仍需要进一步的研究分析二者之间的具体关系和作用机制。香叶木素 (diosmetin, DIO) 是一种天然黄酮类化合物, 在自然界中分布广泛, 多存在于菊花、柠檬、柑橘和橄榄叶等多种植物中<sup>[10]</sup>。DIO因其抗炎、抗氧化、抗菌和抗癌特性等多种生物活性在非酒精性脂肪性肝病、炎症性肠病及急性肾损伤等疾病中

表现出保护作用<sup>[11-14]</sup>,但DIO能否通过调节铁死亡改善男性不育尚未完全阐明。本研究探讨DIO对谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione, peroxidase, GSH-Px)抑制剂(1S, 3R)-RSL3(RSL3)诱导的GC-2细胞铁死亡的影响,阐明其调控小鼠精母细胞铁死亡抑制生殖毒性的作用,以期为临床治疗男性不育提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、主要试剂和仪器** 小鼠精母细胞GC-2购自美国ATCC细胞库。铁死亡诱导剂RSL3购自美国Selleck公司, DIO购自美国Sigma公司, 高糖培养基购自上海源培生物科技股份有限公司, 胎牛血清购自上海VivaCell公司, 噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)和铁死亡抑制剂Ferrostatin-1(Fer-1)购自上海MCE公司, 还原型GSH、氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒和DAPI购自上海碧云天生物技术有限公司, 胰酶、1%青-链霉素和二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)购自生工生物工程(上海)股份有限公司, 丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒购自安徽Biosharp公司, FTH1抗体(批号:A19544)购自武汉Abclonal公司, GPX4抗体(批号:381958)购自成都ZEN-BIOSCIENCE公司, 酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)抗体(批号:22401-1-AP)、HO-1抗体(批号:10701-1-AP)和 $\beta$ -tubulin抗体(批号:00124309)购自美国Proteintech公司, 山羊抗鼠IgG和山羊抗兔IgG购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 山羊抗兔红色荧光二抗购自美国Jackson公司。蛋白电泳仪购自美国Bio-Rad公司, 5804 R超速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司, AI600成像仪购自美国General Electric公司, 倒置荧光显微镜和NIS-Elements激光共聚焦显微镜购自日本Nikon公司, SYNERGY H1多功能酶标仪购自美国BioTek公司, CO<sub>2</sub>培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司。

**1.2 GC-2细胞培养和分组** GC-2细胞采用含10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM培养基, 于5% CO<sub>2</sub>、37℃细胞培养箱中培养。每2 d换液1次, 待细胞生长2~3 d, 细胞融合度约80%时, 加入胰酶消化30 s, 进行细胞传代处理。GC-2细胞分

为对照组、RSL3组、RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组和RSL3+Fer-1组(200 nmol·L<sup>-1</sup> Fer-1)。

**1.3 MTT法检测不同浓度RSL3和DIO作用后GC-2细胞存活率** 取对数生长期GC-2细胞, 以 $5 \times 10^4$  mL<sup>-1</sup>的细胞密度接种于24孔细胞培养板中, 每孔加入500  $\mu$ L DMEM细胞培养基, 按十字形晃动孔板, 使细胞均匀分散, 细胞培养箱中培养24 h, 分别采用500  $\mu$ L终浓度为0、1、5、10、50、100、500和1 000 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3溶液处理细胞。另取GC-2细胞, 按上述方式培养后, 分别采用500  $\mu$ L终浓度为0、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0和50.0  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> DIO溶液处理细胞, 细胞培养箱继续培养12 h, 取出后每孔加入5 g·L<sup>-1</sup> MTT溶液50  $\mu$ L, 培养箱继续孵育4 h, 轻轻吸弃培养基, 每孔加入500  $\mu$ L DMSO溶液, 放置于摇床上振荡15 min, 采用酶标仪于波长570 nm和630 nm处测定吸光度(A)值, 计算GC-2细胞存活率, 筛选RSL3和DIO最适作用浓度。细胞存活率=(实验孔A值-空白孔A值)/(对照孔A值-空白孔A值)×100%。

**1.4 MTT法检测各组GC-2细胞存活率** 取对数生长期GC-2细胞, 按照“1.3”中方法培养。将GC-2细胞分为空白组、模型组和给药组。空白组使用完全培养基正常培养GC-2细胞, 模型组GC-2细胞加入500  $\mu$ L终浓度为100 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3溶液, 给药组GC-2细胞分为0.8、4.0和20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组(分别加入终浓度为0.8、4.0和20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO溶液)及RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组和RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO组(分别加入100 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3溶液和终浓度为0.8、4.0及20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO溶液)。继续培养12 h后, 每孔加入5 g·L<sup>-1</sup> MTT溶液50  $\mu$ L, 继续孵育4 h后, 按照“1.3”中方法, 计算GC-2细胞存活率。

**1.5 Western blotting法检测RSL3作用不同时间后各组GC-2细胞中铁死亡相关蛋白表达水平** 取对数生长期GC-2细胞, 以 $4 \times 10^5$  mL<sup>-1</sup>的细胞密度接种于6孔细胞培养板中, 每孔加入2 mL DMEM细胞培养基, 培养箱中过夜, 取出后加入100 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3溶液分别处理细胞0、6、12、24、36和48 h。预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤1次, 裂解液裂解细胞,

提取总蛋白并测定蛋白含量, 100 °C加热 10 min使蛋白变性。蛋白样品经凝胶电泳转至PVDF膜后, 于5%脱脂奶粉中封闭1 h。分别加入FTH1 (1:1 000)、GPX4 (1:1 000)、HO-1 (1:2 000) 和 $\beta$ -tubulin抗体 (1:40 000), 室温孵育2 h或4 °C孵育过夜。回收一抗, TBST溶液洗涤3次, 每次10 min, 二抗室温孵育1 h, TBST溶液洗涤3次, 每次10 min。于PVDF膜上滴加化学发光液, 在凝胶成像仪显影成像, 以 $\beta$ -tubulin为内参, 采用Image J软件分析蛋白条带灰度值, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平=目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

**1.6 试剂盒检测各组GC-2细胞中SOD活性和MDA水平及GSH/GSSG比值** 取对数生长期GC-2细胞, 以 $4 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞密度接种于6孔细胞培养板中, 每孔加入2 mL DMEM细胞培养基, 细胞培养箱中培养过夜。按照“1.2”中分组及给药, 按照试剂盒说明书操作, 检测各组GC-2细胞中SOD活性和MDA水平及GSH/GSSG比值。

**1.7 免疫荧光法观察各组GC-2细胞中ACSL4蛋白荧光强度** 取对数生长期GC-2细胞, 以 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞密度接种于预先加入爬片的6孔细胞培养板中, 培养过夜。按照“1.2”中分组及给药, 吸去培养基, PBS缓冲液洗涤1次。加入1 mL 4%多聚甲醛组织固定液, 固定30 min后吸弃干净, PBS缓冲液洗涤3次, 将爬片取1块放置于载玻片上, 圈出染色区域, PBS缓冲液轻轻润洗1次, 每次5 min。0.5% Triton X-100作用10 min后, PBS缓冲液洗涤3次, 每次3 min; 用染色封闭液于37 °C封闭1 h, ACSL4一抗 (1:100) 滴加至染色区域, 4 °C孵育过夜; 回收一抗, PBS缓冲液洗涤3次, 每次5 min; 山羊抗兔二抗 (1:10 000) 滴加至染色区域, 湿盒中室温孵育1 h; 吸弃二抗, PBS缓冲液洗涤3次, 每次5 min, 避光; DAPI溶液 (1:1 000) 滴加至染色区域, 室温孵育10 min; 吸弃溶液, PBS缓冲液洗涤3次, 每次5 min, 避光。激光共聚焦显微镜采集图片, 观察GC-2细胞中ACSL4蛋白荧光强度。以红色荧光代表ACSL4蛋白表达情况, 红色荧光越强, ACSL4蛋白表达越强; 红色荧光越弱, ACSL4蛋白表达越弱。

**1.8 统计学分析** 采用Graphpad Prism 8.0统计软件进行统计学分析。各组细胞存活率, 细胞中

SOD活性、MDA水平和GSH/GSSG比值及铁死亡相关蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同浓度RSL3和DIO作用后GC-2细胞存活率** 与0 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3组比较, 50、100、500和1 000 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3组GC-2细胞存活率均明显降低 ( $P < 0.01$ )。与0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO组比较, 0.5、1.0、5.0、10.0和50.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DIO组GC-2细胞存活率均明显降低 ( $P < 0.01$ )。后续实验中选择100 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3作用GC-2细胞, DIO作用浓度 $< 0.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表1和2。

**表1 不同浓度RSL3作用后各组GC-2细胞存活率**  
**Tab. 1 Survival rates of GC-2 cells in various groups after treated with different concentrations of RSL3**

( $n = 3, \bar{x} \pm s, \eta / \%$ )

Group	Survival rate
Concentration of RSL3 (nmol·L <sup>-1</sup> )	
0	100.00 ± 5.12
1	96.00 ± 2.65
5	97.28 ± 4.64
10	91.09 ± 1.32
50	73.54 ± 7.51*
100	59.61 ± 0.35*
500	15.21 ± 0.61*
1 000	13.66 ± 0.07*

\* $P < 0.01$  vs 0 nmol·L<sup>-1</sup> RSL3 group.

**表2 不同浓度DIO作用后各组GC-2细胞存活率**  
**Tab. 2 Survival rates of GC-2 cells in various groups after treated with different concentrations of DIO**

( $n = 3, \bar{x} \pm s, \eta / \%$ )

Group	Survival rate
Concentration of DOI ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	
0	100.00 ± 1.97
0.1	94.70 ± 3.96
0.5	85.57 ± 0.55*
1.0	84.30 ± 1.47*
5.0	76.50 ± 2.30*
10.0	64.41 ± 8.46*
50.0	18.74 ± 0.22*

\* $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DOI group.

**2.2 各组GC-2细胞存活率** 与空白组比较,模型组GC-2细胞存活率明显降低 ( $P<0.01$ )。与模型组比较, RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组细胞存活率明显升高 ( $P<0.01$ )。见表3。

表3 各组GC-2细胞存活率

Tab. 3 Survival rates of GC-2 cells in various groups

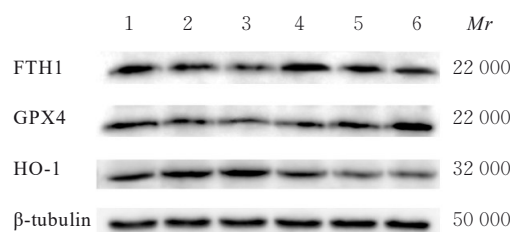
( $n=3, \bar{x}\pm s, \eta/\%$ )

Group	Survival rate
Blank	100.00±4.47
Model	67.94±0.38 <sup>*</sup>
0.8 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	99.41±2.65
4.0 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	95.46±0.74
20.0 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	95.25±0.87
RSL3+0.8 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	70.81±0.74
RSL3+4.0 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	71.33±2.32
RSL3+20.0 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	76.96±5.13 <sup>△</sup>

<sup>\*</sup> $P<0.01$  vs blank group; <sup>△</sup> $P<0.01$  vs model group.

**2.3 RSL3作用不同时间后GC-2细胞中铁死亡相关蛋白表达水平** 与0 h比较, RSL3作用6 h时GC-2细胞中GPX4蛋白表达水平明显降低 ( $P<0.01$ ), RSL3作用12 h时GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ), GPX4和FTH1蛋白表达水平均明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), RSL3作用24 h时GC-2细胞中GPX4和HO-1蛋白表达水平均明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), RSL3作用36和48 h时GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平均明显降低 ( $P<0.01$ )。将100 nmol·L<sup>-1</sup>RSL3作用GC-2细胞12 h作为构建GC-2细胞铁死亡细胞模型实验条件。见图1和表4。

**2.4 各组GC-2细胞中SOD活性和MDA水平及GSH/GSSG比值** 与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中MDA水平明显升高 ( $P<0.01$ ), SOD活性和GSH/GSSG比值均明显降低 ( $P<0.05$ )。与RSL3组比较, RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中SOD活性均明显升高 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中MDA水平均明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中GSH/GSSG比值均明显升高 ( $P<0.05$ 或 $P<$



Lane 1: 0 h group; Lane 2: 6 h group; Lane 3: 12 h group; Lane 4: 24 h group; Lane 5: 36 h group; Lane 6: 48 h group.

图1 Western blotting法检测RSL3作用不同时间后GC-2细胞中FTH1、GPX4和HO-1蛋白表达电泳图

Fig. 1 Electrophoregram of expressions of FTH1, GPX4, and HO-1 proteins in GC-2 cells after treated with RSL3 for different time detected by Western blotting method

表4 RSL3作用不同时间后GC-2细胞中FTH1、GPX4和HO-1蛋白表达水平

Tab. 4 Expression levels of FTH1, GPX4, and HO-1 proteins in GC-2 cells after treated with RSL3 for different time ( $n=3, \bar{x}\pm s$ )

Group	FTH1	GPX4	HO-1
Time after treated with RSL3			
0 h	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
6 h	0.84±0.12	0.63±0.16 <sup>**</sup>	1.09±0.06
12 h	0.72±0.01 <sup>*</sup>	0.68±0.05 <sup>**</sup>	1.23±0.03 <sup>*</sup>
24 h	0.84±0.15	0.65±0.11 <sup>**</sup>	0.56±0.32 <sup>*</sup>
36 h	0.78±0.02	0.83±0.05	0.47±0.18 <sup>**</sup>
48 h	0.85±0.11	1.10±0.03	0.42±0.23 <sup>**</sup>

<sup>\*</sup> $P<0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P<0.01$  vs 0 h group.

0.01)。见表5。

**2.5 各组GC-2细胞中ACSL4蛋白荧光强度** 与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中ACSL4蛋白荧光强度明显增强。与RSL3组比较, RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中ACSL4蛋白荧光强度均明显减弱。见图2。

2.6 各组GC-2细胞中铁死亡相关蛋白表达水平

与对照组比较, RSL3组GC-2细胞中HO-1蛋白表达水平明显升高 ( $P<0.05$ ), GPX4和FTH1蛋白表达水平均明显降低 ( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ )。与RSL3组比较, RSL3+0.8 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组、RSL3+4.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组、RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup>DIO组和RSL3+Fer-1组GC-2细胞中HO-1蛋白

表5 各组GC-2细胞中SOD活性和MDA水平及GSH/GSSG比值

Tab. 5 Activities of SOD, levels of MDA, and ratios of GSH/GSSG in GC-2 cells in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	SOD [ $\lambda_B/(U \cdot mg^{-1})$ ]	MDA [ $m_B/(mol \cdot g^{-1})$ ]	Ratio of GSH/GSSG
Control	355.69 ± 24.05	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
RSL3	269.64 ± 39.82*	1.85 ± 0.35**	0.36 ± 0.04*
RSL3+0.8 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	373.40 ± 28.41 <sup>△</sup>	1.42 ± 0.48	0.79 ± 0.31
RSL3+4.0 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	402.08 ± 39.52 <sup>△△</sup>	1.26 ± 0.22	0.96 ± 0.18 <sup>△</sup>
RSL3+20.0 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	425.60 ± 25.37 <sup>△△</sup>	1.08 ± 0.21 <sup>△</sup>	1.20 ± 0.23 <sup>△△</sup>
RSL3+Fer-1	377.03 ± 22.71 <sup>△</sup>	1.04 ± 0.20 <sup>△△</sup>	1.28 ± 0.32 <sup>△△</sup>

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs RSL3 group.

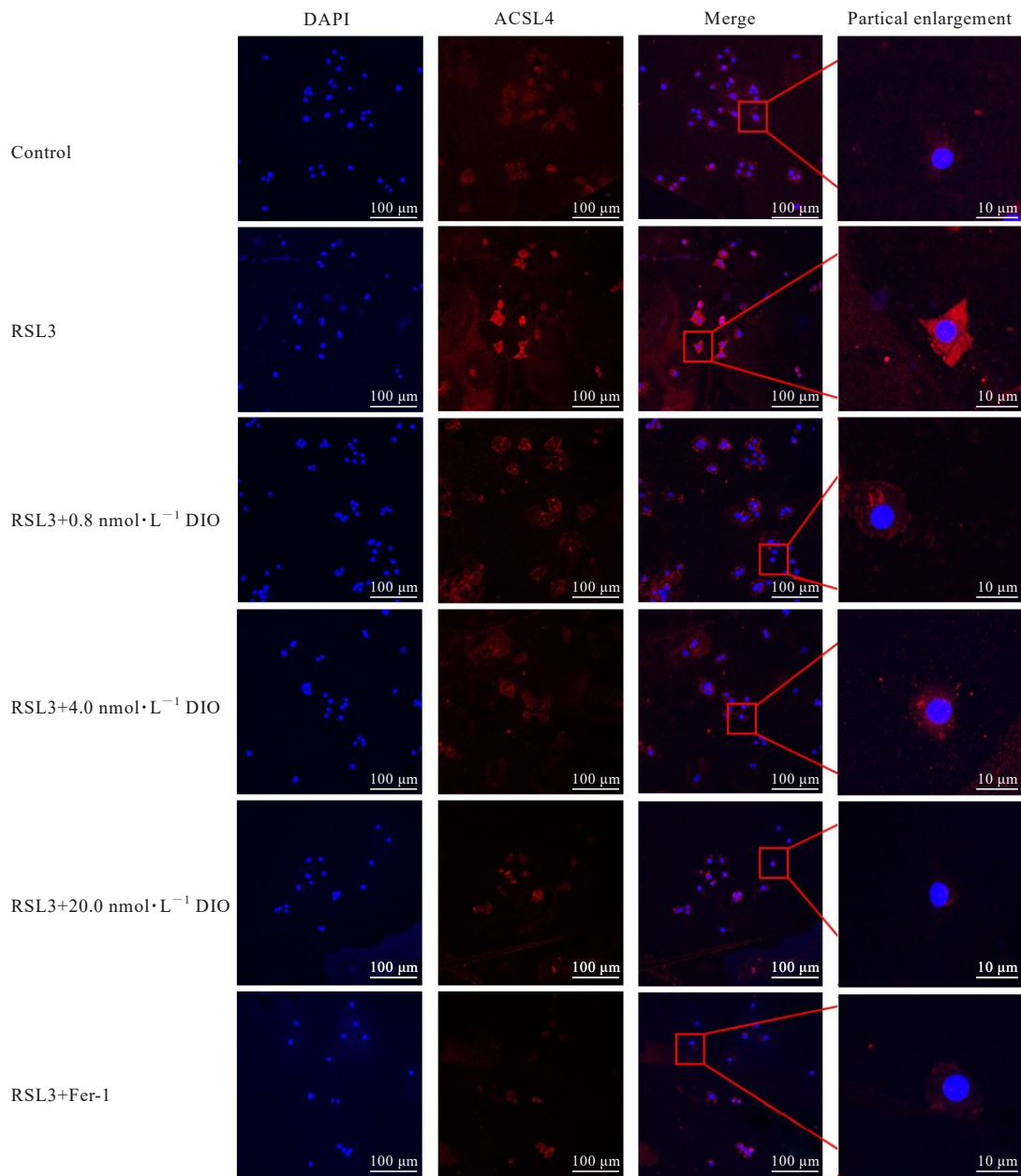
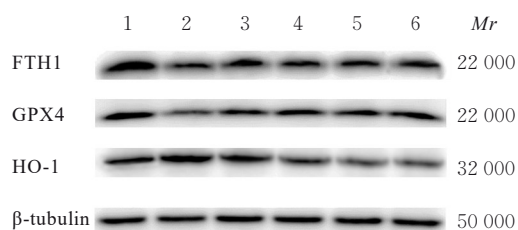


图2 免疫荧光法观察各组GC-2细胞中ACSL4蛋白荧光强度

Fig. 2 Fluorescence intensities of ACSL4 protein in GC-2 cells in various groups observed by immunofluorescence method

表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), GPX4 和 FTH1 蛋白表达水平均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见图3和表6。



Lane 1: Control group; Lane 2: RSL3 group; Lane 3: RSL3 + 0.8 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group; Lane 4: RSL3 + 4.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group; Lane 5: RSL3+20.0 nmol·L<sup>-1</sup> DIO group; Lane 6: RSL3+Fer-1 group.

图3 Western blotting法检测各组GC-2细胞中铁死亡相关蛋白表达电泳图

Fig. 3 Electrophoregram of expressions of ferroptosis-related proteins in GC-2 cells in various groups detected by Western blotting method

### 3 讨论

男性不育与细胞中铁水平有密切关联。研究<sup>[15]</sup>显示:铁水平不足时精子数量减少,进而影响男性不育。铁离子在铁死亡过程中发挥重要作用,血液循环中的Fe<sup>3+</sup>与转铁蛋白结合并运输,通过TFR1进入细胞后,被还原并释放至细胞质的不稳定铁池中,多余的铁贮存于铁蛋白中。细胞内不稳定铁池主要以Fe<sup>2+</sup>的形式存在,由于Fe<sup>2+</sup>的不稳定性和高反应活性,铁通过芬顿反应产生羟自由基,可直接与细胞膜和质膜中的多不饱和脂肪酸反应,产生大量脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS),导致细胞发生铁死亡<sup>[16]</sup>。研究<sup>[17]</sup>发现:RSL3能够直接抑制GPX4诱导细胞发生铁死亡。本研究结果显示:RSL3处理12h时铁死亡相关蛋

白FTH1和GPX4蛋白表达明显下调,HO-1蛋白表达上调,表明RSL3处理12h是GC-2细胞铁死亡模型建立的最适条件。经RSL3处理后GC-2细胞中MDA水平明显升高,SOD活性和GSH/GSSG比值明显降低,HO-1蛋白表达水平明显升高,GPX4和FTH1蛋白表达水平明显降低且ACSL4蛋白荧光强度增强,提示GC-2细胞铁死亡模型建模成功,RSL3作用的GC-2细胞发生铁死亡。

铁死亡是与铁代谢及脂质代谢相关的一种新型细胞死亡方式,其主要的生化特征表现为ROS累积、GSH合成减少、过氧化产物MDA堆积和Fe<sup>2+</sup>水平升高<sup>[18]</sup>。GPX4作为GSH-Px家族成员,能够抑制脂质过氧化过程,将脂质氢过氧化物还原为脂质醇,使得ROS累积减少,从而抑制细胞铁死亡的发生<sup>[19]</sup>。GSH是GSH-Px清除脂质过氧化物的必需辅助因子,GSH减少,GSH-Px活性降低,细胞抗过氧化能力降低,脂质过氧化物堆积,最后细胞发生铁死亡<sup>[20]</sup>。HO-1是由Hmox1基因编码的应激反应酶,能够催化血红素的分解,产生一氧化碳、亚铁和胆红素等一系列具有生物学效应的代谢产物。铁是血红素中的重要元素,因此HO-1也与铁代谢密切相关<sup>[21]</sup>。HO-1在组织损伤、炎症、缺氧和氧化应激等情况下会被诱导表达,进而减少血红素的蓄积,促进铁的释放和转运<sup>[22]</sup>。同时,HO-1的诱导也可促进铁的储存和利用,通过参与铁代谢调节保护人体免受氧化应激等伤害<sup>[23-24]</sup>。研究<sup>[25]</sup>发现:肝星状细胞中HO-1敲低导致细胞中ROS水平升高并诱导铁死亡,表明HO-1作为铁死亡相关蛋白之一,在铁死亡中发挥关键作用。生物体内的铁元素除结合在血红蛋白中的铁离子外,还有部分贮存于铁蛋白中。铁蛋白以可溶性、无毒和易获取的形式储存铁,对于维持铁稳态和保护细胞免受氧化损伤至关重要

表6 各组GC-2细胞铁死亡相关蛋白表达水平

Tab. 6 Expression levels of ferroptosis-related proteins in GC-2 cells in various groups ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

Group	FTH1	GPX4	HO-1
Control	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
RSL3	0.54±0.05*	0.74±0.05**	1.38±0.16*
RSL3+0.8 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	1.06±0.18 <sup>△</sup>	0.93±0.01 <sup>△</sup>	1.05±0.03 <sup>△</sup>
RSL3+4.0 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	1.21±0.34 <sup>△△</sup>	0.98±0.06 <sup>△</sup>	1.00±0.09 <sup>△</sup>
RSL3+20.0 nmol·L <sup>-1</sup> DIO	1.12±0.20 <sup>△△</sup>	0.93±0.01 <sup>△</sup>	0.95±0.21 <sup>△△</sup>
RSL3+Fer-1	1.10±0.12 <sup>△</sup>	0.95±0.06 <sup>△</sup>	0.83±0.16 <sup>△△</sup>

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group; <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs RSL3 group.

要<sup>[26]</sup>。铁蛋白主要由FTH1和FTL 2个亚基组成。其中FTH1具有亚铁氧化酶活性, 可将机体内过剩的铁催化成 $Fe^{3+}$ 并储存于铁蛋白复合物中, 维持正常的铁稳态, 同时也具有抗氧化应激功能, 在吸收和释放铁方面, 能够降解自由基有效阻止由过量铁引起的氧化损害<sup>[27-28]</sup>。FTH1参与调节多种重要的细胞过程, 包括细胞凋亡、细胞周期和铁死亡等, 与疾病发生发展有密切关联<sup>[29-31]</sup>。

研究<sup>[32]</sup>证实: DIO通过抑制细胞中ROS产生和MDA形成发挥较强的抗氧化作用, 还可通过减轻炎症和铁死亡抑制金黄色葡萄球菌诱导的乳腺炎。本研究结果显示: DIO能够降低RSL3诱导的小鼠精母细胞GC-2中MDA水平, 升高GSH/GSSG比值和SOD活性, 并下调铁死亡相关蛋白HO-1蛋白表达, 上调GPX4和FTH1蛋白表达。

综上所述, DIO可减轻RSL3处理的GC-2细胞中脂质过氧化物积累, 其机制可能与抑制HO-1蛋白表达和上调GPX4及FTH1蛋白表达有关。

#### 利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

#### 作者贡献声明:

马宝莲参与研究选题、实验操作、数据收集、整理和统计学分析及论文撰写, 胡晓雪和艾霄文参与实验操作及统计学分析, 张永兰参与研究选题、数据收集和整理及论文撰写和审校。

#### [参考文献]

- [1] 石敏, 桂耀庭, 龙霞, 等. 小鼠精母细胞在体外分化为精子细胞[J]. 生殖与避孕, 2007, 27(3): 173-177.
- [2] ZHAO Y, ZHANG H, CUI J G, et al. Ferroptosis is critical for phthalates driving the blood-testis barrier dysfunction via targeting transferrin receptor [J]. Redox Biol, 2023, 59: 102584.
- [3] TANG D L, KROEMER G. Ferroptosis [J]. Curr Biol, 2020, 30(21): R1292-R1297.
- [4] RYTER S W. Heme oxygenase-1, a cardinal modulator of regulated cell death and inflammation [J]. Cells, 2021, 10(3): 515.
- [5] 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.
- [6] LIU Y, WAN Y C, JIANG Y, et al. GPX4: the hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2023, 1878(3): 188890.
- [7] WANG J K, ZHANG Z H, SHI F Q, et al. PM<sub>2.5</sub> caused ferroptosis in spermatocyte via overloading iron and disrupting redox homeostasis [J]. Sci Total Environ, 2023, 872: 162089.
- [8] RADAELLI E, ASSENMACHER C A, VERRELLE J, et al. Mitochondrial defects caused by PARL deficiency lead to arrested spermatogenesis and ferroptosis [J]. eLife, 2023, 12: e84710.
- [9] HASHEMI M M, BEHNAMPOUR N, NEJABAT M, et al. Impact of seminal plasma trace elements on human sperm motility parameters [J]. Rom J Intern Med, 2018, 56(1): 15-20.
- [10] 蔡双莲, 吴峥, 吴进, 等. 天然黄酮香叶木素类及其衍生物的合成与生物活性研究 [J]. 有机化学, 2012, 32(3): 560-566.
- [11] CHOI J, LEE D H, PARK S Y, et al. Diosmetin inhibits tumor development and block tumor angiogenesis in skin cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117: 109091.
- [12] LEE H N, SUNG J, KIM Y, et al. Inhibitory effect of diosmetin on inflammation and lipolysis in coculture of adipocytes and macrophages [J]. J Food Biochem, 2020, 44(7): e13261.
- [13] YANG K, LI W F, YU J F, et al. Diosmetin protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in mice [J]. J Surg Res, 2017, 214: 69-78.
- [14] LIU J F, FU L, YIN F, et al. Diosmetin maintains barrier integrity by reducing the expression of ABCG2 in colonic epithelial cells [J]. J Agric Food Chem, 2023, 71(23): 8931-8940.
- [15] JANISZEWSKA E, KOKOT I, KMIECIAK A, et al. Are there associations between seminal plasma advanced oxidation protein products and selected redox-associated biochemical parameters in infertile male patients? A preliminary report [J]. Cells, 2022, 11(22): 3667.
- [16] CHEN J Y, YANG X, FANG X X, et al. The role of ferroptosis in chronic diseases [J]. Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2020, 49(1): 44-57.
- [17] YANG W S, STOCKWELL B R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation [J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(3): 165-176.
- [18] ZHENG J S, CONRAD M. The metabolic underpinnings of ferroptosis [J]. Cell Metab, 2020, 32(6): 920-937.
- [19] BERSUKER K, HENDRICKS J M, LI Z P, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis [J]. Nature, 2019, 575(7784): 688-692.
- [20] MAIORINO M, CONRAD M, URSINI F. GPx4,

- lipid peroxidation, and cell death: discoveries, rediscoveries, and open issues [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(1): 61-74.
- [21] CARR J, LA P, DENNERY P. Heme oxygenase-1 is required for iron homeostasis and mitochondrial respiration[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 128: S81.
- [22] YANATORI I, RICHARDSON D R, TOYOKUNI S, et al. The iron chaperone poly (rC) -binding protein 2 forms a metabolon with the heme oxygenase 1/cytochrome P450 reductase complex for heme catabolism and iron transfer[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(32): 13205-13229.
- [23] NYBAKKEN G, GRATZINGER D. Myelodysplastic syndrome macrophages have aberrant iron storage and heme oxygenase-1 expression [J]. *Leuk Lymphoma*, 2016, 57(8): 1893-1902.
- [24] ROCHA E R, BERGONIA H A, GERDES S, et al. *Bacteroides fragilis* requires the ferrous-iron transporter FeoAB and the CobN-like proteins BtuS1 and BtuS2 for assimilation of iron released from heme [J]. *Microbiol Open*, 2019, 8(4): e00669.
- [25] LUO P, LIU D D, ZHANG Q, et al. Celastrol induces ferroptosis in activated HSCs to ameliorate hepatic fibrosis *via* targeting peroxiredoxins and HO-1 [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(5): 2300-2314.
- [26] AJOOLABADY A, ASLKHODAPASANDHOKMABAD H, LIBBY P, et al. Ferritinophagy and ferroptosis in the management of metabolic diseases [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2021, 32(7): 444-462.
- [27] HU W Y, ZHOU C T, JING Q G, et al. FTH promotes the proliferation and renders the HCC cells specifically resist to ferroptosis by maintaining iron homeostasis [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1): 709.
- [28] OMIYA S, ITO J, OTSU K. Labile iron derived from autophagy-mediated ferritin degradation in cardiomyocytes under pressure overload increases myocardial oxidative stress and develops heart failure in mice [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(Supplement 1): ehab724.0747.
- [29] SHAO Y, ZUO X. PTPRC inhibits ferroptosis of osteosarcoma cells via blocking TFEB/FTH1 signaling [J]. *Mol Biotechnol*, 2024, 66(10): 2985-2994.
- [30] LIU F, DU Z Y, HE J L, et al. FTH1 binds to Daxx and inhibits Daxx-mediated cell apoptosis [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(2): 873-879.
- [31] ZHANG R N, PAN T, XIANG Y, et al. Curcumenol triggered ferroptosis in lung cancer cells via lncRNA H19/miR-19b-3p/FTH1 axis [J]. *Bioact Mater*, 2021, 13: 23-36.
- [32] ZHAO L H, JIN L, YANG B. Diosmetin alleviates *S. aureus*-induced mastitis by inhibiting SIRT1/GPX4 mediated ferroptosis [J]. *Life Sci*, 2023, 331: 122060.