

# 铁死亡在支气管哮喘气道重塑中的作用

孙丛丛<sup>1\*</sup>, 崔文静<sup>2\*</sup>, 张锦涛<sup>1</sup>, 张东<sup>2</sup>, 刘晓菲<sup>2</sup>, 潘云<sup>2</sup>,  
亓倩<sup>1</sup>, 徐嘉蔚<sup>1</sup>, 曾荣<sup>2</sup>, 郭红喜<sup>1</sup>, 董亮<sup>1,2</sup>

(1. 山东第一医科大学第一附属医院(山东省千佛山医院)呼吸与危重症医学科,

山东省呼吸疾病研究所, 山东 济南 250014;

2. 山东大学 山东省千佛山医院呼吸与危重症医学科, 山东 济南 250014)

**摘要:** **目的** 通过建立卵清蛋白(ovalbumin, OVA)诱导的哮喘小鼠模型,研究铁死亡在支气管哮喘气道重塑发病中的作用,为治疗哮喘气道重塑提供新的靶点。**方法** 将24只雌性C57BL/6小鼠随机分为4个组:对照组、哮喘模型组(OVA组)、干预组(Fer-1组)及Fer-1联合哮喘组(Fer-1+OVA组),每组6只,通过建立OVA诱导哮喘小鼠模型联合公共数据库筛选的对照组和OVA诱导的OVA组小鼠肺组织差异表达谱,探索铁死亡与哮喘的联系。应用铁离子检测试剂盒和普鲁士蓝铁染色法对小鼠肺组织中的铁表达进行测定,通过免疫印记及免疫组化评估肺组织谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)蛋白的表达,检测小鼠肺组织脂质过氧化代谢物丙二醛(malondialdehyde, MDA)的表达,透射电子显微镜观察小鼠气道上皮超微结构改变,应用MASSON组织染色法对小鼠气道上皮下胶原沉积进行观察。为了进一步验证铁死亡抑制剂对哮喘气道重塑的影响,给予哮喘模型小鼠铁死亡抑制剂干预后,对气道周围胶原沉积情况及肺组织GPX4蛋白表达进行评估,并分析气道重塑指标的改变。**结果** 生物信息学分析显示,哮喘小鼠肺组织中铁死亡通路较对照组明显富集,OVA组小鼠气道上皮中GPX4表达较对照组显著降低,表明铁死亡可能参与哮喘的发病过程。OVA组小鼠肺组织中铁含量增加,气道上皮GPX4表达降低,肺组织MDA表达升高,气道上皮下胶原沉积增加,伴有小鼠气道上皮特征性超微结构改变,表明铁死亡与哮喘气道重塑密切相关。铁死亡抑制剂干预哮喘小鼠后,气道上皮GPX4表达升高,气道上皮下胶原沉积减轻,气道重塑标志蛋白表达降低,上皮标志蛋白表达升高。**结论** 铁死亡参与支气管哮喘气道重塑的发病过程,铁死亡抑制剂Fer-1可减轻哮喘气道重塑的结构改变,为治疗支气管哮喘气道重塑提供新靶点。

**关键词:** 哮喘;气道重塑;铁死亡;Ferrostatin-1;治疗靶点

中图分类号:R562.2+5

文献标志码:A

## Roles of ferroptosis in asthmatic airway remodeling

SUN Congcong<sup>1\*</sup>, CUI Wenjing<sup>2\*</sup>, ZHANG Jintao<sup>1</sup>, ZHANG Dong<sup>2</sup>, LIU Xiaofei<sup>2</sup>, PAN Yun<sup>2</sup>,  
QI Qian<sup>1</sup>, XU Jiawei<sup>1</sup>, ZENG Rong<sup>2</sup>, GUO Hongxi<sup>1</sup>, DONG Liang<sup>1,2</sup>

(1. Department of Respiratory, The First Affiliated Hospital of Shandong First Medical University & Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Shandong Institute of Respiratory, Jinan 250014, Shandong, China;

2. Department of Respiratory, Shandong Provincial Qianfoshan Hospital, Shandong University, Jinan 250014, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To explore the contribution of ferroptosis to airway remodeling in asthma by establishing a ovalbumin (OVA)-induced asthma mice model, and to provide new directions in the treatment of airway remodeling of asthma. **Methods** Twenty-four female C57BL/6 mice were stochastically divided into four groups: the control group ( $n=6$ ), the OVA group ( $n=6$ ), the ferrostatin (Fer)-1 group ( $n=6$ ), and the Fer-1+OVA group ( $n=6$ ). The asso-

收稿日期:2024-05-09

基金项目:国家自然科学基金项目(82270032,82100056);山东省重点研发计划项目(2021SFGC0504);山东省自然科学基金联合基金项目(ZR2021LSW015);山东省自然科学基金项目(ZR2021QH170);济南市呼吸疾病临床医学研究中心项目(202132002)

通信作者:董亮。E-mail:dl5506@126.com

\* 共同第一作者。

ciation between ferroptosis and asthma was clarified by establishing the differentially expressed genes of lung tissues in the OVA-induced asthma mice and controls screened from public databases. The iron concentration was measured by iron detection kit and Perl's stain, and the expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) protein was evaluated by Western blotting and immunohistochemical staining. The levels of the lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA) in lung tissue were assayed and the ultra-structural changes in the airway epithelium were observed using transmission electron microscopy (TEM). Lung tissue slices were stained with Masson staining to evaluate collagen deposition. To further verify the effect of ferroptosis inhibitor on the airway remodeling in asthma, the mice were intervened with Fer-1, and then collagen deposition was evaluated by MASSON staining, the expression of GPX4 protein was detected by immunofluorescence and Western blotting. **Results** The results of bioinformatics analysis showed that the ferroptosis signaling pathway was significantly enriched in OVA group, suggesting that ferroptosis played a certain role in the pathogenesis of asthma. Meanwhile, in this gene set, GPX4 was significantly decreased in OVA group. In asthma mice model, collagen deposition was accompanied by a series of ferroptosis features such as increased iron concentration, decreased GPX4 expression, MDA accumulation, increased collagen deposition, and characteristic ultra-structural changes in the airway epithelium, suggesting that ferroptosis was intimately linked with asthma airway remodeling. After treated with Fer-1, for the asthma model mice, the GPX4 expression was elevated, the collagen deposition was reduced, the expressions of airway remodeling indicators were suppressed, and epithelial cell markers were increased. **Conclusion** Ferroptosis participates in the pathogenesis of asthma airway remodeling, ferroptosis inhibitor Fer-1 attenuates airway remodeling in asthma, and the application of Fer-1 provides a new therapeutic target for asthmatic airway remodeling.

**Key words:** Asthma; Airway remodeling; Ferroptosis; Ferrostatin-1; Therapeutic target

支气管哮喘是一种以气道高反应、气道炎症和气道重塑为特征的异质性疾病,随着疾病的进展,气道重塑导致哮喘患者肺功能进行性下降和不可逆的气流受限<sup>[1-2]</sup>。铁死亡是一种由代谢和生化过程异常引起的铁依赖性细胞死亡形式。细胞内铁稳态失调与谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 等因子导致抗氧化系统紊乱,引起胞内活性氧和脂质过氧化代谢物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 累积,导致铁死亡的发生<sup>[3]</sup>。大量研究表明,铁死亡参与了哮喘及其他呼吸系统疾病的发病过程<sup>[4-6]</sup>。哮喘患者支气管肺泡灌洗液中铁负荷细胞数量增加,与下降的一秒率具有相关性,表明哮喘气流受限与铁死亡关系密切<sup>[7]</sup>。另有研究表明,气道上皮中 15-脂氧合酶 1 (15-lipoxygenase 1, 15-LO1) 与磷脂酰乙醇胺结合蛋白 1 (phosphatidylethanolamine-binding protein 1, PEBP1) 结合诱发铁死亡的发生,导致哮喘的 Th2 型炎症恶化<sup>[8]</sup>。到目前为止,哮喘气道重塑中关于铁死亡的作用研究较少。本研究建立了卵清蛋白 (ovalbumin, OVA) 诱导的哮喘小鼠模型,通过观察小鼠肺组织中的铁含量、GPX4、脂质过氧化产物 MDA 蛋白的表达,对小鼠气道上皮细胞超微结构及气道重塑的组织学变化进行分析,并应用铁死亡抑制剂 (ferrostatin-1, Fer-1) 观察对小鼠气道上皮 GPX4 表达、气道胶原沉积及气道重塑病理改变

的影响,旨在探讨铁死亡在哮喘气道重塑发病中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

24 只健康雌性小鼠 (C57BL/6), 7~8 周龄, 18~20 g, 购买于济南朋悦实验动物有限公司, 所有动物实验程序均经山东第一医科大学第一附属医院医学伦理审查委员会批准 (2022-S012)。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

OVA、Fer-1 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; Al(OH)<sub>3</sub> 购自美国 ThermoFisher 公司; 铁含量检测试剂盒购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司; 抗 GPX4 单克隆抗体购自美国 Abcam 公司; MASSON 染色试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; MDA 检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司; 抗 GPX4 单克隆抗体、抗 GAPDH 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 抗 E-cadherin 单克隆抗体、抗 N-cadherin 单克隆抗体、抗  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体购自美国 CST 公司; 抗 Fibronectin 单克隆抗体购自杭州华安生物技术有限公司; 细胞铁死亡 PCR 阵列购自上海沃吉基因科技

有限公司; 动物雾化仪 (北京亚都科技服务公司); 组织匀

浆仪(中国天根公司);低温离心机(美国贝克曼公司);轮转式切片机(德国 Leica 公司);石蜡包埋机(德国 Leica 公司),JEM-100cx II 透射电子显微镜(日本电子株式会社);蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Chemidoc 化学发光仪(美国 Bio-Rad 公司);酶标分析仪(日本 Biotec 公司);分光光度计(美国 ThermoFisher 公司)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 生物信息学分析

本研究从基因表达数据库(Gene Expression Omnibus, GEO)中对数据集(GSE6858)进行检索,筛选了对照小鼠和 OVA 诱导小鼠的 RNA 图谱,使用 R 语言的 Limma 软件包(版本:3.40.2)进行差异基因分析,使用 R 语言 ggplot2 包绘制可视化的气泡图。 $P < 0.05$  定义为筛选基因差异有统计学意义。

### 1.2.2 哮喘小鼠模型构建

将 24 只小鼠随机分为 4 个组:对照组、哮喘模型组(OVA 组)、干预组(Fer-1 组)及 Fer-1 联合哮喘组(Fer-1+OVA 组),每组 6 只小鼠。建模方法如下:OVA 组小鼠应用免疫佐剂 Al(OH)<sub>3</sub> 和 OVA 腹腔注射致敏,在第 1、7 和 14 天对 OVA 组小鼠与 Fer-1+OVA 组小鼠进行腹腔注射,对照组以及 Fer-1 组小鼠给予腹腔注射等体积的生理盐水。第 21 天后,OVA 组与 Fer-1+OVA 组小鼠雾化吸入 OVA 溶液(每隔 1 d),直至第 56 天,对照组及 Fer-1 组小鼠雾化吸入等量的生理盐水。Fer-1 组与 Fer-1+OVA 组小鼠雾化后给予腹腔注射浓度为 2.5  $\mu\text{mol/kg}$  的 Fer-1,对照组及 OVA 组小鼠给予腹腔注射等量的无菌盐水。末次激发后 24 h 内无痛处死小鼠,收集肺组织标本及血液。

### 1.2.3 采用铁离子试剂盒和普鲁士蓝铁染色测定各组小鼠肺组织中的铁表达

#### 1.2.3.1 铁离子试剂盒法

取新鲜肺组织块 0.1 g,裂解液裂解后离心取上清,吸取不同浓度的标准品及样本,加入 150  $\mu\text{L}$  显色液,振荡混匀,孵育后酶标仪测定 593 nm 处的吸光度值。

#### 1.2.3.2 普鲁士蓝铁染色法

肺组织切片常规脱蜡至水,浸入普鲁士蓝染色液,染色 20 min,蒸馏水冲洗后,加入伊红染液中染色 2 min,经不同浓度的乙醇溶液进行逐级脱水,置入二甲苯溶液透明,最后应用中性树胶封片。

### 1.2.4 采用免疫组织化学法检测小鼠肺组织 GPX4 蛋白的表达

小鼠肺组织石蜡切片烘烤后逐步脱蜡至水化,

固定于枸橼酸修复液中进行抗原修复,封闭内源性过氧化物酶、山羊血清封闭内源性抗原后,加入抗 GPX4 抗体(用 PBS 按 1:200 稀释),4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱过夜后,加入二抗工作液,室温下孵育 1 h,加入 DAB 显色液,于显微镜下观察显色结果,显微镜下观察并控制显色时间,及时将切片浸入 PBS 终止显色,加入苏木素复染,经不同浓度的乙醇溶液进行逐步脱水,置入二甲苯溶液透明,最后应用中性树胶封片,应用显微镜镜检,图像采集分析。

### 1.2.5 透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)观察气道上皮超微结构改变

小鼠气道黏膜组织置于戊二醛固定液固定 2 h 后,再次置于 1% 锇酸固定液中 2 h,经不同浓度的乙醇溶液进行逐级脱水,后用丙酮浸透包埋,超薄切片机切片,经醋酸铀-枸橼酸铅双染色后用 TEM 镜检,图像采集分析。

### 1.2.6 检测肺组织脂质过氧化代谢物 MDA 水平

将新鲜肺组织块中加入 RIPA 裂解液,离心后取上清液进行 BCA 蛋白定量,收集剩余样品按照 MDA 试剂盒说明书进行加样,在 532 nm 波长测定各孔的 OD 值。

### 1.2.7 采用 HE 染色法评估气道炎症

肺组织切片浸入苏木素染液中染细胞核,盐酸乙醇分化后浸入伊红染液中染细胞质,乙醇-二甲苯溶液逐级脱水透明,中性树胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。

### 1.2.8 采用 PAS 染色法评估气道黏液高分泌

肺组织石蜡切片脱蜡,浸入 PAS 氧化剂中后置于 Schiff 试剂中染色,苏木素染液染细胞核,盐酸乙醇分化,乙醇-二甲苯溶液逐级脱水透明,中性树胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。

### 1.2.9 采用 MASSON 染色法评估气道胶原沉积情况

肺组织石蜡切片放入媒染液,60  $^{\circ}\text{C}$  恒温下媒染 1 h,流水冲洗 10 min,依次给予天青石蓝染色 2.5 min, Mayer 苏木素染色 2.5 min,盐酸乙醇分化液中浸泡,丽春红染色 5 min,浸入磷钼酸水溶液 5 min,后浸入苯胺蓝液染色 3 min,弱酸溶液洗去苯胺蓝 1 min。乙醇-二甲苯溶液逐级脱水透明,中性树胶封片。显微镜镜检,图像采集分析。

### 1.2.10 应用组织免疫荧光染色法检测肺组织 GPX4、气道重塑指标 N-cadherin、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 的表达

小鼠肺组织石蜡切片烘烤后逐步脱蜡至水化,固定于枸橼酸修复液中进行抗原修复,封闭内源性过氧化物酶,山羊血清封闭内源性抗原后,加入一抗

(抗 GPX4、N-cadherin、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 抗体,用 PBS 按 1:200 稀释)4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗后加入荧光二抗孵育 1 h, 加入 DAPI 染液染细胞核, 加入防荧光淬灭剂后使用树脂封片, 应用荧光显微镜镜检, 图像采集分析。

1.2.11 采用 Western blotting 测定肺组织 GPX4 与气道重塑指标 E-cadherin、Fibronectin 的蛋白表达水平

取新鲜肺组织块加入 RIPA 裂解液研磨至匀浆状态, 离心后进行 BCA 蛋白浓度测定, 取部分蛋白样品加入十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳胶的泳道内, 恒压条件下电泳, 转膜时间及电流大小依据所需蛋白分子量大小而定, 5% 脱脂奶粉室温封闭 90 min, 分别加入一抗(抗 GPX4、E-cadherin、Fibronectin, 按照说明书进行稀释)4 °C 冰箱孵育, 洗涤缓冲液洗涤后加入 1:5 000 稀释的二抗, 孵育后经洗涤缓冲液洗涤, ECL 发光液按照 1:1 的比例配制显色, 采集图片, 分析蛋白灰度。

### 1.3 统计学处理

数据分析采用 SPSS 22.0 软件, 应用 Graphpad Prism 8.4 软件绘制数据图表, 计量资料以平均数 $\pm$ 标准差表示。两组间数据比较采用 two-sided Student *t* test; 多组间的比较采用单因素方差分析。

$P < 0.05$  为差异有统计学意义。

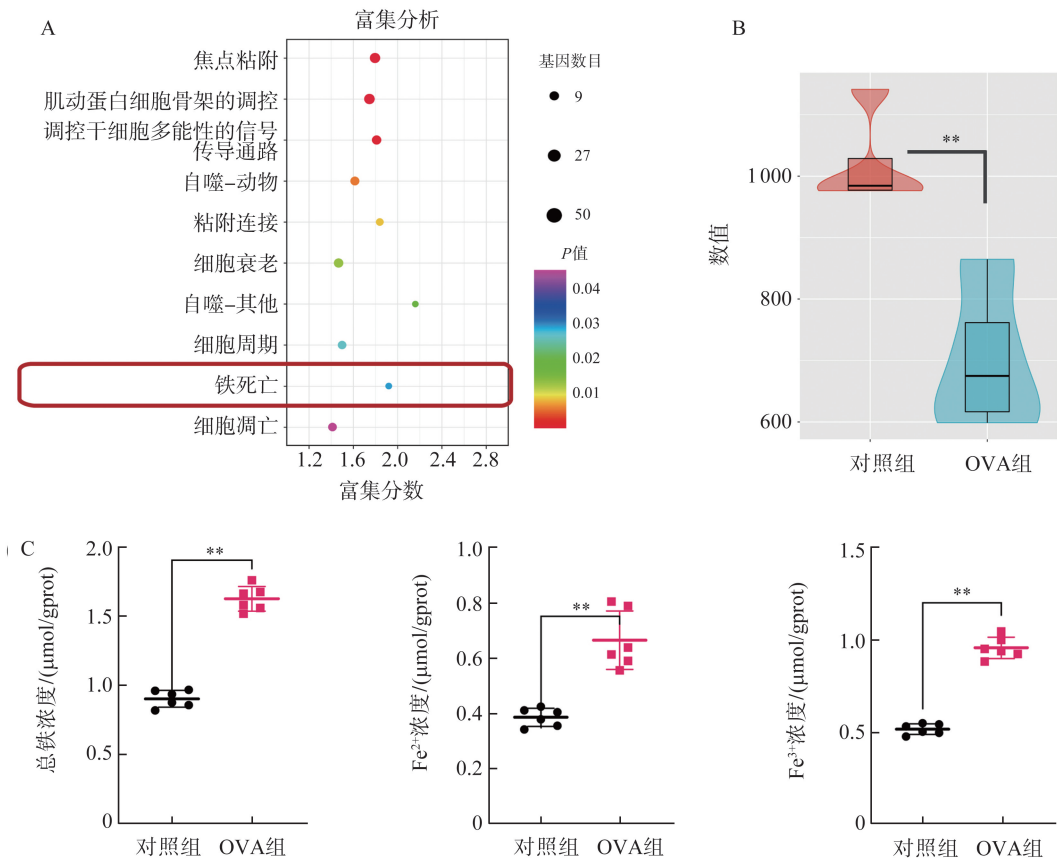
## 2 结果

### 2.1 OVA 组小鼠存在铁过载现象

相比于对照组小鼠, 铁死亡信号通路在 OVA 组小鼠肺组织中显著富集, 表明铁死亡在哮喘中发挥关键作用。OVA 组小鼠肺组织中 GPX4 的表达显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。基于上述结果, 本研究利用 OVA 建立了哮喘小鼠模型, 结果发现, 与对照组相比, OVA 组小鼠肺组织匀浆中的总铁、 $\text{Fe}^{2+}$  和  $\text{Fe}^{3+}$  浓度显著升高 ( $P < 0.01$ ), OVA 组小鼠肺组织中非血红素铁的表达显著升高。见图 1。

### 2.2 哮喘小鼠模型造模成功

HE 染色结果显示, OVA 组小鼠较对照组小鼠气道周围炎症细胞浸润增多, 伴有气道上皮破坏、脱落, 血管周围出现水肿及炎症细胞增多。PAS 染色结果显示, OVA 组小鼠出现气道杯状细胞增生, 伴有黏液高分泌。MASSON 染色结果显示, OVA 组小鼠较对照组小鼠气道上皮下胶原沉积显著增多, Fer-1+OVA 组小鼠气道上皮下胶原沉积减轻。上述病理改变在对照组与 Fer-1 组之间差异无统计学意义。见图 2。



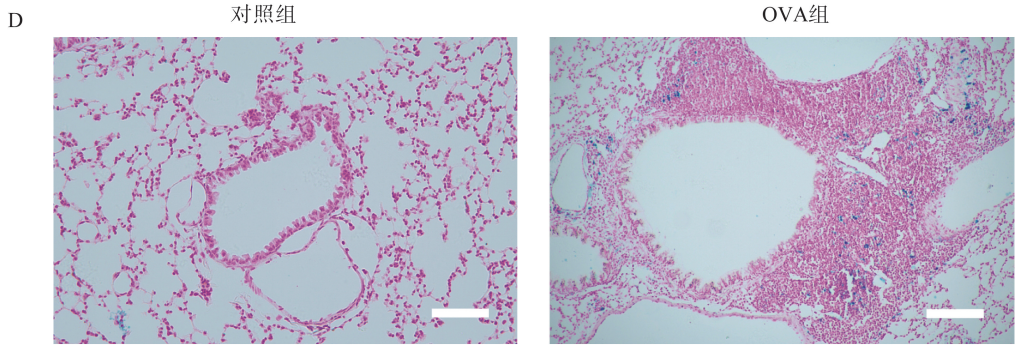


图1 OVA组小鼠存在铁过载现象

A: KEGG富集分析结果显示OVA组小鼠铁死亡信号通路显著富集; B: GPX4在对照组小鼠和OVA组小鼠之间的差异表达分析; C: 各组小鼠肺组织匀浆中的铁表达; D: 小鼠肺组织切片普鲁士蓝铁染色图片。放大倍数:  $\times 200$ ; 比例尺:  $50\ \mu\text{m}$ 。\* $P < 0.01$ 。

Figure 1 Iron overload existed in OVA-induced asthma

A: KEGG enrichment analysis showed that the ferroptosis signaling pathway was significantly enriched in the OVA group; B: Differential expression analysis of GPX4 between the control and OVA groups; C: The iron levels in lung tissue homogenates; D: Prussian blue staining images of lung tissue slices of mice. Original magnification,  $\times 200$ . Scale bars,  $50\ \mu\text{m}$ . \* $P < 0.01$ .

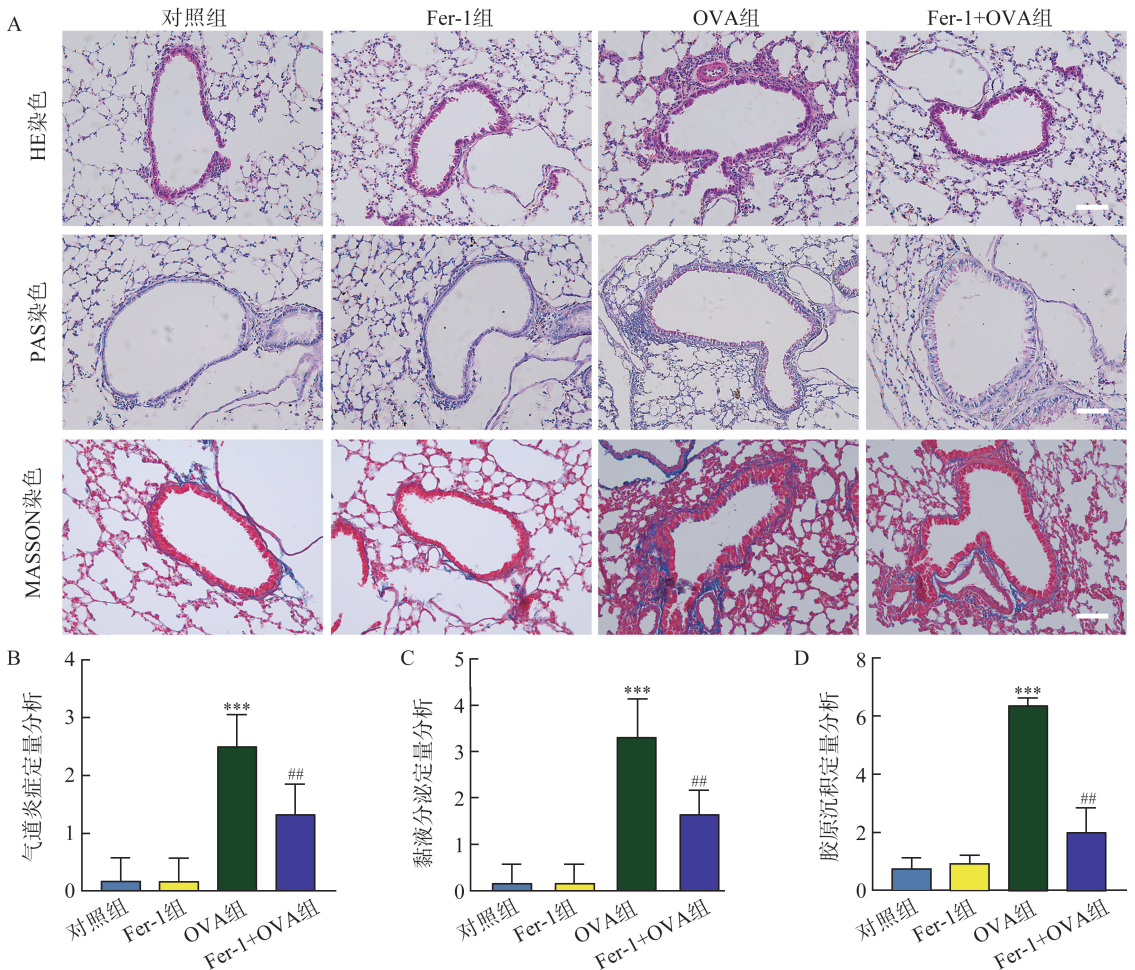


图2 Fer-1减轻哮喘模型小鼠气道炎症和重塑

A: 小鼠肺组织切片HE、PAS、MASSON染色结果; B: HE染色气道炎症定量分析; C: PAS染色气道黏液分泌定量分析; D: MASSON染色气道胶原沉积定量分析。放大倍数:  $\times 200$ , 比例尺:  $50\ \mu\text{m}$ 。\*\*\* $P < 0.001$  vs. 对照组; \*\* $P < 0.01$  vs. OVA组。

Figure 2 Fer-1 effectively relieved OVA-induced airway inflammation and remodeling in mice

A: HE, PAS, and MASSON staining were used to evaluate histopathological changes in mouse models; B: Quantitative analysis of airway inflammation evaluated by HE staining; C: Quantitative analysis of airway mucus hypersecretion evaluated by PAS staining; D: Quantitative analysis of collagen deposition in the airway evaluated by MASSON staining. Original magnification,  $\times 200$ . Scale bar,  $50\ \mu\text{m}$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs. the control group; \*\* $P < 0.01$  vs. the OVA group.

### 2.3 OVA 组小鼠中铁死亡与气道重塑共同存在

免疫组化结果显示, OVA 组小鼠气道上皮中的 GPX4 表达显著低于对照组。蛋白质印迹结果进一步验证了 OVA 组小鼠肺组织匀浆中 GPX4 的蛋白表达显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。TEM 结果显示, OVA 组小鼠气道上皮细胞线粒体体积减小, 线粒体嵴减少或消失, 线粒体外膜破裂, 线粒体膜密度浓缩, 而细胞质

膜没有破裂、气泡现象, 细胞核正常, 染色质未凝聚, 符合铁死亡的特征性超微结构改变。OVA 组小鼠肺组织中 MDA 的表达显著高于对照组 ( $P < 0.01$ )。上述结果均表明铁死亡在 OVA 组小鼠中的表达显著高于对照组。同时, OVA 组小鼠气道周围胶原沉积显著高于对照组, 表明铁死亡与哮喘气道重塑共同存在, 提示铁死亡可能参与了哮喘气道重塑的发病过程。见图 3。

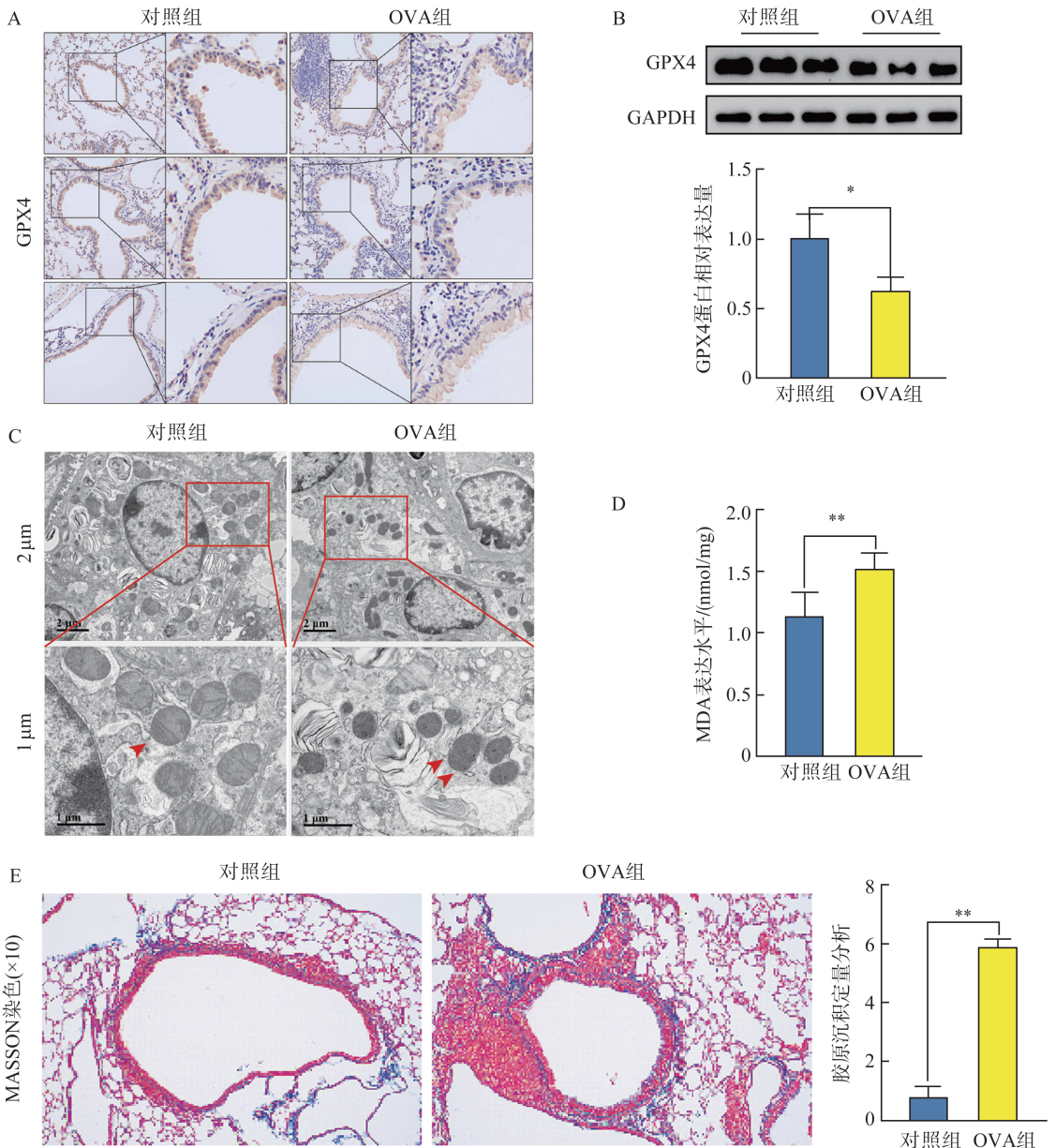


图 3 OVA 组小鼠中铁死亡与气道重塑共同存在

A: 免疫组织化学染色观察小鼠肺组织 GPX4 的水平; B: Western blotting 检测小鼠肺组织 GPX4 蛋白的表达情况; C: 应用 TEM 观察气道上皮特征性超微结构改变, 红色单箭头指向正常线粒体, 红色双箭头指向损伤的线粒体; D: 小鼠肺组织中 MDA 的表达水平; E: MASSON 染色法检测气道周围胶原沉积情况。放大倍数:  $\times 200$ ; 比例尺:  $50 \mu\text{m}$ 。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

Figure 3 Ferroptosis and airway remodeling co-existed in OVA-induced asthma mice

A: Immunohistochemistry detection of GPX4 protein; B: Western blotting assessed the protein expression of GPX4 and subsequent quantitative analysis; C: TEM was used to detect the characteristic changes of ultrastructure of bronchial epithelial cells. Single red arrows pointed to normal mitochondria, and paired red arrows pointed to impaired mitochondria; D: The expression level of the lipid peroxidation product MDA; E: MASSON staining revealed collagen deposition in the airway. Original magnification,  $\times 200$ . Scale bars,  $50 \mu\text{m}$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

## 2.4 铁死亡抑制剂 Fer-1 减轻 OVA 诱导哮喘小鼠气道重塑的病理改变

Fer-1 干预后,哮喘小鼠气道重塑标志物、胶原沉积水平伴随铁死亡水平显著下降。OVA 组小鼠气道上皮中 GPX4 的表达显著低于对照组,气道重塑蛋白 N-cadherin、 $\alpha$ -SMA 表达升高以及上皮标志蛋白 E-cadherin 表达降低。而在加入 Fer-1 干预后,GPX4 和 E-cadherin 的表达显著升高,N-cad-

herin、 $\alpha$ -SMA 的表达显著降低。蛋白质印迹与免疫荧光得到了一致的结果,Fer-1+OVA 组小鼠肺组织 GPX4 的表达高于 OVA 组,Fibronectin 表达下降,E-cadherin 表达升高( $P < 0.01$ )。而上述蛋白在 Fer-1 组的表达差异无统计学意义。上述结果表明,铁死亡参与哮喘气道重塑的发病过程,Fer-1 可显著减轻哮喘气道重塑的病理改变。见图 4。

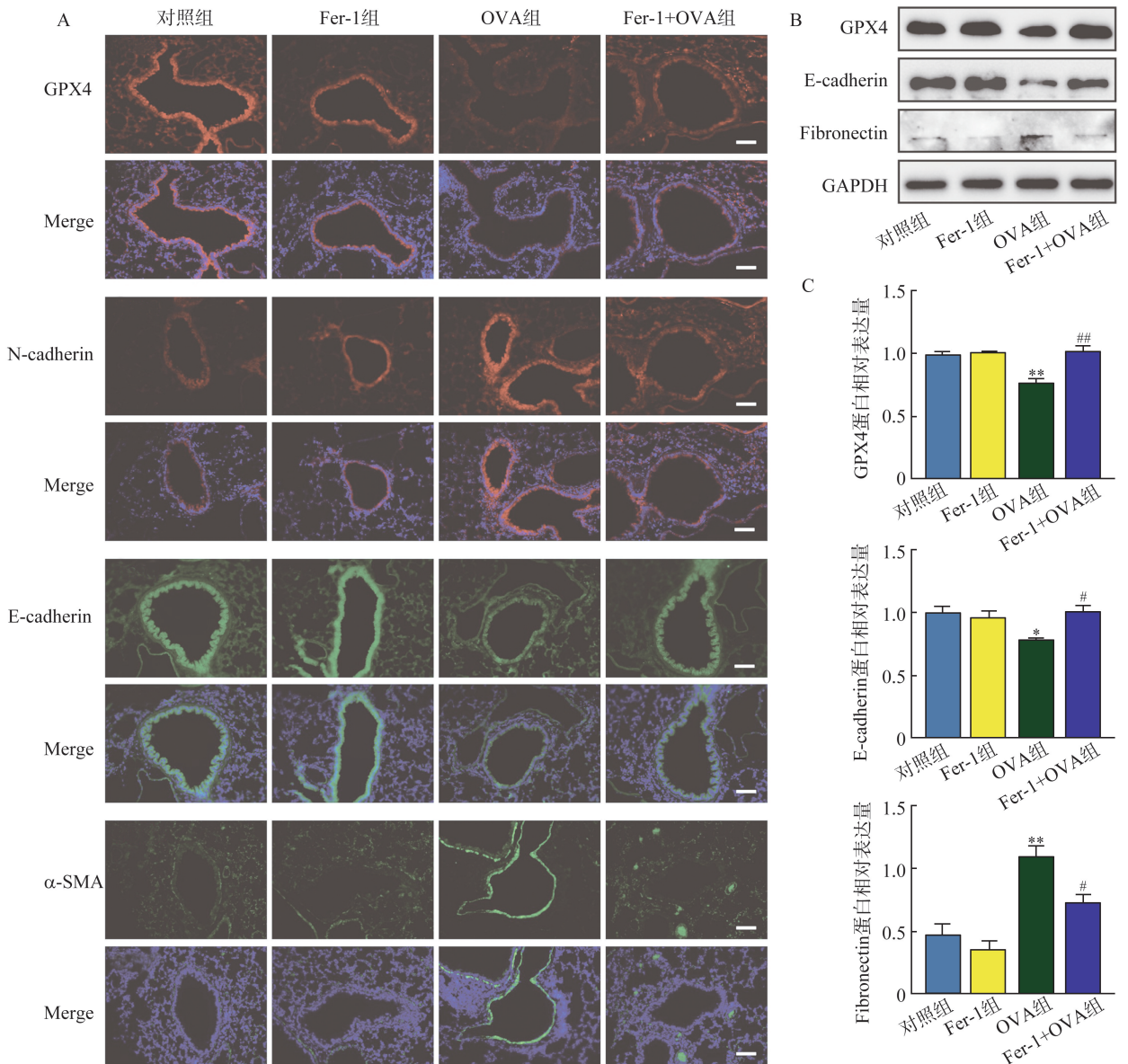


图 4 铁死亡抑制剂 Fer-1 减轻 OVA 诱导哮喘小鼠模型气道重塑的病理改变

A: 免疫荧光染色法检测 GPX4、N-cadherin、E-cadherin、 $\alpha$ -SMA 等气道重塑指标的变化; B: Western blotting 检测小鼠肺组织 GPX4、E-cadherin、Fibronectin 蛋白的水平; C: Western blotting 检测小鼠肺组织 GPX4、E-cadherin、Fibronectin 蛋白的定量分析。放大倍数:  $\times 200$ ; 比例尺:  $50 \mu\text{m}$ 。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. 对照组; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs. OVA 组。

Figure 4 Fer-1 relieved pathological changes of airway remodeling in OVA-induced asthma mice

A: Immunofluorescence detection of ferroptosis and airway remodeling indicator proteins (GPX4, E-cadherin, N-cadherin, and  $\alpha$ -SMA); B: Western blotting assessed the protein expression of GPX4, E-cadherin, and Fibronectin; C: Quantitative analysis of the protein expressions of GPX4, E-cadherin, and Fibronectin evaluated by Western blotting assay. Original magnification,  $\times 200$ . Scale bars,  $50 \mu\text{m}$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. the control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs. the OVA group.

### 3 讨论

近年来,支气管哮喘患者的数量逐年增加,支气管哮喘已成为我国第二大呼吸道疾病,2019年发表在《柳叶刀》期刊的研究数据显示,我国成人(20岁及以上)哮喘患者总人数达4570万,其中26.2%的哮喘患者肺功能结果提示存在气流受限<sup>[9]</sup>。随着哮喘疾病进展,气道重塑逐渐加重,导致不可逆性气流受限。哮喘气道重塑的主要病理变化包括气道上皮细胞变化和黏液腺增生<sup>[10]</sup>、上皮细胞下成纤维细胞活化<sup>[11]</sup>、气道平滑肌细胞增殖与迁移<sup>[12]</sup>、气道壁血管增生等<sup>[13]</sup>。气道重塑增加哮喘急性发作的频率,与哮喘的病情严重程度显著相关。已有研究表明,与健康对照人群相比,重症哮喘患者气道壁显著增厚,伴有气道管腔显著狭窄<sup>[14]</sup>。目前,糖皮质激素、长效 $\beta_2$ 受体激动剂等药物可在一定程度上减轻气道炎症<sup>[15]</sup>,但仍有部分哮喘患者病情反复发作,考虑与气道重塑出现后患者对上述治疗药物反应性降低有关<sup>[16]</sup>。因此,需要寻找针对哮喘气道重塑的治疗靶点,为哮喘的个体化治疗提供新的方向<sup>[17]</sup>。

铁死亡是不同于坏死、凋亡和自噬的一种新型细胞死亡方式,其主要特征是铁离子依赖和脂质过氧化,铁诱导的脂质活性氧积聚导致细胞发生过氧化反应<sup>[18]</sup>。已有研究发现,铁死亡参与了多种疾病组织重塑的发病过程。血管紧张素II导致高血压模型小鼠收缩压升高、肾铁死亡和肾间质纤维化的发生,铁死亡抑制剂能有效减轻高血压模型小鼠血管紧张素II诱发的上述改变<sup>[19]</sup>。此外,在博来霉素诱导的肺纤维化小鼠模型中,二型肺泡上皮细胞发生铁死亡,铁死亡抑制剂及铁螯合剂可显著减轻博来霉素诱导的肺纤维化,提示铁死亡在肺纤维化的发病过程中发挥一定作用<sup>[20-21]</sup>。然而铁死亡在哮喘气道重塑发病中的作用尚不明确,因此,我们针对铁死亡与气道重塑之间的关系进行了相关研究。

为明确铁死亡是否与哮喘发病有关,本研究首先对公共数据库中筛选的对照组和OVA诱导的哮喘模型小鼠肺组织中的差异表达谱进行了分析。结果显示,OVA组小鼠铁死亡信号通路表达显著高于对照组,且OVA组小鼠GPX4表达与对照组小鼠相比显著降低,提示铁死亡参与了哮喘疾病进展。为进一步明确铁死亡是否参与了哮喘气道重塑的发病过程,本研究构建了OVA诱导的哮喘小鼠模型,结果发现OVA组小鼠的肺组织匀浆总铁、 $Fe^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$

水平明显高于对照组,且OVA组小鼠肺组织非血红素铁表达较对照组显著升高。上述结果提示,哮喘模型小鼠中存在铁过载现象。既往研究发现,哮喘患者气道上皮转铁蛋白受体1、转铁蛋白受体2的表达显著高于对照组<sup>[7]</sup>,与本研究结果一致。本研究还发现,OVA组小鼠气道上皮及肺组织中的GPX4表达显著低于对照组。GPX4作为一种抗氧化剂,通过消除细胞内脂质活性氧从而抑制铁死亡的发生<sup>[22]</sup>。GPX4活性下降后会导致细胞无法清除累积的脂质过氧化物,从而导致铁死亡。研究发现,母体血清硒浓度下降会降低胎儿气道上皮GPX4的表达,引起抗氧化系统失衡,导致哮喘的发生<sup>[23]</sup>。

铁死亡的特征是脂质过氧化的铁依赖性积累达到一定程度,最终诱发细胞死亡。体外研究发现,哮喘气道上皮细胞中的15-LO与PEBP1结合导致铁死亡的发生,提示在哮喘的发病过程中脂质过氧化反应起了一定作用<sup>[24]</sup>。本研究结果显示,OVA组小鼠肺组织MDA水平显著升高。通过应用TEM观察OVA组小鼠肺组织病理改变,发现OVA组小鼠气道上皮细胞线粒体体积减小,线粒体嵴减少或消失,线粒体外膜破裂,线粒体膜密度浓缩,而细胞质膜没有破裂、气泡现象,细胞核正常,染色质未凝聚,符合铁死亡的特征性超微结构改变。

已有研究证实,铁死亡抑制剂Fer-1可抑制IL-13、IL-6、屋尘螨诱导的哮喘模型中的铁死亡<sup>[25-27]</sup>。本研究首次在OVA诱导的哮喘小鼠模型中应用了铁死亡抑制剂Fer-1,发现Fer-1治疗后,哮喘小鼠气道上皮中GPX4的表达水平上调,气道周围胶原沉积及气道重塑减轻,进一步验证了铁死亡在哮喘气道重塑中的作用。

本研究通过建立OVA诱导的哮喘小鼠模型,发现哮喘模型小鼠肺组织铁含量高于对照组,伴随着GPX4表达下降、MDA累积、气道上皮铁死亡特征性超微结构变化及气道重塑指标改变。铁死亡抑制剂Fer-1减轻了哮喘小鼠气道重塑的组织学改变。因此,本研究结果表明,铁死亡参与哮喘气道重塑的发病过程,铁死亡抑制剂可能成为今后哮喘气道重塑治疗的新靶点,其具体分子机制还有待于进一步深入研究。

### 参考文献:

- [1] Ntontsi P, Photiades A, Zervas E, et al. Genetics and epigenetics in asthma[J]. *Int J MolSci*, 2021, 22(5): 2412. doi:10.3390/ijms22052412.
- [2] Thomas D, McDonald VM, Pavord ID, et al. Asthma

- remission; what is it and how can it be achieved? [J]. *Eur Respir J*, 2022, 60 (5): 2102583. doi:10.1183/13993003.02583-2021.
- [3] Zhang YL, Kong Y, Ma Y, et al. Loss of COPZ1 induces NCOA4 mediated autophagy and ferroptosis in glioblastoma cell lines[J]. *Oncogene*, 2021, 40: 1425-1439. doi:10.1038/s41388-020-01622-3.
- [4] Yoshida M, Minagawa S, Araya J, et al. Involvement of cigarette smoke-induced epithelial cell ferroptosis in COPD pathogenesis[J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3145. doi:10.1038/s41467-019-10991-7.
- [5] Lv X, Dong M, Tang W, et al. Ferroptosis, novel therapeutics in asthma[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113516. doi:10.1016/j.biopha.2022.113516.
- [6] Yang Y, Tai W, Lu N, et al. lncRNA ZFAS1 promotes lung fibroblast-to-myofibroblast transition and ferroptosis via functioning as a ceRNA through miR-150-5p/SLC38A1 axis[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(10): 9085-9102.
- [7] Ali MK, Kim RY, Brown AC, et al. Crucial role for lung iron level and regulation in the pathogenesis and severity of asthma[J]. *Eur Respir J*, 2020, 55(4): 1901340. doi:10.1183/13993003.01340-2019.
- [8] Nagasaki T, Schuyler AJ, Zhao J, et al. 15LO1 dictates glutathione redox changes in asthmatic airway epithelium to worsen type 2 inflammation[J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(1): e151685. doi:10.1172/jci151685.
- [9] Huang K, Yang T, Xu J, et al. Prevalence, risk factors, and management of asthma in China: a national cross-sectional study[J]. *Lancet*, 2019, 394(10196): 407-418.
- [10] Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, et al. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(5): 1720-1745.
- [11] Shifren A, Witt C, Christie C, et al. Mechanisms of remodeling in asthmatic airways[J]. *J Allergy (Cairo)*, 2012, 2012: 316049. doi:10.1155/2012/316049.
- [12] Benayoun L, Druilhe A, Dombret MC, et al. Airway structural alterations selectively associated with severe asthma[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(10): 1360-1368.
- [13] Chetta A, Zanini A, Foresi A, et al. Vascular component of airway remodeling in asthma is reduced by high dose of fluticasone [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(5): 751-757.
- [14] Brilllet PY, Debray MP, Golmard JL, et al. Computed tomography assessment of airways throughout bronchial tree demonstrates airway narrowing in severe asthma [J]. *Acad Radiol*, 2015, 22(6): 734-742.
- [15] Miller RL, Grayson MH, Strothman K. Advances in asthma: new understandings of asthma's natural history, risk factors, underlying mechanisms, and clinical management[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2021, 148(6): 1430-1441.
- [16] Schoettler N, Strek ME. Recent advances in severe asthma: from phenotypes to personalized medicine [J]. *Chest*, 2020, 157(3): 516-528.
- [17] Banno A, Reddy AT, Lakshmi SP, et al. Bidirectional interaction of airway epithelial remodeling and inflammation in asthma[J]. *ClinSci (Lond)*, 2020, 134(9): 1063-1079.
- [18] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Ferroptosis in infection, inflammation, and immunity[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(6): e20210518. doi:10.1084/jem.20210518.
- [19] Li XT, Song JW, Zhang ZZ, et al. Sirtuin 7 mitigates renal ferroptosis, fibrosis and injury in hypertensive mice by facilitating the KLF15/Nrf2 signaling[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 193(Pt 1): 459-473.
- [20] Pei Z, Qin Y, Fu X, et al. Inhibition of ferroptosis and iron accumulation alleviates pulmonary fibrosis in a bleomycin model[J]. *Redox Biol*, 2022, 57: 102509. doi:10.1016/j.redox.2022.102509.
- [21] Takahashi M, Mizumura K, Gon Y, et al. Iron-dependent mitochondrial dysfunction contributes to the pathogenesis of pulmonary fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 643980. doi:10.3389/fphar.2021.643980.
- [22] Seibt TM, Proneth B, Conrad M. Role of GPX4 in ferroptosis and its pharmacological implication[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 133: 144-152. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.09.014.
- [23] Shaheen SO, Rutterford CM, Lewis SJ, et al. Maternal selenium status in pregnancy, offspring glutathione peroxidase 4 genotype, and childhood asthma [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(4): 1083-1085..
- [24] Wenzel SE, Tyurina YY, Zhao J, et al. PEBP1 wards ferroptosis by enabling lipoxygenase generation of lipid death signals[J]. *Cell*, 2017, 171(3): 628-641.
- [25] Zeng Z, Huang H, Zhang J, et al. HDM induce airway epithelial cell ferroptosis and promote inflammation by activating ferritinophagy in asthma [J]. *FASEB J*, 2022, 36(6): e22359. doi:10.1096/fj.202101977rr.
- [26] Yang N, Shang Y. Ferrostatin-1 and 3-methyladenine ameliorate ferroptosis in OVA-induced asthma model and in IL-13-challenged BEAS-2B cells[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 9657933. doi:10.1155/2022/9657933.
- [27] Han F, Li S, Yang Y, et al. Interleukin-6 promotes ferroptosis in bronchial epithelial cells by inducing reactive oxygen species-dependent lipid peroxidation and disrupting iron homeostasis [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 5279-5288.