

论著·基础研究

铁死亡对肌肉损伤后再生能力的影响

杜玉婷, 张 婧, 黄 莺, 张 晶

上海交通大学基础医学院病理生理学系, 细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025

[摘要] **目的**·探讨铁死亡对心脏毒素 (cardiotoxin, CTX) 诱发肌肉损伤后肌肉再生能力的影响。**方法**·在15只8周龄 C57BL/6J 雄性小鼠胫骨前肌 (tibialis anterior, TA) 上取上、中、下3个点注射CTX, 在第0、3、7日分别取5只小鼠的TA做苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin, H-E 染色) 观察肌肉损伤程度; 采用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 和蛋白质印迹法分别从RNA和蛋白水平检测肌肉再生相关指标及铁死亡相关指标的表达水平。同时, 将45只8周龄 C57BL/6J 雄性小鼠分为生理盐水对照组、铁离子螯合剂去铁胺 (deferrioxamine, DFO) 处理组和铁死亡抑制剂 UAMC-3203 处理组, 每组15只。通过分别提前1周腹腔注射生理盐水或DFO, 以及提前1d腹腔注射UAMC-3203对小鼠进行预处理。随后在小鼠TA部位注射CTX, 分别于第0、3、7日取TA组织, 利用RNA测序 (RNA sequencing, RNA-seq) 技术以及生物信息学分析铁死亡抑制剂预处理后对CTX诱导的肌肉损伤后再生能力的影响, 通过H-E染色观察及qPCR检测铁死亡抑制剂对肌肉再生相关基因RNA表达水平的影响。**结果**·H-E染色显示CTX注射后肌肉损伤再生模型构建成功。实验观察到铁死亡相关指标酰基辅酶A合成酶长链家族成员4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, *Acs14*) 和血红素加氧酶1 (heme oxygenase-1, *Hmox-1*) 在RNA和蛋白水平上明显升高, 提示肌肉损伤及再生过程中发生了铁死亡。在注射CTX后第3日肌肉组织的损伤情况较为严重, 伴随着肌肉再生相关基因成肌分化抗原 (myogenic differentiation antigen, *Myod*)、肌细胞生成素 (myogenin, *Myog*)、固生蛋白 (tenascin-c, *Tnc*) 的明显上调, 第7日有所恢复。通过对RNA-seq差异基因的京都基因与基因组数据库 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 通路分析发现, 与生理盐水组比较, UAMC-3203处理组中性粒细胞的脱颗粒化, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的生成以及吞噬作用中的磷脂等信号通路发生了明显的改变; 并且组织蛋白酶S (cathepsin S, *Ctss*) 的表达水平明显升高。更重要的是, 注射UAMC-3203和DFO可抑制肌肉再生相关基因的表达。**结论**·抑制铁死亡在一定程度上减慢了肌肉的再生过程, 提示铁死亡的发生可能促进了肌肉的再生。

[关键词] 铁死亡; 肌肉损伤; 肌肉再生; 心脏毒素

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2022.03.006 **[中图分类号]** R363.1 **[文献标志码]** A

Effect of ferroptosis on regeneration after muscle injury

DU Yuting, ZHANG Jing, HUANG Ying, ZHANG Jing

Department of Pathophysiology, Key Laboratory for Cell Differentiation and Apoptosis Ministry of Education, Shanghai Jiao Tong University School of Basic Medicine, Shanghai 200025, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the role of ferroptosis in muscle regeneration after injury induced by cardiotoxin (CTX). **Methods**·CTX was injected into the tibialis anterior (TA) of fifteen 8-week-old male C57BL/6J mice at the upper, middle and lower points. After injection, TA tissue of the mice was collected at 0 d, 3 d and 7 d respectively ($n=5$) to detect injury by hematoxylin-eosin (H-E) staining. Meanwhile, quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blotting were used respectively to detect the expression levels of muscle regeneration-related indexes and ferroptosis-related genes from RNA and protein levels, respectively. At the same time, forty-five 8-week-old C57BL/6J male mice were divided into 3 groups before CTX injection: saline control group, iron chelator deferrioxamine (DFO) treatment group and ferroptosis inhibitor UAMC-3203 treatment group ($n=15$). CTX was injected into TA, and muscle tissue was collected at 0 d, 3 d and 7 d respectively. RNA sequencing (RNA-seq) technology and bioinformatics were used to analyze the effect of ferroptosis inhibitor pretreatment on muscle injury and regeneration after CTX injection. H-E

[基金项目] 国家自然科学基金 (32070734); 上海市自然科学基金 (20ZR1430800); 上海市浦江人才计划 (20PJ1409500); 上海交通大学医学院高水平地方高校创新团队 (SHSMU-ZDCX20212000)。

[作者简介] 杜玉婷 (1997—), 女, 硕士生; 电子信箱: duduyuting@sjtu.edu.cn。

[通信作者] 张 晶, 电子信箱: jingzhang@shsmu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (32070734); Natural Science Foundation of Shanghai (20ZR1430800); Shanghai Pujiang Talent Plan (20PJ1409500); Innovative Research Team of High-Level Local Universities in Shanghai (SHSMU-ZDCX20212000).

[Corresponding Author] ZHANG Jing, E-mail: jingzhang@shsmu.edu.cn.



staining and qPCR were utilized to analyze the effect of ferroptosis inhibitor on the expression levels of muscle regeneration-related genes. **Results** The muscle injury and regeneration model was successfully established by CTX injection, as revealed by H-E staining. The increase of ferroptosis-related genes including acyl-CoA synthetase long chain family member 4 (*Acs14*) and heme oxygenase-1 (*Hmox-1*) at both RNA and protein levels was observed, suggesting the occurrence of ferroptosis during muscle injury. There was severe muscle injury at day 3, which was detected by the up-regulation of myogenic differentiation antigen (*Myod*), myogenin (*Myog*), and tenascin-c (*Tnc*), followed by declines at day 7. According to the analysis of Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway of RNA-seq differential genes, it was found that UAMC-3203 treatment group had significant changes in neutrophil degranulation, production of reactive oxygen species (ROS) and phospholipids in phagocytosis compared with CTX injection alone. And the expression of cathepsin S (*Ctss*) was much higher in the UAMC-3203 treatment group. More importantly, the expression of muscle regeneration-related genes were dramatically inhibited by both UAMC-3203 and DFO injection. **Conclusion** Inhibition of ferroptosis slows down the process of muscle regeneration to a certain degree, suggesting that ferroptosis may play a key role in facilitating muscle regeneration.

[Key words] ferroptosis; muscle injury; muscle regeneration; cardiotoxin (CTX)

骨骼肌是人体第二大可塑性组织,仅次于神经组织^[1],对呼吸、代谢、运动、体温保持等基本生命活动具有重要的调控作用。运动、疾病、创伤等会导致骨骼肌不同程度的损伤^[2]。骨骼肌再生是骨骼肌对损伤或肌病做出反应并进行修复的生理过程^[3]。肌肉急性损伤诱导骨骼肌再生的模型应用广泛、功能强大,其病理生理过程涉及多种细胞的协同作用,受到复杂、精细的调控,以保证再生过程的有序进行^[4]。心脏毒素(cardiotoxin, CTX)可通过肌肉注射导致肌肉损伤,常被用于肌肉损伤模型的构建^[5]。CTX注射后的第3日中性粒细胞开始积聚,而巨噬细胞在3 d后开始积聚^[6]。

骨骼肌在损伤后具有显著的再生能力,肌肉再生是一个高度协调的过程。研究表明,肌肉修复通常从肌纤维变性开始,形态学上类似于坏死。在病理情况下,过度的坏死性凋亡(necroptosis),由于其促炎反应,通常会给机体带来危害。最近,有研究^[7]表明坏死性凋亡能够通过促进固生蛋白(tenascin-c, TNC)的释放进而促进肌肉再生。然而到目前为止,肌纤维其他的坏死方式对肌肉损伤修复的影响并不清楚。

铁死亡(ferroptosis)是近年来报道的一种新型的细胞死亡方式^[8],其具体机制是由于铁过载而导致脂质过氧化(lipid peroxidation)从而引起细胞死亡^[9]。铁死亡诱导剂可以诱导细胞脂质过氧化或死亡,其中,酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)在游离脂肪酸结合到磷脂过程中发挥关键作用^[10-11]。研究^[12-14]表明,铁死亡与多种细胞过程有关,如铁稳态、氧化还原稳态和脂质代谢;另一方面,谷胱甘

肽过氧化物酶(glutathione peroxidase 4, GPX4)是哺乳动物细胞中一种专门消除脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)的酶,可防止铁死亡的发生。作为小分子的ferrostatin-1(Fer-1)具有中和脂质ROS的能力,去铁胺(deferoxamine, DFO)具有螯合铁离子的能力,因此它们被认为是铁死亡的有效抑制剂^[8,12]。从Fer-1衍生的新型抑制剂UAMC-3203具有更好的溶解性,抑制铁死亡的能力与DFO比较表现出更强的效果,在小鼠体内显示对多种器官的损伤具有良好的保护作用^[15]。在过去的几年中,越来越多的证据^[12,16-17]表明,铁死亡与多种病理学改变有关,如组织缺血再灌注损伤、神经退行性变、脑卒中和癌症。因此,了解铁死亡是否与其他形式的细胞死亡一样,参与其他生理和病理过程是很重要的。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8周龄SPF级的C57BL/6J雄性小鼠60只(灵畅生物提供),体质量20~25 g。实验小鼠饲养于上海交通大学医学院动物科学部,12 h明暗交替,动物房温度18~26 °C,相对湿度40%~60%。动物使用许可证号SYXK(沪)2018-0002,生产许可证号SCXK(沪)2018-0007。实验符合上海交通大学医学院动物实验伦理标准。

1.2 主要试剂与仪器

TRIzol(Thermo Fisher,美国),反转录试剂盒(诺唯赞,中国),Genious 2×SYBR Green Fast实时荧光定量PCR(quantitative real-time PCR, qPCR) Mix

(ABclonal, 中国武汉), DFO (Sigma, 美国), CTX (Merck, 美国), UAMC-3203 (Selleck, 美国), 生理盐水 (Servicebio, 中国武汉), 异氟烷 (瑞沃德生命科技有限公司), 脱脂牛奶 (雅酶生物医药, 中国上海), ACSL4 抗体 (Santa Cruz, 美国), 血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HMOX-1) 抗体 (Proteintech, 美国), 成肌分化抗原 (myogenic differentiation antigen, MYOD) 抗体 (ABclonal), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (Proteintech, 美国), 鼠荧光二抗 (1:15 000, LI-COR), 兔荧光二抗 (1:20 000, LI-COR), cocktail (APE×BIO), 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白定量试剂盒 (Thermo Fisher, 美国)。

组织研磨仪 (上海净信), 研磨珠 (Servicebio, 中国武汉), 脱水机 (Diapath, Donatello), 包埋机 (武汉俊杰电子有限公司, JB-P5), 病理切片机 (上海莱卡仪器有限公司, RM2016), 冷冻台 (武汉俊杰电子有限公司, JB-L5), 组织切片机 (浙江金华科迪仪器设备有限公司), 染色机 (Diapath), 烤箱 (天津市莱博瑞仪器设备有限公司), 载玻片 (Servicebio), 正置光学显微镜 (日本尼康), 1 mL 注射器 (康德莱), 倒置显微成像系统 (Olympus)。

1.3 研究方法

1.3.1 肌肉损伤再生模型构建 CTX 诱导的急性肌肉损伤模型能够维持基底膜和微血管的基本结构, 有充足的血液供应, 通常用于研究肌肉损伤再生。将

CTX 溶于生理盐水配置成浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的母液。取 15 只 C57BL/6J 小鼠, 刮去腿毛。使用麻醉机用异氟烷对小鼠进行麻醉, 分别在胫骨前肌 (tibialis anterior, TA) 上、中、下选取 3 个点注射 CTX, 每个点注射 30 μL 。CTX 注射后, 分别在第 0、3、7 日取 5 只小鼠的 TA 组织, 3 个时间点分别代表肌肉损伤、再生和修复的不同阶段。本研究通过检测这 3 个关键节点的肌肉组织形态学变化及相关分子通路, 探究再生过程中生理病理机制。

1.3.2 分组及预处理 将 45 只 8 周龄的 C57BL/6J 雄性小鼠随机分为生理盐水组、铁离子螯合剂 DFO 组、铁死亡抑制剂 UAMC-3203 组, 每组 15 只。生理盐水组和 DFO 组连续 7 d 分别腹腔注射生理盐水和 DFO, 注射剂量为 100 mg/kg。UAMC-3203 组在注射 CTX 前 1 d 腹腔注射, 剂量为 10 mg/kg。

1.3.3 小鼠 TA 肌肉取样及病理学观察 分别在注射 CTX 后第 0、3、7 日取样。取 TA 组织放入 4% 多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA) 固定液中固定, 再将组织块包埋于石蜡后做苏木精-伊红染色 (hematoxylin and eosin staining, H-E 染色), 在显微镜下观察拍片。

1.3.4 RNA 抽提、反转录及 qPCR 肌肉组织用 TRIzol 进行裂解, 实验前尽量确保样品处于无 RNA 酶污染的环境, 定量后去除基因组 DNA 后反转录成 cDNA 用于后续 qPCR。采用 Genious 2×SYBER Green Fast qPCR Mix 荧光定量试剂盒, 设计特异荧光定量引物 (primer bank), 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。每个待测样品设置 3 个复孔, 内参使用小鼠 *Gapdh*。

表 1 qPCR 引物序列 (5'→3')

Tab 1 Primer sequences for qPCR (5'→3')

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Myod</i>	CCACTCCGGGACATAGACTTG	AAAAGCGCAGGTCTGGTGAG
<i>Myog</i>	GAGACATCCCCCTATTCTACCA	GCTCAGTCCGCTCATAGCC
<i>Tnc</i>	TTTGCCCTCACTCCCGAAG	AGGGTCAIGTTTAGCCCACTC
<i>Hmox-1</i>	ACAGAGGAACACAAAGACCAG	GTGTCTGGGATGAGCTAGTG
<i>Acs14</i>	CTCACCATTATATTGCTGCCTGT	TCTCTTTGCCATAGCGTTTTTCT
<i>Ctss</i>	CCATTGGGATCTCTGGAAGAAAA	TCATGCCCACTTGGTAGGTAT
<i>Gapdh</i>	CCCCAATGTGTCCGTCGTG	GCCTGCTTACCACCTTCT

Note: *Myog*—myogenin; *Ctss*—cathepsin S.

1.3.5 蛋白质印迹法 根据 TA 组织质量加入 RIPA 裂解液裂解, 同时加入蛋白酶抑制剂 cocktail。预冷组织研磨仪至 4 $^{\circ}\text{C}$ 后向样品中加入研磨珠对组织进行

研磨, 频率为 70 Hz, 30 s/次, 共 3 次。12 000 \times g 离心取上清液, BCA 蛋白定量后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-

polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 用5%的脱脂牛奶封闭0.5 h后用HMOX-1抗体(1:3 000), ACSL4抗体(1:300), MYOD抗体(1:2 000), GAPDH抗体(1:8 000), 4 °C过夜孵育。回收一抗后洗膜孵育二抗, 室温1 h, 洗膜显影。

1.3.6 肌肉组织RNA测序 分别从生理盐水组和UAMC-3203组随机选取3只小鼠的TA组织进行RNA测序(RNA sequencing, RNA-Seq), 测序实验由诺禾公司完成。对cDNA进行文库的构建和质检后使用Qubit2.0 Fluorometer进行初步定量, 符合预期后上机测序。

1.4 统计学方法及差异表达分析

1.4.1 统计学方法 采用Microsoft Excel和Graphpad Prism 8进行数据处理和统计学分析。2组比较采用Student's *t*检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

1.4.2 差异表达分析 使用DESeq 2软件(1.16.1)分别对第0日及第3日生理盐水组和UAMC-3203组进行差异表达分析(每个组2个生物学重复)。DESeq 2提供了统计程序, 用于使用基于负二项式分布的模型来确定数字基因表达数据中的差异表达。使用Benjamini和Hochberg的方法来调整所得 P 值以控制错误发现率。通过DESeq 2发现调整的 $P < 0.05$ 的基因被分配为差异表达基因(对于没有生物学重复的采用edgeR)。在进行差异基因表达分析之前, 对于每个测序文库, 通过一个比例归一化因子使用edgeR程序包调整读取计数。2个条件的差异表达分析使用edgeR软件包(3.18.1)进行。使用Benjamini和Hochberg的方法调整 P 值。校正后的 P 值以及 $|\log_2 \text{foldchange}|$ 作为显著差异表达的阈值。

1.4.3 差异基因富集分析 通过clusterProfiler(3.4.4)软件实现差异表达基因的基因本体数据库(Gene Ontology, GO)富集分析, 其中修正了基因长度偏差。考虑具有小于0.05的校正 P 值的GO term通过差异表达基因富集。京都基因与基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)是一个数据库资源, 用于从分子水平的信息, 特别是基因组测序产生的大规模分子数据集和其他高通量数据库中了解生物系统的高级功能和效用, 如细胞、生物体和生态系统等。我们使用clusterProfiler

(3.4.4)软件分析KEGG通路中差异表达基因的富集统计。

2 结果

2.1 CTX注射后肌肉损伤再生相关指标的检测

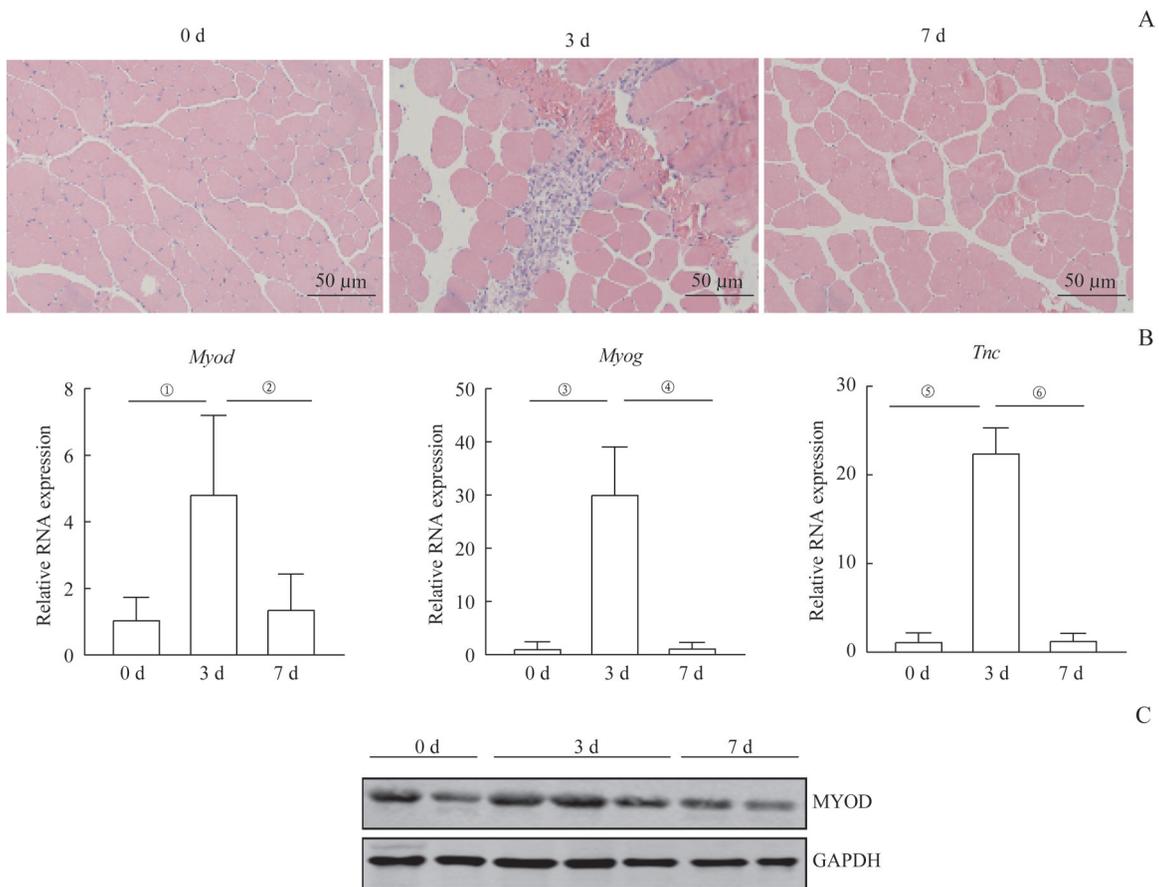
TA组织注射CTX后, 为了验证CTX注射诱导的肌肉损伤模型是否构建成功, 本研究通过对肌肉组织进行H-E染色来观察肌肉损伤再生情况。H-E染色如图1A所示: CTX注射后第3日损伤较为严重, 出现单核细胞的浸润, 中性粒细胞的大量积聚; 第7日肌肉组织形态基本恢复。为检测此过程是否有肌肉再生, 本研究分别检测肌肉再生关键基因*Myod*、肌细胞生成素(myogenin, *Myog*)和*Tnc*。*Myod*表达于肌肉细胞及其前体细胞中, 促进成肌细胞向肌肉细胞分化^[18]。*Myog*基因是生肌调节因子*Myod*家族中的一员, 该基因在肌肉的生长发育、肌肉萎缩以及肌肉再生中具有重要作用^[19]。*Tnc*能促进成肌细胞的增殖^[20], 这个过程由损伤肌肉组织中坏死性凋亡来调控^[7]。如图1B所示, 肌肉再生相关标志基因RNA水平的表达在第3日明显升高(均 $P < 0.05$)。同时, 我们也从蛋白水平检测MYOD的表达, 发现同样在第3日升高(图1C), 此趋势与RNA结果一致, 说明肌肉损伤再生模型构建成功。

2.2 CTX注射后铁死亡相关指标的检测

在15只C57BL/6J小鼠的TA注射CTX后, 分别于第0、3、7日取TA组织, 从RNA和蛋白水平检测铁死亡相关指标。由图2可知, 注射CTX后第3日铁死亡相关指标*Acs14*、*Hmox-1*在RNA和蛋白水平上有明显升高趋势, 第7日有所恢复(均 $P < 0.05$)。结果表明, CTX引起的肌肉损伤过程中有铁死亡的发生。

2.3 铁死亡抑制剂对肌肉损伤再生的转录组调控

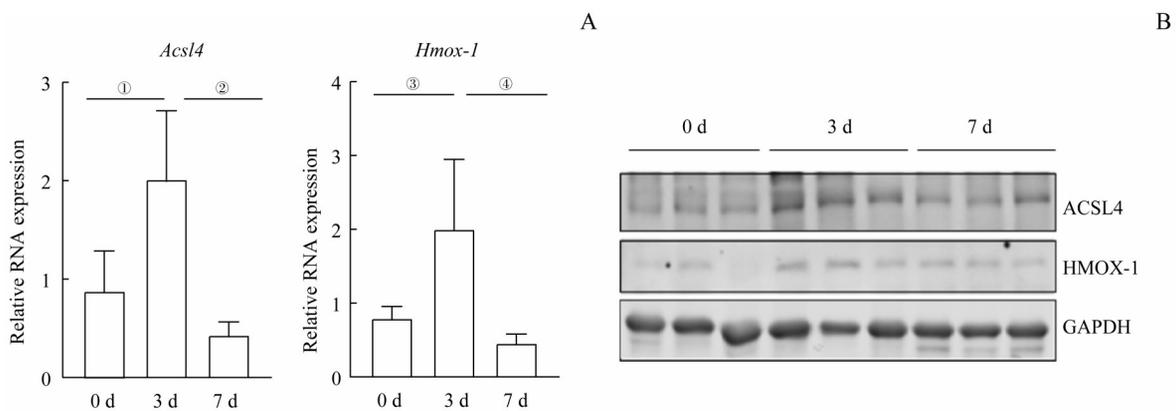
为了探究铁死亡对小鼠肌肉损伤再生过程中转录组表达水平的影响, 我们随机从生理盐水组和UAMC-3203组中选取3只小鼠的TA组织进行RNA-seq。以 $\log_2(\text{CTX+生理盐水}) / (\text{CTX+UAMC-3203})$ 或者 $\log_2(\text{CTX+UAMC-3203}) / (\text{CTX+生理盐水}) \geq 1.5$, 以及 t 检验 $P < 0.05$ 为条件, 共筛选出显著差异表达基因531个, 其中UAMC-3203组显著升



Note: A. Representative H-E staining ($\times 20$) of TA muscle cross-sections from injured mice at different time points (0, 3 and 7 d after CTX injection, respectively). B. qPCR analysis of muscle regeneration factors *Myod*, *Myog*, and *Tnc* mRNA levels in TA isolated from injured mice (0, 3 and 7 d after CTX injection). The mRNA level of *Gapdh* was used as the internal controls. ^① $P=0.005$, ^② $P=0.040$, ^③ $P=0.000$, ^④ $P=0.000$, ^⑤ $P=0.003$, ^⑥ $P=0.000$. C. Protein expression level of MYOD in TA muscle isolated from injured mice (0, 3 and 7 d after CTX injection). The protein level of GAPDH was used as the internal controls.

图1 CTX注射诱导肌肉组织损伤后再生

Fig 1 Muscle injury and regeneration induced by CTX



Note: A. qPCR analysis of ferroptosis marker gene *Acs14* and *Hmox-1* expression levels in TA muscle isolated from mice (0, 3 and 7 d after CTX injection). The mRNA level of *Gadph* was used as the internal control. ^① $P=0.042$, ^② $P=0.001$, ^③ $P=0.042$, ^④ $P=0.015$. B. Protein expression level of ACSL4 and HMOX-1 in TA muscle.

图2 CTX注射后铁死亡相关指标RNA和蛋白的表达

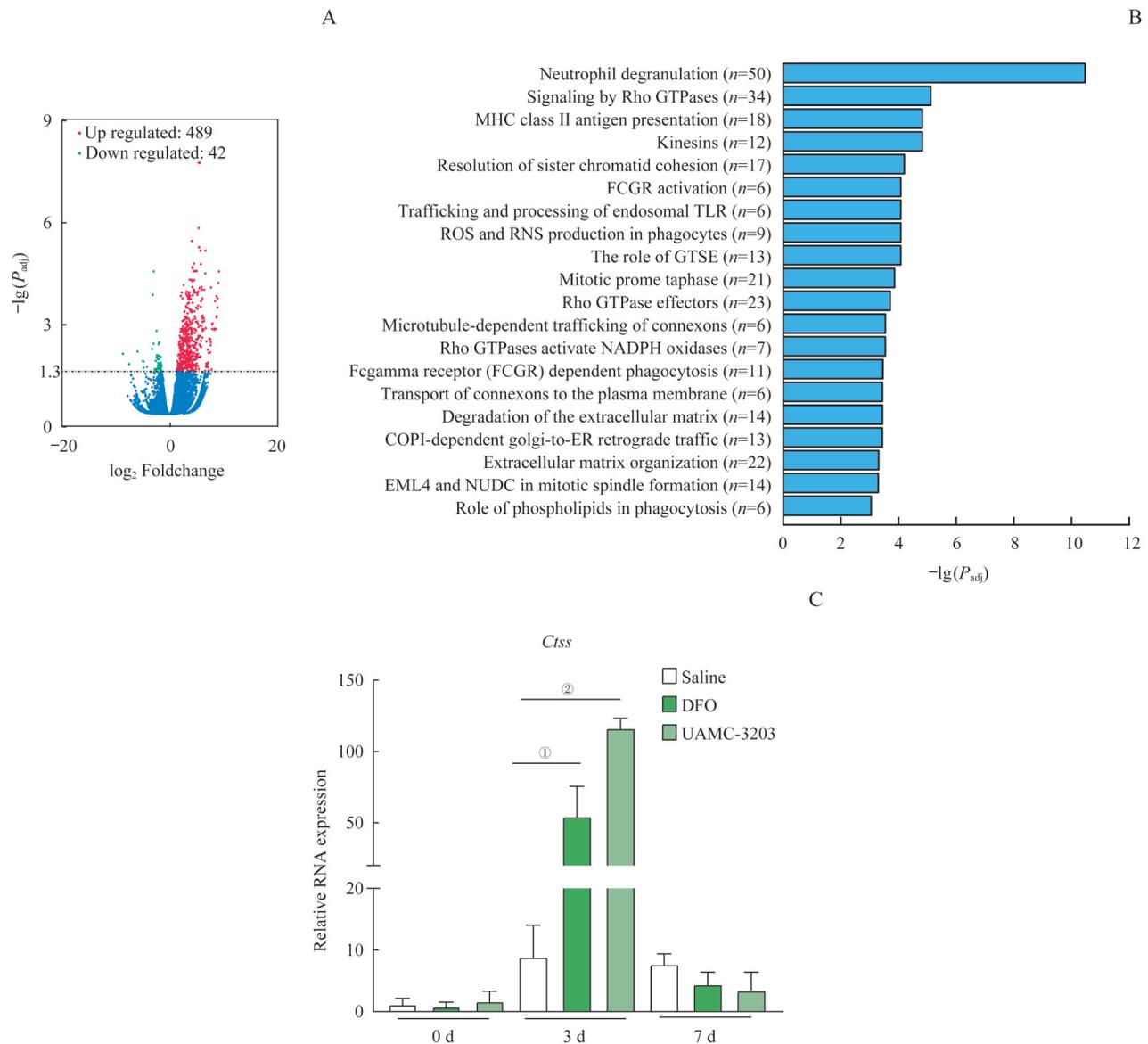
Fig 2 RNA and protein expression of ferroptosis-related indicators after CTX injection

高的基因有489个(图3A的红色部分),显著降低的基因42个(图3A的绿色部分)。通过对RNA-seq差异基因的GO分子功能通路分析发现, UAMC-3203

组中性粒细胞的脱颗粒化, ROS的生成, 以及吞噬作用中的磷脂等信号通路发生了明显的改变(图3B)。在RNA-seq显著变化的基因中, 我们注意到组

织蛋白酶 S (cathepsin S, *Ctss*) 基因表达的显著升高。如图 3C 所示, CTX 注射后第 3 日, 与生理盐水

组比较, UAMC-3203 组和 DFO 组 *Ctss* 基因的表达都显著增强 (均 $P < 0.05$)。



Note: A. Volcano plot of differentially expressed genes in the TA muscle of CTX+saline and CTX+UAMC-3203 injection mice 3 days after CTX-injection. B. KEGG pathway of RNA-seq analysis between the CTX+saline group and CTX+UAMC-3203 group. C. qPCR analysis of *Ctss* which was highly up-regulated in GO analysis in TA muscle. ^① $P=0.016$, ^② $P=0.000$.

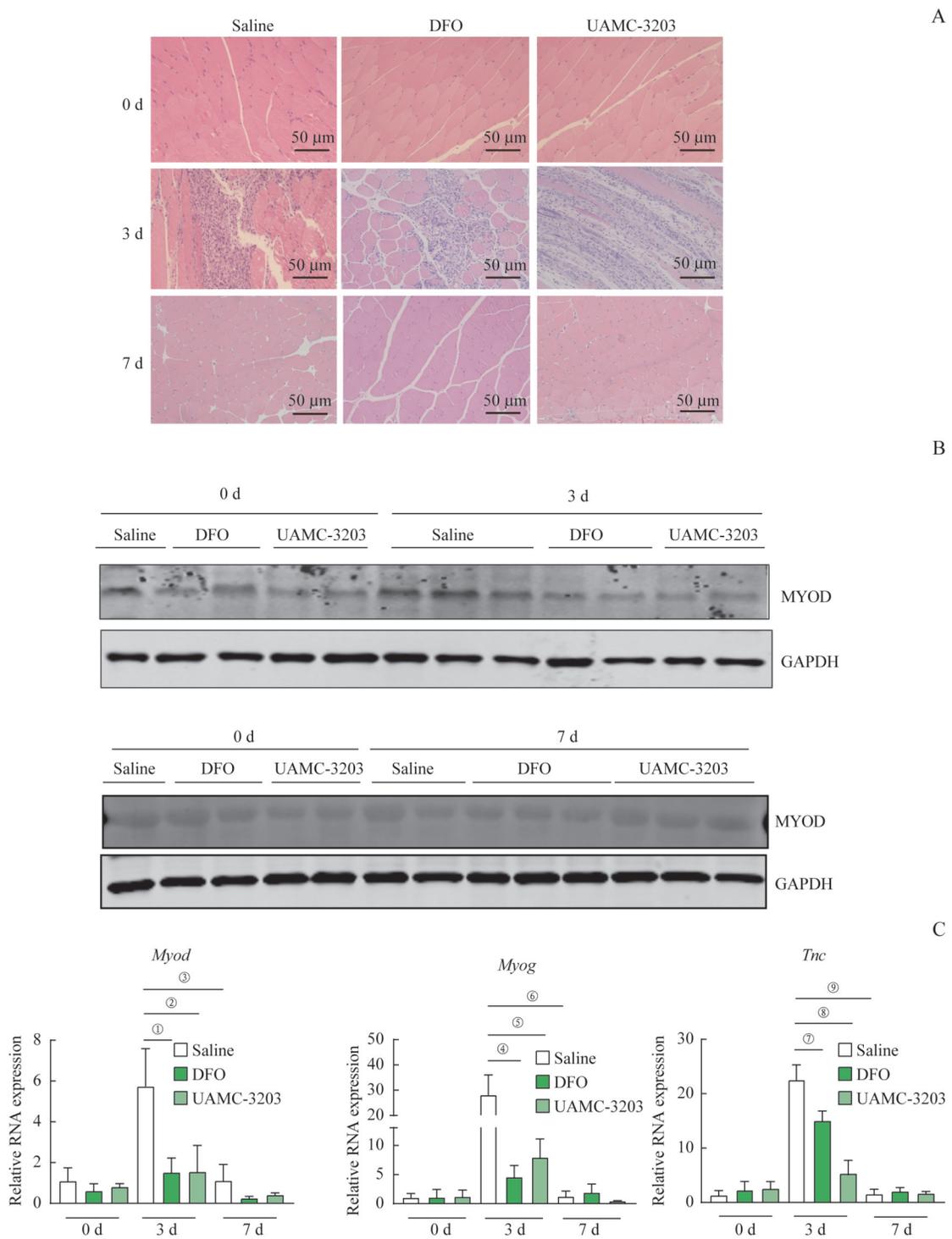
图3 铁死亡抑制剂UAMC-3203预处理之后的转录组分析

Fig 3 Effect of ferroptosis inhibitors UAMC-3203 on CTX-induced skeletal muscle regeneration at transcriptome level

2.4 铁死亡抑制剂预处理后对肌肉再生的影响

H-E染色由图4A所示,注射CTX后第3日肌肉损伤较为严重,出现单核细胞的浸润,第7日肌肉组织形态基本恢复。DFO组和UAMC-3203组损伤程度较生理盐水组更为严重。我们检测了CTX注射后不同组别MYOD的表达水平,结果如图4B所示,CTX注射3d后,MYOD蛋白的表达显著升高,而DFO组和UAMC-3203组中MYOD蛋白的升高被明

显抑制。同时,如图4C所示,CTX注射后第3日,肌肉再生标志基因*Myod*、*Tnc*和*Myog*的RNA表达在生理盐水组也显著升高,而铁死亡抑制剂组肌肉再生相关基因的表达明显低于生理盐水组(均 $P < 0.05$)。第7日肌肉再生标志基因*Myod*、*Tnc*和*Myog*的RNA表达水平均较第3日呈现下降趋势(均 $P < 0.05$)。这些结果提示铁死亡至少部分参与了肌肉再生。



Note: A. Representative of H-E staining of TA muscle cross-sections from both uninjured (0 d) and injured (3 d and 7 d) mice after CTX injection. B. Protein expression level of MYOD in TA muscle isolated from injured mice treated with saline, DFO and UAMC-3203 (comparison of 0 d and 3 d, 0 d and 7 d). Whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and immunoblotting analysis using antibodies as indicated. GAPDH served as the loading control. C. qPCR analysis of *Myod*, *Myog*, *Tnc* mRNA levels of TA muscle isolated from injured mice (0,3 and 7 d after CTX injection). The mRNA level of *Gapdh* was used as the internal control. ①*P*=0.006, ②*P*=0.000, ③*P*=0.000, ④*P*=0.000, ⑤*P*=0.003, ⑥*P*=0.024, ⑦*P*=0.004, ⑧*P*=0.040, ⑨*P*=0.000.

图4 铁死亡抑制剂预处理对肌肉再生能力的抑制作用

Fig 4 Inhibitory effect of ferroptosis inhibitor on the regeneration ability of skeletal muscle

3 讨论

骨骼肌的生长和再生依赖于从中胚层发育而来的

成人干细胞亚型，即卫星细胞 (satellite cells)。卫星细胞可以在外部刺激和肌肉损伤的情况下重新进入细胞周期，在MYOD和MYOG等因子的调节下产生成

肌细胞,参与肌纤维的重建或修复。肌肉损伤再生模型常用于分析肌肉再生过程中相关分子所起的作用。铁死亡作为一种新型的细胞死亡方式,是否影响肌肉损伤后再生仍是未知。作为一种病理性的细胞死亡,铁死亡已被证实与多种组织损伤和疾病相关,包括缺血再灌注损伤和神经退行性疾病等。本研究旨在探究铁死亡对肌肉再生的影响。我们首先构建了CTX肌肉损伤再生模型,通过H-E染色发现有炎症细胞的浸润,并在RNA及蛋白水平上发现*Myod*等指标在第3日水平升高,验证了肌肉损伤再生模型构建成功。接下来,我们检测在肌肉损伤修复过程中是否有铁死亡的发生,发现在CTX注射后第3日铁死亡相关指标*Acsf4*和*Hmox-1*在RNA和蛋白水平上有明显上升趋势,提示在CTX诱导的肌肉损伤模型中有铁死亡的发生。

接下来我们通过RNA-seq实验探究铁死亡在损伤过程中发挥怎样的作用。实验结果显示中性粒细胞的脱颗粒化,以及吞噬作用中的磷脂等信号通路发生了明显的改变。有意思的是,我们发现在显著变化的基因中*Ctss*的表达有明显升高趋势。*CTSS*属于溶酶体半胱氨酸蛋白酶家族,在巨噬细胞和树突状细胞中被鉴定为一种主要的内蛋白酶;在小鼠中,*Ctss*基因的缺失并不影响其生存能力。在组织损伤和炎症中分泌的*CTSS*,参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的重塑和组织愈合^[21]。除了在抗原加工中的作用,*CTSS*还参与组织重构过程中ECM的构建。之前已有文献^[22]报道急性肌肉损伤及mdx小鼠[进行性假肥大性肌营养不良(Duchenne's muscular dystrophy, DMD)模型]的肌肉中,*CTSS*蛋白表达水平和蛋白水解活性显著提高。*Ctss*基因的缺失会增

加肌纤维肌膜的稳定性、提高整合素和 β -dystroglycan的表达以及膜定位的准确性,从而维持骨骼肌结构的稳定性^[21,23]。我们推测,抑制铁死亡后*Ctss*基因的表达升高导致肌纤维坏死增加,从而表现出肌肉组织病理学功能缺陷,以及肌肉损伤后再生过程的延缓。但*CTSS*具体参与铁死亡哪一条通路仍是未知,还需进一步探究。

接下来我们想知道铁死亡在肌肉再生的过程中是否起主要作用,于是通过用铁死亡抑制剂DFO和UAMC-3203腹腔注射预处理后建立肌肉损伤模型,从RNA和蛋白水平检测肌肉再生相关标志物的表达。结果显示注射铁死亡抑制剂组相较于生理盐水组肌肉生长因子的表达水平明显下降。到第7日无论是生理盐水组还是铁死亡抑制剂组肌肉坏死水平都有所恢复,但铁死亡抑制剂组较生理盐水组相比恢复得较慢,仍能看到部分损伤。本研究取样截止时间点选在第7日,肌肉损伤后再生完全恢复时间还有待于进一步探究和摸索。最近,有学者^[7]证明,细胞坏死性凋亡能通过促进TNC的释放促进肌肉再生,其意义在于探究细胞坏死在生理过程中发挥积极的作用。另一方面,在慢性肌肉疾病(如DMD)中,肌纤维是否发生坏死仍有争议^[22-23]。此外,有研究^[23]观察到CTX急性损伤再生模型中,野生型小鼠的肌肉干细胞并未发生坏死,而在mdx小鼠中有一群非竞争的肌肉干细胞有坏死的症状。这些结果表明,铁死亡可能参与急性和慢性肌肉再生,但扮演着不同的角色。

综上所述,本研究显示了经DFO和UAMC-3203处理后肌肉再生能力有所下降,提示铁死亡的发生可能帮助了肌肉的再生,这将为我们拓展对铁死亡的病理功能的认识提供新思路。

参·考·文·献

- [1] FRONTERA W R, OCHALA J. Skeletal muscle: a brief review of structure and function[J]. *Calcif Tissue Int*, 2015, 96(3): 183-195.
- [2] BAGHDADI M B, TAJBAKHS S. Regulation and phylogeny of skeletal muscle regeneration[J]. *Dev Biol*, 2018, 433(2): 200-209.
- [3] HUARD J, LI Y, FU F H. Muscle injuries and repair: current trends in research[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2002, 84(5): 822-832.
- [4] BEHM D G, BLAZEVICH A J, KAY A D, et al. Acute effects of muscle stretching on physical performance, range of motion, and injury incidence in healthy active individuals: a systematic review[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2016, 41(1): 1-11.
- [5] DALLE S, HIROUX C, POFFÉ C, et al. Cardiotoxin-induced skeletal muscle injury elicits profound changes in anabolic and stress signaling, and muscle fiber type composition[J]. *J Muscle Res Cell Motil*, 2020, 41(4): 375-387.
- [6] MATHES A L, LAFYATIS R. Role for Toll-like receptor 3 in muscle regeneration after cardiotoxin injury[J]. *Muscle Nerve*, 2011, 43(5): 733-740.
- [7] ZHOU S A, ZHANG W, CAI G H, et al. Myofiber necroptosis promotes muscle stem cell proliferation via releasing tenascin-c during regeneration[J]. *Cell Res*, 2020, 30(12): 1063-1077.
- [8] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [9] CONRAD M, ANGELI J P F, VANDENABEELE P, et al. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5): 348-366.
- [10] KAGAN V E, MAO G W, QU F, et al. Oxidized arachidonic and adrenergic PEs navigate cells to ferroptosis[J]. *Nat Chem Biol*, 2017,



- 13(1): 81-90.
- [11] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91-98.
- [12] ANGELI J P F, SCHNEIDER M, PRONETH B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1180-1191.
- [13] INGOLD I, BERNDT C, SCHMITT S, et al. Selenium utilization by GPX4 is required to prevent hydroperoxide-induced ferroptosis[J]. *Cell*, 2018, 172(3): 409-422. e21.
- [14] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1-2): 317-331.
- [15] DEVISSCHER L, VAN COILLIE S, HOFMANS S, et al. Discovery of novel, drug-like ferroptosis inhibitors with *in vivo* efficacy[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(22): 10126-10140.
- [16] DIXON S J, STOCKWELL B R. The hallmarks of ferroptosis[J]. *Annu Rev Cancer Biol*, 2019, 3: 35-54.
- [17] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282.
- [18] SOUSA-VICTOR P, GARCÍA-PRAT L, MUÑOZ-CÁNOVES P. Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021. DOI: 10.1038/s41580-021-00421-2.
- [19] WANG H Y, HUANG Y L, YU M, et al. Muscle regeneration controlled by a designated DNA dioxygenase[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(6): 535.
- [20] TIERNEY M T, GROMOVA A, SESILLO F B, et al. Autonomous extracellular matrix remodeling controls a progressive adaptation in muscle stem cell regenerative capacity during development[J]. *Cell Rep*, 2016, 14(8): 1940-1952.
- [21] TJONDROKOESEMO A, SCHIPS T G, SARGENT M A, et al. Cathepsin S contributes to the pathogenesis of muscular dystrophy in mice[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(19): 9920-9928.
- [22] MORGAN J E, PROLA A, MARIOT V, et al. Necroptosis mediates myofibre death in dystrophin-deficient mice[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 3655.
- [23] SREENIVASAN K, IANNI A, KÜNNE C, et al. Attenuated epigenetic suppression of muscle stem cell necroptosis is required for efficient regeneration of dystrophic muscles[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(7): 107652.

[收稿日期] 2021-12-24

[本文编辑] 包玲

学术快讯

李乾课题组在 *Molecular Biology and Evolution* 发表嗅觉受体及其配体共进化的研究成果

2022年3月3日,上海交通大学医学院李乾研究员团队在分子进化生物学国际知名期刊 *Molecular Biology and Evolution* 上发表了题为 Evolution of brain-expressed biogenic amine receptors into olfactory trace amine-associated receptors 的研究论文。研究人员系统地深入解析了一类嗅觉受体家族——痕量胺相关受体 (trace amine-associated receptor, TAAR) 的进化起源、进化历史以及识别配体的共进化过程,并系统地刻画了TAAR这一嗅觉受体及其配体在物种进化进程中的全景图,为理解感觉系统的其他受体/通道家族及其配体的共进化提供了新视角。