基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003607

HSF1/AMPK信号通路在铁死亡参与糖尿病心肌病发病的机制研究

周 康，宋俊华，周 密，杨艳丽，陈海滨，张 沥
（长沙市第四医院/湖南师范大学附属长沙医院内分泌科，长沙 410000）

【摘 要】目的：探讨热休克因子1（heat shock factor 1，HSF1）/5′-单磷酸腺苷活化蛋白激酶（adenosine monophosphate activated protein kinase，AMPK）信号通路调控铁死亡对糖尿病心肌病（diabetic cardiomyopathy，DCM）发病的影响。**方法：**本研究为实验研究，采用空白对照与多组实验对照。H9c2细胞随机分为4组：低葡萄糖组（control，Con）、高葡萄糖组（high glucose，HG）、HG+HSF1组、HG+HSF1+化合物C（compound C，CC）组。分别对细胞进行罗丹明胶质蛋白染色、细胞线粒体（reactive oxygen species，ROS）检测和细胞脂质ROS检测，并通过Western blot分析AMPK信号表达。雄性C57/BL6小鼠随机分为4组：NC组、NC+HSF1组、DM组和DM+HSF1组，每组12只。通过超声心动图评估了小鼠心血管功能参数。**结果：**与Con组相比，HG组HSF1、pAMPK/AMPK水平明显下调（P=0.005、0.002），和相对细胞表面积、线粒体Fe^{2+}水平、线粒体ROS水平、细胞脂质ROS水平明显增加（P=0.001、0.003、0.006、0.002）。与HG组相比，HG+HSF1组明显逆转了这些变化（P=0.001、0.001、0.002、0.006、0.007、0.003），但加入CC时HSF1的逆转作用明显减弱（P<0.05）。与NC组相比，DM组EF%、FS%、E/A、E′/A′和心脏组织中HSF1、pAMPK/AMPK表达明显降低（均P<0.01），和心脏组织中Fe^{2+}、ROS、丙二醛（Malondialdehyde，MDA）水平和4-羟基壬烯酸（4-Hydroxynonenal，4-HNE）蛋白水平明显增加（P=0.004、0.003、0.001、0.004），DM+HSF1组明显逆转了这些变化。**结论：**HSF1在DCM病理过程中发挥心脏保护作用，其抗铁死亡作用可能与AMPK依赖性的脂质代谢和线粒体稳态调节有关。

【关键词】热休克因子1；5′-单磷酸腺苷活化蛋白激酶；糖尿病心肌病；小鼠；铁死亡
【中图分类号】R587.2 **【文献标志码】**A **【收稿日期】**2023-09-21

Role of the HSF1/AMPK signaling pathway in the pathogenesis of ferroptosis-involving diabetic cardiomyopathy

Zhou Kang，Song Junhua，Zhou Mi，Yang Yanli，Chen Haibin，Zhang Li
（*Department of Endocrinology，The Fourth Hospital of Changsha，Hunan Normal University*）

【Abstract】*Objective*：To investigate the effect of ferroptosis regulated by the heat shock factor 1（HSF1）/adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase（AMPK）signaling pathway on the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy（DCM）. ***Methods*：**This was an experimental study with a blank control and multiple experimental controls. H9c2 cells were randomly divided into 4 groups：low glucose group（control，Con），high glucose（HG）group，HG+HSF1 group，and HG+HSF1+compound C（CC）group. The cells were stained by rhodamine colloid protein，and tested for mitochondrial reactive oxygen species（ROS）and cellular lipid ROS. The AMPK signal expression was analyzed by Western blot. Male C57/BL6 mice were randomly divided into four groups：negative control（NC）group，NC+HSF1 group，DM group，and DM+HSF1 group，with 12 mice in each group. The cardiovascular function parameters of mice were evaluated by echocardiography. ***Results*：**Compared with the Con group，the levels of HSF1 and pAMPK/AMPK in the HG group decreased significantly（P=0.005，0.002），and the relative cell surface area，mitochondrial Fe^{2+} level，mitochondrial ROS level，and cellular lipid ROS level increased significantly（P=0.001，0.003，0.006，0.002）. Compared with the HG group，the HG+HSF1 group significantly reversed these changes（P=0.001，0.001，0.002，0.006，0.007，0.003），but the reversal effect of HSF1 was obviously weakened when CC was added（P<0.05）. Compared with the NC group，the ejection fraction，fractional shortening，mitral ratio of peak early to late diastolic filling velocity（E/A），and E′/A′ as well as the expression levels of HSF1 and pAMPK/AMPK in heart tissues in the DM group were significantly decreased（P<0.01），and the levels of Fe^{2+}，ROS，malondialdehyde，and 4-hydroxynonenal protein in heart tissues were significantly increased（P=0.004，0.003，0.001，0.004）；the DM+HSF1 group significantly reversed these changes. ***Conclusion*：**HSF1 plays a cardioprotective role in the pathological process of DCM，and its anti-ferroptosis effect may be related to AMPK-dependent lipid metabolism and mitochondrial homeostasis regulation.

【Key words】heat shock factor 1；adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase；diabetic cardiomyopathy；mouse；ferroptosis

作者介绍：周 康，Email：gugdf754@163.com，
研究方向：糖尿病及其并发症。

基金项目：湖南省卫生健康委科研计划资助项目（编号：202100236512）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.r.20241023.0949.030
（2024-10-23）

糖尿病心肌病（diabetic cardiomyopathy，DCM）是在糖尿病（diabetes mellitus，DM）患者中发现的一种特殊类型的心肌病，可引起病理异常，包括心肌细胞凋亡、左心室功能障碍、心脏重塑、炎症、氧化反应和心肌代谢紊乱[1]。目前预防DCM的治疗策略结果不能令人满意。因此，新的药物或分子干预措施对遏制DCM患者心室功能障碍和重塑的发生率不断上升至关重要。最近研究发现，铁死亡与各种疾病有关，包括心脏疾病[2]。铁死亡是一种非凋亡形式的调节性细胞死亡，由磷脂氢过氧化物以铁依赖的方式过量产生而诱导[3]。铁死亡与心脏缺血/再灌注损伤和多柔比星诱导的心肌病相关的病理过程有关[4]。然而，目前尚不清楚铁死亡是否也在慢性疾病相关的心脏功能障碍（如DCM）中起作用。越来越多的证据表明，糖尿病患者体内的铁过载不仅会增加胰岛素抵抗和糖尿病进展的风险，还会通过芬顿反应加重心血管并发症[5]。因此，本研究旨在明确铁死亡在扩张型心肌病发病机制中的作用。热休克因子1（heat shock factor 1，HSF1）是一种应激反应转录因子，在各种应激因素下调节热休克蛋白的表达[6]。由HSF1介导的热休克是生物体长期进化过程中形成的一种分子应激防御反应[6]。在心血管方面，HSF1在压力过载心力衰竭模型中可以通过积极调节环磷酸腺苷途径来缓解心力衰竭[7]。此外，最近研究证实，HSF1可能通过维持细胞的铁平衡和谷胱甘肽过氧化酶4（glutathione Peroxidase 4，GPX4）的表达，成为对抗铁死亡的关键防御者[6]。但目前仍缺乏关于HSF1在DCM保护方面的更多细节。因此，本研究拟通过体内外DCM模型探讨HSF1在铁死亡和心脏损伤中的保护作用和潜在机制。

1 材料与方法

1.1 H9c2细胞培养

从中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库获得H9c2细胞系。将细胞在含有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的达尔伯克（氏）必需基本培养基（dulbecco's minimum essential medium，DMEM）（美国Hyclone公司）中培养。细胞随机分成4组：低葡萄糖组（Con；加入5.5 mmol/L葡萄糖培养48 h）、高葡萄糖组（high glucose，HG；加入33 mmol/L葡萄糖培养48 h）、HG+HSF1（重组人HSF1蛋白，美国Abcam公司）、HG+HSF1+化合物C（compound C，CC，美国MedChemExpress公司）。HG+HSF1组细胞用33 mmol/L葡萄糖培养前，用50 ng/mL HSF1处理1 h。HG+HSF1+CC组细胞用33 mmol/L葡萄糖培养前，用50 ng/mLHSF1和5 μmol/L CC处理1 h。

1.2 罗丹明胶质蛋白染色

通过罗丹明标记鬼笔环肽染色（上海宜胜生物科技有限公司）评估相对细胞表面积。首先，H9c2心肌细胞在37 ℃下用罗丹明标记鬼笔环肽（5 μg/mL）染色1 h；然后，在黑暗中用4′，6-二氨基-2-苯基吲哚（4,6-diamino-2-phenyl indole，DAPI）反应5 min。用BX53荧光显微镜（日本Olympus公司）观察染色情况。

1.3 细胞线粒体超氧化物产生（mitochondrion reactive oxygen species，mitoROS）检测

将H9c2细胞与100 nmol/L Mito-Tracker Green（美国Thermo Fisher Scientific公司）在37 ℃的低血清培养基中孵化30 min。然后将细胞与磷酸盐缓冲盐水中的5 μmol/L Mito-Sox Red（美国Thermo Fisher Scientific公司）在37 ℃下在黑暗中孵育30 min。此外，用温热的磷酸盐缓冲液（phosphate buffered salin，PBS）缓冲液轻轻清洗细胞3次，并立即用ImageXpress® Micro Confocal High-Content Imaging System（美国Molecular Devices公司）进行检测，以确定ROS水平。

1.4 细胞脂质ROS检测

将H9c2细胞与C11-BODIPY（美国Thermo Fisher Scientific公司）在37 ℃下孵育30 min。孵育后，用Hoechst33342（上海碧云天生物科技有限公司）染色，并用ImageXpress® Micro Confocal High-Content Imaging System（美国Molecular Devices公司）进行分析。

1.5 Western blot分析

使用放射免疫沉淀法裂解缓冲液裂解小鼠心脏组织和心肌细胞。使用二辛可宁酸蛋白定量试剂盒测定细胞裂解液的蛋白浓度。使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质，然后转移到聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜上（美国Millipore公司）。在室温下用5%的脱脂牛奶在Tris-缓冲盐水中阻断非特异性结合点2 h，在4 ℃下将膜与一级抗体孵育过夜。此外，将膜与相应的二抗一起孵育，通过ChemiDoc XRS（美国Bio-Rad公司）对斑点进行可视化和定量。用Image J软件分析斑点强度。

本研究中使用的主要抗体包括抗GPX4抗体（1∶1 000，美国abcam公司），抗心钠肽（atrial natriuretic peptide，ANP）抗体（1∶1 000，美国Abcam公司），抗4-羟基壬烯酸（4-hydroxynonenal，4-HNE）抗体（1∶2 000，美国Abcam公司），抗乙酰辅酶A羧化酶（acetyl-CoA carboxylase，ACC）抗体（1∶1 000，美国Cell Signaling Technology公司），抗磷酸化ACC抗体（1∶1 000，美国Cell Signaling Technology公司），抗磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶（adenosine monophosphate activated protein kinase，AMPK）抗体（1∶1 000，美国Cell Signaling Technology公司），抗磷酸化AMPK抗体（Thr172；1∶1 000，美国Cell Signaling Technology公司），抗长链酰基辅酶a合成酶4（long-chain acyl-CoA synthetase 4，ACSL4）抗体（1∶1 000，美国proteintech group公司）和抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体（1∶1 000，美国proteintech group公司）。

1.6 动物实验

雄性C57/BL6小鼠（8周，20~22 g）购自北京维通达生物技术有限公司。所有小鼠均在标准化条件下饲养（12 h光/暗循环，温度22~24 ℃，湿度35%~60%），可自由饮用食物和水。喂养1周后，将小鼠随机分为4组：正常对照（normal

control，NC）组、NC+HSF1 组、DM 组和 DM+HSF1 组，每组 12 只。DM 组和 DM+HSF1 组小鼠喂食高脂饮食 3 个月以诱导胰岛素抵抗，然后连续 2 d 腹腔内注射链脲佐菌素（streptozocin，STZ，溶于柠檬酸缓冲液中，50 mg/kg）诱导部分胰岛素缺乏和高血糖症，以空腹血糖≥11.1 mmol/L 确认 DM 建模成功[8]。NC 组、NC+HSF1 组喂食正常饲料。建模后，DM 组和 DM+HSF1 组继续给予高脂饮食。NC+HSF1 组和 DM+HSF1 组小鼠从建模后皮下注射 HSF1（0.5 mg/kg），每周 3 次，连续治疗 6 个月。当 HSF1 治疗完成后，进行超声心动图检查，然后处死小鼠（DM 发病后 6 个月）。

1.7 超声心动图

各组随机选取 6 只小鼠，麻醉后通过超声心动图测量（Vevo TM 2100，加拿大 VisualSonics 公司）评估小鼠的心脏功能。在乳头肌水平记录 m 型追踪，分析了射血分数（ejection fraction，EF）和分数缩短（fraction shortening，FS）。脉冲多普勒超声心动图和组织多普勒成像分别用于测量 E/A 比值和 E′/A′比值。

1.8 组织学和免疫组织化学分析

心肌样品用 4% 多聚甲醛固定 24 h，然后包埋在石蜡中。将 5 μm 的心肌横截面横向切成 4 mm 的切片，用苏木精和伊红（hematoxylin-eosin，H&E）染色。此外，心脏切片用 Masson 三色染色以检测细胞外基质（extracellular matrix，ECM）沉积。将组织切片与抗 HSF1（1∶500；美国 Cell Signaling Technology 公司）抗体在 4℃孵育过夜，随后进行 DAB 染色（上海 Beyotime 公司）。使用 ImageProPlus6.0 分析数据。

1.9 ROS、谷胱甘肽（glutathione，GSH）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）和 Fe^{2+} 水平测定

使用 ROS、GSH 和 MDA 检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）测定心脏组织中的 ROS、GSH 和 MDA 水平。使用铁分析试剂盒（美国 Abcam 公司）测量心脏组织中的 Fe^{2+} 水平。

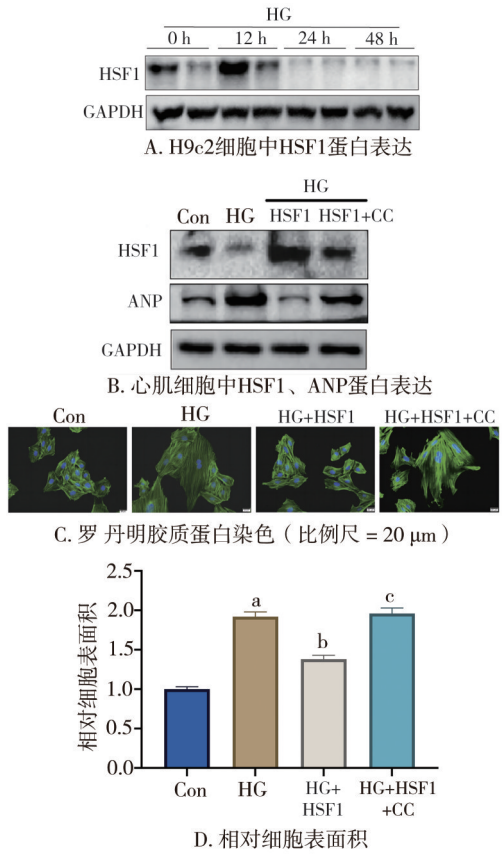
1.10 统计学方法

通过 SPSS 25.0 进行统计分析。数据表示为平均值 ± 标准差。使用单向方差分析和 Tukey 事后检验进行多组比较。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 HSF1 上调对 HG 诱导的心肌细胞肥大影响

首先，本研究测定了 H9c2 细胞中 HSF1 的水平，发现与 HG 处理 0 h 相比，HG 处理 12 h 时细胞中 HSF1 蛋白表达明显上调（相对水平：1.00 ± 0.03 vs. 2.42 ± 0.22，P<0.001），和 24 h、48 h 时明显下调（相对水平：1.00 ± 0.03 vs. 0.28 ± 0.03、0.24 ± 0.02，均 P<0.001）（图 1A）。然后研究采用 HSF1 拯救 HG 诱导 H9c2 中 HSF1 水平的下调，结果显示与 HG 组相比，HG+HSF1 组 HSF1 水平显著上调（相对水平：0.25 ± 0.02 vs. 1.63 ± 0.07，P<0.001）。随后，本研究通过测量肥大标志物 ANP 的蛋白水平和用罗丹明磷灰素染色细胞，研究 HSF1 在心肌细胞肥大中的作用。与 Con 组相比，HG 组 ANP 的蛋白水平和相对细胞表面积均明显增加（均 P<0.05）。HG+HSF1 组 ANP 的蛋白水平和相对细胞表面积均较 HG 组明显降低（P<0.05）（图 1B~D）。



A. H9c2细胞中HSF1蛋白表达

B. 心肌细胞中HSF1、ANP蛋白表达

C. 罗丹明胶质蛋白染色（比例尺 = 20 μm）

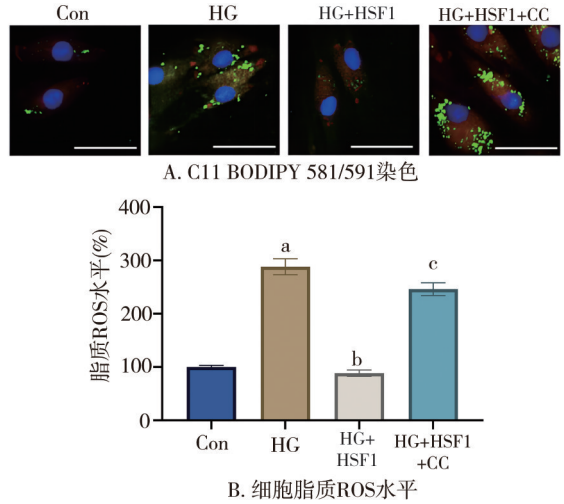
D. 相对细胞表面积

注：a，与 Con 组相比，P<0.01；b，与 HG 组相比，P<0.05；c，与 HG+HSF1 组相比，P<0.01

图 1 HSF1 上调对 HG 诱导的心肌细胞肥大影响

2.2 HSF1 上调对 HG 诱导的心肌细胞铁死亡影响

与 Con 组相比，HG 组细胞脂质 ROS 水平明显增加（P<0.001）。HG+HSF1 组细胞脂质 ROS 水平明显低于 HG+Vector 组（P<0.001）（图 2）。



A. C11 BODIPY 581/591染色

B. 细胞脂质ROS水平

注：绿色为 Oxidized bodipy，红色为 non-oxidized bodipy，蓝色为 Hoechst，比例尺=25 μm。a，与 Con 组相比，P<0.001；b，与 HG 组相比，P<0.001；c，与 HG+HSF1 组相比，P<0.01

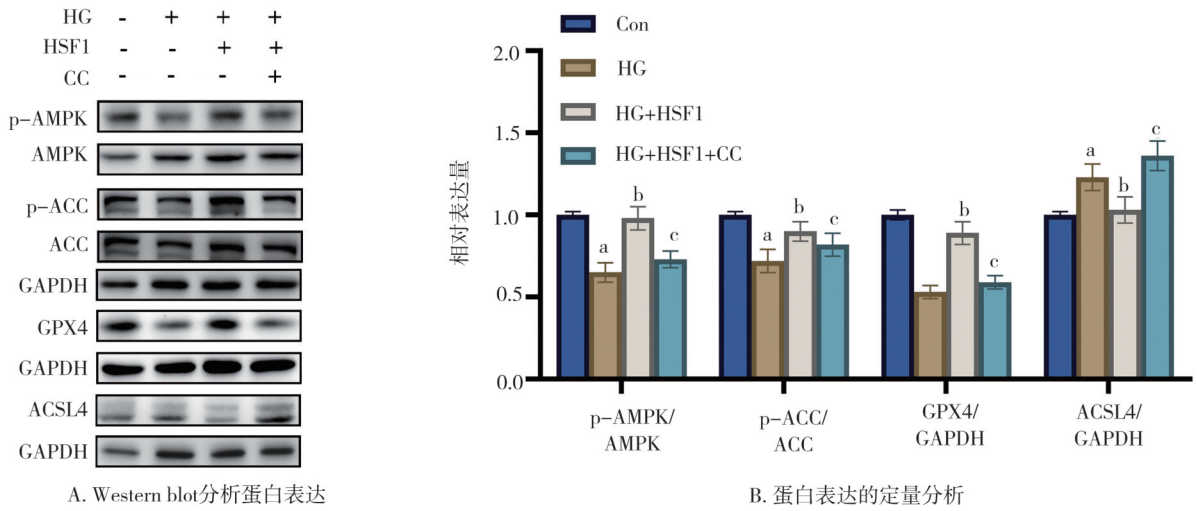
图 2 HSF1 上调对 HG 诱导的 H9c2 细胞中脂质 ROS 的影响

2.3 HSF1通过激活AMPK对铁死亡表现出保护作用

激活AMPK是治疗HG诱导的心脏毒性的一种潜在应对策略[5]。以前的一些研究广泛地探讨了AMPK在铁死亡中的作用，并证实了HSF1对AMPK的激活作用[7]。与Con组相比，HG组细胞中pAMPK/AMPK、pACC/ACC、GPX4表达明显降低（相对水平：1.00 ± 0.02 vs. 0.65 ± 0.06，1.00 ± 0.02 vs. 0.72 ± 0.07，1.00 ± 0.03 vs. 0.53 ± 0.04，P<0.01），和ACSL4表达明显增加（相对水平：1.00 ± 0.02 vs. 1.23 ± 0.08，P<0.01）。与HG组相比，HG+HSF1组细胞中pAMPK/AMPK、pACC/ACC、GPX4表达明显增加（相对水平：0.65 ± 0.06 vs. 0.98 ± 0.07，0.72 ± 0.07 vs. 0.90 ± 0.06，0.53 ± 0.04 vs. 0.89 ± 0.07，P<0.01），和ACSL4表达明显降低（相对水平：1.23 ± 0.08 vs. 1.03 ± 0.08，P<0.01）。另一方面，化合物C（CC），一种AMPK的抑制剂，抑制了HSF1对AMPK信号的激活作用（图3）。此外，CC增加了HSF1干预后HG处理的H9c2细胞的ANP蛋白水平（图1B）、相对细胞表面积（P<0.01）（图1C）和脂质ROS水平（P<0.01）（图2B）。

2.4 HSF1上调对HG诱导的铁死亡中线粒体毒性影响

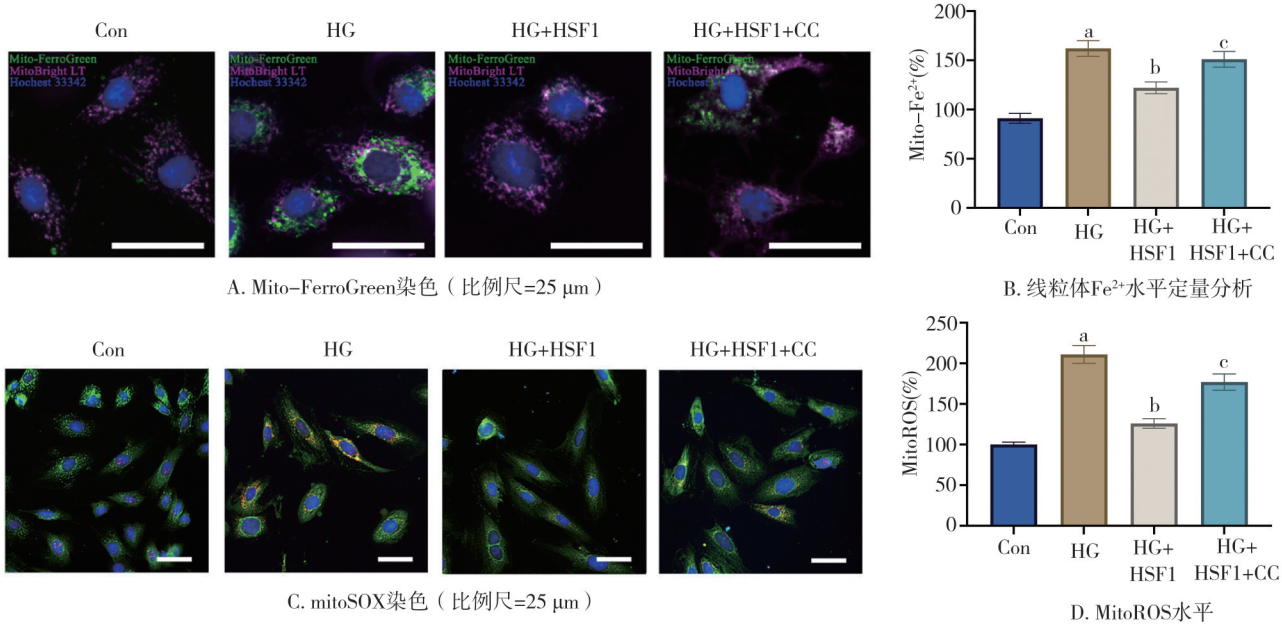
在HG处理的H9c2细胞中，线粒体Fe^{2+}水平增加，线粒体ROS水平随之增加（P<0.01）。HSF1上调部分抑制了HG诱导的线粒体Fe^{2+}和线粒体ROS产生的过度积累（P<0.01）。然而，HSF1上调对线粒体的保护作用被CC逆转（P<0.01）（图4）。



A. Western blot分析蛋白表达　　B. 蛋白表达的定量分析

注：a，与Con组相比，P<0.01；b，与HG组相比，P<0.01；c，与HG+HSF1组相比，P<0.01

图3 pACC、ACC、p-AMPK、AMPK、GPX4、ACSL4和GAPDH的蛋白表达水平



A. Mito-FerroGreen染色（比例尺=25 μm）　　B. 线粒体Fe^{2+}水平定量分析

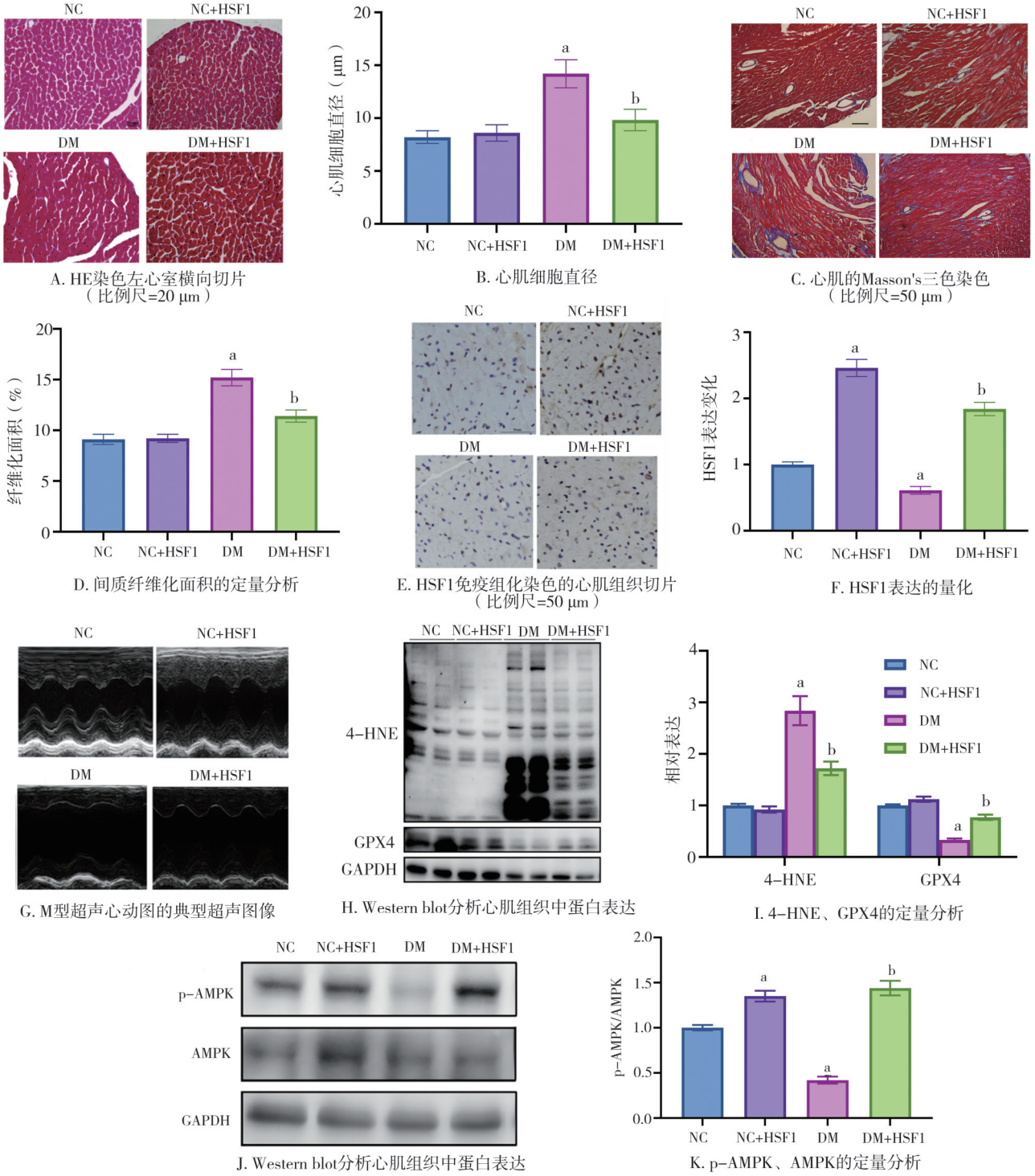
C. mitoSOX染色（比例尺=25 μm）　　D. MitoROS水平

注：绿色为Mitotracker，红色为Mito SOX，蓝色为DAPI。a，与Con组相比，P<0.01；b，与HG组相比，P<0.01；c，与HG+HSF1组相比，P<0.05

图4 HSF1上调对HG诱导的铁 死亡中线粒体毒性影响

2.5　HSF1通过预防心肌细胞铁死亡保护心脏功能

与NC组相比，DM组诱导心脏组织肥厚性改变，心肌内的细胞外基质沉积明显增加（均P<0.01），和心肌组织中HSF1表达明显降低（P<0.01）。与DM组相比，DM+HSF1组心脏组织肥厚性和细胞外基质沉积显著减轻，和心肌组织中HSF1表达明显增加（均P<0.01）（图5A~F）。超声心动图分析显示，与NC组相比，DM组EF%、FS%、E/A、E′/A′明显降低（均P<0.01），和LVEDd明显增加（均P<0.01），DM+HSF1组明显逆转了这些变化（图5G、表1）。铁死亡指标分析显示，与NC组相比，DM组心脏组织中Fe^{2+}、ROS、MDA水平和4-HNE蛋白水平明显增加（均P<0.01），以及GSH水平和GPX4、pAMPK/AMPK表达明显降低（均P<0.01），DM+HSF1组显著逆转了这些变化（图5H~K、表1）。综上所述，HSF1上调通过激活AMPK对铁死亡介导的DCM具有明显的保护作用。



A. HE染色左心室横向切片（比例尺=20 μm）　B. 心肌细胞直径　C. 心肌的Masson's三色染色（比例尺=50 μm）

D. 间质纤维化面积的定量分析　E. HSF1免疫组化染色的心肌组织切片（比例尺=50 μm）　F. HSF1表达的量化

G. M型超声心动图的典型超声图像　H. Western blot分析心肌组织中蛋白表达　I. 4-HNE、GPX4的定量分析

J. Western blot分析心肌组织中蛋白表达　K. p-AMPK、AMPK的定量分析

注：a，与NC组相比，P<0.05；b，与DM组相比，P<0.05

图5　HSF1通过预防心肌细胞铁死亡保护心脏功能（n=6）

表1 小鼠的心血管功能参数和心脏组织铁死亡相关参数（n=6）

变量	NC	NC+HSF1	DM	DM+HSF1	F值	P值
EF（%）	63.76 ± 1.25	62.93 ± 2.30	47.67 ± 0.73[a]	58.34 ± 1.62[b]	24.09	0.000
FS（%）	35.95 ± 1.58	35.50 ± 1.34	22.81 ± 0.60[a]	32.93 ± 1.12[b]	28.07	0.000
LVEDd（mm）	3.15 ± 0.08	3.16 ± 0.10	3.61 ± 0.03[a]	3.25 ± 0.03[b]	20.04	0.000
E/A	1.25 ± 0.02	1.23 ± 0.03	0.67 ± 0.04[a]	1.06 ± 0.03[b]	14.91	0.000
E′/A′	1.40 ± 0.09	1.37 ± 0.08	0.72 ± 0.04[a]	1.10 ± 0.05[b]	22.53	0.000
Fe^{2+}（μmol/mgprot）	8.62 ± 3.14	8.94 ± 3.26	16.78 ± 2.80[a]	11.56 ± 2.71[b]	42.06	0.000
ROS（fold change）	1.02 ± 0.08	0.92 ± 0.12	1.88 ± 0.16[a]	1.21 ± 0.13[b]	27.15	0.000
MDA（nmol/mgprot）	1.45 ± 0.57	1.51 ± 0.62	2.47 ± 0.74[a]	1.83 ± 0.71[b]	22.15	0.000
GSH（μmol/mgprot）	19.32 ± 2.17	18.74 ± 1.83	8.27 ± 1.35[a]	16.72 ± 1.55[b]	19.12	0.000

注：a，与NC组相比，P<0.01；b，与DM组相比，P<0.05

3 讨 论

DM是导致异常心血管疾病的主要环境原因。目前，DCM的发病率在DM患者中逐渐增加。最近研究证实，铁死亡是DCM的1个主要特征。心肌细胞的不断丧失引发了心肌肥大、心肌纤维化，以及收缩和舒张功能受损[9]。铁死亡是一种以铁超载为特征的细胞死亡形式，导致脂质过氧化物的致死水平积累[10]。高铁饮食导致严重的心脏损伤和肥厚性心肌病[10]。此外，铁超载增加了AngⅡ诱导的心脏纤维化并促进新生内膜的形成[11]。本研究表明，HSF1通过限制铁积累、恢复GPX4依赖的抗氧化能力以及防止细胞水平或线粒体水平的脂质过氧化来抑制体外高糖模拟DCM模型的铁中毒。体内研究也证实了HSF1上调通过激活AMPK对铁死亡介导的DCM具有显著的保护作用。

心肌细胞损失是DM诱导的心脏损伤和功能障碍的主要原因[12]。此外，预防心肌细胞损失是治疗DCM的有效方法。据报道，不同类型的程序性细胞死亡，如细胞凋亡、坏死和铁死亡等均参与了DCM[13-14]。铁死亡的特点是铁依赖性的脂质过氧化的过度积累。本研究表明，在DM小鼠的心脏组织中，铁死亡阴性调节剂GPX4的水平降低，而阳性标志物如4-HNE则增加。这些变化与脂质过氧化产物和铁含量的增加有关。值得注意的是，所有这些变化在体外经HG处理的H9c2心肌细胞中也有表现。研究发现，HG处理的心肌细胞表现出铁中毒的特征，如游离铁的增加和脂质过氧化物的积累[15]。因此，本研究的结果表明，针对铁死亡的抑制是预防DCM的一种有效的心脏保护策略。

HSF1是一种应激诱导的转录因子，通过转录激活各种热休克蛋白，在热休克反应中起着关键作用。近年来，一些研究已经注意到HSF1在调控应激反应的细胞氧化还原平衡中的重要性[6]。HSF1的缺乏导致心脏和肾脏中的谷胱甘肽（GSH）/谷胱甘肽二硫酸盐（GSSG）比率下降约40%，并增加线粒体的氧化损伤，进而导致细胞程序性死亡[16]。此外，HSF1可以通过转录调节热休克蛋白（如HSPA1A、HSPA4和HSPB6）来应对重金属引起的应激反应[17]。HSF1已经被发现参与了癌细胞的铁死亡[18]。在本研究中，HG暴露抑制H9c2心肌细胞中HSF1表达，并导致细胞的肥大效应、Fe^{2+}水平积累和脂质过氧化。通过上调H9c2心肌细胞中HSF1表达，逆转了HG暴露诱导的这些变化。线粒体是连接新陈代谢和细胞死亡的重要调节器。最近研究报道，铁中毒主要与线粒体形态和功能受损有关[19]。线粒体约占心肌细胞体积的45%，是关键的能量代谢场所。研究发现，线粒体触发了HG诱导的心肌细胞铁中毒的细胞死亡[20]。此外，调节线粒体的ROS可能是HG诱导的心肌细胞死亡和损伤的有效治疗方案[21]。本研究发现，HSF1上调减轻了HG诱导的线粒体毒性作用，这可能有助于减轻H9c2心肌细胞中铁死亡。

铁中毒相关的代谢重塑最近受到越来越多的关注。研究发现，AMPK的激活赋予了抵抗铁死亡的能力[5]。Lee M等[22]研究报告称，AMPK对铁死亡的调节与AMPK介导的乙酰CoA羧化酶的磷酸化和多不饱和脂肪酸的生物合成相关联。AMPK的ACC磷酸化和失活抑制了乙酰CoA向丙二酰CoA的转化，而丙二酰CoA是脂肪酸（包括长链PUFA）生物合成所必需的，导致脂质过氧化物的生成减少，最终抑制了铁中毒[23]。AMPK还与线粒体的脂肪酸氧化和平衡有关。它的激活会引起线粒体的生物生成。最近研究证实，HSF1可以通过转录激活上调AMPK的转录水平，而敲除HSF1可逆转这

一过程[6]。本研究在体内外研究均证实了HSF1可能通过激活AMPK表现出对铁死亡诱导心脏损伤的保护作用。值得注意的是，CC是AMPK的抑制剂，它逆转了HSF1对用HG处理的心肌细胞铁死亡的保护作用，进一步表明HSF1对HG诱导的心肌细胞铁死亡的保护作用可能依赖于AMPK的激活。

总之，本研究揭示了铁死亡在DCM病理过程中的重要作用，并确立了HSF1的心脏保护作用，其抗铁死亡作用可能与AMPK依赖性的脂质代谢和线粒体稳态调节有关。这些发现可以更好地理解DCM心脏损伤的病理生理学基础，并为其预防或缓解提供新的线索。

参 考 文 献

[1] 管海燕，耿 洲，杨文斌. 罗格列酮对糖尿病心肌病小鼠心肌纤维化进程的影响[J]. 中国临床药理学杂志，2021，37(21)：2917-2919，2928.

Guan HY，Geng Z，Yang WB. Effect of rosiglitazone on myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy mice[J]. Chin J Clin Pharmacol，2021，37(21)：2917-2919，2928.

[2] 胡乃华. 萝卜硫素可通过AMPK/Nrf2途径调控铁死亡预防糖尿病心肌病[J]. 天然产物研究与开发，2022，34(4)：587.

Hu NH. Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane via AMPK/Nrf2 pathways[J]. Nat Prod Res Dev，2022，34(4)：587.

[3] Fang XX，Wang H，Han D，et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy[J]. Proc Natl Acad Sci U S A，2019，116(7)：2672-2680.

[4] Kitakata H，Endo J，Ikura H，et al. Therapeutic targets for DOX-induced cardiomyopathy：role of apoptosis *vs*. ferroptosis[J]. Int J Mol Sci，2022，23(3)：1414.

[5] Wang X，Chen XX，Zhou WQ，et al. Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane *via* AMPK/NRF2 pathways[J]. Acta Pharm Sin B，2022，12(2)：708-722.

[6] Wang N，Ma H，Li J，et al. HSF1 functions as a key defender against palmitic acid-induced ferroptosis in cardiomyocytes[J]. J Mol Cell Cardiol，2021，150：65-76.

[7] Wang MY，Zou J，Wang JJ，et al. Aberrant HSF1 signaling activation underlies metformin amelioration of myocardial infarction in mice[J]. Mol Ther Nucleic Acids，2022，29：312-328.

[8] Sun YK，Zhou SS，Guo H，et al. Protective effects of sulforaphane on type 2 diabetes-induced cardiomyopathy via AMPK-mediated activation of lipid metabolic pathways and NRF2 function[J]. Metabolism，2020，102：154002.

[9] Tao K，Li M，Gu XF，et al. Activating transcription factor 4 aggravates angiotensin II-induced cell dysfunction in human vascular aortic smooth muscle cells via transcriptionally activating fibroblast growth factor 21[J]. Korean J Physiol Pharmacol，2022，26(5)：347-355.

[10] Fang XX，Cai ZX，Wang H，et al. Loss of cardiac ferritin H facilitates cardiomyopathy via Slc7a11-mediated ferroptosis[J]. Circ Res，2020，127(4)：486-501.

[11] dos Santos L，Bertoli SR，Ávila RA，et al. Iron overload，oxidative stress and vascular dysfunction：Evidences from clinical studies and animal models[J]. Biochim Biophys Acta Gen Subj，2022，1866(9)：130172.

[12] Nargesi AA，Farah MC，Zhu XY，等. 肾血管性高血压诱导代谢综合征猪的心肌线粒体损伤，导致心脏损伤和功能障碍[J]. 中华高血压杂志，2022，8(3)：300.

Aa N，Mc F，Xy Z，et al. Renovascu-lar hypertension induces myocardial mitochondrial damage，contributing to cardiac injury and dysfunction in pigs with met-abolic syndrome[J]. Chin J Hypertens，2022，8(3)：300.

[13] Lin C，Guo YZ，Xia YL，et al. FNDC5/Irisin attenuates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes mouse model by activation of integrin αV/β5-AKT signaling and reduction of oxidative/nitrosative stress[J]. J Mol Cell Cardiol，2021，160：27-41.

[14] Alabi TD，Chegou NN，Brooks NL，et al. Effects of *Anchomanes difformis* on inflammation，apoptosis，and organ toxicity in STZ-induced diabetic cardiomyopathy[J]. Biomedicines，2020，8(2)：29.

[15] Li WY，Li W，Wang Y，et al. Inhibition of DNMT-1 alleviates ferroptosis through NCOA4 mediated ferritinophagy during diabetes myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Cell Death Discov，2021，7(1)：267.

[16] Katiyar A，Fujimoto M，Tan K，et al. HSF1 is required for induction of mitochondrial chaperones during the mitochondrial unfolded protein response[J]. FEBS Open Bio，2020，10(6)：1135-1148.

[17] Manikandan P，Vijayakumar R，Alshehri B，et al. Exploring the biological behavior of Heat shock protein(HSPs) for understanding the Anti-ischemic stroke in humans[J]. J Infect Public Health，2022，15(4)：379-388.

[18] Brown CW，Chhoy P，Mukhopadhyay D，et al. Targeting prominin2 transcription to overcome ferroptosis resistance in cancer[J]. EMBO Mol Med，2021，13(8)：e13792.

[19] Battaglia AM，Chirillo R，Aversa I，et al. Ferroptosis and cancer：mitochondria meet the “iron maiden” cell death[J]. Cells，2020，9(6)：1505.

[20] Sun X，Sun P，Zhen D，et al. Melatonin alleviates doxorubicin-induced mitochondrial oxidative damage and ferroptosis in cardiomyocytes by regulating YAP expression[J]. Toxicol Appl Pharmacol，2022，437：115902.

[21] 王佳慧，梁 欢，方 典，等. 抑制线粒体活性氧自由基可减轻高糖诱导的心肌细胞焦亡和铁死亡[J]. 南方医科大学学报，2021，41(7)：980-987.

Wang JH，Liang H，Fang D，et al. Inhibition of mitochondrial reactive oxygen species reduces high glucose-induced pyroptosis and ferroptosis in H9C2 cardiac myocytes[J]. J South Med Univ，2021，41(7)：980-987.

[22] Lee M，Katerelos M，Gleich K，et al. Phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase by AMPK reduces renal fibrosis and is essential for the anti-fibrotic effect of metformin[J]. J Am Soc Nephrol，2018，29(9)：2326-2336.

[23] Lee H，Zandkarimi F，Zhang YL，et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis[J]. Nat Cell Biol，2020，22(2)：225-234.

（责任编辑：李青颖）