

A 型流感病毒通过激活 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路诱导肺上皮细胞铁死亡的机制

黄家望¹, 马心悦¹, 冯芷莹², 王康宇², 刘卓琳¹, 李玲^{*1,3}

1 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208

2 湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208

3 湖南中医药大学中西医结合病原生物学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208

黄家望, 马心悦, 冯芷莹, 王康宇, 刘卓琳, 李玲. A 型流感病毒通过激活 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路诱导肺上皮细胞铁死亡的机制[J]. 微生物学通报, 2024, 51(1): 306-322.

HUANG Jiawang, MA Xinyue, FENG Zhiying, WANG Kangyu, LIU Zhuolin, LI Ling. Mechanism of influenza A virus inducing ferroptosis in lung epithelial cells by activating the HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway[J]. Microbiology China, 2024, 51(1): 306-322.

摘要: 【背景】已发现 A 型流感病毒(influenza A virus, IAV)可激活多种程序性细胞死亡途径, 这些途径在宿主细胞防御系统中起着重要作用。铁死亡是一种新型的非凋亡细胞死亡, 主要由铁依赖性脂质过氧化介导。【目的】探讨 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路在 IAV 感染诱导的细胞铁死亡中的作用机制。【方法】使用 IAV 感染小鼠肺上皮细胞(MLE-12)构建细胞损伤模型后检测细胞病毒滴度和炎症因子分泌; 使用荧光探针法和比色法检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总铁离子和亚铁离子; 透射电镜观察细胞超微结构; 检测细胞铁死亡标志物 mRNA 和蛋白表达; 生物信息学预测流感病毒诱导铁死亡潜在作用机制; 激光共聚焦观察 IAV 对细胞缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)表达影响, 并检测其信号通路相关元件 mRNA 和蛋白表达; 构建 HIF-1 α 敲低模型, 探讨 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路在 IAV 诱导细胞铁死亡中的作用。【结果】铁死亡抑制剂能降低 IAV 感染细胞的病毒载量和炎症因子的分泌, 并能抑制细胞 ROS、总铁离子和亚铁离子含量, 促进细胞 SOD 活性, 修复细胞线粒体损伤, 逆转铁死亡标志物 mRNA 和蛋白表达; 生物信息学预测发现 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路在 IAV 诱导的铁死亡中具有重要的相关性; 试验验证 IAV 感染能促进细胞 HIF-1 α 的激活和易位入核, 并激活 HIF-1 α 、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)的 mRNA 和蛋白表达。【结论】IAV 感染可以

资助项目: 国家自然科学基金(81973670); 湖南省自然科学基金(2020JJ5418); 中西医结合病原生物学湖南省重点实验室开放基金(2022KFJJ02)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81973670), the Natural Science Foundation of Hunan Province (2020JJ5418), and the Opening Fund for Hunan Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology Based on Integrated Chinese and Western Medicine (2022KFJJ02).

*Corresponding author. E-mail: liling1049@hnu.edu.cn

Received: 2023-05-29; Accepted: 2023-08-17; Published online: 2023-10-11

诱导细胞发生铁死亡，其作用机制可能是通过激活 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路发挥作用。

关键词：A 型流感病毒；铁死亡；HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路；生物信息学

Mechanism of influenza A virus inducing ferroptosis in lung epithelial cells by activating the HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway

HUANG Jiawang¹, MA Xinyue¹, FENG Zhiying², WANG Kangyu², LIU Zhuolin¹, LI Ling^{*1,3}

1 School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China

2 School of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China

3 Hunan Provincial Key Laboratory of Pathogenic Biology Based on Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China

Abstract: **[Background]** Influenza A virus (IAV) can activate multiple programmed cell death pathways, which play important roles in the host defense system. Ferroptosis is a novel non-apoptotic type of cell death and mainly mediated by iron-dependent lipid peroxidation. **[Objective]** To explore the mechanism of IAV-induced ferroptosis via the HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway. **[Methods]** Mouse lung epithelial (MLE-12) cells were infected with IAV to establish a cell injury model, and the virus titer and inflammatory cytokine secretion were examined. The fluorescence probe and colorimetric methods were used to measure the levels of reactive oxygen species (ROS), superoxide dismutase (SOD), total iron ions, and ferrous ions. Transmission electron microscopy was employed to observe the cell ultrastructure. The mRNA and protein levels of cell ferroptosis markers were determined. Bioinformatics tools were used to predict the potential mechanism of IAV-induced ferroptosis. Laser confocal microscopy was employed to observe the effect of IAV on the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in cells, and the mRNA and protein levels of the proteins involved in the HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway were determined. A HIF-1 α knockdown model was established to explore the role of the HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway in IAV-induced cell ferroptosis. **[Results]** The ferroptosis inhibitor reduced the virus titer and inflammatory cytokine secretion of IAV-infected cells. Moreover, it lowered the levels of ROS, total iron ions, and ferrous ion, increased the SOD activity, repaired mitochondrial damage, and reversed the mRNA and protein levels of ferroptosis markers. Bioinformatics predicted that the HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway was closely associated with IAV-induced ferroptosis. IAV infection promoted the activation and nuclear translocation of HIF-1 α in cells and up-regulated the mRNA and protein levels of HIF-1 α , vascular endothelial growth factor (VEGF), and inducible nitric oxide synthase (iNOS). **[Conclusion]** IAV infection can induce cell ferroptosis by activating the HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway.

Keywords: influenza A virus; ferroptosis; HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway; bioinformatics

流感是一种急性病毒性呼吸道感染性疾病,在全世界范围内具有较高的发病率和死亡率,并且流感具有高度的传染性和易感性,临床上主要症状表型为发热、咳嗽、发冷或出汗、肌肉酸痛和不适^[1-2]。

细胞死亡是多细胞生物生理过程至关重要的一个环节。铁死亡是最近发现的一种主要由铁依赖性脂质过氧化介导的新型细胞死亡模式,其特点是铁过载和脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累,过量的铁通过芬顿反应促进 ROS 的产生并加速脂质过氧化^[3-4]。病毒感染后宿主体内发生脂质过氧化的积累和感染细胞线粒体萎缩等铁死亡特征性表征,并且在肠道病毒感染期间使用铁死亡抑制剂可以显著降低细胞对病毒的易感性和病毒载量^[5]。酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-coa synthetase long chain family member 4, ACSL4)和谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4)已分别被公认为铁质增多的阳性和阴性调节剂^[6]。谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidases, GPXs)家族由在不同亚细胞位置和组织上表达的多个同工酶组成。与其他 GPX 成员相比,GPX4 直接将膜中的脂质过氧化氢还原为无毒的脂质醇,在铁死亡破坏过程中可增加细胞的抗氧化能力^[7]。无节制的脂质过氧化是铁死亡的标志,含铁酶脂氧合酶是铁死亡的主要促进剂,其可以通过 ACSL4 依赖性脂质生物合成的激活产生脂质氢过氧化物,增加各种病理生理学背景下促进铁死亡发生的可能性^[8-9], 研究报道, ACSL4 是 RNA 病毒复制中常见的宿主蛋白,病毒入侵宿主细胞后通过激活 ACSL4 的表达来促进病毒复制和诱导细胞铁死亡的发生^[5]。

缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)是一个转录因子家族,由组成型表达亚基 HIF- β 的异二聚体和氧调节亚基 HIF- α 组成^[10]。在常氧

环境中, HIF- α 亚基(HIF-1 α 、HIF-2 α 或 HIF-3 α)通过羟基化保持低活性状态。在缺氧条件下,由于氧含量低, HIF- α 羟基化受到抑制, HIF- α 亚基易位至细胞核,并与 HIF- β 亚基二聚化,异二聚体复合物与其靶基因的特定 DNA 结合区域(缺氧反应元件)结合,从而对其进行转录调控^[11-12],进而对其下游靶基因如血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)等的调控^[13]。一些证据表明 ROS 可以抑制脯氨酰-4-羟化酶(proline hydroxylase domain, PHD)的活性,从而增加 HIF1- α 的稳定性,当 Nrf2 敲低时能上调 HIF-1 α , 促进小鼠体内铁死亡,从而诱导小鼠肠道缺血/再灌注,导致小鼠发生急性肺损伤^[14]。

病毒感染是调节细胞死亡的一个重要因素,有研究报道, A 型流感病毒(influenza A virus, IAV)感染可导致自噬、坏死、坏死性凋亡和细胞焦亡等多种形式的细胞死亡^[15-17], 然而,关于铁死亡介导病毒反应的研究尚少, IAV 是否能诱导铁死亡尚不清楚。因此,本研究拟探讨 IAV 感染诱导小鼠肺上皮细胞铁死亡发生的潜在作用机制(图 1), 以期能为以铁死亡为靶点的抗流感病毒治疗提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

IAV 病毒株(A/PR/8/34)由湖南师范大学病毒研究室惠赠;无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级鸡蛋, 济南斯帕法斯家禽有限公司;小鼠肺上皮 MLE-12 细胞, 中国科学院细胞库。

1.1.2 培养基和溶液配制

病毒稀释液、病毒维持液配方参考本团队前期研究^[18]; MLE-12 细胞培养基: 含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素混合液的 RPMI-1640 基础培养液。

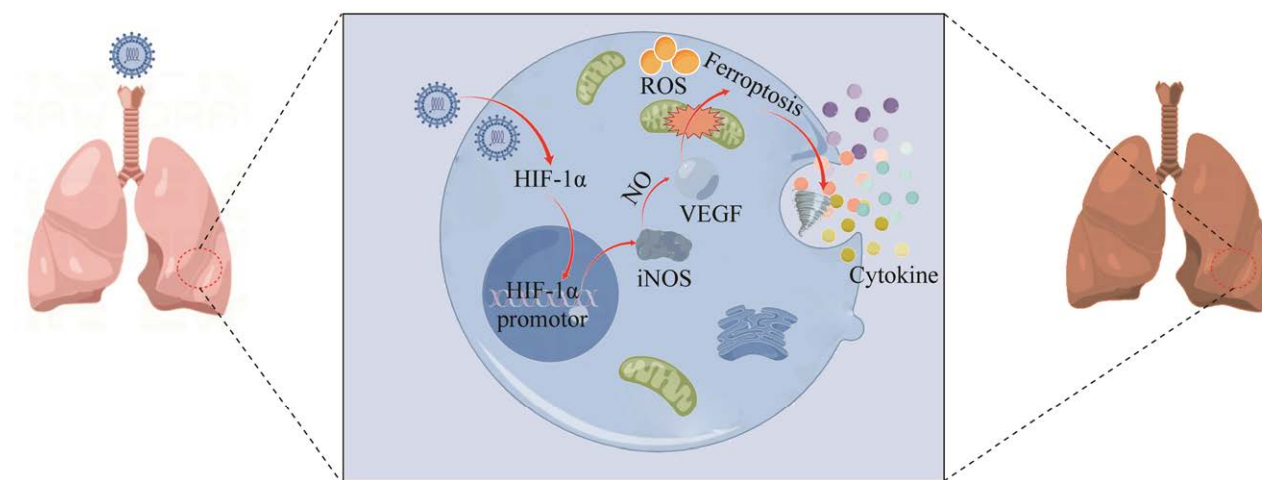


图 1 IAV 诱导肺上皮细胞铁死亡发生机理图

Figure 1 Mechanism of IAV-induced ferroptosis in lung epithelial cells.

1.1.3 主要试剂和仪器

RPMI-1640 细胞基础培养基、青霉素-链霉素混合液和 0.25%胰蛋白酶溶液，武汉普诺赛生命科技有限公司；胎牛血清，Gibco 公司；Ferrostatin-1, Sigma-Aldrich 公司；白细胞介素-1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒、白细胞介素-6 (interleukin 6, IL-6) ELISA 检测试剂盒、活性氧荧光法测定试剂盒、细胞总铁比色法测定试剂盒和细胞亚铁比色法测定试剂盒，武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒，南京建成生物工程研究所有限公司；TRIzol 试剂，杭州新景生物试剂开发有限公司；逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒，上海近岸科技有限公司； β -actin 抗体、GPX4 抗体、ACSL4 抗体、HIF-1 α 抗体、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)抗体和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体，Abcam 公司；实时荧光定量 PCR (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)引物和 HIF-1 α -siRNA 均由生工生物

工程(上海)股份有限公司合成；4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)溶液和罗丹明标记鬼笔环肽(rhodamine phalloidin, TRITC)，北京索莱宝科技有限公司；异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC)荧光标记山羊抗兔二抗，Proteintech 公司。CO₂ 细胞培养箱，Thermo Fisher Scientific 公司；倒置显微镜，Motic 公司；超高分辨率激光共聚焦显微镜，Zeiss 公司；实时定量 PCR 仪、化学发光成像仪和 Synergy2 多功能酶标仪，BioTek 公司；透射电镜，日立(中国)有限公司。

1.2 病毒制备和定量

鸡胚在培养箱内 37 °C 恒温恒湿培养 10 日后将 IAV 接种至鸡胚尿囊腔内培养传代，37 °C 恒温恒湿培养 48 h 后收集尿囊腔，血凝效价 1:640 以上者供试验用。将病毒尿囊液以灭菌生理盐水稀释至感染复数(multiplicity of infection, MOI)=0.1 置于冰袋中备用。

1.3 细胞培养及试验分组

MLE-12 细胞培养在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中，待细胞增殖至培养瓶约 90%时，用 0.25% 胰蛋白酶进行消化传代。试验分为对照组(Con)、

模型组(Model)和铁死亡抑制剂(Fer-1)组,除Con组外,Model组和Fer-1组均使用IAV感染,Fer-1组在病毒干预前12 h使用2 $\mu\text{mol/L}$ Fer-1干预细胞,随后采用相同方法用IAV干预MLE-12细胞。根据本课题组之前的研究工作^[1,18],病毒感染细胞造模条件为:待细胞贴壁后,病毒工作液干预细胞2 h后去细胞上清液换病毒维持液继续培养8 h。

1.4 细胞计数试剂盒8 (cell counting kit-8, CCK8)法检测细胞活性

待细胞增殖至培养瓶约90%时,使用0.25%胰蛋白酶溶液对细胞消化重悬,按每孔5 000个细胞接种至96孔板。分组及干预方式同1.3。试验结束后将CCK8试剂加入96孔板内在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱继续孵育2 h,用酶标仪在450 nm处测量每个孔的吸光度,计算各组细胞活性。

1.5 透射电镜观察细胞超微结构

待细胞增殖至培养瓶约90%时,使用0.25%胰蛋白酶溶液对细胞消化重悬,按每孔 5×10^5 个细胞接种至6孔板,分组及干预方式同1.3。试验结束后收集各组细胞使用1%锇酸固定液固定2 h。在铜网上取20 μL 细胞悬液,然后滴3%磷钨酸溶液室温负染5 min,用滤纸吸干负染液,晾干。在透射电镜下观察并拍照。

1.6 ELISA 检测细胞上清液中 IL-1 β 和 IL-6 水平

待细胞增殖至培养瓶约90%时,使用0.25%胰蛋白酶溶液对细胞消化重悬,按每孔 5×10^5 个细胞接种至6孔板,分组及干预方式同1.3。试验结束后收集细胞上清液,根据ELISA试剂盒说明书检测IL-1 β 和IL-6的分泌水平。

1.7 2,7-二氯荧光素二乙酸酯 (2,7-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 荧光探针法检测细胞 ROS 含量

待细胞增殖至培养瓶约90%时,使用0.25%胰蛋白酶溶液对细胞消化重悬,按每孔 5×10^5 个

细胞接种至6孔板,分组及干预方式同1.3。收集细胞前2 h在阳性对照孔内加入活性氧阳性对照试剂,收集细胞前1 h在各组细胞内加入荧光探针DCFH-DA工作液,培养箱内孵育1 h,收集细胞,重悬于磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)中,1 000 r/min离心5 min后弃上清液,洗去多余的探针,洗涤2次,离心后将细胞重悬于PBS中,加入96孔酶标板中。使用激发波长为488 nm,发射波长为525 nm的荧光酶标仪读数。

1.8 比色法检测 SOD 活性、总铁离子和亚铁离子含量

待细胞增殖至培养瓶约90%时,使用0.25%胰蛋白酶溶液对细胞消化重悬,按每孔 5×10^5 个细胞接种至6孔板,分组及干预方式同1.3。用胰酶消化并收集到离心管中,1 000 r/min离心10 min以弃去上清液。根据SOD活性检测试剂盒说明书检测每组细胞的SOD活性。根据细胞总铁比色法测定试剂盒、细胞亚铁比色法测定试剂盒说明书检测各组细胞总铁离子的含量和细胞内亚铁离子的含量。

1.9 定量实时聚合酶链反应(RT-qPCR)检测细胞 mRNA 表达情况

待细胞增殖至培养瓶约90%时,使用0.25%胰蛋白酶溶液对细胞消化重悬,按每孔 5×10^5 个细胞接种至6孔板,分组及干预方式同1.3。收集细胞,使用TRIzol法提取细胞总RNA,按照逆转录试剂盒说明书将1 μg RNA逆转录成cDNA,用荧光定量PCR试剂盒扩增。RT-qPCR反应体系:cDNA模板(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 1 μL ,引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各1 μL ,2 \times qPCR Mix 10 μL ,焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水补足20 μL 。RT-qPCR反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,40次循环。以 β -actin为内参,2 $^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算相关基因相对表达,引物序列见表1。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

Name	Forward primer sequence (5'→3')	Reverse primer sequence (5'→3')	Product length (bp)
NP	CCTGTGTGTATGGACCTGCC	CTCTTGGGACCACCTTCGTC	234
GPX4	ATAAGAACGGCTGCGTGGTGAAG	TAGAGATAGCACGGCAGGTCCTTC	82
ACSL4	TTGGCTACTTACCTTTGGCTCATGTG	TACAATCACCTTGCTTCCCTTCTTG	144
HIF-1 α	ACATCAAGTCAGCAACGTGGAAGG	ACACTGAGGTTGGTACTGTTGGTATC	83
iNOS	ATCTTGGAGCGAGTTGTGGATTGTC	TAGGTGAGGGCTTGGCTGAGTG	131
VEGF	GGGCTCTTCTCGCTCCGTAGTAG	CCCTCTCCTTCTCCTTCTTCCCTC	137
β -actin	ACGCCAACACAGTGCTGTCTG	TGCTTGCTGATCCACATCTGCTG	101

1.10 Western blotting 法检测细胞蛋白表达情况

待细胞增殖至培养瓶约 90%时,使用 0.25% 胰蛋白酶溶液对细胞消化重悬,按每孔 5×10^5 个细胞接种至 6 孔板,分组及干预方式同 1.3。收集细胞,使用放射免疫沉淀(radio immunoprecipitation assay, RIPA)裂解液提取细胞总蛋白,用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白浓度,取 50 μ g 蛋白样品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),电转,室温封闭 2 h 后分别加入靶蛋白一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)后在化学发光成像仪中显影成像。使用 ImageJ 软件分析图像分析灰度值。

1.11 激光共聚焦检测细胞蛋白荧光强度

待细胞增殖至培养瓶约 90%时,使用 0.25% 胰蛋白酶溶液对细胞消化重悬,按每孔 8 000 个细胞接种至 6 孔板,分组及干预方式同 1.3。收集细胞,4%多聚甲醛固定 30 min,0.5% Triton X-100 室温通透 20 min,1%牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)封闭 30 min。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,DAPI 核染,TRITC 对细胞骨架进行染色,激光共聚焦显微镜下观察。

1.12 生物信息学分析

使用 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)和 OMIM 数据库(<https://omim.org/>)检索流

感目的基因;使用 FerrDb 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/current/>)获取铁死亡作用靶点。使用在线维恩图(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)绘制流感和铁死亡目标的维恩图,以获得交叉目标。采用 R 3.6.3 clusterProfiler 软件包对流感感染和铁下垂的交叉靶点进行基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析。

1.13 细胞瞬时转染

HIF-1 α -siRNA 序列购自生工生物工程(上海)股份有限公司,阴性对照(Negative control, NC) siRNA (正义序列为:5'-CCAGUUACGAUUGUGAAGUUATT-3',反义序列为:5'-UAACUUCACAAUCGUAACUGGTT-3')、HIF-1 α -siRNA (正义序列为:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3',反义序列为:5'-ACGUGACACGUUCGAGAATT-3')。当细胞生长到约 60%汇合时,根据转染试剂说明书,将 HIF-1 α -siRNA 和阴性对照 RNA 瞬时转染到细胞中,转染 24 h 后用于后续试验。

1.14 统计学分析

采用 SPSS 23.0 统计学软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差表示,对样本先进行方差齐性检验,方差齐时,用 One-way ANOVA 检验,并用最小显著性差异(least significant difference, LSD)法进行组间的多重比较;方差不齐时,用

非参数秩和检验,先用 Kruskal-Wallis H test 比较总的差异,再用 Mann-Whitney U 进行两组之间比较。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Fer-1 对细胞形态及细胞活性的影响

构建细胞模型后在显微镜下观察各组细胞形态,并使用 CCK8 试验对细胞活性进行检测。

与对照组相比,模型组细胞数量减少,视野内出现细胞碎片,细胞活性下降($P<0.01$),损伤较为严重。与模型组相比,Fer-1 组细胞活性增加($P<0.01$),细胞形态较为完整(图 2A、2B)。

2.2 Fer-1 对细胞病毒核蛋白 NP 的表达及炎症因子释放的影响

与对照相比,模型组细胞内 NP 的 mRNA ($P<0.01$)及上清液中炎症因子 IL-1 β 、IL-6 显著

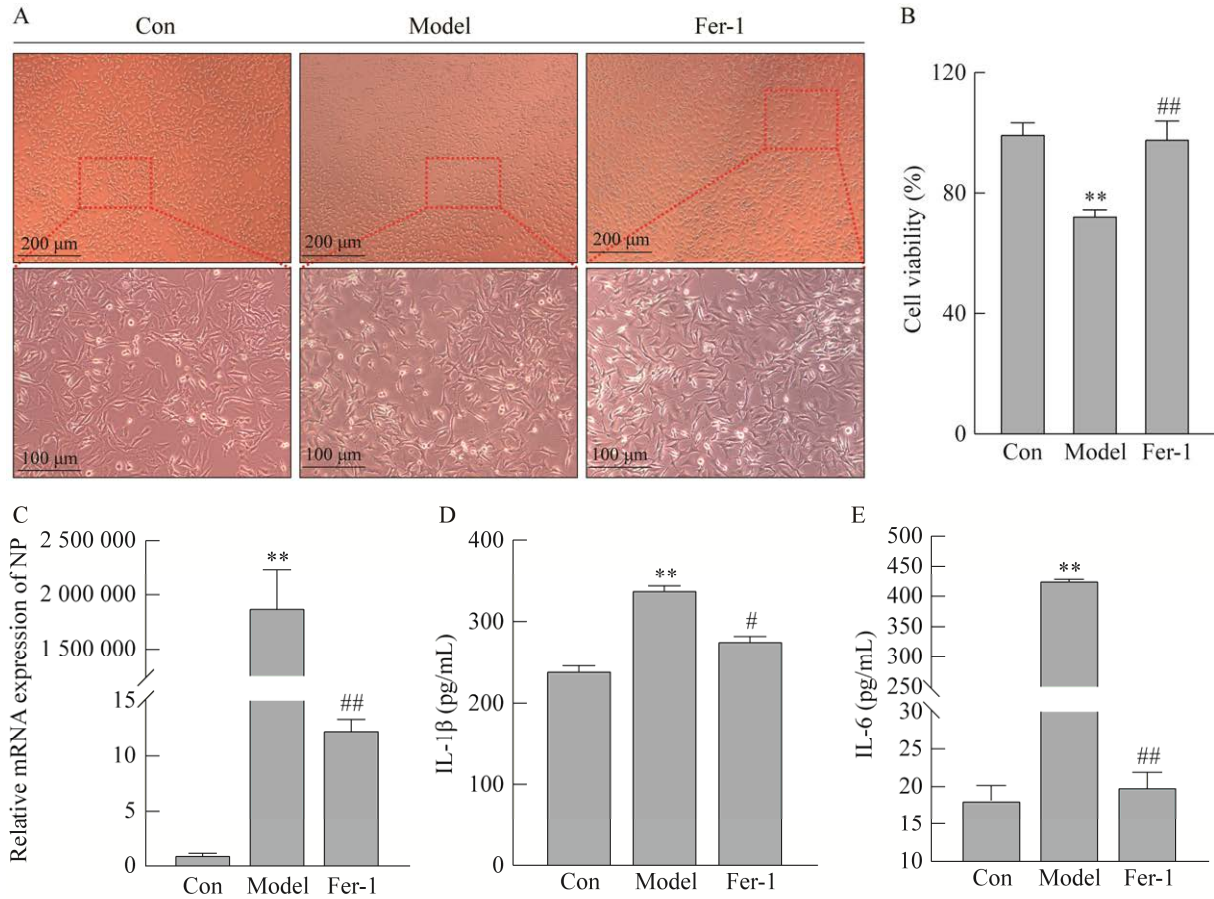


图 2 Fer-1 对 IAV 感染诱导细胞损伤的修复作用 A: IAV 感染后各组细胞在光学显微镜下的形态和生长状态. B: IAV 感染后各组细胞活性. C: 感染 IAV 后各组细胞流感病毒 NP mRNA 表达. D: IAV 感染可促进细胞 IL-1 β 的分泌. E: IAV 感染可促进细胞 IL-6 的分泌. 与对照组相比, **: $P<0.01$; 与模型组相比, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$

Figure 2 The repair effect of Fer-1 on cell damage induced by IAV infection. A: Morphology and growth state of the cells in each group under light microscope after IAV infection. B: Cell activity of each group after IAV infection. C: The influenza virus NP protein gene expression in each group after IAV infection. D: IAV infection can promote the secretion of cellular IL-1 β . E: IAV infection can promote the secretion of cellular IL-6. Compared with the control group, **: $P<0.01$; compared with the model group, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$.

增加($P<0.01$); 与模型组相比, Fer-1 组细胞内 NP 的 mRNA ($P<0.01$)及上清液中炎症因子 IL-1 β ($P<0.05$)、IL-6 显著降低($P<0.01$) (图 2C–2E)。

2.3 Fer-1 对细胞 ROS 释放、SOD 活性及总铁离子和亚铁离子含量的影响

与对照组相比, 模型组 ROS、总铁离子和亚铁离子含量增加($P<0.01$) (图 3A、3B), SOD 活性降低($P<0.01$) (图 3C); 与模型组相比, Fer-1 组 ROS 减少($P<0.01$), SOD 活性增加($P<0.05$), 总铁和亚铁离子含量降低($P<0.01$)。

2.4 IAV 感染对细胞线粒体结构的影响

如图 4 所示, 与对照组相比, 模型组细胞线粒体双层膜高度浓缩, 线粒体收缩, 线粒体嵴减少或消失, 与模型组相比, Fer-1 组细胞线粒体损伤较轻, 表现出正常细胞相似的线粒体结构。这个结果表明 IAV 感染能导致细胞出现铁死亡典型的形态学表现。

2.5 IAV 感染后细胞 ACSL4 和 GPX4 的 mRNA 表达变化

RT-qPCR 结果显示(图 5A), 与对照组相比,

模型组可显著促进细胞中 ACSL4 的 mRNA 表达($P<0.01$), 降低细胞中 GPX4 的 mRNA 表达($P<0.01$), 与模型组相比, Fer-1 组细胞中 ACSL4 的 mRNA 表达显著降低($P<0.01$), GPX4 的 mRNA 表达显著增加($P<0.01$)。

2.6 IAV 感染后细胞中 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达的变化

Western blotting 结果(图 5B、5C)显示, 与对照组相比, 模型组可显著促进细胞中 ACSL4 的蛋白表达($P<0.01$), 降低细胞中 GPX4 的蛋白表达($P<0.01$); 与模型组相比, Fer-1 组细胞中 ACSL4 的蛋白表达显著降低($P<0.05$), GPX4 的蛋白表达显著增加($P<0.05$)。

2.7 流感感染诱导铁死亡机制的预测

如图 6A 所示, 共检索到 99 个流感和铁死亡之间的交集靶点。GO 富集分析显示(图 6B), 主要参与氧化应激响应、细胞质翻译、细胞化学应激反应等生物过程相关, KEGG 富集分析结果显示(图 6C), 其主要富集 IL-17 信号通路、C 型凝集素受体信号通路、PD-L1 表达和 PD-1

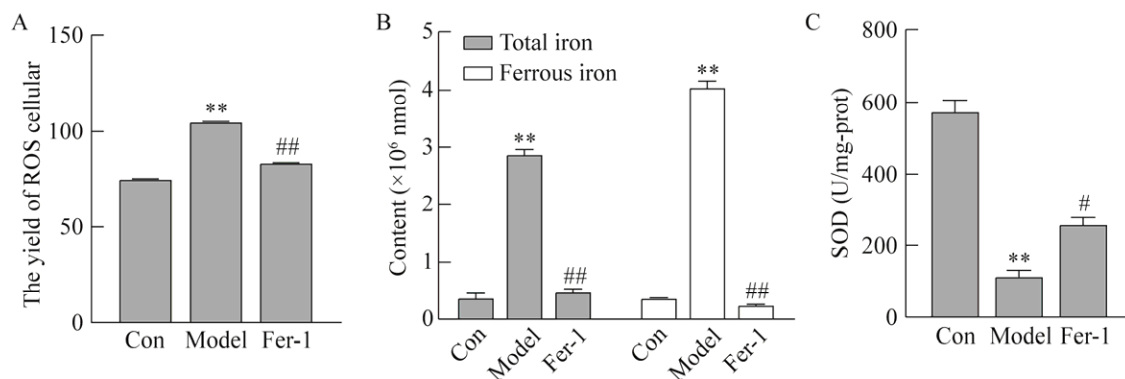


图 3 IAV 感染后细胞 ROS 释放、SOD 活性以及细胞内总铁离子和亚铁离子的含量 A: 使用荧光探针法检测细胞 ROS 释放. B: 使用比色法检测细胞内总铁和亚铁离子的含量. C: 使用比色法检测细胞 SOD 活性. 与对照组相比, **: $P<0.01$; 与模型组相比, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$

Figure 3 Cellular ROS release, SOD activity, and contents of total intracellular iron and ferrous ions after IAV infection. A: Cellular ROS release was detected using the fluorescent probe method. B: Contents of intracellular total iron and ferrous ions were detected using the colorimetric method. C: Contents of intracellular SOD activity were detected using the colorimetric method. Compared with the control group, **: $P<0.01$; compared with the model group, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$.

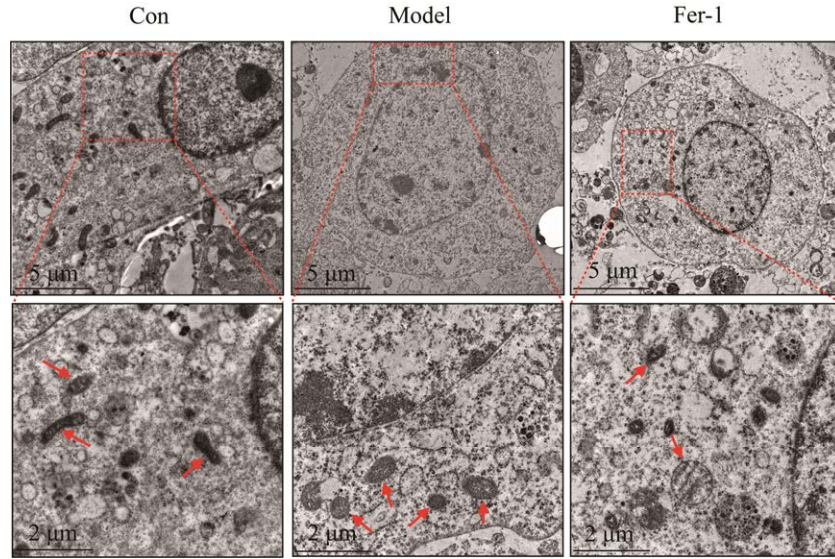


图 4 透射电镜下各组细胞线粒体形态 图中红色箭头表示细胞线粒体

Figure 4 The mitochondrial morphology of IAV-infected cells in each group under the transmission electron microscope. The red arrow in the picture indicates the cell mitochondria.

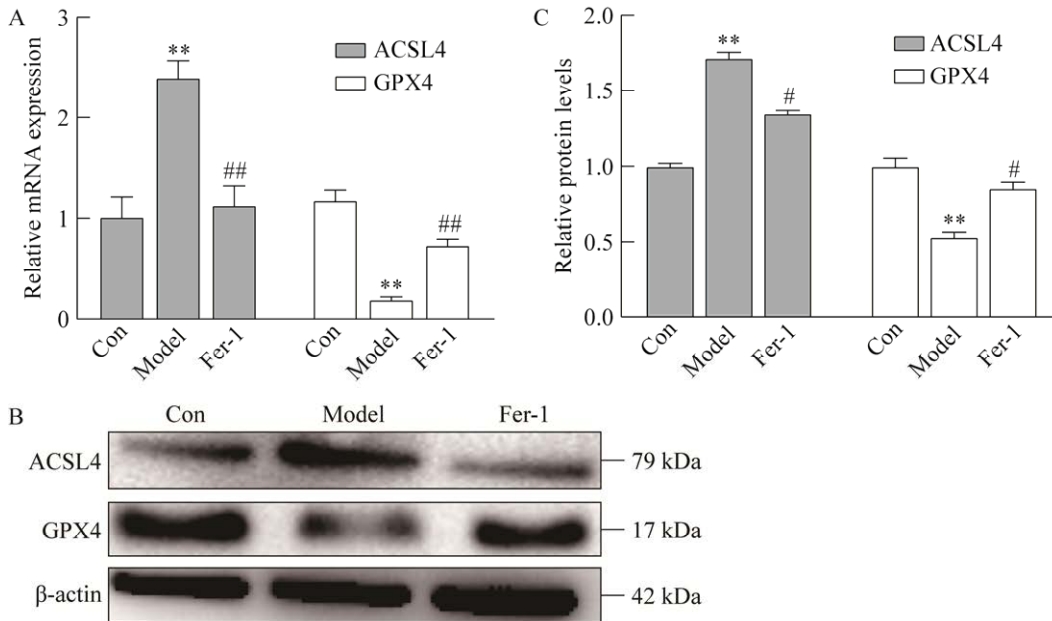
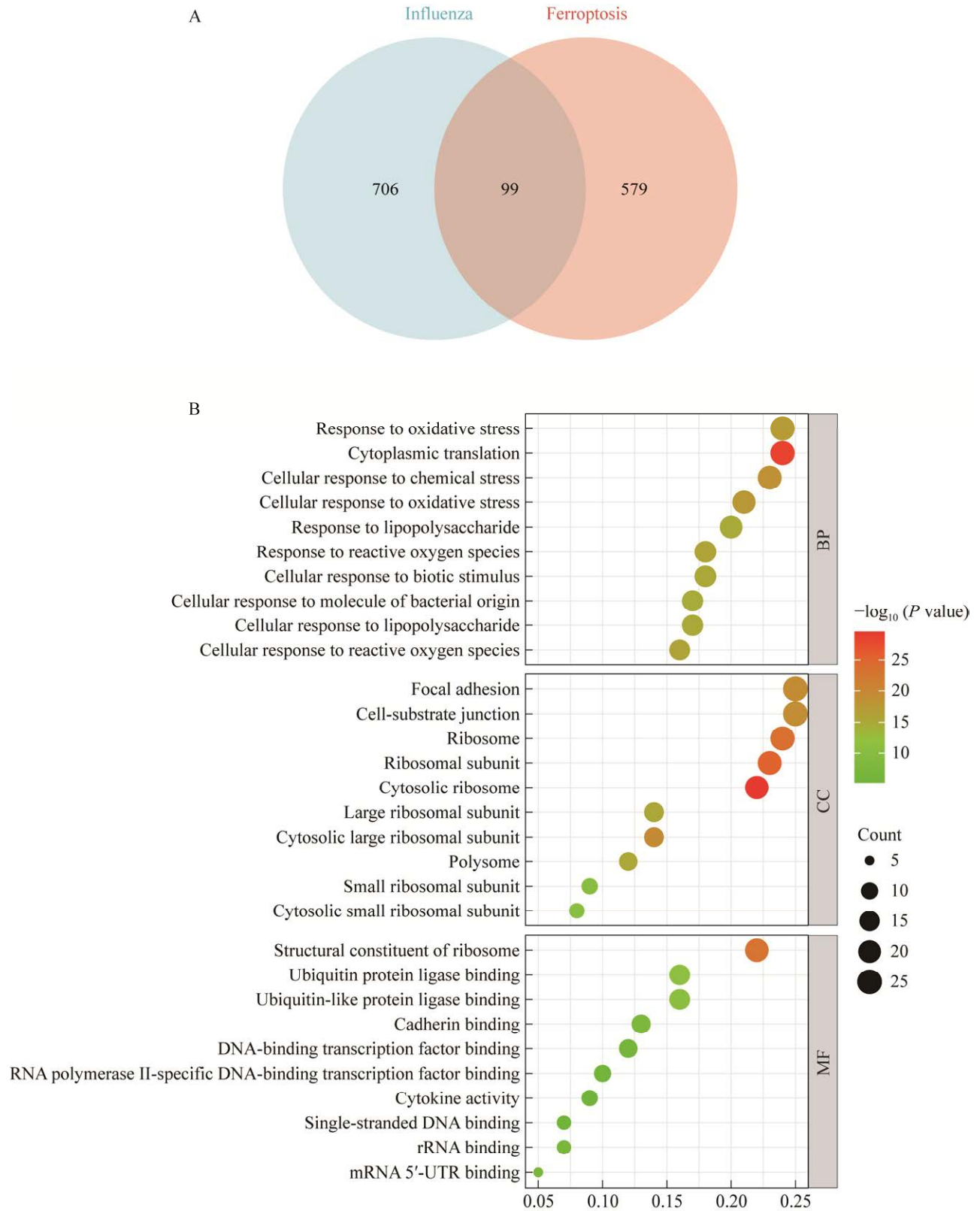


图 5 IAV 感染对 MLE-12 细胞中 GPX4 和 ACSL4 的 mRNA 和蛋白质表达的影响 A: IAV 感染对 MLE-12 细胞中 GPX4 和 ACSL4 的 mRNA 表达的影响. B、C: IAV 感染对 MLE-12 细胞中 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达的影响. 与对照组相比, **: $P < 0.01$; 与模型组相比, #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$

Figure 5 Effects of IAV infection on the mRNA and protein expressions of GPX4 and ACSL4 in MLE-12 cells. A: Effects of IAV infection on the mRNA expressions of GPX4 and ACSL4 in MLE-12 cells. B, C: Effects of IAV infection on the protein expressions of GPX4 and ACSL4 in MLE-12 cells. Compared with the control group, **: $P < 0.01$; compared with the model group, #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$.



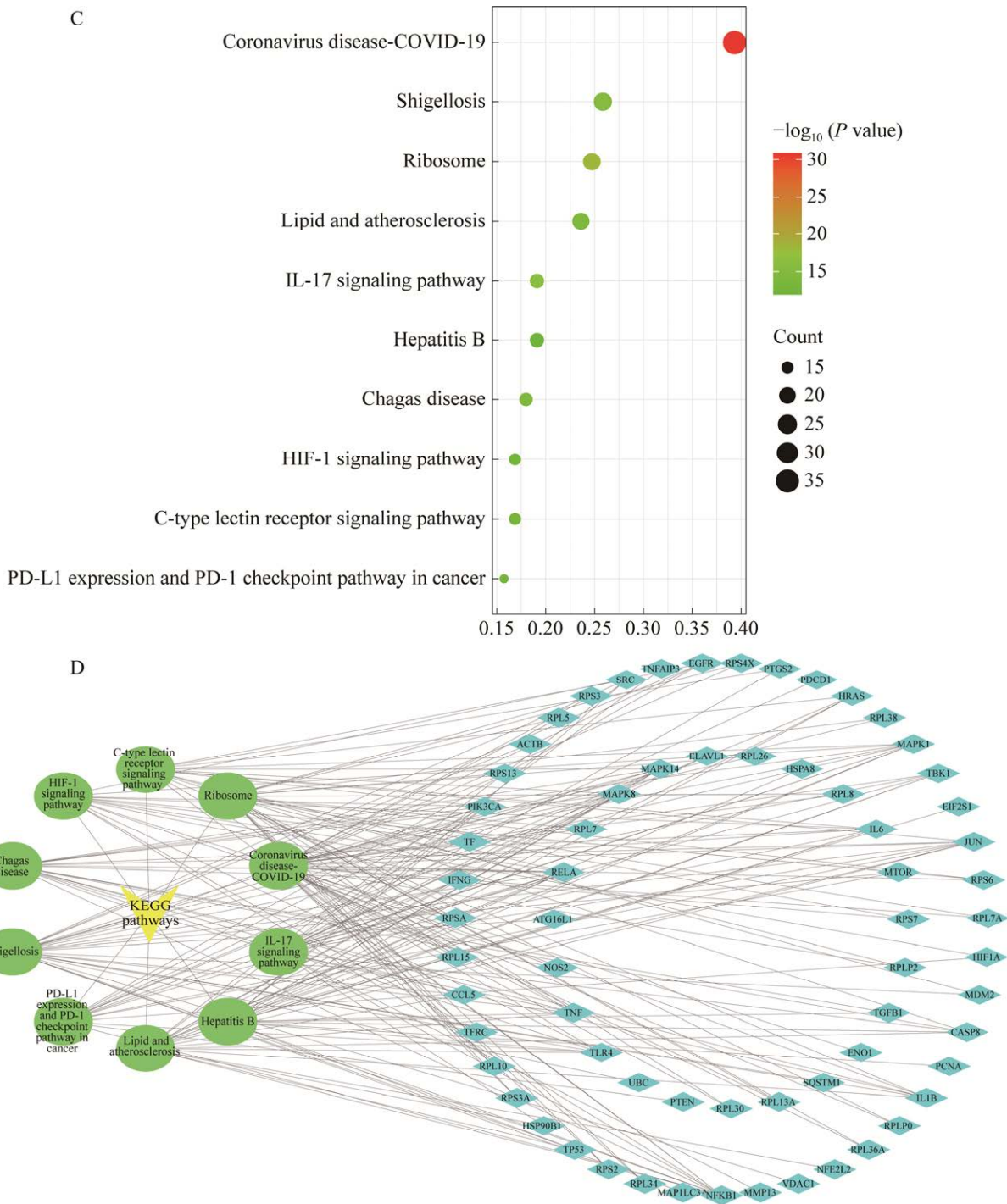


图 6 流感诱导的铁死亡机制的预测 A: 流感和铁死亡交集靶点. B: 流感引起铁死亡的 GO 富集分析. C: 流感引起铁死亡的 KEGG 富集分析. D: KEGG 富集分析的网络可视化

Figure 6 Prediction of the mechanism of influenza-induced ferroptosis. A: The intersection targets between influenza and ferroptosis. B: GO enrichment analysis for the prediction of influenza-induced ferroptosis. C: KEGG enrichment analysis for the prediction of influenza-induced ferroptosis. D: Network visualization of KEGG enrichment analysis for the prediction of influenza-induced ferroptosis prediction.

在癌症检查点通路和 HIF-1 信号通路, 其中 HIF-1 信号通路排名第九, 且 $P < 0.01$ 。使用 Cytoscape v3.8.0 对 KEGG 富集分析中的前十个信号通路进行网络可视化(图 6D)。

2.8 IAV 感染可促进 HIF-1 α 在 MLE-12 细胞中的活化和易位入核

如图 7A 所示(蓝色代表细胞核, 绿色代表 HIF-1 α 蛋白表达, 红色代表细胞骨架), 与对照组相比, 模型组细胞内 HIF-1 α 的表达显著增加, 并能促进 HIF-1 α 进入 MLE-12 细胞的细胞核, 提示 IAV 感染可促进 MLE-12 细胞内 HIF-1 α

的活化和易位入核。

2.9 IAV 感染对 MLE-12 细胞 HIF-1 α 、iNOS 和 VEGF mRNA 表达的影响

RT-qPCR 结果显示: 与对照组相比, 模型组细胞内 HIF-1 α 、iNOS 和 VEGF 的 mRNA 表达显著增加($P < 0.01$) (图 7B)。表明 IAV 感染能促进细胞内 HIF-1 α 及其下游靶标 iNOS 和 VEGF 的 mRNA 表达。

2.10 IAV 感染对 MLE-12 细胞 HIF-1 α 、iNOS 和 VEGF 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示: 与对照组相比,

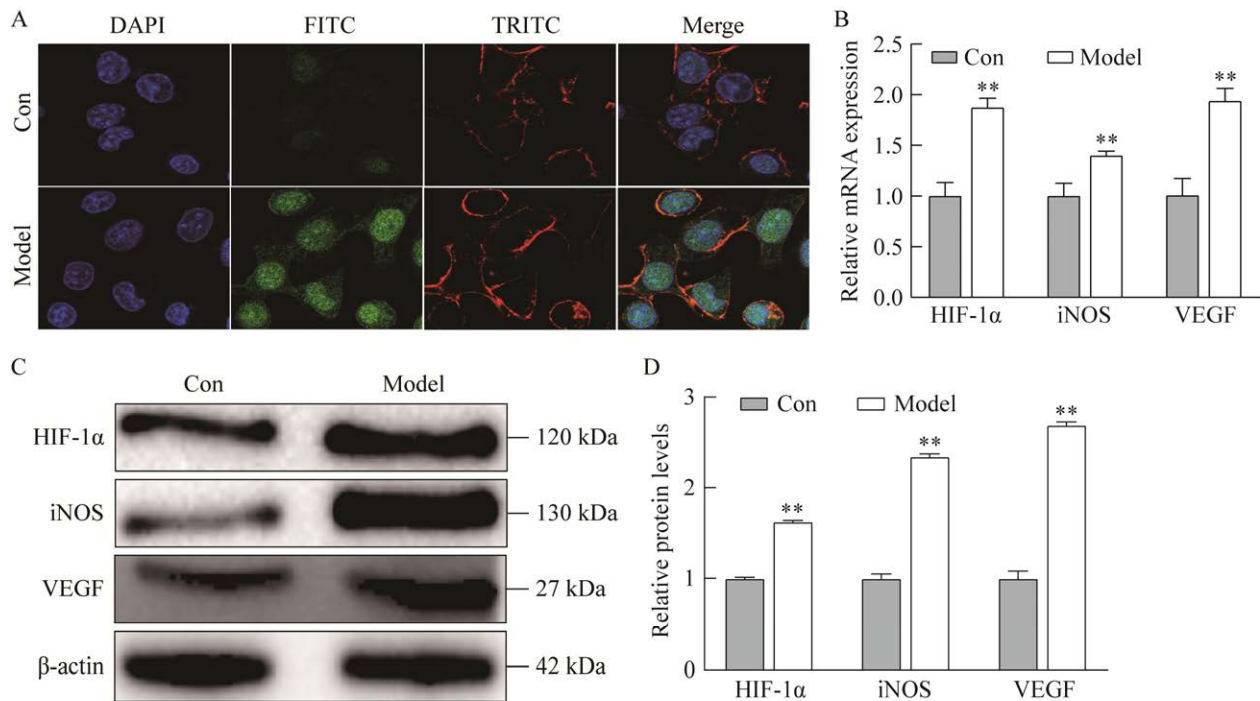


图 7 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路在 IAV 感染诱导的铁死亡中的潜在机制 A: IAV 感染促进了 HIF-1 α 的活化和 MLE-12 细胞的核进入. B: IAV 感染对 MLE-12 细胞 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路中 HIF-1 α 、iNOS 和 VEGF 的 mRNA 表达的影响. C: Western blotting 检测细胞中 HIF-1 α 、iNOS、VEGF 蛋白表达情况. D: 蛋白相对表达定量分析. 与对照组相比, **: $P < 0.01$

Figure 7 The potential mechanism of HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway in IAV infection-induced ferroptosis. A: IAV infection promoted HIF-1 α activation and nuclear entry in MLE-12 cells. B: Effects of IAV infection on the mRNA expressions of HIF-1 α , iNOS and VEGF in the HIF-1 α /iNOS/VEGF signaling pathway in MLE-12 cells. C: Western blotting detected the expression of HIF-1 α , iNOS and VEGF proteins in cells. D: Quantitative analysis of relative protein expression. Compared with the control group, **: $P < 0.01$.

模型组细胞内 HIF-1 α 、iNOS 和 VEGF 蛋白表达显著增加($P<0.01$) (图 7C、7D)。提示 IAV 感染能促进细胞内 HIF-1 α 及其下游靶标 iNOS 和 VEGF 的蛋白表达。

2.11 敲低 HIF-1 α 可抑制 ROS 释放, 降低 IAV 感染细胞中总铁和亚铁离子的含量

成功构建 HIF-1 α 敲低细胞模型后使用 IAV 感染细胞(图 8A、8B)。与对照组相比, 模型组

和 NC 组细胞 ROS、总铁离子和亚铁离子的含量显著增加 ($P<0.01$)；与模型组相比, siRNA-HIF-1 α 组细胞 ROS、总铁离子和亚铁离子的含量显著降低($P<0.01$) (图 8C、8D)。

2.12 HIF-1 α 敲低后 IAV 感染的 MLE-12 细胞中 GPX4、ACSL4 和 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路相关元件的 mRNA 表达变化

RT-qPCR 结果显示：与对照组相比, 模型

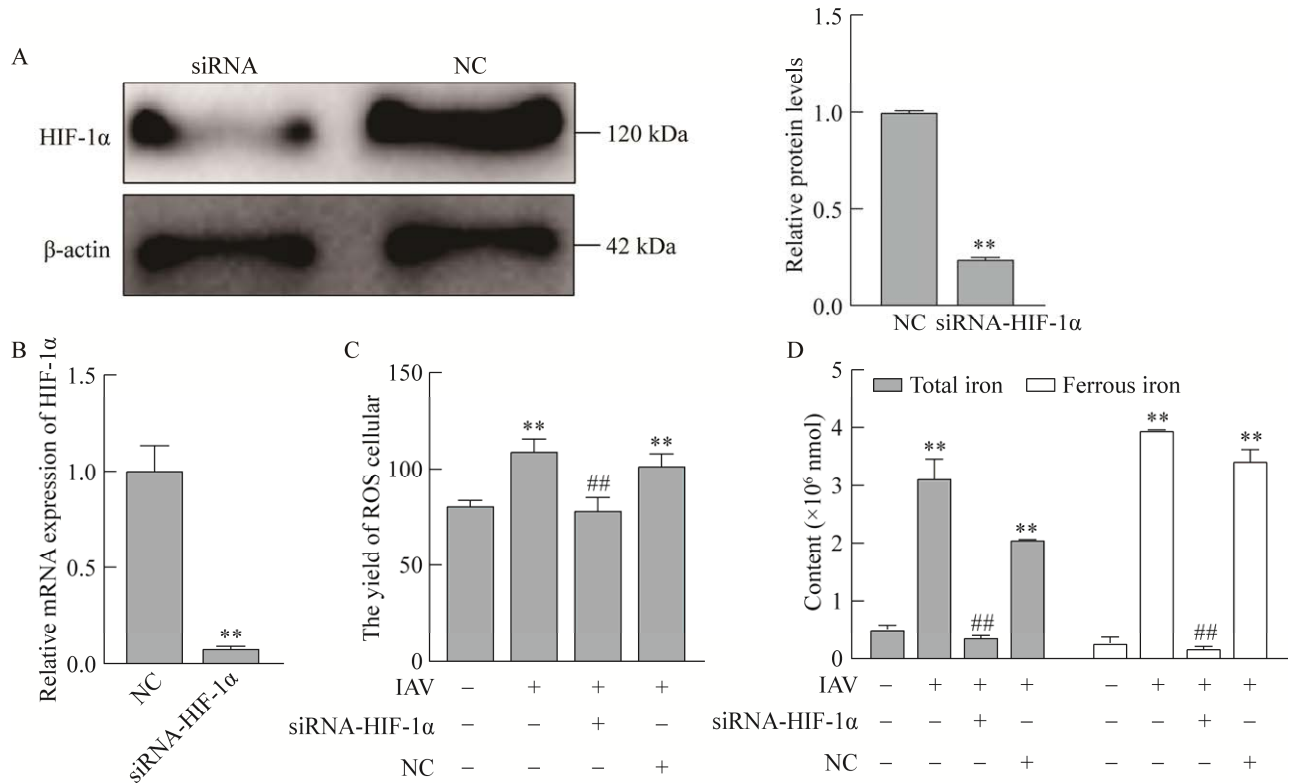


图 8 HIF-1 α 敲低模型的构建及敲低后 ROS 释放和总铁和亚铁离子含量的变化 A: MLE-12 细胞转染 siRNA 后细胞 HIF-1 α 蛋白表达水平. B: MLE-12 细胞转染 siRNA 后细胞 HIF-1 α 的 mRNA 表达水平. C: 敲低 HIF-1 α 能抑制 IAV 感染细胞诱导的 ROS 释放. D: 敲低 HIF-1 α 逆转了 IAV 感染细胞中总细胞内铁和亚铁离子含量的增加. +: 使用该方式干预; -: 未使用该方式干预. 与对照组相比, **: $P<0.01$; 与模型组相比, #: $P<0.01$

Figure 8 Knockdown of HIF-1 α and changes in ROS release and contents of total iron and ferrous ions after knockdown. A: Cellular HIF-1 α protein expression levels after MLE-12 cells transfected with siRNA. B: Cellular HIF-1 α mRNA expression levels after MLE-12 cells transfected with siRNA. C: Knockdown of HIF-1 α inhibits the ROS release induced by IAV-infected cells. D: Knockdown of HIF-1 α reverses the increase in the contents of total intracellular iron and ferrous ions in IAV-infected cells. +: Use this method to intervene; -: No intervention using this method. Compared with the control group, **: $P<0.01$; compared with the model group, #: $P<0.01$.

组和 NC 组细胞 GPX4 的 mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$), ACSL4、HIF-1 α 、VEGF 和 iNOS 的 mRNA 表达显著增加 ($P<0.01$), 与模型组相比, siRNA-HIF-1 α 组 GPX4 的 mRNA 表达显著增加 ($P<0.01$), ACSL4、HIF-1 α 、VEGF 和 iNOS 的 mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$) (图 9A)。

2.13 HIF-1 α 敲低后 IAV 感染的 MLE-12 细胞中 GPX4、ACSL4 和 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路相关元件的蛋白质表达变化

Western blotting 结果显示: 与对照组相比, 模型组和 NC 组细胞 GPX4 蛋白表达显著降低, ACSL4、HIF-1 α 、VEGF 和 iNOS 蛋白表达显著

增加 ($P<0.01, P<0.05$), 与模型组相比, siRNA-HIF-1 α 组 GPX4 蛋白表达显著增加 ($P<0.01$), ACSL4、HIF-1 α 、VEGF 和 iNOS 蛋白表达显著降低 ($P<0.01, P<0.05$) (图 9B、9C)。

3 讨论与结论

本研究探讨了 IAV 感染能否诱导 MLE-12 细胞发生铁死亡, 以及 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路在其中可能的作用机制。本研究的主要发现如下: (1) 通过体外细胞试验构建流感病毒感染损伤模型, 发现 IAV 感染确实能诱导 MLE-12 细胞发生铁死亡。 (2) 通过生物信息学

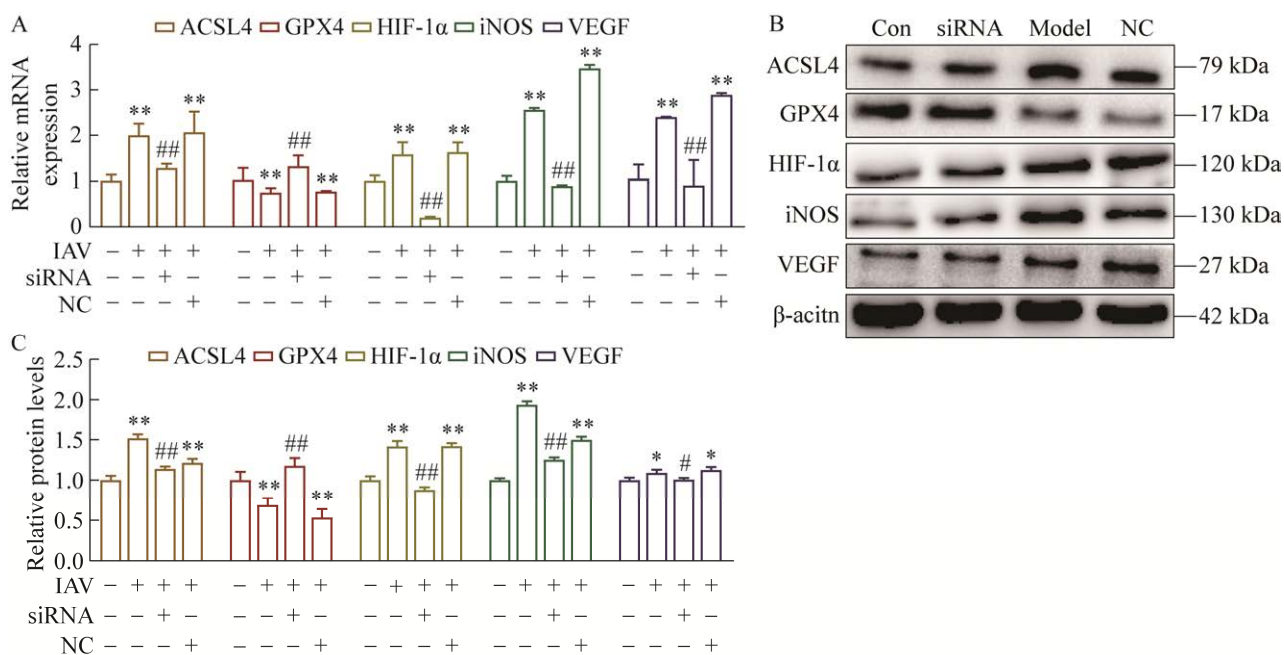


图 9 HIF-1 α 的敲低对 IAV 感染细胞的影响 A: 敲低 HIF-1 α 对 IAV 感染细胞中 GPX4、ACSL4 和 HIF-1 α /iNOS/VEGF 通路元件的 mRNA 表达的影响. B、C: 敲低 HIF-1 α 对 IAV 感染细胞中 GPX4、ACSL4 和 HIF-1 α /iNOS/VEGF 通路元件蛋白表达的影响. 与对照组相比, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; 与模型组相比, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$

Figure 9 Effects of knockdown of HIF-1 α on IAV-infected cells. A: Effects of knockdown of HIF-1 α on the mRNA expressions of GPX4, ACSL4 and HIF-1 α /iNOS/VEGF pathway elements in IAV-infected cells. B, C: Effects of knockdown of HIF-1 α on the protein expressions of GPX4, ACSL4 and HIF-1 α /iNOS/VEGF pathway elements in IAV-infected cells. Compared with the control group, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$; compared with the model group, #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$.

预测流感感染可能诱导发生铁死亡, 其潜在作用机制与多条信号通路相关, 其中包含 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路。(3) 结合生物信息学的预测结果, 进一步对 IAV 诱导 MLE-12 细胞发生铁死亡的作用机制进行了研究, 发现 IAV 诱导 MLE-12 细胞发生铁死亡可能与 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路有关。

作为铁依赖性细胞死亡的一种形式, 铁死亡的特征是细胞内 ROS 的积累, 它在形态、生化和遗传上与自噬、细胞凋亡和坏死不同, 虽然尚不确定铁死亡的生理功能, 但已确定其在人类疾病中发挥着重要作用, 与各种人类疾病有关^[19]。研究已经发现, 当细胞发生铁死亡时, 细胞会出现线粒体体积减小、线粒体膜密度浓缩、线粒体嵴缺失甚至线粒体外膜破裂等状况^[20], 而在使用 IAV 感染 MLE-12 细胞后, 透射电镜下可以观察到细胞线粒体出现了类似的变化, 而使用了 Fer-1 的细胞线粒体与正常细胞线粒体基本一致。铁死亡作为一种铁依赖性的一种程序性细胞死亡, 由 SOD 等酶促抗氧化剂调节的氧化过程, 当细胞发生铁死亡时, 由于细胞内过量的铁促进 ROS 的释放和 SOD 活性降低而发生铁死亡^[4,21], 本研究中发现, IAV 感染能够促进细胞释放大量的 ROS 并降低细胞 SOD 活性, 这可能是 IAV 感染细胞导致细胞损伤的原因之一。此外, 本研究还发现与铁死亡密切相关的基因 GPX4 和 ACSL4 在 IAV 感染后表达也会出现相应的改变, 上述这些数据证明, IAV 感染细胞确实能够诱导细胞发生铁死亡造成细胞损伤。近年来, “坏死性炎症”概念的提出和定义, 让人们对于生物体内坏死细胞死亡的炎症反应有了更清晰的了解, 即身体内正常受调节的凋亡途径不会引起严重的炎症, 但是坏死性凋亡、铁死亡和焦亡等会不可避免地释放细胞内损伤相关分子模式(damage associated

molecular patterns, DAMP), 从而将高度免疫原性细胞内的分子和细胞器释放到间质中, 进而导致人类自身免疫性炎症疾病^[22]。在本研究中发现, 在使用了 Fer-1 抑制了细胞铁死亡后, 细胞分泌的 IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子是明显减少的, 这很有可能说明 IAV 感染细胞后如不及时治疗, 除了很有可能使细胞发生铁死亡外, 还有可能会发生更严重的坏死性炎症。

缺氧的适应主要通过 HIF-1 α 来实现, HIF-1 α 通过调节缺氧相关基因的激活血管生成^[23]。已有研究报道发现, 糖尿病模型小鼠的 HIF-1 α 的表达水平明显增加, 加剧 ROS 形成, 进而加重小鼠肾小管铁超负荷, 导致小鼠肾脏中的脂质过氧化和铁死亡的发生^[24]。此外也有研究报道, 可以通过抑制 VEGF 的表达可以抑制细胞铁死亡的发生^[25]。在本研究中发现, IAV 感染细胞后能够激活细胞 HIF-1 α 的表达并促进其易位入核, 同时还可以激活 HIF-1 α 下游靶基因 iNOS 和 VEGF 的表达。将 HIF-1 α 的 siRNA 序列转染至细胞内构建细胞 HIF-1 α 的敲低模型发现 HIF-1 α 的降低能抑制流感感染细胞 ROS 的释放和总铁、亚铁离子的含量, 并逆转 IAV 感染导致的铁死亡标志基因的表达和抑制 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路相关元件的表达。

总之, 本研究结果描述了一种 IAV 感染后诱导的一种新的细胞死亡形式——铁死亡, 这个过程涉及了 HIF-1 α /iNOS/VEGF 信号通路的调节, IAV 感染细胞诱导的铁死亡可能是通过激活 HIF-1 α 并促进其进入细胞核调节细胞转录进而促进其下游靶基因 iNOS 和 VEGF 的激活, 最终诱导细胞发生铁死亡。

REFERENCES

- [1] ZHU MC, MA XY, HUANG JW, LU FG, CHEN YL, HU J, CHENG LJ, ZHANG B, LIU WR, LI L. Extracellular vesicle-derived miR-1249-5p regulates

- influenza A virus-induced acute lung injury in RAW246.7 cells through targeting SLC4A1[J]. *Microbes and Infection*, 2022, 24(8): 104998.
- [2] 黄家望, 马心悦, 朱梦晨, 胡燕, 刘薇蓉, 陈雨露, 李玲. 基于“扶正祛邪”治则的中医药抗病毒性肺炎作用机制的研究进展[J]. *中医药学报*, 2022, 50(12): 97-101.
- HUANG JW, MA XY, ZHU MC, HU Y, LIU WR, CHEN YL, LI L. Research progress on action mechanism of TCM in treating viral pneumonia based on principle of ‘fuzheng quxie’[J]. *Acta Chinese Medicine and Pharmacology*, 2022, 50(12): 97-101 (in Chinese).
- [3] SHARMA A, FLORA SJS. Positive and negative regulation of ferroptosis and its role in maintaining metabolic and redox homeostasis[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021, 2021: 9074206.
- [4] XU T, DING W, JI XY, AO X, LIU Y, YU WP, WANG JX. Molecular mechanisms of ferroptosis and its role in cancer therapy[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(8): 4900-4912.
- [5] KUNG YA, CHIANG HJ, LI ML, GONG YN, CHIU HP, HUNG CT, HUANG PN, HUANG SY, WANG PY, HSU TA, BREWER G, SHIH SR. Acyl-coenzyme A synthetase long-chain family member 4 is involved in viral replication organelle formation and facilitates virus replication via ferroptosis[J]. *mBio*, 2022, 13(1): e0271721.
- [6] JIANG XJ, STOCKWELL BR, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 22(4): 266-282.
- [7] CHEN X, LI JB, KANG R, KLIONSKY DJ, TANG DL. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081.
- [8] DOLL S, PRONETH B, TYURINA YY, PANZILIUS E, KOBAYASHI S, INGOLD I, IRMLER M, BECKERS J, AICHLER M, WALCH A, PROKISCH H, TRÜMBACH D, MAO GW, QU F, BAYIR H, FÜLLEKRUG J, SCHEEL CH, WURST W, SCHICK JA, KAGAN VE, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nature Chemical Biology*, 2017, 13(1): 91-98.
- [9] SHA R, XU YQ, YUAN CW, SHENG XN, WU ZP, PENG J, WANG YH, LIN YP, ZHOU LH, XU SG, ZHANG J, YIN WJ, LU JS. Predictive and prognostic impact of ferroptosis-related genes ACSL4 and GPX4 on breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy[J]. *eBioMedicine*, 2021, 71: 103560.
- [10] SEMENZA GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway[J]. *Science’s STKE: Signal Transduction Knowledge Environment*, 2007, 2007(407): cm8.
- [11] CORRADO C, FONTANA S. Hypoxia and HIF signaling: one axis with divergent effects[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(16): 5611.
- [12] SLEMC L, KUNEJ T. Transcription factor HIF1A: downstream targets, associated pathways, polymorphic hypoxia response element (HRE) sites, and initiative for standardization of reporting in scientific literature[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(11): 14851-14861.
- [13] JIANG S, GAO Y, YU QH, LI M, CHENG X, HU SB, SONG ZF, ZHENG QC. P-21-activated kinase 1 contributes to tumor angiogenesis upon photodynamic therapy via the HIF-1 α /VEGF pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 526(1): 98-104.
- [14] LI YC, CAO YM, XIAO J, SHANG JW, TAN Q, PING F, HUANG WF, WU F, ZHANG HJ, ZHANG XP. Inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53 inhibits ferroptosis and alleviates intestinal ischemia/reperfusion-induced acute lung injury[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2020, 27(9): 2635-2650.
- [15] TRIPATHI S, BATRA J, CAO W, SHARMA K, PATEL JR, RANJAN P, KUMAR A, KATZ JM, COX NJ, LAL RB, SAMBHARA S, LAL SK. Influenza A virus nucleoprotein induces apoptosis in human airway epithelial cells: implications of a novel interaction between nucleoprotein and host protein Clusterin[J]. *Cell Death & Disease*, 2013, 4(3): e562.
- [16] MOSAVI SZ, SHAHSAVANDI S, EBRAHIMI MM, HATAMI AR, SADEGHI K, SHAHIVANDI H. Necrotic response to low pathogenic H9N2 influenza virus in chicken hepatoma cells[J]. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 2015, 8(1): e13770.
- [17] GANNAGÉ M, DORMANN D, ALBRECHT R, DENGJEL J, TOROSI T, RÄMER PC, LEE M, STROWIG T, ARREY F, CONENELLO G, PYPAERT M, ANDERSEN J, GARCÍA-SASTRE A, MÜNZ C. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes[J]. *Cell Host & Microbe*, 2009, 6(4): 367-380.
- [18] 马心悦, 朱梦晨, 卢芳国, 陈雨露, 王平, 赵澄, 黄家望, 李玲. 流感病毒诱导的小鼠肺上皮细胞损伤及

- 外泌体 miRNA 差异表达谱研究[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(1): 40-49.
- MA XY, ZHU MC, LU FG, CHEN YL, WANG P, ZHAO C, HUANG JW, LI L. Influenza virus-induced lung epithelial cell injury and differential expression profile of miRNAs in exosomes[J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2022, 38(1): 40-49 (in Chinese).
- [19] SKOUTA R, DIXON SJ, WANG JL, DUNN DE, ORMAN M, SHIMADA K, ROSENBERG PA, LO DC, WEINBERG JM, LINKERMANN A, STOCKWELL BR. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models[J]. Journal of the American Chemical Society, 2014, 136(12): 4551-4556.
- [20] LI L, SUN SL, TAN LL, WANG YF, WANG LY, ZHANG ZR, ZHANG L. Polystyrene nanoparticles reduced ROS and inhibited ferroptosis by triggering lysosome stress and TFEB nucleus translocation in a size-dependent manner[J]. Nano Letters, 2019, 19(11): 7781-7792.
- [21] XIE Y, HOU W, SONG X, YU Y, HUANG J, SUN X, KANG R, TANG D. Ferroptosis: process and function[J]. Cell Death & Differentiation, 2016, 23(3): 369-379.
- [22] LINKERMANN A. Death and fire—the concept of necroinflammation[J]. Cell Death & Differentiation, 2019, 26(1): 1-3.
- [23] SEMENZA GL. HIF-1 mediates metabolic responses to intratumoral hypoxia and oncogenic mutations[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(9): 3664-3671.
- [24] FENG XM, WANG S, SUN ZC, DONG HB, YU HT, HUANG MX, GAO X. Ferroptosis enhanced diabetic renal tubular injury *via* HIF-1 α /HO-1 pathway in db/db mice[J]. Frontiers in Endocrinology, 2021, 12: 626390.
- [25] ZHAO XH, GAO M, LIANG J, CHEN YH, WANG YM, WANG YW, XIAO YS, ZHAO ZZ, WAN XL, JIANG M, LUO XT, WANG F, SUN XD. SLC7A11 reduces laser-induced choroidal neovascularization by inhibiting RPE ferroptosis and VEGF production[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2021, 9: 639851.