

· 基础研究 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2026.04.007

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20260302.1324.026\(2026-03-02\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20260302.1324.026(2026-03-02))

## 长链酰基辅酶 A 合成酶 4 促进铁死亡调控 血管钙化的机制研究\*

陈杨 马兴宇 罗稳健 赵俊勇 田婷婷 刘川 秦浙学<sup>△</sup>

(陆军军医大学第二附属医院心血管内科, 重庆 400037)

**[摘要]** **目的** 探讨长链酰基辅酶 A 合成酶 4(ACSL4)对血管钙化的调控作用及其分子机制。**方法** 在体外利用高磷刺激大鼠血管平滑肌细胞,模拟体外血管钙化的病理过程,同时建立维生素 D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>)小鼠钙化模型。通过 Western blot、免疫荧光等技术分析细胞和动物模型中 ACSL4 的表达变化,并通过体内应用 ACSL4 抑制剂 Prgl493 及体外过表达 ACSL4 进一步探究 ACSL4 对血管钙化的调控作用。通过检测细胞内脂质过氧化水平、亚铁离子(Fe<sup>2+</sup>)水平、GPX4 表达及运用铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 探究 ACSL4 调控血管钙化的分子机制。**结果** 血管钙化过程中,ACSL4 表达水平明显升高( $P < 0.05$ )。体内 Prgl493 干预能明显降低 RUNX2、OPN 表达水平,提升 SM22 $\alpha$  表达水平( $P < 0.05$ ),减少钙盐沉积。体外过表达 ACSL4 能明显提升 RUNX2、OPN 表达水平,降低 SM22 $\alpha$  表达水平( $P < 0.05$ ),增加钙盐沉积。过表达 ACSL4 能增加细胞内脂质过氧化水平及 Fe<sup>2+</sup> 水平( $P < 0.05$ ),而 Ferrostatin-1 干预能够逆转 ACSL4 对血管钙化的调控作用。**结论** ACSL4 通过促进铁死亡加重血管钙化。

**[关键词]** 长链酰基辅酶 A 合成酶 4;血管钙化;血管平滑肌细胞;C57BL/6J 小鼠;铁死亡

**[中图分类号]** R543.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2026)04-0755-08

## Long-chain acyl-CoA synthetase 4 promotes vascular calcification through activation of ferroptosis\*

CHEN Yang, MA Xingyu, LUO Wenjian, ZHAO Junyong, TIAN Tingting, LIU Chuan, QIN Zhexue<sup>△</sup>

(Department of Cardiology, Second Affiliated Hospital of Army

Medical University, Chongqing 400037, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the regulatory role of long-chain acyl-CoA synthetase 4 (ACSL4) in vascular calcification and its molecular mechanisms. **Methods** High phosphate stimulation was used to stimulate rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) in vitro to simulate the pathological process of vascular calcification. A vitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>)-induced mouse calcification model was established. The expression changes of ACSL4 in cellular and animal models were analyzed through Western blot and immunofluorescence. The regulatory role of ACSL4 in vascular calcification was further investigated by administering the ACSL4 inhibitor Prgl493 in vivo and overexpressing ACSL4 in vitro. The molecular mechanism by which ACSL4 regulates vascular calcification was explored by detected intracellular lipid peroxidation levels, ferrous ion (Fe<sup>2+</sup>) levels, GPX4 expression, and applied the ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1. **Results** During vascular calcification, ACSL4 expression significantly increased ( $P < 0.05$ ). In vivo Prgl493 intervention significantly reduced RUNX2 and OPN expression levels, elevated SM22 $\alpha$  expression level ( $P < 0.05$ ), and decreased calcium salt deposition. In vitro overexpression of ACSL4 significantly increased RUNX2 and OPN expression levels, lowered SM22 $\alpha$  expression level ( $P < 0.05$ ), and promoted calcium salt deposition. Overexpression of ACSL4 increased intracellular lipid peroxidation levels and Fe<sup>2+</sup> levels ( $P < 0.05$ ), while Ferrostatin-1 intervention reversed the regulatory effects of ACSL4 on vascular calcification. **Conclusion** ACSL4 aggravates vascular calcification by promoting ferroptosis.

**[Key words]** ACSL4; vascular calcification; vascular smooth muscle cells; C57BL/6J mice; ferroptosis

血管钙化是指心血管疾病中磷酸钙盐的异常沉积过程<sup>[1]</sup>,是主要不良心血管事件的重要关联因素<sup>[2]</sup>。随着全球老龄化加剧和代谢性疾病增多,其患病率明显上升<sup>[3-4]</sup>。血管钙化过程类似于生理性骨形成,病理特征为血管平滑肌细胞向成骨细胞样表型转化<sup>[5-6]</sup>。在促钙化环境中,血管平滑肌细胞的收缩标志物[平滑肌蛋白 22 $\alpha$ (smooth muscle protein 22 alpha, SM22 $\alpha$ )和  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)]表达水平降低,而成骨标志物[如骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和 Runt 相关转录因子-2(Runt-related transcription factor 2, RUNX2)]表达水平升高<sup>[7]</sup>。目前血管钙化的病理机制尚未完全阐明,临床缺乏有效的预防和治疗手段。长链酰基辅酶 A 合成酶(long-chain acyl-CoA synthetase, ACSL)通过催化游离长链脂肪酸转化为酰基辅酶 A,在脂类代谢中起关键作用<sup>[8]</sup>。作为家族成员,ACSL4 优先结合花生四烯酸(arachidonic acid, AA),参与含 AA 磷脂的重构<sup>[9]</sup>。ACSL4 参与调控动脉粥样硬化、心肌梗死和缺血性卒中,且与动脉粥样硬化中内皮细胞损伤密切相关<sup>[10]</sup>。然而,ACSL4 对平滑肌细胞表型转化及血管钙化的影响尚未见报道。

铁死亡是一种调节性细胞死亡形式,由含多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid, PUFA)的磷脂产生的过氧化脂质积累引起<sup>[11-12]</sup>。脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)通过催化生成脂质过氧化物促进铁死亡,这一过程依赖于 ACSL4 介导的脂质生物合成通路激活。相反,含硒酶谷胱甘肽过氧化物酶 4(selenium-dependent glutathione peroxidase 4, GPX4)是铁死亡的关键抑制因子,其活性依赖于谷胱甘肽(glutathione, GSH)<sup>[13]</sup>。研究表明,抑制铁死亡相关的溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)/GSH/GPX4 通路促进了慢性肾脏病患者的动脉钙化和血管平滑肌细胞成骨分化<sup>[14]</sup>。尽管铁死亡已被证明是血管钙化的重要调控通路之一,但 ACSL4 在血管钙化相关的铁死亡通路中的作用尚不清楚。因此,本研究旨在探讨 ACSL4 对血管钙化的调控作用及其介导途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

选取 4 只无特定病原体级、体重 250~300 g 的雄性 SD 大鼠、60 只 6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠作为研究对象,实验动物均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供[许可证号:SCXK(京)2024-0003]。本研究的动物实验过程遵照我国实验动物相关法律法规要求进行,已通过陆军军医大学实验动物福利伦理委

员会批准(审批号:AMUWEC20245285)。

#### 1.1.2 试剂

1%青/链霉素(货号:C0222)、钙含量显色检测试剂盒(货号:S1063S)、免疫染色通透液(货号:P0096)、二甲基亚砜(货号:ST038)、BCA 蛋白测定试剂盒(货号:P0012S)、DAPI 染液(货号:C1006)、脱脂奶粉(货号:P0216)、TBS 粉剂(货号:ST665)、RUNX2(货号:AF2593)、OPN(货号:AF7665)购自上海碧云天生物技术有限公司;低糖培养基(货号:G4520-500ML)购自武汉赛维尔生物技术有限公司;Von Kossa 试剂盒(货号:G3282)购自北京索莱宝生物技术有限公司;胎牛血清(货号:16010159)、0.25%胰蛋白酶消化液(货号:25200056)购自美国 Gibco 公司;蓖麻油(货号:C110662)、Ferrostatin-1(货号:F129882)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;胶原酶(货号:C0130)、弹性蛋白酶(货号:E7885)、维生素 D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>, 货号:47763)、异氟烷(货号:1349003)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;山羊抗鼠二抗(货号:AS059)、山羊抗兔二抗(货号:AS014)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;Prgl493(货号:T35666)购自美国 TargetMol 公司;Elabscience<sup>®</sup>细胞亚铁比色法测试盒(货号:E-BC-K881-M)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;C11-BODIPY-581/591(货号:MX5211)购自上海懋康生物科技有限公司; $\beta$ -actin 一抗(货号:66009)购自武汉三鹰生物技术有限公司;ACSL4 一抗(货号:ab155282)购自英国 Abcam 公司;SM22 $\alpha$  一抗(货号:GT336)购自美国 Genetex 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 实验动物分组及干预方法

动物实验分为两个部分。(1)选取 24 只 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠,采用简单随机法分为对照组和 VD<sub>3</sub> 组,每组 12 只。每组取 6 只小鼠的主动脉检测相关蛋白表达,剩余 6 只用于制作冰冻切片。(2)选取 36 只 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠,采用简单随机法分为对照组、VD<sub>3</sub> 组和 Prgl493 组,每组 12 只。每组取 6 只小鼠的主动脉检测相关蛋白表达,剩余 6 只用于制作冰冻切片。VD<sub>3</sub> 组小鼠连续 3 d 腹腔注射  $5 \times 10^5$  IU/kg VD<sub>3</sub> 溶液;Prgl493 组小鼠连续 3 d 腹腔注射  $5 \times 10^5$  IU/kg VD<sub>3</sub> 和 10 mg/kg Prgl493 溶液;对照组小鼠连续 3 d 腹腔注射等量 0.9%氯化钠溶液。7 d 后,采用异氟烷麻醉小鼠并处死取材。

#### 1.2.2 细胞实验分组及干预方法

细胞实验分为 3 个部分。(1)将细胞分为对照组( $n=4$ )和高磷组( $n=4$ )。对照组在含 2%胎牛血清的低糖培养基中培养;高磷组在对照组培养基的基础上加入 2.8 mmol/L 磷酸盐处理。(2)将细胞分为对

对照组( $n=4$ )、高磷组( $n=4$ )和过表达组( $n=4$ )。对照组及高磷组转染携带空载体的慢病毒,过表达组转染携带 ACSL4 基因的慢病毒。转染 48 h 后,对照组在含 2% 胎牛血清的低糖培养基中培养;高磷组及过表达组在对照组培养基的基础上加入 2.8 mmol/L 磷酸盐处理。(3)将细胞分为高磷组( $n=4$ )、过表达组( $n=4$ )和 Ferrostatin-1 组(Fer-1 组, $n=4$ )。高磷组转染携带空载体的慢病毒,过表达组及 Fer-1 组转染携带 ACSL4 基因的慢病毒。转染 48 h 后,高磷组及过表达组在含 2% 胎牛血清的低糖培养基中加入 2.8 mmol/L 磷酸盐培养;Fer-1 组在过表达组的基础上加入 2  $\mu$ mol/L 的铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 处理。

### 1.2.3 原代细胞分离与培养

选取 4 只雄性 SD 大鼠,异氟烷麻醉后,于超净工作台下剪开胸腔充分暴露主动脉。在主动脉弓起始端和膈主动脉处分别剪断,取出主动脉。采用 I 型胶原酶消化法分离血管平滑肌细胞。去除主动脉内皮、外膜及脂肪组织后,将组织置于含 2 mg/mL I 型胶原酶和 2 mg/mL 弹性蛋白酶的消化液中,37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下消化 90 min。消化后的细胞悬液经 1 000 r/min 离心 5 min,将细胞接种于低糖培养基培养。实验使用 3~10 代、融合度约为 80% 的血管平滑肌细胞。

### 1.2.4 Western blot 检测相关蛋白表达

细胞或小鼠主动脉组织匀浆后,加入裂解缓冲液提取总蛋白。加入上样缓冲液,煮沸变性。取适量变性蛋白标本进行凝胶上样,依次完成电泳分离与转膜操作。转膜后以 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。加入兔抗 RUNX2(稀释比例 1:500)、兔抗 OPN(稀释比例 1:500)、兔抗 ACSL4(稀释比例 1:10 000)、鼠抗 SM22 $\alpha$ (稀释比例 1:5 000)、鼠抗  $\beta$ -actin(稀释比例 1:500)的一抗,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBST 洗涤后,加入山羊抗兔(稀释比例 1:2 000)、山羊抗鼠(稀释比例 1:2 000)的相应二抗,室温孵育 2 h。TBST 洗涤后滴加增强化学发光显影液显影,使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

### 1.2.5 Von Kossa 染色

将小鼠主动脉冰冻切片(厚度:6  $\mu$ m)或细胞爬片,用 4% 多聚甲醛固定,洗涤后按 Von Kossa 试剂盒步骤染色,光镜下观察。

### 1.2.6 免疫荧光染色

将细胞爬片或小鼠主动脉冰冻切片,分别用 4% 多聚甲醛固定 15 min 或 48 h、免疫染色通透液透化 15 min 或 30 min,室温封闭 1 h。滴加 1:5 000 兔抗 ACSL4 一抗,于 4  $^{\circ}$ C 环境下孵育过夜。在避光条件下滴加荧光二抗,室温孵育 1 h。DAPI 复染核 5 min

后封片,激光共聚焦显微镜拍摄图像。

### 1.2.7 细胞内钙含量测量

将细胞或小鼠主动脉组织用 0.6 mol/L 盐酸脱钙处理。收集脱钙上清液,采用钙含量显色检测试剂盒检测钙含量,同时采用 BCA 蛋白测定试剂盒测定标本蛋白水平。钙含量结果以蛋白浓度进行标准化校正。

### 1.2.8 细胞内亚铁离子(Fe<sup>2+</sup>)水平测量

收集 6 孔板中各组细胞,采用 Elabscience<sup>®</sup> 细胞亚铁比色法测试盒检测铁水平,依据试剂盒说明书的操作流程,规范完成各项实验步骤。

### 1.2.9 细胞脂质过氧化水平测量

将接种于激光共聚焦培养皿的细胞按分组干预后,采用预热的无血清培养基洗涤,加入含 C11-BODIPY-581/591 工作液的无血清培养基,避光孵育 30 min。吸除工作液,采用预冷 PBS 洗涤 3 次,去除游离探针,采用 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 2 次。激光共聚焦显微镜下观测染料氧化态(激发光 510 nm)和还原态(激发光 585 nm)荧光,采用氧化态与还原态荧光强度比值代表脂质过氧化水平,比较各组差异。

### 1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism9.5.0 软件进行数据分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间比较采用非配对  $t$  检验,多组间比较采用单因素方差分析;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

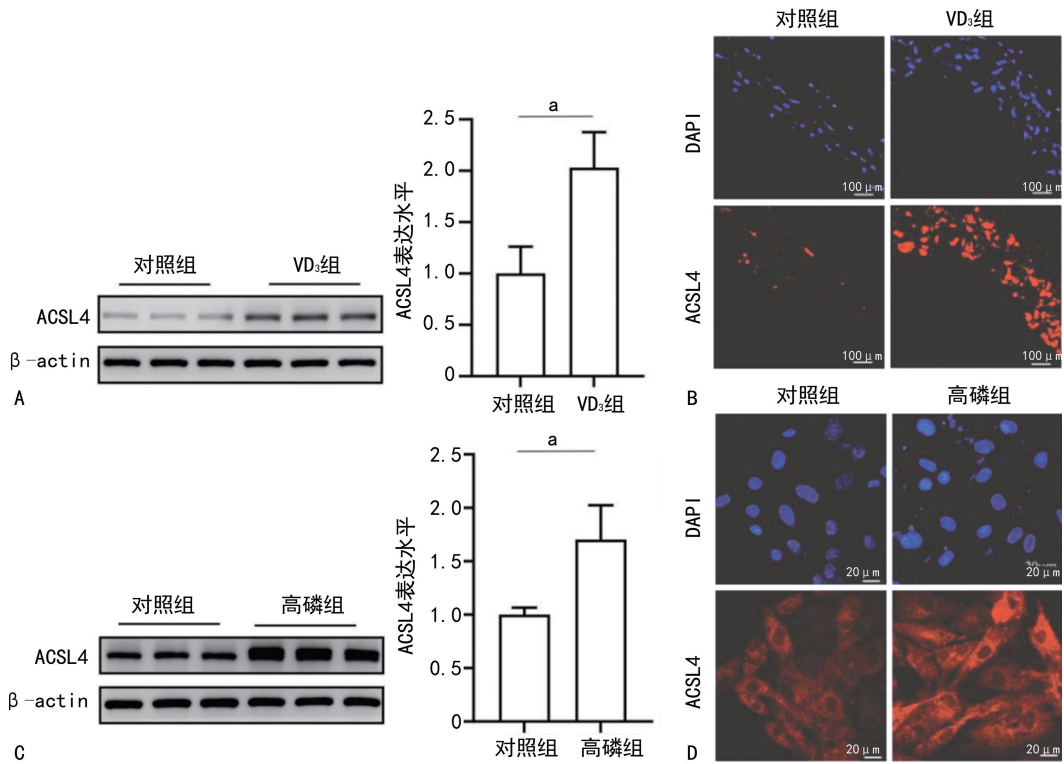
## 2 结 果

### 2.1 ACSL4 在血管钙化过程中表达升高

Western blot 结果显示,与对照组比较,VD<sub>3</sub> 组和高磷组 ACSL4 表达水平明显升高( $P < 0.05$ );免疫荧光染色显示,与对照组比较,VD<sub>3</sub> 组和高磷组 ACSL4 荧光强度增强,见图 1。

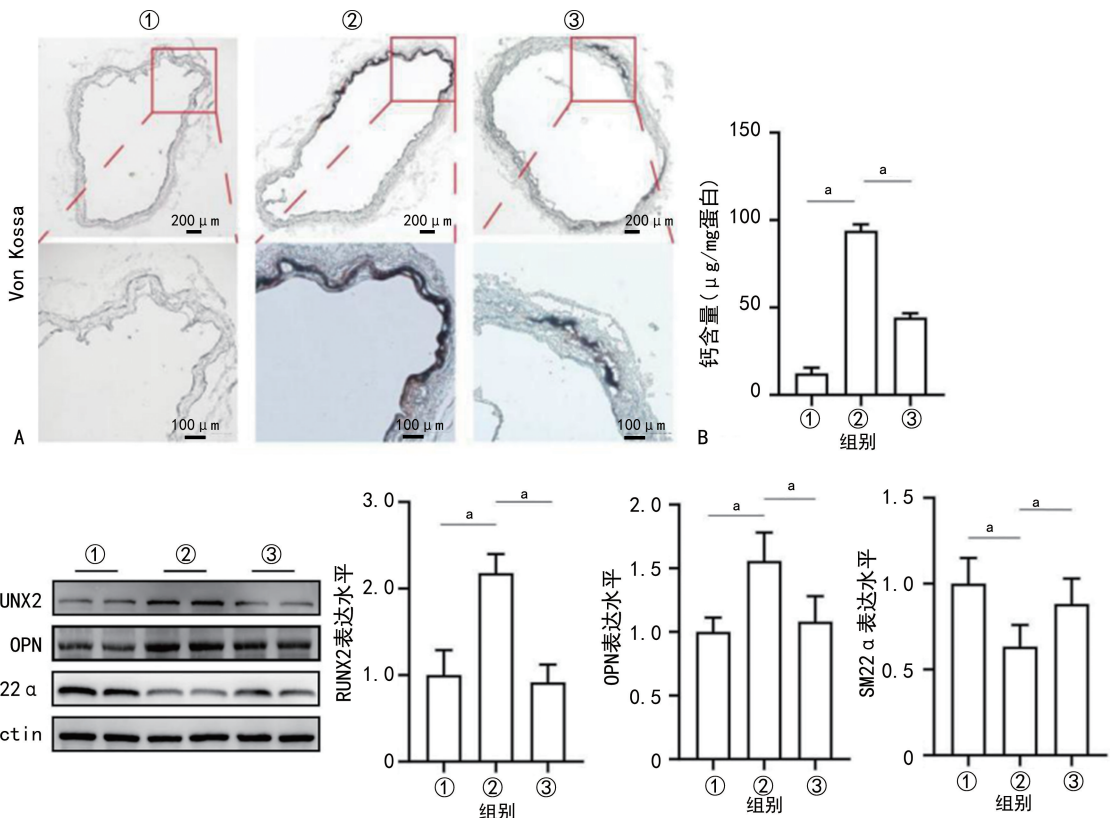
### 2.2 药理抑制 ACSL4 可改善 VD<sub>3</sub> 诱导的小鼠血管钙化

Von Kossa 染色结果显示,与对照组比较,VD<sub>3</sub> 组主动脉中膜可见弥漫性棕黑色钙盐沉积斑块,染色呈强阳性;与 VD<sub>3</sub> 组比较,Prg1493 组主动脉中膜钙化灶明显减少,仅见局灶性淡棕色沉积斑块,钙化范围及强度明显减弱,见图 2A。钙含量检测结果显示,与对照组比较,VD<sub>3</sub> 组钙含量明显增加( $P < 0.05$ );与 VD<sub>3</sub> 组比较,Prg1493 组钙含量明显降低( $P < 0.05$ ),见图 2B。Western blot 结果显示,与对照组比较,VD<sub>3</sub> 组 RUNX2、OPN 表达水平明显升高,SM22 $\alpha$  表达水平明显降低( $P < 0.05$ );与 VD<sub>3</sub> 组比较,Prg1493 组 RUNX2、OPN 表达水平明显降低,SM22 $\alpha$  表达水平明显升高( $P < 0.05$ ),见图 2C。



A: Western blot 检测对照组和 VD<sub>3</sub> 组小鼠主动脉组织 ACSL4 表达及定量分析图; B: 免疫荧光染色检测对照组和 VD<sub>3</sub> 组小鼠主动脉组织 ACSL4(红色)表达定位; C: Western blot 检测对照组和高磷组细胞 ACSL4 表达及定量分析图; D: 免疫荧光染色检测对照组和高磷组小鼠主动脉组织 ACSL4(红色)表达定位; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ 。

图 1 血管钙化过程中 ACSL4 表达变化



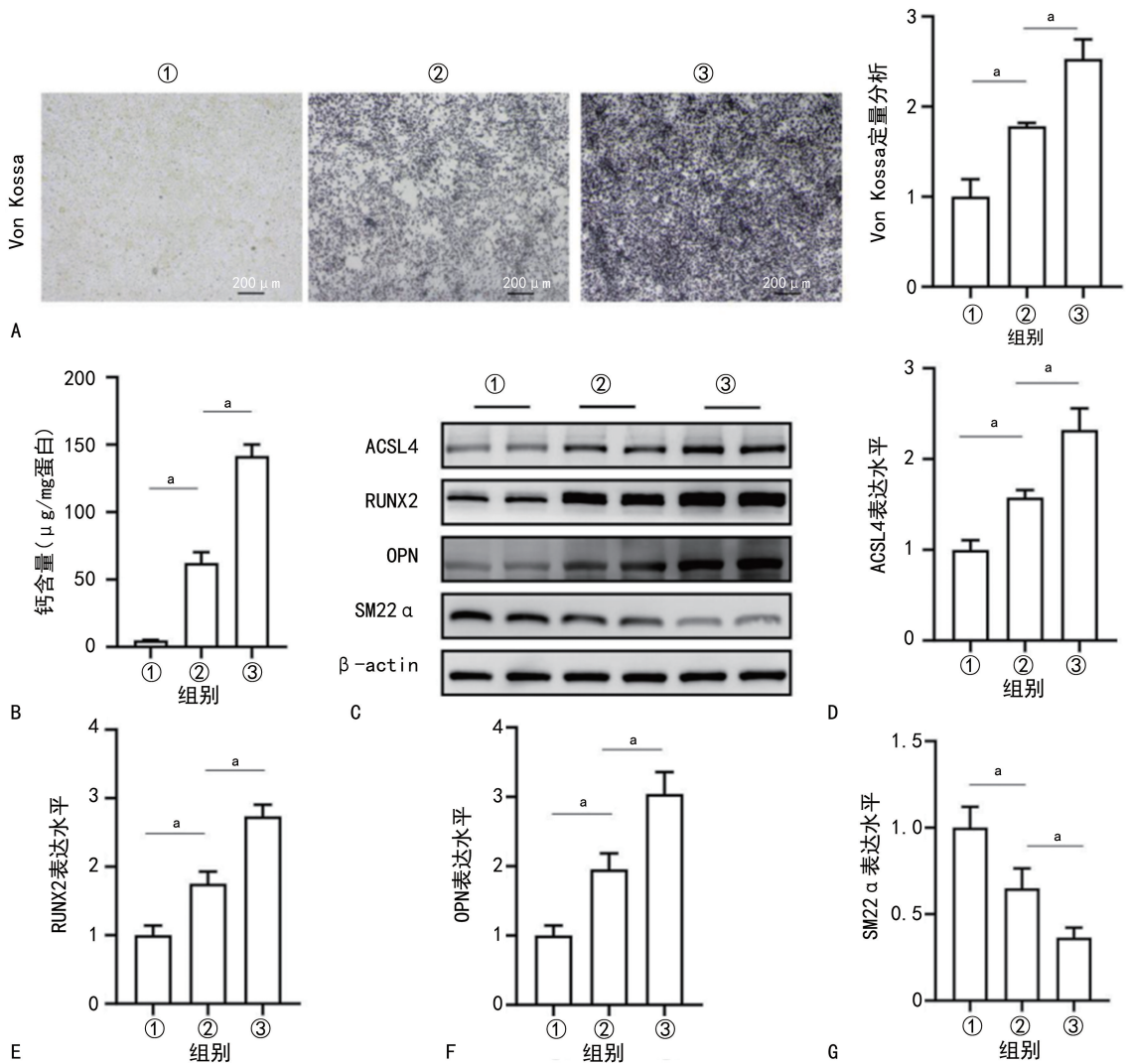
A: 对照组、VD<sub>3</sub> 组和 Prg1493 组小鼠主动脉组织 Von Kossa 染色; B: 对照组、VD<sub>3</sub> 组和 Prg1493 组小鼠主动脉组织钙含量定量分析图; C: Western blot 检测各组小鼠主动脉组织 RUNX2、OPN、SM22 $\alpha$  表达及定量分析图; ①: 对照组; ②: VD<sub>3</sub> 组; ③: Prg1493 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ 。

图 2 ACSL4 抑制剂逆转 VD<sub>3</sub> 诱导的小鼠病理过程

### 2.3 过表达 ACSL4 可促进大鼠血管平滑肌细胞钙化

Von Kossa 染色结果显示,与对照组比较,高磷组可见散在的棕黑色钙盐沉积颗粒,钙盐沉积面积的百分比明显升高( $P < 0.05$ );与高磷组比较,过表达组钙盐沉积颗粒数量进一步增多,染色深度进一步加深,钙盐沉积面积的百分比进一步升高( $P < 0.05$ ),见图 3A。钙含量检测结果显示,与对照组比较,高磷组

钙含量明显增加( $P < 0.05$ );与高磷组比较,过表达组钙含量进一步增加( $P < 0.05$ ),见图 3B。Western blot 结果显示,与对照组比较,高磷组 ACSL4、RUNX2、OPN 表达水平明显升高,SM22 $\alpha$  表达水平明显降低( $P < 0.05$ );与高磷组比较,过表达组 ACSL4、RUNX2、OPN 表达水平进一步升高,SM22 $\alpha$  表达水平进一步降低( $P < 0.05$ ),见图 3C~G。



A: 对照组、高磷组和过表达组细胞 Von Kossa 染色及定量分析图; B: 对照组、高磷组和过表达组细胞钙含量定量分析图; C~G: Western blot 检测对照组、高磷组和过表达组细胞 ACSL4、RUNX2、OPN、SM22 $\alpha$  表达及定量分析图; ①: 对照组; ②: 高磷组; ③: 过表达组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ 。

图 3 过表达 ACSL4 对大鼠血管平滑肌细胞钙化的影响

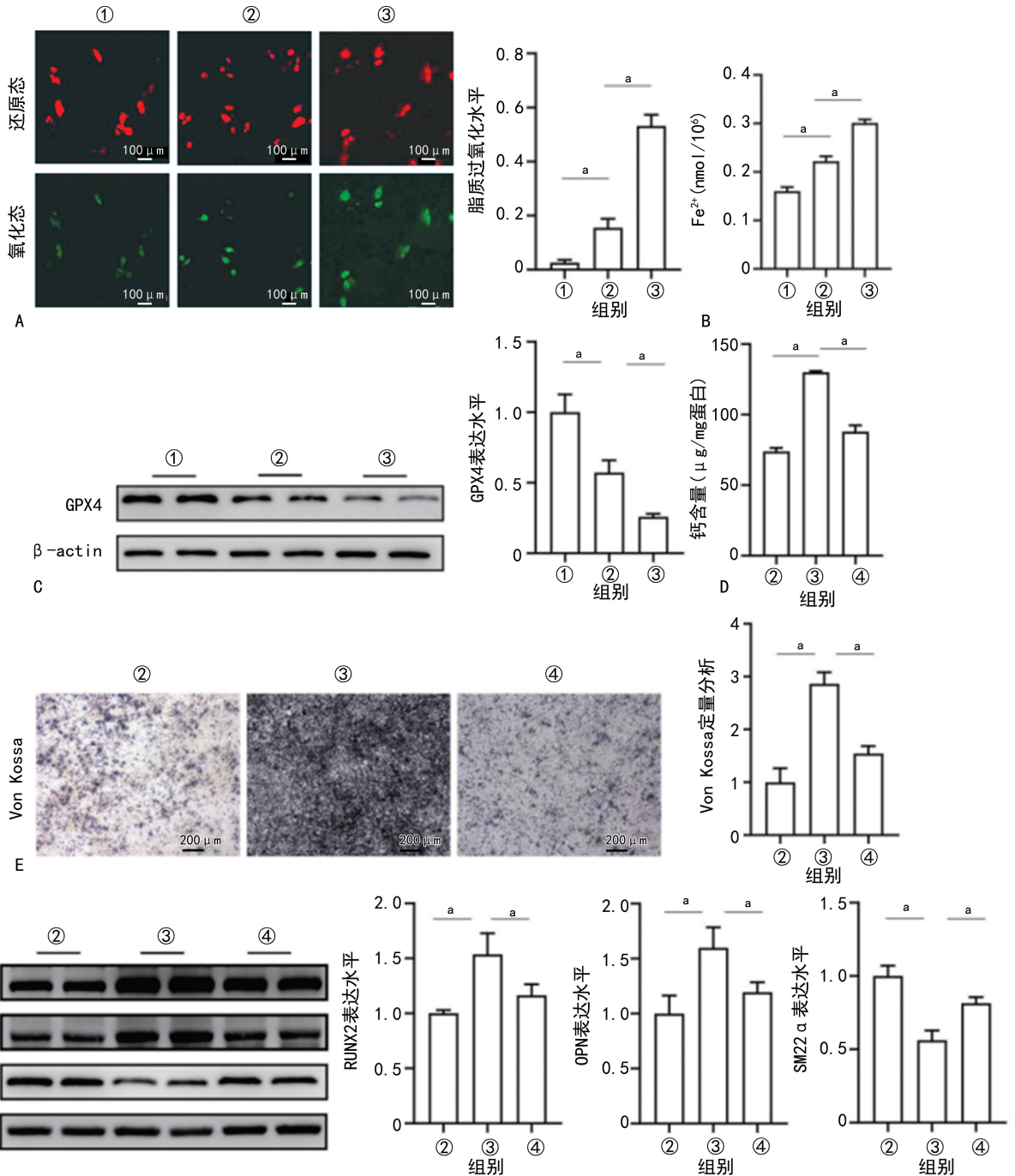
### 2.4 ACSL4 通过铁死亡促进血管钙化

C11-BODIPY-581/591 染色结果显示,与对照组比较,高磷组绿色荧光强度明显增强,红色荧光强度明显减弱,脂质过氧化水平明显升高( $P < 0.05$ );与高磷组比较,过表达组绿色荧光强度进一步增强,红色荧光强度进一步减弱,脂质过氧化水平进一步升高( $P < 0.05$ ),见图 4A。Fe<sup>2+</sup> 检测结果显示,与对照组比较,高磷组 Fe<sup>2+</sup> 水平明显提高( $P < 0.05$ );与高磷组比较,过表达组 Fe<sup>2+</sup> 水平进一步提高( $P < 0.05$ ),

见图 4B。Western blot 结果显示,与对照组比较,高磷组 GPX4 表达水平明显降低( $P < 0.05$ );与高磷组比较,过表达组 GPX4 表达水平进一步降低( $P < 0.05$ ),见图 4C。钙含量检测结果显示,与高磷组比较,过表达组钙含量明显增加( $P < 0.05$ );与过表达组比较, Fer-1 组钙含量明显减少( $P < 0.05$ ),见图 4D。Von Kossa 染色结果显示,与高磷组比较,过表达组可见弥漫性钙盐沉积颗粒,钙盐沉积面积的百分比明显升高( $P < 0.05$ );与过表达组比较, Fer-1 组仅见散

在钙盐沉积颗粒, 钙盐沉积面积的百分比明显降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 4E。Western blot 结果显示, 与高磷组比较, 过表达组 RUNX2、OPN 表达水平明显升

高, SM22 $\alpha$  表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ ), 与过表达组比较, Fer-1 组 RUNX2、OPN 表达水平明显降低, SM22 $\alpha$  表达水平明显升高 ( $P < 0.05$ ), 见图 4F。



A: C11-BODIPY-581/591 检测对照组、高磷组和过表达组细胞内脂质过氧化水平及定量分析图; B: 对照组、高磷组和过表达组细胞 Fe<sup>2+</sup> 水平检测结果; C: Western blot 检测对照组、高磷组和过表达组细胞 GPX4 表达及定量分析图; D: 高磷组、过表达组和 Fer-1 组细胞钙含量检测结果; E: 高磷组、过表达组和 Fer-1 组细胞 Von Kossa 染色及定量分析图; F: Western blot 检测高磷组、过表达组和 Fer-1 组细胞 RUNX2、OPN、SM22 $\alpha$  表达及定量分析图; ①: 对照组; ②: 高磷组; ③: 过表达组; ④: Fer-1 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.05$ 。

图 4 ACSL4 促进血管钙化依赖铁死亡途径

### 3 讨论

ACSL4 与心血管损伤有关, 有研究分析了 40 例人冠状动脉标本, 发现 ACSL4 在动脉粥样硬化晚期表达水平上调, 且与病变严重程度呈正相关<sup>[15]</sup>。本研究发现, VD<sub>3</sub> 组及高磷组大鼠血管平滑肌中 ACSL4 表达水平明显升高, 表明 ACSL4 可能参与血管钙化

进程。血管钙化中 ACSL4 表达调控机制尚不清楚, 但其可能受 miR-205、miR-20a-5p 等非编码 RNA<sup>[16-18]</sup> 及特异性蛋白 1<sup>[19]</sup>、蛋白激酶 C $\beta$  II<sup>[20]</sup> 和蛋白酪氨酸磷酸酶 2<sup>[21]</sup> 等蛋白调控。ACSL4 是调节 PUFA 代谢的关键同工酶, 能将游离 PUFA 整合至磷脂中。富含 PUFA 的磷脂是细胞内脂质氧化的主

要来源。当抗氧化系统无法清除蓄积的脂质过氧化物时,会导致膜氧化损伤及细胞死亡。应用 ACSL4 强效选择性抑制剂 Prg1493 可部分减轻主动脉弓缩窄术后小鼠的心肌肥厚,降低心肌肥厚标志物表达并改善心室功能<sup>[22]</sup>。本研究显示,Prg1493 处理明显减少小鼠主动脉中膜钙化灶形成、降低主动脉钙含量,同时降低 RUNX2、OPN 表达并升高 SM22 $\alpha$  表达,表明抑制 ACSL4 活性可在一定程度上缓解血管钙化。然而,体外过表达 ACSL4 会增加钙盐沉积及细胞内钙含量,提升 RUNX2、OPN 水平并降低 SM22 $\alpha$  表达水平,提示 ACSL4 能促进血管钙化。此外,ACSL4 抑制剂在多种疾病中显示潜在治疗价值,如罗格列酮改善糖尿病肾病小鼠肾功能<sup>[23]</sup>、阿贝西利(Abemaciclib)减轻非酒精性脂肪性肝病症状<sup>[24]</sup>,由此推测此类抑制剂也可能在一定程度上抑制血管钙化。

铁死亡是一种铁依赖性、非凋亡的调节性细胞死亡,脂质过氧化和铁沉积是其典型生物学标志<sup>[25]</sup>。ACSL4 是决定细胞铁死亡易感性的核心调控因子<sup>[26]</sup>,主要重塑膜磷脂组成<sup>[27]</sup>。ACSL4 优先活化  $\omega$ -6 PUFA[如 AA 和肾上腺酸(adrenic acid, AdA)],生成相应酰辅酶 A(coenzyme A, CoA)<sup>[28]</sup>。随后,AA-CoA 和 AdA-CoA 在溶血磷脂酰胆碱酰基转移酶 3(lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 的催化下掺入膜磷脂,生成 AA-磷脂酰乙醇胺(Phosphatidylethanolamine, PE)和 AdA-PE<sup>[29]</sup>。这些分子可被 LOX 或细胞色素 P450 还原酶氧化为 AA/AdA-PE-OOH<sup>[30]</sup>。当 GPX4/GSH 抗氧化通路功能不足时,PE-OOH 累积导致膜结构损伤并最终触发细胞死亡。铁死亡在心肌病<sup>[31]</sup>、心肌缺血<sup>[32]</sup>及动脉粥样硬化<sup>[33]</sup>等心血管疾病中发挥了重要作用,但尚不明确 ACSL4 是否通过铁死亡参与血管钙化。本研究发现,过表达 ACSL4 会升高细胞内脂质过氧化水平、Fe<sup>2+</sup> 水平,降低 GPX4 表达,提示铁死亡水平升高;Ferrostatin-1 处理可逆转 ACSL4 过表达对血管钙化的促进作用。这些结果表明 ACSL4 通过促进铁死亡加重血管钙化。

ACSL4 作为铁死亡脂质重塑通路的关键上游酶,通过调控 PUFA-PE 底物库的形成决定细胞对脂质过氧化的易感性,是潜在的临床干预靶点。与单纯清除活性氧不同,靶向 ACSL4 属于“源头调控”策略,可通过减少可被氧化的磷脂底物,从根本上抑制铁死亡相关的膜损伤过程。本研究表明,ACSL4 抑制剂对血管钙化有治疗作用,这与 ACSL4 抑制剂在其他多种疾病中的作用一致<sup>[34]</sup>,这为其临床前转化提供了初步依据。另一方面,现有抑制剂的选择性和靶点特异性仍需优化,以推动靶向 ACSL4 策略向临床应用转化。本研究尚存在不足,例如未阐明血管钙化过程中 ACSL4 升高的机制,且体内实验仅使用了抑制剂,未采用 ACSL4 特异性敲除小鼠,难以完全排除药物的脱靶效应,后续有必要进一步探究,以完善该通路的理论体系。

综上所述,ACSL4 通过诱导铁死亡途径驱动血管钙化,靶向 ACSL4 的治疗策略为血管钙化提供了新方向。

**利益冲突:**所有作者声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] COZZOLINO M, CICERI P, GALASSI A, et al. The key role of phosphate on vascular calcification [J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(4): 213.
- [2] ZHANG T T, ZHU M M, MA J L, et al. Moscatilin inhibits vascular calcification by activating IL13RA2-dependent inhibition of STAT3 and attenuating the WNT3/ $\beta$ -catenin signalling pathway [J]. *J Adv Res*, 2025, 68: 445-457.
- [3] YANG S Q, ZENG Z L, YUAN Q, et al. Vascular calcification: from the perspective of crosstalk [J]. *Mol Biomed*, 2023, 4(1): 35.
- [4] LIU W, ZHANG Y, YU C M, et al. Current understanding of coronary artery calcification [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2015, 12(6): 668-675.
- [5] LIN X, XIANG Q Y, LI S, et al. BMF-AS1/BMF promotes diabetic vascular calcification and aging both in vitro and in vivo [J]. *Aging Dis*, 2023, 14(1): 170-183.
- [6] BOSTROM K, WATSON K E, HORN S, et al. Bone morphogenetic protein expression in human atherosclerotic lesions [J]. *J Clin Invest*, 1993, 91(4): 1800-1809.
- [7] WATSON K E, BOSTROM K, RAVINDRANATH R, et al. TGF-beta 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(5): 2106-2113.
- [8] ZHOU X, ZHAO R, LV M F, et al. ACSL4 promotes microglia-mediated neuroinflammation by regulating lipid metabolism and VGLL4 expression [J]. *Brain Behav Immun*, 2023, 109: 331-343.
- [9] KUWATA H, NAKATANI E, SHIMBARA-MATSUBAYASHI S, et al. Long-chain acyl-CoA synthetase 4 participates in the formation of highly unsaturated fatty acid-containing phospholipids in murine macrophages [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(11): 1606-1618.
- [10] 高洋, 秦合伟, 刘丹丹. ACSL4 介导铁死亡及在动脉粥样硬化性心脏病中的潜在作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2025, 29(6): 1239-1247.
- [11] GU Y L, LI Y Z, WANG J X, et al. Targeting ferroptosis: paving new roads for drug design and discovery [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 247:

- 115015.
- [12] STOCKWELL B R, FRIEDMANN ANGELI J P, BAYIR H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease[J]. *Cell*, 2017, 171(2): 273-285.
- [13] CHEN X, LI J B, KANG R, et al. Ferroptosis: machinery and regulation [J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2054-2081.
- [14] YE Y Z, CHEN A, LI L, et al. Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification [J]. *Kidney Int*, 2022, 102(6): 1259-1275.
- [15] ZHOU Y Q, ZHOU H X, HUA L, et al. Verification of ferroptosis and pyroptosis and identification of PTGS2 as the hub gene in human coronary artery atherosclerosis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 171: 55-68.
- [16] SUN W X, WU X, YU P, et al. LncAABR-07025387. 1 enhances myocardial ischemia/reperfusion injury via miR-205/ACSL4-mediated ferroptosis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 672391.
- [17] SHI L, SONG Z X, LI Y Z, et al. MiR-20a-5p alleviates kidney ischemia/reperfusion injury by targeting ACSL4-dependent ferroptosis[J]. *Am J Transplant*, 2023, 23(1): 11-25.
- [18] MA L L, LIANG L, ZHOU D, et al. Tumor suppressor miR-424-5p abrogates ferroptosis in ovarian cancer through targeting ACSL4 [J]. *Neoplasia*, 2021, 68(1): 165-173.
- [19] ORLANDO U, COOKE M, CORNEJO MACIEL F, et al. Characterization of the mouse promoter region of the acyl-CoA synthetase 4 gene; role of Sp1 and CREB[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 369(1/2): 15-26.
- [20] ZHANG H L, HU B X, LI Z L, et al. PKC $\beta$  II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(1): 88-98.
- [21] COOKE M, ORLANDO U, MALOBERTI P, et al. Tyrosine phosphatase SHP2 regulates the expression of acyl-CoA synthetase ACSL4[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(11): 1936-1948.
- [22] BI X K, WU X T, CHEN J Q, et al. Characterization of ferroptosis-triggered pyroptotic signaling in heart failure [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 257.
- [23] MA Y J, ZHANG X H, ALSAIDAN O A, et al. Long-chain Acyl-CoA synthetase 4-mediated fatty acid metabolism sustains androgen receptor pathway-independent prostate cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 19(1): 124-135.
- [24] DUAN J J, WANG Z, DUAN R, et al. Therapeutic targeting of hepatic ACSL4 ameliorates NASH in mice [J]. *Hepatology*, 2022, 75(1): 140-153.
- [25] 郑薪汝, 吴静娴, 段玉印. GPX4 调控动脉粥样硬化相关的巨噬细胞铁死亡的研究进展[J]. *重庆医学*, 2025, 54(12): 2915-2920.
- [26] ZHOU J J, SHI Y G, JIAN Y L, et al. Identification of key ferroptosis genes in hepatocellular carcinoma and type 2 diabetes mellitus through bioinformatics analysis[J]. *Discov Oncol*, 2025, 16(1): 916.
- [27] TANG D L, CHEN X, KANG R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications[J]. *Cell Res*, 2021, 31(2): 107-125.
- [28] GE C, ZHANG S J, MU H W, et al. Emerging mechanisms and disease implications of ferroptosis: potential applications of natural products [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 774957.
- [29] TIAN H Y, HUANG B Y, NIE H F, et al. The interplay between mitochondrial dysfunction and ferroptosis during ischemia-associated central nervous system diseases [J]. *Brain Sci*, 2023, 13(10): 1367.
- [30] JIN R, DAI Y, WANG Z, et al. Unraveling ferroptosis: a new frontier in combating renal fibrosis and CKD progression [J]. *Biology (Basel)*, 2024, 14(1): 12.
- [31] WANG X, CHEN X X, ZHOU W Q, 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.
- [32] ZHANG C H, YAN Y J, LUO Q. The molecular mechanisms and potential drug targets of ferroptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Life Sci*, 2024, 340: 122439.
- [33] GUO Y, LU C J, HU K, et al. Ferroptosis in cardiovascular diseases: current status, challenges, and future perspectives [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(3): 390.
- [34] DING K Y, LIU C B, LI L, et al. Acyl-CoA synthetase ACSL4: an essential target in ferroptosis and fatty acid metabolism [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2023, 136(21): 2521-2537.