

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.03.0239

论著

基于铁死亡通路的高糖诱导人肾小管上皮细胞损伤的机制研究

曾晓娇, 田玲, 张景云

(天津医科大学朱宪彝纪念医院、天津市内分泌研究所、国家卫健委激素与发育重点实验室、天津市代谢性疾病重点实验室, 天津 300134)

摘要 目的:探讨铁死亡对高糖损伤人肾小管上皮(HK-2)细胞的影响。方法:将 HK-2 细胞系分为正常对照组(Ctrl)、高糖组(HG)、甘露醇组(MA)和高糖+Ferrostatin-1 组(HG+Fer-1)。试剂盒检测细胞内活性氧簇(ROS)、铁离子(Fe²⁺)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)水平。透射电子显微镜观察细胞内线粒体形态学变化。qPCR 和 Western 印迹检测溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、谷胱甘肽-S-转氨酶(GCLC)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、转铁蛋白受体 1(TFR-1)mRNA 和蛋白表达。结果:与 Ctrl 组相比,HG 组细胞内 ROS、Fe²⁺ 和 MDA 水平升高($F=17.72, 14.33, 39.53$, 均 $P<0.01$), GSH 含量下降($F=18.24, P<0.001$);线粒体嵴断裂和膜密度增加;SLC7A11、GPX4 和 GCLC mRNA 水平降低($F=22.22, 19.43, 22.3$, 均 $P<0.001$), TFR-1 mRNA 水平升高($F=10.01, P<0.01$);SLC7A11、GPX4 和 GCLC 蛋白水平降低($F=12.74, 18.79, 17.49$, 均 $P<0.01$), TFR-1 蛋白水平升高($F=15.08, P<0.01$)。与 HG 组相比,HG+Fer-1 组细胞内 ROS、Fe²⁺ 和 MDA 水平降低($P<0.05, P<0.01, P<0.001$), GSH 含量增加($P<0.01$);线粒体形态恢复正常;SLC7A11、GPX4 和 GCLC mRNA 水平上调($P<0.01, P<0.01, P<0.001$), TFR-1 mRNA 水平下调($P<0.05$);SLC7A11、GPX4 和 GCLC 蛋白水平上调(均 $P<0.01$), TFR-1 蛋白水平下调($P<0.01$)。结论:高糖诱导 HK-2 细胞铁死亡,促进细胞损伤。

关键词 肾小管上皮细胞;Ferrostatin-1;高糖;铁死亡

中图分类号 R587.1

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)03-0239-06

Exploring the mechanism of high glucose-induced injury in human renal tubular epithelial cells based on the ferroptosis pathway

ZENG Xiaojiao, TIAN Ling, ZHANG Jingyun

(NHC Key Laboratory of Hormones and Development, Tianjin Key Laboratory of Metabolic Diseases, Chu Hsien-I Memorial Hospital & Tianjin Institute of Endocrinology, Tianjin Medical University, Tianjin 300134, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of ferroptosis on high-glucose injured human renal tubular epithelial (HK-2) cells. **Methods:** HK-2 cell line was divided into four groups: normal control group (Ctrl), high glucose group (HG), mannitol group (MA), and high glucose+Ferrostatin-1 group (HG+Fer-1). The reagent kit was used to detect intracellular levels of reactive oxygen species (ROS), iron ions (Fe²⁺), malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH). Transmission electron microscopy was performed to observe the morphological changes of intracellular mitochondria. qPCR and Western blotting were performed to detect the mRNA and protein expression of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), glutathione peroxidase 4 (GPX4), glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), and transferrin receptor 1 (TFR-1). **Results:** Compared with the Ctrl group, the HG group exhibited increased levels of ROS, Fe²⁺ and MDA ($F=17.72, 13.2, 39.53$, all $P<0.01$) and decreased level of GSH ($F=18.24, P<0.001$); mitochondrial cristae rupture and membrane density were increased; SLC7A11, GPX4 and GCLC mRNA levels were decreased ($F=22.22, 19.43, 22.3$, all $P<0.001$) and TFR-1 mRNA level was increased ($F=10.01, P<0.01$); SLC7A11, GPX4 and GCLC protein levels decreased ($F=12.74, 18.79, 17.49$, all $P<0.01$) and TFR-1 protein level was increased ($F=15.08, P<0.01$). Compared with the HG group, intracellular ROS, Fe²⁺ and MDA levels were decreased in the HG+Fer-1 group ($P<0.05, P<0.01, P<0.001$), GSH content was increased ($P<0.01$); mitochondrial morphology was returned to normal; SLC7A11, GPX4 and GCLC mRNA levels were upregulated ($P<0.01, P<0.01, P<0.001$), and TFR-1 mRNA levels were down-regulated ($P<0.05$); SLC7A11, GPX4 and GCLC protein levels were up-regulated (all $P<0.01$), and TFR-1 protein levels were down-regulated ($P<0.01$). **Conclusion:** High glucose induces ferroptosis and promotes cell injury in HK-2 cells.

Key words renal tubular epithelial cells; ferrostatin-1; high glucose; ferroptosis

作者简介 曾晓娇(1998-),女,硕士在读,研究方向:内分泌与代谢病;通信作者:张景云, E-mail: kathy Zhang2004@163.com。

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是一种严重的糖尿病微血管并发症,影响约 40%的糖尿病

患者,已成为全球终末期肾病的主要原因^[1]。由于其存在复杂的代谢紊乱,一旦发展到肾功能衰竭,往往比其他肾脏疾病的治疗更加棘手,造成卫生保健系统和社会巨大财政负担,然而目前临床上尚缺乏有效的防治手段^[2]。因此,深入研究 DN 的调控途径有望成为改变 DN 进程与结局的主要切入点,为寻找更为安全有效的防治策略提供有力的科学依据。DN 进展为慢性肾功能衰竭的最终途径是肾小球硬化和肾小管间质纤维化。研究表明,肾小管损伤在 DN 早期就已出现,可独立于肾小球病变直接导致肾功能恶化^[3]。在尿糖、尿蛋白、氧化应激等病理刺激下,肾小管上皮细胞发生慢性炎症以及纤维化等变化而促进肾功能衰竭^[4]。因此,肾小管上皮细胞被认为是治疗 DN 的关键。

糖尿病状态下,肾小管上皮细胞长期处于高糖环境,过度的氧化应激导致质膜活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)蓄积^[5]。过量的 ROS 攻击蛋白质、DNA 和脂质等生物大分子,导致不同形式的细胞死亡方式,包括自噬、凋亡和铁死亡^[6]。然而,影响糖尿病肾损伤的具体细胞死亡方式尚未明确。研究发现,铁超载能够触发芬顿反应,导致细胞内 ROS 积累,进一步促进 DN 发展^[7]。在 DN 患者和糖尿病小鼠的近端肾小管溶酶体中检测到铁沉积,其可导致肾组织功能障碍^[8-10]。低铁饮食或铁螯合剂治疗可以延缓大鼠 DN 的进展^[11]。此外,铁死亡促进肾缺血-再灌注损伤,并在其他急性肾损伤模型中发挥着重要作用,有效抑制铁死亡能够保护肾脏^[12]。因此,铁死亡这种以铁依赖性 ROS 积聚为特征的细胞死亡方式,为探索 DN 发病机制提供了一个新方向。本研究旨在揭示铁死亡对 DN 的重要作用,探索 DN 发生、发展的新机制,为 DN 治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 人肾小管上皮(HK-2)细胞购于中国科学院细胞库。DMEM 低糖/高糖培养基购自天津中奥天元科技有限公司(GIBCO)。胎牛血清(FBS)购于中国依科赛生物有限公司。青-链霉素抗生素、RIPA 裂解液、DAPI 溶液、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)检测试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司。Ferrostatin-1(Fer-1)购于美国 Selleck 生物技术有限公司。2.5%戊二醛购于上海如吉科技发展有限公司。四氧化钼、环氧树脂、乙酸铀酰和柠檬酸铅购于天津化学试剂一厂。蛋白 Marker 和即用型 BCA 蛋白定量试剂盒(ZJ102)购于上海雅酶生物医药科技有限公司。RNA 提取试剂盒(AC0202)购于山东思科捷生物技术公司。反转录试剂盒(CW2020)购

自康为世纪有限公司。2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 购自武汉 Abclonal 生物科技有限公司。DCFH-DA 和总铁(iron)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。SLC7A11 和 TFR-1 抗体购于美国 Affinity 公司。羊抗兔 IgG-HRP 购自武汉 Abclonal 生物科技有限公司。倒置荧光显微镜(奥林巴斯),H-500 型透射电镜(日立),曝光机(Tannon-5200),实时荧光定量 PCR 仪(Applied biosystems QuantStudio3)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将冻存于液氮罐内的 HK-2 细胞迅速取出,复苏于含 10%FBS、100 U/mL 的青霉素和链霉素的 DMEM 培养基中,置于含 5% CO₂ 的 37℃恒温箱中培养。当细胞生长至 80%左右密度时进行传代处理,将充分混匀的细胞悬液接种于洁净的孔板中。当细胞密度达到 70%左右时,将细胞随机分为正常对照组(Ctrl 组,含 5.5 mmol/L 葡萄糖),高糖组(HG 组,含 30 mmol/L 葡萄糖),甘露醇组(MA 组,含 5.5 mmol/L 葡萄糖+24.4 mmol/L 甘露醇)和高糖+Fer-1 组(HG+Fer-1 组,含 30 mmol/L 葡萄糖和 1 μmol/L Fer-1),24 h 观察细胞状态并更换培养基,48 h 后收集各组细胞。

1.2.2 细胞透射电子显微镜成像 将 HK-2 细胞培养于洁净的 10 cm² 大皿中,按照 1.2.1 细胞分组处理,收集细胞后用 2.5%的戊二醛常温固定 5 min,用细胞刮沿同一个方向轻柔刮下细胞,将细胞团挑起使其悬浮于固定液中。室温下用 1%四氧化钼固定液固定 2 h,在 50%~90%的乙醇中进行梯度脱水后包埋于环氧树脂中,60℃固化 48 h。制备 50 nm 的超薄切片,用 3%的乙酸铀酰-柠檬酸铅进行双染色,最后用透射电子显微镜观察并拍照。

1.2.3 细胞内 Iron、MDA、GSH 测定 收集各组干预完毕的细胞,通过超声细胞破碎仪将各组细胞均质化。将破碎的细胞匀浆置于低温高速离心机中,8 000 g 4℃离心 10 min,取上清,置冰上待测。使用即用型 BCA 蛋白定量试剂盒于 562 nm 波长测定蛋白浓度。根据 Iron、GSH 和 MDA 检测试剂盒的说明书,将上清液和足够的工作试剂转移到 96 孔板中,在 520、412、532 nm 处的吸光度分别对应 Iron、GSH 和 MDA 的光密度,最后用蛋白质浓度进行均一化校准。

1.2.4 ROS 测定 将 HK-2 细胞接种于提前放入盖玻片的孔板中,按照 1.2.1 做细胞分组处理。干预完毕后用无菌 PBS 轻柔清洗 2 遍,锡箔纸包裹进行避光处理。在黑暗条件下,加入用培养基稀释的

DCFH-DA 染液,移至 37℃恒温培养箱染色 30 min。染色完成后用 PBS 轻柔漂洗 3 次,每次 5 min。使用 4%多聚甲醛固定细胞 15 min 后加入 DAPI 染液避光染色 30 min,PBS 漂洗 3 次,每次 5 min。提前在载玻片上滴加适量的防荧光淬灭封片剂并做好标记,DAPI 染色结束后用镊子轻柔夹出孔板中的盖玻片,将有细胞的一面均匀附在载玻片上。在荧光显微镜下观察 ROS 荧光强度,使用 Image J 软件进行荧光强度定量分析。

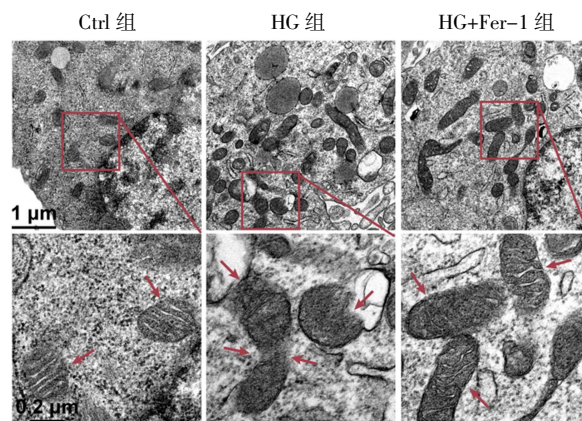
1.2.5 qPCR 检测 mRNA 水平 按照 1.2.1 做细胞分组处理,培养 48 h 后按照细胞 RNA 快速提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA。测定 RNA 浓度后,使用康为世纪快速去基因组逆转录预混液在冰盒上将 1 μ g RNA 逆转录为 cDNA。将逆转录的 cDNA 和 2 \times Universal SYBR Green Fast qPCR Mix 在冰上配制为 20 μ L qPCR 反应体系,每个样品设置 3 个复孔,彻底混匀后瞬时离心,将反应体系加入八连管中。随后将八连管放入实时荧光定量 PCR 仪,95℃预变性 3 min,随后 40 个循环(95℃变性 5 s,60℃重复和延伸 30 s),循环结束读取 CT 值。得到数据后以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算实验组各目的基因的相对表达量。目的基因引物序列:GAPDH 上游引物为 5'-GGCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游引物为 5'-GGTGGCACTGATGGCATGGAC-3';SLC7A11 上游引物为 5'-TGTGTTTCCTGTCTC-CAGGTTATTC-3',下游引物为 5'-GAGAAGAGAT-CACCATCGTCAGAG-3';GPX4 上游引物为 5'-A-GATCCACGAATGTCCCAAG-3',下游引物为 5'-CCTCCTCCTTAAACGCACAC-3';GCLC 上游引物为 5'-TCCAGGTGACATTCCAAGCC-3',下游引物为 5'-GAAATCACTCCCCAGCGACA-3';TFR-1 上游引物为 5'-TCGTGGAGACTACTTCCGT-GCTAC-3',下游引物为 5'-TCTTGGAGATACATA-GGGCGACAGG-3'。

1.2.6 Western 印迹 从恒温箱中取出干预完毕的细胞,在冰上加入 RIPA 裂解液获取各组蛋白样品,使用即用型 BCA 蛋白定量试剂盒测定每个样品的蛋白浓度,采用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离后转至 PVDF 膜上封闭 2 h。加入一抗 GAPDH (1:1 000)、SLC7A11 (1:1 000)、GPX4 (1:1 000)、GCLC (1:1 000) 和 TFR-1 (1:1 000) 于摇床上 4℃ 孵育过夜,使用 TBST 在摇床上室温洗 3 次,每次 5 min。加入羊抗兔 IgG-HRP 二抗于摇床上室温孵育 2 h, TBST 洗 3 次,每次 5 min。最后加入发光液在曝光机中显色曝光,使用 Image J 软件进行条带灰度扫描并分析。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 进行统计分析,各组实验独立重复 3 次,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较使用 ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制铁死亡对高糖诱导 HK-2 细胞中线粒体形态的影响 如图 1 所示, Ctrl 组细胞线粒体膜完整,线粒体嵴连续;HG 组细胞线粒体膜密度增加,线粒体嵴断裂甚至消失;经过 Fer-1 治疗有效缓解了高糖诱导 HK-2 细胞中线粒体形态的特征性变化。



注:Ctrl 组:正常对照组;HG 组:高糖组;HG+Fer-1 组:Fer-1 干预的高糖培养组

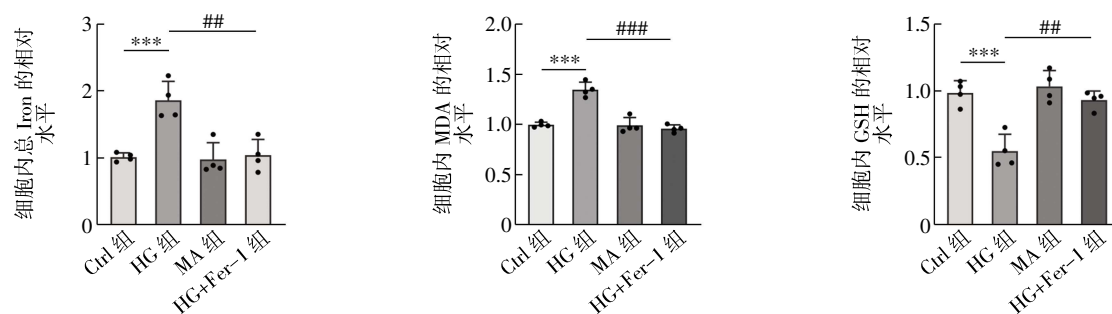
图 1 各组细胞线粒体超微结构的变化

Fig.1 Changes of mitochondrial ultrastructure in HK-2 cells of the indicated groups

2.2 高糖对 HK-2 细胞中 MDA、GSH 和 Iron 水平的影响 与 Ctrl 组相比,HG 组细胞中 Iron 和 MDA 的水平明显增加 ($F=14.33, 39.53$, 均 $P < 0.001$), GSH 含量显著减少 ($F=18.24, P < 0.001$);与 HG 组相比, HG+Fer-1 组细胞内 Iron 和 MDA 的水平下调 ($P < 0.01, P < 0.001$), GSH 含量上调 ($P < 0.01$)。相同渗透压的甘露醇并不影响 MDA、GSH 和 Iron 水平,见图 2。

2.3 高糖对 HK-2 细胞中 ROS 水平的影响 如图 3 所示, Ctrl 组荧光强度较弱,与 Ctrl 组相比,HG 组荧光亮度增强 ($F=17.72, P < 0.01$);与 HG 组相比, HG+Fer-1 组荧光信号明显减弱 ($P < 0.05$)。

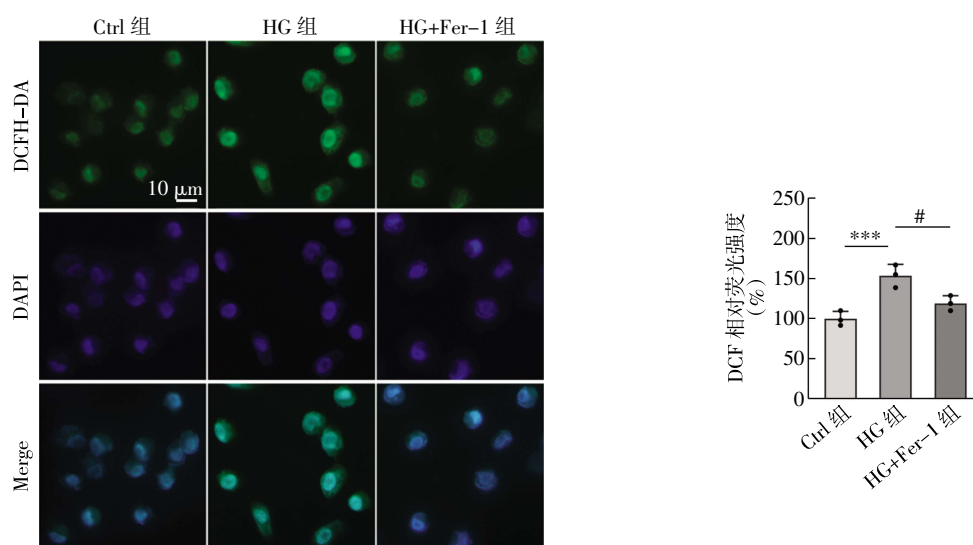
2.4 高糖损伤 HK-2 细胞中铁死亡相关因子的 mRNA 表达情况 如图 4 所示,与 Ctrl 组相比,HG 组 SLC7A11、GPX4 和 GCLC 的 mRNA 表达量下降 ($F=22.22, 19.43, 22.3$, 均 $P < 0.001$), TFR-1 的表达量升高 ($F=10.01, P < 0.01$);与 HG 组相比, HG+Fer-1 组 SLC7A11、GPX4 和 GCLC 的 mRNA 表达水平上调 ($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.001$), TFR-1 的表达水平下调 ($P < 0.05$)。相同渗透压的甘露醇并不影响 SLC7A11、GPX4、GCLC 和 TFR-1 的 mRNA 表达。



注: Ctrl 组: 正常对照组; HG 组: 高糖组; MA 组: 甘露醇组; HG+Fer-1 组: Fer-1 干预的高糖培养组; MDA: 丙二醛; GSH: 谷胱甘肽; Iron: 铁离子; 与 Ctrl 组相比: *** $P < 0.001$; 与 HG 组相比: ### $P < 0.001$, # $P < 0.01$

图 2 不同处理组 HK-2 细胞中 MDA、GSH 和 Iron 的水平

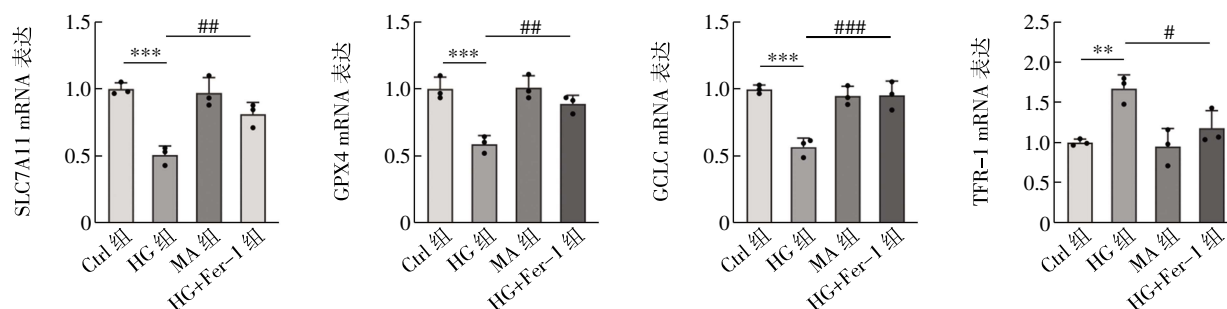
Fig.2 Levels of MDA, GSH and Iron in HK-2 cells of the indicated groups



注: Ctrl 组: 正常对照组; HG 组: 高糖组; HG+Fer-1 组: Fer-1 干预的高糖培养组; DCFH-DA: 2', 7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯; DCF: 2', 7'-二氯荧光素; DAPI: 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶; Merge: 合并; 与 Ctrl 组相比: ** $P < 0.01$; 与 HG 组相比: # $P < 0.05$

图 3 各组 HK-2 细胞中 ROS 的水平

Fig.3 Levels of ROS in HK-2 cells of the indicated groups



注: Ctrl 组: 正常对照组; HG 组: 高糖组; MA 组: 甘露醇组; HG+Fer-1 组: Fer-1 干预的高糖培养组; SLC7A11: 溶质载体家族 7 成员 11; GCLC: 谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基; GPX4: 谷胱甘肽过氧化物酶 4; TFR-1: 转铁蛋白受体 1; 与 Ctrl 组相比: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$; 与 HG 组相比: ### $P < 0.001$, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$

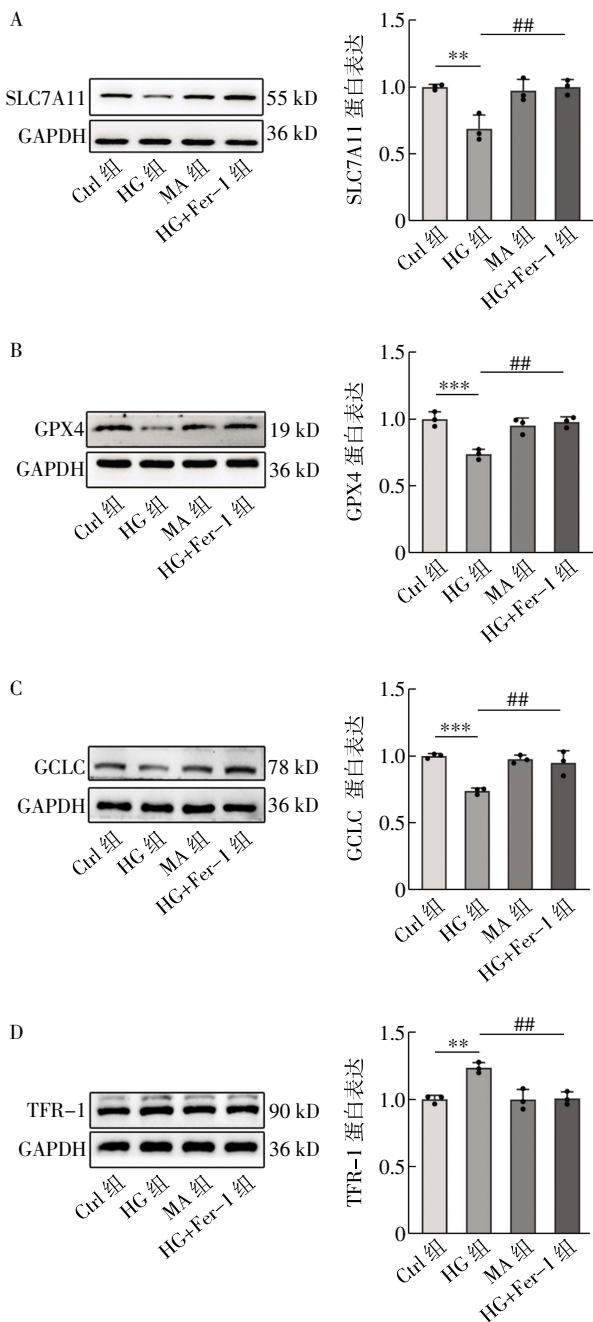
图 4 各组细胞 SLC7A11、GPX4、GCLC 和 TFR-1 mRNA 的表达水平

Fig.4 Expression of SLC7A11, GPX4, GCLC and TFR-1 mRNA in HK-2 cells of the indicated groups

2.5 高糖损伤 HK-2 细胞中铁死亡相关因子的蛋白表达水平 如图 5 所示, 与 Ctrl 组相比, HG 组 SLC-7A11、GPX4 和 GCLC 的蛋白表达水平降低 ($F=12.74$ 、

18.79、17.49, $P < 0.01$, $P < 0.001$, $P < 0.001$), TFR-1 的表达量升高 ($F=15.08$, $P < 0.01$); 与 HG 组相比, HG+Fer-1 组 SLC7A11、GPX4 和 GCLC 的蛋白相对表达

量增加(均 $P < 0.01$), TFR-1 的表达水平下降 ($P < 0.01$)。相同渗透压的甘露醇并不影响 SLC7A11、GPX4、GCLC 和 TFR-1 的蛋白表达。



注: Ctrl 组: 正常对照组; HG 组: 高糖组; MA 组: 甘露醇组; HG+Fer-1 组: Fer-1 干预的高糖培养组; SLC7A11: 溶质载体家族 7 成员 11; GCLC: 谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基; GPX4: 谷胱甘肽过氧化物酶 4; TFR-1: 转铁蛋白受体 1; 与 Ctrl 组相比: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$; 与 HG 组相比: ## $P < 0.01$

图5 各组细胞 SLC7A11、GPX4、GCLC 和 TFR-1 蛋白的表达水平
Fig.5 Expression of SLC7A11, GPX4, CLC and TFR-1 protein in HK-2 cells of the indicated groups

3 讨论

DN 是全球慢性肾脏病的首要病因, 通常需要

血液透析或肾移植, 给卫生保健系统和社会造成巨大财政负担, 然而目前临床上尚缺乏有效的防治手段。DN 进展至终末期肾病的主要病理基础是肾小管病变。肾小管上皮细胞在糖尿病状态下产生过度的氧化应激反应, 导致细胞内 ROS 聚集, 引起不同类型的细胞死亡^[13]。肾小管上皮细胞在 DN 早期就已经发生了凋亡和坏死, 研究表明, 即使在 BAK、caspases、RIPK3、MLKL 和 RIPK1 等与凋亡和坏死相关因子缺乏的情况下, 铁死亡仍然能够独立发生^[14]。因此, 铁死亡这种以 ROS 蓄积为特征的调节性细胞死亡方式, 可能是探索 DN 发病机制新的突破口。

ROS 蓄积是导致铁死亡的中心环节。过量 ROS 诱发细胞膜脂质过氧化损伤产生 MDA, 导致脂质双层的破坏和膜的损伤, 引起细胞毒性, 诱导铁死亡^[15]。健康肾脏产生的少量 ROS 可被机体正常的抗氧化系统清除, 但是过量的 ROS 会造成显著的肾损伤^[16]。在本研究中, 与正常对照组相比, 高糖培养的 HK-2 细胞中 ROS 含量显著增加, 脂质过氧化产物 MDA 水平升高。此外, 在高糖培养的 HK-2 细胞中还观察到细胞线粒体皱缩, 双层膜密度增加, 线粒体嵴减少或消失, 提示高糖诱导 HK-2 细胞产生了铁死亡特征性形态学变化。与 HG 组相比, HG+Fer-1 组细胞中上述铁死亡特征性变化得到了有效缓解, 提示铁死亡与 DN 的发生、发展密切相关。GSH 耗尽是铁死亡的另一个关键机制, GSH 作为三肽抗氧化剂通过减少 ROS 产生来抑制铁死亡的发生^[17]。SLC7A11 调节的胱氨酸(GSH 的前体)转运和谷氨酰半胱氨酸连接酶(GCL)介导的半胱氨酸与谷氨酸结合维持 GSH 合成。SLC7A11 作为氨基酸反向转运体的成员之一, 能够将胱氨酸转运到细胞质, 维持 GSH 这种内源性抗氧化剂的生成。SLC7A11 下调会导致 GSH 耗竭, GPX4 的活性降低, 脂质氧化物无法在 GPX4 催化的 GSH 还原酶作用下进行代谢, 诱发铁死亡^[18-19]。GCLC 作为 GSH 合成限速酶 GCL 的催化亚基和调节亚基, 能催化谷氨酸和半胱氨酸的连接从而抑制铁死亡, 其表达的降低可能导致细胞合成谷胱甘肽的能力下降^[20]。本研究结果表明, 在高糖干预的 HK-2 细胞中检测到 SLC7A11、GPX4 和 GCLC 表达量减少和 GSH 水平下降, 提示细胞抗氧化能力受损, 对铁死亡的敏感性增加。TFR-1 在铁代谢的调控中发挥重要作用, 与铁死亡的发生密切相关^[21]。循环中的 Fe^{3+} 与转铁蛋白结合并通过 TFR-1 导入细胞, 随后在胞内中转化为 Fe^{2+} , Fe^{2+} 过量会通过芬顿反应产生 ROS 促进脂质过氧化反应, 进而引起铁死亡^[22]。该研究发现, 高糖培

养的 HK-2 细胞中 TFR-1 的 mRNA 和蛋白表达水平显著升高,提示高糖诱导 HK-2 细胞铁稳态失衡。笔者也在高糖干预的 HK-2 细胞中观察到铁超载现象,表明高糖诱导细胞发生铁死亡。

综上所述,本研究结果表明脂质过氧化物堆积、抗氧化能力减弱和铁超载这些铁死亡特征性指标存在于高糖培养的 HK-2 细胞中,而用 Fer-1 抑制铁死亡能够改善高糖对 HK-2 细胞的损伤作用,其具体的分子调控机制仍需进行深入研究。本研究证实了铁死亡促进高糖诱导的 HK-2 细胞损伤,为研究 DN 的发病机制提供了新思路。

参考文献:

- [1] LEE W C, LEE Y T, LI L C, et al. The number of comorbidities predicts renal outcomes in patients with stage 3 (-)5 chronic kidney disease[J]. *J Clin Med*, 2018, 7(12):493.
- [2] UMANATH K, LEWIS J B. Update on diabetic nephropathy: core curriculum 2018[J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(6):884-895.
- [3] HASEGAWA K, WAKINO S, SIMIC P, et al. Renal tubular sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing claudin-1 overexpression in podocytes[J]. *Nat Med*, 2013, 19(11):1496.
- [4] MAGRI C J, FAVA S. The role of tubular injury in diabetic nephropathy[J]. *Eur J Intern Med*, 2009, 20(6):551-555.
- [5] LLORENS-CEBRIA C, MOLINA-VAN D B M, VERGARA A, et al. Antioxidant roles of SGLT2 inhibitors in the kidney[J]. *Bio-molecules*, 2022, 12(1):143.
- [6] SU L J, ZHANG J H, GOMEZ H, et al. Reactive oxygen species-induced lipid peroxidation in apoptosis, autophagy, and ferroptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019: 5080843.
- [7] 韩立坤, 李明举, 毛宇, 等. 糖尿病肾病大鼠铁超载对内皮功能及氧化应激的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 37(22): 5515-5518.
- [8] CHAUDHARY K, CHILAKALA A, ANANTH S, et al. Renal iron accelerates the progression of diabetic nephropathy in the HFE gene knockout mouse model of iron overload[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317(2):F512-F517.
- [9] MOCZULSKI D K, GRZESZCZAK W, GAWLIK B. Role of hemochromatosis C282Y and H63D mutations in HFE gene in development of type 2 diabetes and diabetic nephropathy[J]. *Diabetes Care*, 2001, 24(7):1187-1191.
- [10] ASLEH R, NAKHOUL F M, MILLER-LOTAN R, et al. Poor lysosomal membrane integrity in proximal tubule cells of haptoglobin 2-2 genotype mice with diabetes mellitus[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(4):779-786.
- [11] MATSUMOTO M, SASAKI N, TSUJINO T, et al. Iron restriction prevents diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat[J]. *Ren Fail*, 2013, 35(8):1156-1162.
- [12] LEE H, ZANDKARIMI F, ZHANG Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2):225-234.
- [13] 罗永兰, 周素娟. 氧化应激诱导糖尿病肾病的研究进展[J]. *慢性病学杂志*, 2022, 23(10):1528-1534.
- [14] 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.
- [15] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: past, present and future[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(2):88.
- [16] LI J M, SHAH A M. ROS generation by nonphagocytic NADPH oxidase: potential relevance in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(8 Suppl 3): S221-226.
- [17] URSINI F, MAIORINO M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152:175-185.
- [18] WANG L, LIU Y, DU T, et al. ATF3 promotes erastin-induced ferroptosis by suppressing system Xc [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(2):662-675.
- [19] MAIORINO M, CONRAD M, URSINI F. GPx4, lipid peroxidation, and cell death: discoveries, rediscoveries, and open issues [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(1):61-74.
- [20] ZHANG H, FORMAN H J. Glutathione synthesis and its role in redox signaling[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(7):722-728.
- [21] LI L B, CHAI R, ZHANG S, et al. Iron exposure and the cellular mechanisms linked to neuron degeneration in adult mice[J]. *Cells*, 2019, 8(2):198.
- [22] FENG H, SCHORPP K, JIN J, et al. Transferrin receptor is a specific ferroptosis marker[J]. *Cell Rep*, 2020, 30(10):3411-3423, e7.

(2023-12-12 收稿)