DOI:10.16016/j.2097-0927.202110189

丹酚酸 B 基于 Nrf2-Gpx4 通路介导的铁死亡途径改善单侧输尿管梗阻大鼠肾脏间质纤维化

孙源博[1],宋嫣然[1],王诗琪[1],孙丽欣[2],李桂芹[1] 157000 黑龙江 牡丹江,牡丹江医学院附属红旗医院:肾脏内科[1],血液透析室[2]

[摘要] **目的** 基于核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)-谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4,Gpx4)通路介导的铁死亡途径,探究丹酚酸 B 对单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction,UUO)大鼠肾脏间质纤维化(renal interstitial fibrosis,RIF)的改善作用。**方法** 采用随机数字表法将 40 只大鼠分为假手术组、模型组、丹酚酸 B 组、丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组,每组 10 只。除假手术组外,其余各组建立 UUO 模型,假手术组除不结扎、剪断输尿管外,其余操作相同。丹酚酸 B 组灌胃 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} 丹酚酸 B,丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组在丹酚酸 B 组基础上腹腔注射 Nrf2 抑制剂 ML385 30 mg·kg^{-1}·d^{-1},假手术组、模型组灌胃等体积无菌生理盐水,连续 9 d。HE 染色和 Masson 染色检测肾组织形态和纤维化情况;试剂盒检测肾脏组织中 Fe^{2+}、丙二醛(maleicdialdehyde,MDA)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性;实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,RT-qPCR)和蛋白质免疫印迹检测肾脏组织中Ⅰ型胶原(Collagen-Ⅰ,CoL-Ⅰ)、Ⅲ型胶原(Collagen-Ⅲ,CoL-Ⅲ)、Nrf2、Gpx4 的 mRNA 和蛋白水平。**结果** 与假手术组相比,模型组肾脏组织中 Fe^{2+}、MDA 含量,CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ的 mRNA 和蛋白水平升高($P<0.05$),血清中 SOD 活性降低($P<0.05$),肾脏组织中 Nrf2、Gpx4 的 mRNA 和蛋白水平降低($P<0.05$);与模型组相比,丹酚酸 B 组肾脏组织中 Fe^{2+}、MDA 含量,CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ的 mRNA 和蛋白水平降低($P<0.05$),血清中 SOD 活性,肾脏组织中 Nrf2、Gpx4 的 mRNA 和蛋白水平升高($P<0.05$);与丹酚酸 B 组相比,丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 Fe^{2+}、MDA 含量,CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ的 mRNA 和蛋白水平升高($P<0.05$),血清中 SOD 活性,肾脏组织中 Nrf2、Gpx4 的 mRNA 和蛋白水平降低($P<0.05$)。**结论** 丹酚酸 B 能够激活 Nrf2-Gpx4 通路进而抑制铁死亡实现对 UUO 大鼠 RIF 的缓解。

[关键词] 肾脏间质纤维化;单侧输尿管梗阻;丹酚酸 B;核因子 E2 相关因子 2-谷胱甘肽过氧化物酶 4 通路

[中图法分类号] R285.5;R692;R693.2 [文献标志码] A

Salvianolic acid B attenuates renal interstitial fibrosis in rats with unilateral ureteral obstruction *via* Nrf2-Gpx4 pathway-mediated ferroptosis

SUN Yuanbo[1], SONG Yanran[1], WANG Shiqi[1], SUN Lixin[2], LI Guiqin[1] [1]Department of Nephrology, [2]Hemodialysis Room, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical College, Mudanjiang, Heilongjiang Province, 157000, China

[**Abstract**] Objective To determine the improving effect of salvianolic acid B on renal interstitial fibrosis (RIF) of rats with unilateral ureteral obstruction (UUO) based on ferroptosis mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)-glutathione peroxidase 4 (Gpx4) pathway. Methods A total of 40

[基金项目] 黑龙江省青年创新人才培养计划项目(UNPYSCT-2018120);黑龙江省省属高等学校基本科研业务费科研项目(2019-KYYWFMY-0047);"红旗科研基金"科技项目(2018HQ-05)

[通信作者] 李桂芹,E-mail:liguiqin427@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

rats were divided into sham operation group, model group, salvianolic acid B group, and salvianolic acid B+Nrf2 inhibitor group, with 10 rats in each group. UUO model was established in the latter 3 groups, and those of the sham operation group received the same operation except for not ligating and cutting the ureter. Salvianolic acid B of 100 mg·kg^{-1}·d^{-1} and Nrf2 inhibitor ML385 of 30 mg·kg^{-1}·d^{-1} were intragastrically administered to the corresponding groups, and sterile normal saline of equal volume was given to the sham operation group and model group, for 9 consecutive days. Hematoxylin-eosin (HE) staining and Masson staining were used to detect the morphology and fibrosis in renal tissues. The contents of Fe^{2+}, maleicdialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) in renal tissues were detected with corresponding kits. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein levels of Collagen-Ⅰ (CoL-Ⅰ), Collagen-Ⅲ (CoL-Ⅲ), Nrf2, and Gpx4 in the renal tissues. **Results** Compared with the sham operation group, the contents of Fe^{2+} and MDA and the mRNA and protein levels of CoL-Ⅰ and CoL-Ⅲ in the renal tissues were increased ($P<0.05$), and the serum SOD activity and the mRNA and protein levels of Nrf2 were decreased ($P<0.05$) in the model group. While the contents of Fe^{2+} and MDA and the mRNA and protein levels of CoL-Ⅰ and CoL-Ⅲ were decreased ($P<0.05$), and the SOD activity and the levels of Nrf2 and Gpx4 were increased ($P<0.05$) in the salvianolic acid B group than the model group. The treatment of salvianolic acid B+Nrf2 inhibitor increased the contents of Fe^{2+} and MDA and the mRNA and protein levels of CoL-Ⅰ and CoL-Ⅲ ($P<0.05$), and reduced the SOD activity and the levels of Nrf2 and Gpx4 ($P<0.05$) when compared with the salvianolic acid B group. **Conclusion** Salvianolic acid B activates the Nrf2-Gpx4 pathway and then inhibits ferroptosis to relieve RIF in UUO rats.

[**Key words**] renal interstitial fibrosis; unilateral ureteral obstruction; salvianolic acid B; nuclear factor erythroid 2-related factor 2-glutathione peroxidase 4 pathway

Supported by the Youth Innovative Talent Training Program of Heilongjiang Province (UNPYSCT-2018120), the Scientific Research Project of Basic Scientific Research Expenses of Colleges and Universities in Heilongjiang Province (2019-KYYWFMY-0047), and the Science and Technology Project of Red-Flag Scientific Research Fund (2018HQ-05). Corresponding author: LI Guiqin, E-mail: liguiqin427@163.com

慢性肾脏疾病已成为全世界人口死亡的主要原因之一,其早期症状不明显,最终进展为终末期肾病,患者表现为肾小球硬化及间质纤维化(renal interstitial fibrosis,RIF)[1],给患者生存和健康带来极大威胁。患者需进行肾透析或肾移植等肾脏替代治疗。肾透析仅能代替肾脏排泄功能,无法代替代谢和内分泌功能;肾移植能恢复肾功能,但存在免疫抑制,使患者生存和生活质量不稳定[2-3]。因此,寻找更加安全有效的治疗方法对于该病至关重要。中医认为 RIF 中肾络淤阻为关键病因之一。丹参是一种著名的中草药,具有抗纤维化、抗氧化、抗炎和抗凋亡特性。研究显示,中药丹参及丹参注射液可以预防铁过载引起的器官损伤,包括肾损伤[4]、肝纤维化[5]和心脏损伤[6]。丹酚酸 B 作为丹参水溶性重要成分,能够活血化瘀、凉血消痈[7],是有效的自由基清除剂和抗氧化剂,具有铁螯合活性[8-9];且丹酚酸 B 能够减轻肾纤维化过程中的上皮间质转化过程,从而缓解终末期肾损伤[10]。然而,丹酚酸 B 对肾纤维化的调控作用是否与铁过载有关还未可知。

铁死亡是近年来新发现的调节性细胞死亡方式,以铁过载和脂质过氧化物积累为主要特征。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)、谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4,Gpx4)是铁死亡的关键调控因子。其缺乏造成的铁代谢异常、脂质过氧化等可导致细胞死亡,在肾脏疾病中可见不同程度的铁代谢异常及脂质过氧化等过程[11],推测 Nrf2-Gpx4 通路介导的铁死亡与肾病关系密切。丹酚酸 B 具有较强的抗氧化作用,可通过激活 Nrf2 抗氧化信号通路减轻肾损伤,且 Nrf2 是其调控抗氧化酶表达发挥其抗氧化作用的核心环节[12]。单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction,UUO)是目前研究 RIF 较为成熟实验模型,且啮类动物纤维化特征与人相似[13]。因此,本研究建立 UUO 大鼠模型,从 Nrf2-Gpx4 通路介导的铁死亡的角度探讨丹酚酸 B 对 RIF 的保护机制,以期为丹酚酸 B 的应用及抗 RIF 的新药开发提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

40只健康SD大鼠、SPF级、雄性、体质量(210±10)g、6~8周龄,购自北京维通利华实验动物科技有限公司,许可证号:SCXK(京)-2016-0011,温度(24±0.5)℃、相对湿度(55±5)%、12 h光照12 h黑暗环境中常规饲养。实验经本院伦理委员会批准(2021-1212),并按实验动物使用的3R原则给予人道关怀。

1.2 试剂与仪器

丹酚酸B购自南京苏朗医药科技开发有限公司;Nrf2抑制剂ML385购自美国Med-ChemExpress公司,纯度99.55%;苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色试剂盒、马松(Masson)染色试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(maleicdialdehyde,MDA)试剂盒均购自上海碧云天科技有限公司;Fe^{2+}检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;一抗Ⅰ型胶原(Collagen-Ⅰ,CoL-Ⅰ)、Ⅲ型胶原(Collagen-Ⅲ,CoL-Ⅲ)、Nrf2、Gpx4,二抗羊抗兔均购自英国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 分组及给药处理 采用随机数字表法将40只大鼠分为假手术组、模型组、丹酚酸B组、丹酚酸B+Nrf2抑制剂组,每组10只。除假手术组外,其余各组参考文献[14]建立UUO模型,无菌条件下麻醉大鼠,大鼠背部左侧肋腰点下0.5 cm左右及脊柱左侧1 cm左右切一个1.5~2 cm的纵向切口,暴露出肾脏,肾下及部分包膜和肾蒂处用小弯镊剥离,分离出输尿管,分别在远离肾盂1 cm左右和紧靠肾盂处用"0"号丝线结扎输尿管,并在两节点中间剪断输尿管,腹腔用庆大霉素生理盐水冲洗,若无出血及渗漏现象,则逐层缝合。假手术组除不结扎、剪断输尿管外,其余操作相同。丹酚酸B组灌胃100 mg/kg丹酚酸B[15],每日1次,丹酚酸B+Nrf2抑制剂组在丹酚酸B组基础上腹腔注射Nrf2抑制剂ML385 30 mg/kg[16],每日1次,假手术组、模型组灌胃等体积无菌生理盐水,连续9 d。

1.3.2 HE染色和Masson染色观测肾组织形态和纤维化情况 分离肾脏,部分固定在4%多聚甲醛中,经梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切片,厚度5 μm。选特征典型的石蜡切片,参考HE染色试剂盒和Masson染色试剂盒说明书进行染色,经酒精脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,光学显微镜拍照。

1.3.3 试剂盒检测肾脏组织中Fe^{2+}、MDA含量及SOD活性 取各组小鼠部分肾脏组织研磨匀浆,试剂盒检测肾脏组织中Fe^{2+}、MDA含量及SOD活性。

1.3.4 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测肾脏组织CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ、Nrf2和Gpx4的mRNA水平 使用TRIzol试剂分离各组小鼠肾组织中的总RNA。使用逆转录试剂盒将1 μg RNA逆转录为cDNA。在实时PCR系统上使用SYBR Green PCR master mix进行RT-qPCR。PCR条件如下:95 ℃预变性15 min,95 ℃变性20 s,55 ℃退火30 s,70 ℃延伸30 s,40个循环。GAPDH用作参考基因。基因表达的相对水平表示为ΔCt=Ct基因-Ct参考,基因表达的倍数变化由$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算。实验重复3次。使用的引物如下:大鼠CoL-Ⅰ正向5′-ACTGGTACATCAGCCCAAACCC-3′,反向5′-GGAATCCATCGGTCATGCTCT-3′;大鼠CoL-Ⅲ正向5′-GAGACTCCCCATCATAGATATCGC-3′,反向5′-AGCAAACAGGGCCAATGTCC-3′;Nrf2正向5′-CACGGATGATGCCAGCCAG-3′,反向5′-GCCCGCCCAGAAGTTCAGAGAG-3′;Gpx4正向5′-ATGCCCACCCACTGTGGAA-3′,反向5′-GGCACACACTTGTAGGGCTAGAGA-3′;GAPDH正向5′-CACATTGGGGGTAGGAACAC-3′,反向5′-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3′。

1.3.5 蛋白质免疫印迹检测肾脏组织中CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ、Nrf2、Gpx4蛋白表达 取各组小鼠50 mg肾脏组织手术剪剪碎、冰上研磨,添加预冷的蛋白裂解液冰上裂解20 min,12 000 r/min 4 ℃离心20 min,上清为总蛋白。每孔上样20 μg总蛋白,凝胶电泳分离蛋白、PVDF转膜、脱脂奶粉封闭,分别添加一抗CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ、Nrf2、Gpx4,内参GAPDH,4 ℃孵育过夜;加入对应二抗,室温孵育1 h。凝胶成像系统灰度分析。

1.4 统计学分析

采用GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析,计量数据以$\bar{x}\pm s$表示,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较行SNK-q检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹酚酸B对肾脏组织形态的影响

假手术组肾组织形态正常;模型组发生肾间质增厚、间质炎症浸润明显,肾小管萎缩,出现明显肾脏纤维化现象;丹酚酸B组出现间质炎症浸润现象,纤维化现象减轻;丹酚酸B+Nrf2抑制剂组较丹酚酸B组症状有所加重,纤维化严重。见图1。

2.2 丹酚酸B对肾脏组织纤维化的影响

与假手术组相比,模型组肾组织胶原纤维明显增多,呈纤维化变性;与模型组相比,丹酚酸B组纤维化

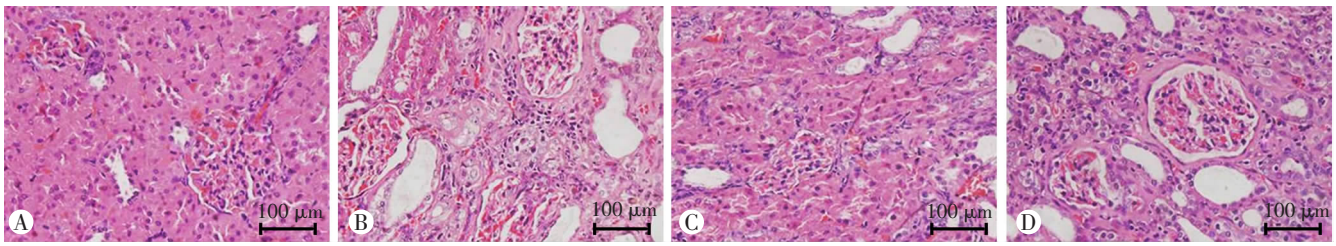
变性减轻,纤维化程度减少;与丹酚酸 B 组相比,丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组纤维化变性有所加重。见图 2。

2.3　丹酚酸 B 对肾脏组织中 Fe^{2+}、MDA 含量及 SOD 活性的影响

与假手术组相比,模型组、丹酚酸 B 组、丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 Fe^{2+}、MDA 含量升高($P<0.05$)、SOD 活性降低($P<0.05$);与模型组相比,丹酚酸 B 组、丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 Fe^{2+}、MDA 含量降低($P<0.05$)、SOD 活性升高($P<0.05$);与丹酚酸 B 组相比,丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 Fe^{2+}、MDA 含量升高($P<0.05$)、SOD 活性降低($P<0.05$)。见表 1。

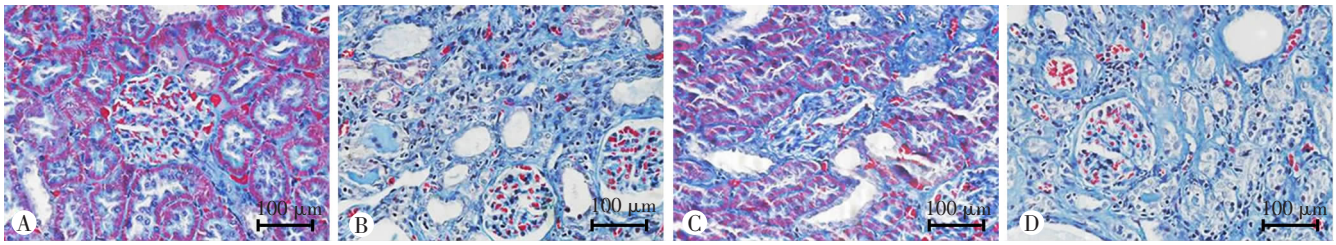
2.4　丹酚酸 B 对肾脏组织中 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ、Nrf2、Gpx4 的 mRNA 水平的影响

与假手术组相比,模型组、丹酚酸 B 组、丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 CoL-Ⅰ和 CoL-Ⅲ的 mRNA 水平升高($P<0.05$),Nrf2 和 Gpx4 的 mRNA 水平降低($P<0.05$);与模型组相比,丹酚酸 B 组、丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 CoL-Ⅰ和 CoL-Ⅲ的 mRNA 水平降低($P<0.05$),Nrf2 和 Gpx4 的 mRNA 水平升高($P<0.05$);与丹酚酸 B 组相比,丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 CoL-Ⅰ和 CoL-Ⅲ的 mRNA 水平升高($P<0.05$),Nrf2 和 Gpx4 的 mRNA 水平降低($P<0.05$)。见表 2。



A:假手术组;B:模型组;C:丹酚酸 B 组;D:丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组

图 1　HE 染色观察 4 组肾脏组织形态



A:假手术组;B:模型组;C:丹酚酸 B 组;D:丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组

图 2　Masson 染色观察 4 组肾脏组织纤维化情况

表 1　4 组肾脏组织中 Fe^{2+}、MDA 含量及 SOD 活性比较($n=10,\bar{x}\pm s$)

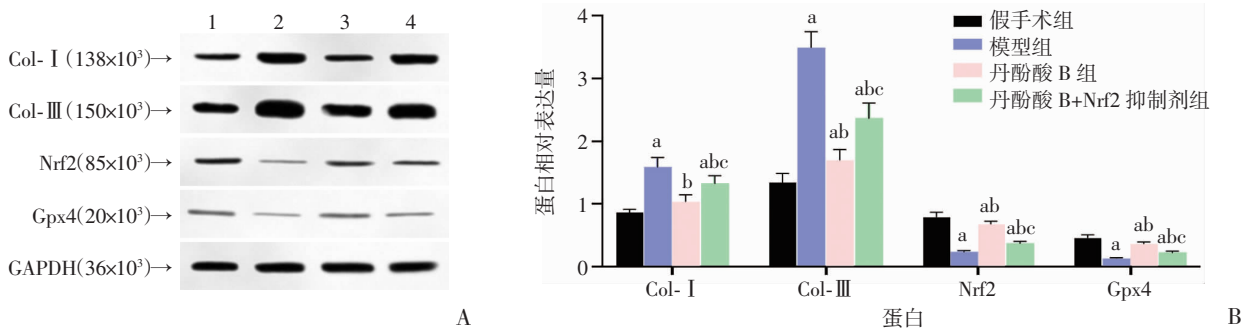
组别	Fe^{2+}/mg·g^{-1}	MDA/nmol·mg^{-1}	SOD/U·mg^{-1}
假手术组	0.09±0.02	26.26±3.58	37.69±3.83
模型组	0.34±0.05^{a}	156.85±23.45^{a}	12.37±3.15^{a}
丹酚酸 B 组	0.17±0.04^{ab}	76.71±9.16^{ab}	22.37±2.33^{ab}
丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组	0.27±0.04^{abc}	123.47±15.88^{abc}	17.63±1.86^{abc}

a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;c:$P<0.05$,与丹酚酸 B 组比较

表 2　4 组肾脏组织中 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ、Nrf2、Gpx4 的 mRNA 水平比较($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	CoL-Ⅰ	CoL-Ⅲ	Nrf2	Gpx4
假手术组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	1.83±0.21^{a}	2.59±0.27^{a}	0.29±0.05^{a}	0.26±0.04^{a}
丹酚酸 B 组	1.20±0.15^{ab}	1.26±0.16^{ab}	0.84±0.09^{ab}	0.78±0.08^{ab}
丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组	1.53±0.18^{abc}	1.74±0.23^{abc}	0.46±0.06^{abc}	0.45±0.07^{abc}

a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;c:$P<0.05$,与丹酚酸 B 组比较



A:Western blot 检测 4 组肾脏组织中 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ、Nrf2、Gpx4 蛋白水平 1:假手术组;2:模型组;3:丹酚酸 B 组;4:丹酚酸 B+Nr+2 抑制剂组;B:蛋白表达半定量分析 a:$P<0.05$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较;c:$P<0.05$,与丹酚酸 B 组比较

图 3 4 组肾脏组织中 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ、Nrf2、Gpx4 蛋白水平情况 ($n=10$, $\bar{x}\pm s$)

2.5 丹酚酸 B 对肾脏组织中 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ、Nrf2、Gpx4 蛋白水平的影响

与假手术组相比,模型组、丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ蛋白水平,丹酚酸 B 组肾脏组织中 CoL-Ⅲ蛋白水平升高($P<0.05$),模型组、丹酚酸 B 组、丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 Nrf2、Gpx4 蛋白水平降低($P<0.05$);与模型组相比,丹酚酸 B 组、丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ蛋白水平降低($P<0.05$),Nrf2、Gpx4 蛋白水平升高($P<0.05$);与丹酚酸 B 组相比,丹酚酸 B+Nrf2 抑制剂组肾脏组织中 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ蛋白水平升高($P<0.05$),Nrf2、Gpx4 蛋白水平降低($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

3.1 丹酚酸 B 减轻 UUO 大鼠 RIF

RIF 中医机制属“水肿”、“关格”、“癃闭”、“虚劳”范畴,以气虚血瘀为主,兼有痰湿互结,治法以扶正活血化瘀祛湿为主[17]。中药能够保护肾功能的残余功能,且能提高生存质量,延长患者生存时间。丹参具有活血化瘀、痛经止痛、清心除烦之功效,能抵抗多种组织纤维化疾病,在一定程度上恢复纤维化的病理生理改变,丹酚酸 B 是丹参中主要水溶性成分[18]。本研究结果显示,模型组大鼠肾间质增厚、间质炎症浸润明显,肾小管萎缩,出现明显肾脏纤维化现象;提示 UUO 模型建立成功,RIF 现象明显。经丹酚酸 B 治疗后,纤维化、炎症现象均明显减轻,肾组织中 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ的 mRNA 和蛋白水平降低。纤维化的产生涉及多种细胞因子和信号分子,特征为改变细胞外基质沉积,导致细胞外基质合成和降解失衡,而细胞外基质以胶原蛋白为主,尤其以 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ为主要成分,CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ水平升高表明纤维化程度严重[19],提示丹酚酸 B 能缓解 RIF 现象。本研究还发现,丹酚酸 B 能降低 MDA 含量、升高 SOD 活性,从而减缓氧化应激,实现对疾病的缓解。

3.2 丹酚酸 B 激活 Nrf2-Gpx4 通路进而抑制铁死亡

本研究发现,模型组肾组织中 Fe^{2+} 含量升高。Fe^{2+}和脂质活性氧依赖的非凋亡程序性死亡命名为铁死亡[20]。铁死亡归纳为 3 个基本特征,即还原性铁激活、含不饱和脂肪酸磷脂过氧化、脂质过氧化修复受损[21]。本研究显示 Fe^{2+}水平升高,氧化损伤严重,而铁可作催化剂参与调节氧化还原平衡过程[22],提示铁死亡可能参与疾病过程。Nrf2-Gpx4 通路是主要的铁死亡发生途径之一[23]。Nrf2 和 Gpx4 的下调会引起细胞内氧化和抗氧化系统失衡,导致细胞内活性氧积累过多,造成细胞死亡[24]。在糖尿病小鼠模型中,铁死亡途径增强可促进糖尿病模型肾小管损伤,阻止铁死亡途径可缓解氧化应激和肾小管基底膜折叠、断裂,改善 RIF 现象,并降低 CoL-Ⅰ、CoL-Ⅲ蛋白水平[25]。本研究结果显示,模型组肾脏组织中 Nrf2 和 Gpx4 的 mRNA 和蛋白表达量下降,下降的 Nrf2、Gpx4 会引起细胞内氧化和抗氧化失衡,导致细胞死亡。与模型组相比,丹酚酸 B 组肾脏组织中 Nrf2、Gpx4 的 mRNA 和蛋白水平升高,铁死亡途径被抑制,氧化损伤及纤维化均被缓解;在丹酚酸 B 基础上添加 Nrf2 抑制剂,肾组织中 Nrf2、Gpx4 的 mRNA 和蛋白水平降低,铁死亡增加;提示添加丹酚酸 B 后可能通过激活 Nrf2-Gpx4 通路,抑制铁死亡,缓解氧化损伤,进而实现对 RIF 的改善作用。

综上所述,丹酚酸 B 可能通过激活 Nrf2-Gpx4 通路从而抑制铁死亡途径实现对 UUO 大鼠 RIF 的改善作用,本研究从铁死亡的角度阐明了丹酚酸 B 治疗肾

脏纤维化的潜力,为抗肾脏纤维化新药的开发提供了一定参考。但铁死亡不止 Nrf2-Gpx4 一个通路,丹酚酸 B 能否通过其他铁死亡途径而发挥作用,是本研究接下来的研究重点。

参考文献:

[1] VARGHESE R, MAJUMDAR A. Current therapies in nephrotic syndrome: HDAC inhibitors, an emerging therapy for kidney diseases[J]. Curr Res Biotechnol, 2021, 3: 182-194. DOI: 10.1016/j.crbiot.2021.05.007.

[2] 路萍, 许化溪. ILC2s 与糖尿病肾病血液透析患者机体内"代谢综合征"状态的关系研究[J]. 重庆医科大学学报, 2020, 45(3): 378-387. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002115.
LU P, XU H X. Relationship between ILC2s and metabolic syndrome in hemodialysis patients with diabetic nephropathy[J]. J Chongqing Med Univ, 2020, 45(3): 378-387. DOI: 10.13406/j.cnki.cyxb.002115.

[3] POSSELT J, HARBECK B, RAHVAR A H, *et al*. Improved cognitive function after kidney transplantation compared to hemodialysis[J]. Ther Apher Dial, 2021, 25(6): 931-938. DOI: 10.1111/1744-9987.13625.

[4] LI L, ZHANG Y Y, MA J J, *et al*. Salvia miltiorrhiza injection ameliorates renal damage induced by lead exposure in mice[J]. Sci World J, 2014, 2014: 572697. DOI: 10.1155/2014/572697.

[5] ZHANG Y, ZHANG Y Y, XIE Y, *et al*. Multitargeted inhibition of hepatic fibrosis in chronic iron-overloaded mice by Salvia miltiorrhiza[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 148(2): 671-681. DOI: 10.1016/j.jep.2013.05.028.

[6] ZHANG Y Y, XUE Y C, ZHENG B, *et al*. Salvia miltiorrhiza (SM) injection ameliorates iron overload-associated cardiac dysfunction by regulating the expression of DMT1, TfR1, and FP_1 in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 6864723. DOI: 10.1155/2021/6864723.

[7] 李均, 付旭, 姚兰, 等. 丹酚酸 B, C 分子药对配伍对 UUO 大鼠肾间质纤维化的保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(20): 113-117. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200113.
LI J, FU X, YAO L, *et al*. Protection and mechanism of compatibility of salvianolic acid B, C on renal interstitial fibrosis in UUO rats[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2015, 21(20): 113-117. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.2015200113.

[8] ZHAO G R, ZHANG H M, YE T X, *et al*. Characterization of the radical scavenging and antioxidant activities of danshensu and salvianolic acid B[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(1): 73-81. DOI: 10.1016/j.fct.2007.06.034.

[9] CHEN S N, LIU Y Q, ZHU L, *et al*. Chaotrope-controlled fabrication of ferritin-salvianolic acid B— epigallocatechin gallate three-layer nanoparticle by the flexibility of ferritin channels[J]. J Agric Food Chem, 2021, 69(41): 12314-12322. DOI: 10.1021/acs.jafc.1c01997.

[10] HE Y, LU R R, WU J B, *et al*. Salvianolic acid B attenuates epithelial-mesenchymal transition in renal fibrosis rats through activating Sirt1-mediated autophagy[J]. Biomedecine Pharmacother, 2020, 128: 110241. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110241.

[11] 韩瑞祎. 铁死亡及其在肾脏疾病中的研究进展[J]. 国际儿科学杂志, 2021, 48(3): 173-177. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4408.2021.03.007.
HAN R Y. Progress of ferroptosis and its role in kidney disease[J]. Int J Pediatr, 2021, 48(3): 173-177. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4408.2021.03.007.

[12] XIAO Z, LIU W, MU Y P, *et al*. Pharmacological effects of salvianolic acid B against oxidative damage[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 572373. DOI: 10.3389/fphar.2020.572373.

[13] LIU L R, LIU F, GUAN Y J, *et al*. Critical roles of SMYD2 lysine methyltransferase in mediating renal fibroblast activation and kidney fibrosis[J]. FASEB J, 2021, 35(7): e21715. DOI: 10.1096/fj.202000554RRR.

[14] 韩宇鹏, 孟庆云, 杨舒贺, 等. 尿毒清颗粒对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化及肾功能和转化生长因子-β1 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(22): 4839-4841. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2020.22.041.
HAN Y P, MENG Q Y, YANG S H, *et al*. Effects of Niaoduqing granules on renal interstitial fibrosis and renal function and expression of transforming growth factor-β1 in rats with unilateral ureteral obstruction[J]. Chin J Gerontol, 2020, 40(22): 4839-4841. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2020.22.041.

[15] 李红莲, 周桔, 林华, 等. 丹酚酸 B 通过抗炎、抗氧化和促进自噬减轻慢性肾小球肾炎的肾功能损伤[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(5): 34-38. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2019.05.008.
LI H L, ZHOU J, LIN H, *et al*. Salvianolic acid B attenuates renal dysfunction in chronic glomerulonephritis through anti-inflammatory, anti-oxidation and promoting autophagy[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2019, 35(5): 34-38. DOI: 10.13412/j.cnki.zyyl.2019.05.008.

[16] 凌林, 佟晶, 曾良. 芍药苷通过激活 Nrf2/Keap1 信号通路改善脓毒症急性肺损伤的研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2020, 51(5): 664-669. DOI: 10.12182/20200960201.

LING L, TONG J, ZENG L. Paeoniflorin improves acute lung injury in Sepsis by activating Nrf2/Keap1 signaling pathway[J]. J Sichuan Univ Med Sci Ed, 2020, 51(5): 664-669. DOI: 10.12182/20200960201.

[17] 李荣荣, 马华, 田树杰, 等. 芪红通瘀饮对肾间质纤维化大鼠肾组织 Wnt/β-catenin 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(4): 1755-1759.
LI R R, MA H, TIAN S J, *et al*. Effects of Qihong Tongyu Decoction on Wnt/β-catenin signaling pathway in renal tissue of rats with renal interstitial fibrosis[J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2020, 35(4): 1755-1759.

[18] 孙宁远, 朱雪林, 陈君. 丹参化学成分抗纤维化药理作用及机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(22): 201-208. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201870.
SUN N Y, ZHU X L, CHEN J. Research progress of anti-fibrosis pharmacological effect and mechanisms of chemical components in salviae miltiorrhizae Radix et rhizoma[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(22): 201-208. DOI: 10.13422/j.cnki.syfjx.20201870.

[19] ZHONG Z Q, LI H Y, ZHONG H Z, *et al*. All-trans retinoic acid regulating angiopoietins-1 and alleviating extracellular matrix accumulation in interstitial fibrosis rats[J]. Ren Fail, 2021, 43(1): 658-663. DOI: 10.1080/0886022X.2021.1910046.

[20] 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. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.

[21] PANY Z, TANG P J, CAO J, *et al*. Lipid peroxidation aggravates anti-tuberculosis drug-induced liver injury: evidence of ferroptosis induction[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 533(4): 1512-1518. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.09.140.

[22] BAY1R H, ANTHONYMUTHU T S, TYURINA Y Y, *et al*. Achieving life through death: redox biology of lipid peroxidation in ferroptosis[J]. Cell Chem Biol, 2020, 27(4): 387-408. DOI: 10.1016/j.chembiol.2020.03.014.

[23] XIE Y, HOU W, SONG X, *et al*. Ferroptosis: process and function[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369-379. DOI: 10.1038/cdd.2015.158.

[24] 钟桂玲, 李文祥, 王贺, 等. 普罗布考经 Nrf2/Gpx4 途径抑制铁死亡保护 H9C2 心肌细胞[J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(3): 462-467. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2021.03.007.
ZHONG G L, LI W X, WANG H, *et al*. Probucol inhibits ferroptosis *via* Nrf2/Gpx4 pathway to protect H9C2 cardiomyocytes[J]. J Guangxi Med Univ, 2021, 38(3): 462-467. DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2021.03.007.

[25] FENG X M, WANG S, SUN Z C, *et al*. Ferroptosis enhanced diabetic renal tubular injury *via* HIF-1α/HO-1 pathway in db/db mice[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12: 626390. DOI: 10.3389/fendo.2021.626390.

(**收稿**:2021-10-29;**修回**:2022-01-27)

(编辑 刘秋池)