黄柏酮对单侧输尿管梗阻模型小鼠肾间质纤维化及铁死亡的影响Δ

邱　莎[1*]，杨　丽[1]，谭睿陟[2]，刘　建[1,3#]（1.西南医科大学附属医院肾病内科/四川省肾脏疾病临床医学研究中心，四川 泸州　646000；2.西南医科大学附属中医医院中西医结合研究中心，四川 泸州　646000；3.西南医科大学附属中医医院肾病内科，四川 泸州　646000）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）05-0554-06
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.05.08

摘　要　目的　研究黄柏酮对单侧输尿管梗阻（UUO）模型小鼠肾间质纤维化的改善作用，并基于核转录因子红系2相关因子2（Nrf2）/谷胱甘肽过氧化物酶4（GPx4）信号通路介导的铁死亡探讨其作用机制。**方法**　将30只小鼠随机分为假手术组、模型组、厄贝沙坦组（阳性对照，20 mg/kg）和黄柏酮低、高剂量组（10、40 mg/kg），每组6只。除假手术组外，其余各组小鼠均通过结扎单侧输尿管建立UUO模型。术后，给药组小鼠腹腔注射相应药物，假手术组、模型组小鼠腹腔注射等体积生理盐水，每天1次，连续7 d。检测小鼠血清中肌酐（Cr）、血尿素氮（BUN）水平，丙二醛（MDA）含量，总超氧化物歧化酶（T-SOD）活力和肾脏组织中Fe^{2+}浓度；苏木精-伊红（HE）染色和Masson染色观察小鼠肾脏组织形态和纤维化情况；免疫组化法检测小鼠肾脏组织中纤连蛋白（Fn）、α-平滑肌肌动蛋白（α-SMA）、GPx4、Nrf2的表达，Western blot法和实时定量聚合酶链反应（RT-qPCR）检测小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4、溶质载体家族7成员11（SLC7A11）蛋白及mRNA的表达水平。**结果**　与假手术组比较，模型组小鼠血清中Cr、BUN水平，MDA含量，肾脏组织中Fe^{2+}浓度以及Fn、α-SMA蛋白和mRNA的表达水平均显著升高（$P<0.05$）；血清中T-SOD活力，肾脏组织中Nrf2、GPx4、SLC7A11蛋白和mRNA的表达水平均显著降低（$P<0.05$）；肾脏组织中肾小管扩张，胶原沉积明显，纤维条索较粗且着色较深，肾间质炎症细胞浸润明显。经黄柏酮干预后，小鼠血清或肾脏组织中上述指标（黄柏酮低剂量组SLC7A11 mRNA除外）水平均显著逆转（$P<0.05$），肾脏组织病理损伤、胶原沉积均有所减轻。**结论**　黄柏酮可改善UUO模型小鼠的肾间质纤维化，具体作用机制可能与激活Nrf2/GPx4信号通路、抑制铁死亡有关。

关键词　黄柏酮；肾间质纤维化；单侧输尿管梗阻；Nrf2/GPx4信号通路；铁死亡

Effects of obacunone on renal interstitial fibrosis and ferroptosis in unilateral ureteral obstruction model mice

QIU Sha[1], YANG Li[1], TAN Ruizhi[2], LIU Jian[1,3]（1. Dept. of Nephrology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University/Nephropathy Clinical Medical Research Center of Sichuan Province, Sichuan Luzhou 646000, China; 2. Research Center of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine Integration, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China; 3. Dept. of Nephrology, the Affiliated Chinese Traditional Medicine Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China）

ABSTRACT　OBJECTVE To study the improvement effects of obacunone on renal interstitial fibrosis (RIF) in unilateral ureteral obstruction (UUO) model mice, and to investigate its mechanism based on ferroptosis mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPx4) signaling pathway. **METHODS** Thirty mice were randomly divided into sham operation group, model group, irbesartan group (positive control, 20 mg/kg), obacunone low-dose and high-dose groups (10, 40 mg/kg), with 6 mice in each group. Except for sham operation group, UUO model was established by ligation of unilateral ureter in other groups. After operation, administration groups were given intraperitoneal injection of relevant medicine, and sham operation group and model group were given intraperitoneal injection of constant volume of normal saline, once a day, for 7 consecutive days. The levels of creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN), the content of malondialdehyde (MDA) and the activities of total superoxide dismutase (T-SOD) in serum and the concentration of Fe^{2+} in renal tissue were all detected. HE staining and Masson staining were performed to observe the morphology and the fibrosis of renal tissues. Immunohistochemical staining was used to determine expressions of the fibronectin (Fn), α-smooth muscle actin (α-SMA), GPx4 and Nrf2 in renal tissue. Western blot and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) were used to detect the protein and mRNA levels of Fn, α-SMA, Nrf2,

Δ**基金项目**　四川省省级科技计划项目（No.2022YFHO118）；西南医科大学-西南医科大学附属中医医院联合项目（No.西南医大校〔2018〕6号）

＊**第一作者**　硕士研究生。研究方向：肾脏病学。E-mail：964083717@qq.com

#**通信作者**　主任医师，教授，硕士生导师。研究方向：肾脏病学。E-mail：834300205@qq.com

GPx4 and SLC7A11 in the renal tissues. **RESULTS** Compared with sham operation group, serum levels of Cr and BUN, the concentration of Fe^{2+} in renal tissue, the protein and mRNA levels of Fn and α-SMA in model group were increased significantly ($P<0.05$), while the activity of T-SOD in serum, protein and mRNA expressions of Nrf2, GPx4, SLC7A11 in kidney tissue were significantly decreased ($P<0.05$); in the kidney tissue, the renal tubules were dilated, the collagen deposition was obvious, the fibrous bands were thicker and darker, and the renal interstitial inflammatory cells infiltrated significantly. After intervened with obacunone, the levels of above indexes (except for mRNA expression of SLC7A11 in obacunone low-dose group) in serum and renal tissue were reversed significantly ($P<0.05$), and pathological damage and collagen deposition of kidney tissue were alleviated. **CONCLUSIONS** Obacunone can improve renal interstitial fibrosis of UUO model mice, the mechanism of which may be associated with activating the Nrf2/GPx4 pathway and then inhibiting ferroptosis to relieve RIF in UUO model mice.

KEYWORDS obacunone; renal interstitial fibrosis; unilateral ureteral obstruction; Nrf2/GPx4 signaling pathway; ferroptosis

慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)的发病率逐年上升,已成为全球性公共卫生问题[1]。肾间质纤维化几乎是所有CKD进展至终末期的共同途径,延缓肾间质纤维化进程是治疗CKD的关键[2]。铁死亡是近年来新发现的铁依赖性、非凋亡的调节性细胞死亡方式,核转录因子红系2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[3]。研究发现,大多数CKD患者会出现不同程度的铁代谢紊乱和脂质代谢紊乱,铁代谢紊乱可导致铁在肾脏中沉积,进而诱导铁死亡;脂代谢紊乱可导致肾实质脂质沉积,促进脂质过氧化,进一步诱导铁死亡[4]。

黄柏酮是从黄柏、白鲜皮等植物中提取的天然化合物,属于柠檬苦素类三萜化合物,具有抗炎[5]、抗氧化[6]、抗肿瘤[7]等多种药理活性。现有研究发现,黄柏酮是一种强效的Nrf2激动剂,可以延缓常染色体显性遗传性多囊肾病中肾囊肿的进展[8],有效缓解肺纤维化[9]、肝纤维化[10],但其对肾间质纤维化的改善作用及机制仍不清楚。因此,本研究探索黄柏酮对单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction,UUO)模型小鼠肾间质纤维化的影响,并通过Nrf2/GPx4信号通路探讨其作用机制,以期为黄柏酮的药理研究及开发利用提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括LightCycler480 Ⅱ型实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)仪(瑞士Roche公司),Mini-Protein Tetra System型蛋白质电泳转印系统、凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司),DM500型生物显微镜(日本Olympus公司),Synergy2型多功能酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 主要药品与试剂

黄柏酮(批号PCS-211109,纯度≥98%)购自成都植标化纯生物技术有限公司;苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、羊抗兔免疫球蛋白G(批号分别为C0105S、A0208)购自上海碧云天科技有限公司;Masson染色试剂盒(批号BA4079A)购自珠海贝索生物技术有限公司;肌酐(creatinine,Cr)、血尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、总超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase,T-SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司(批号分别为C011-2-1、C013-2-1、A001-1-2、A003-1-2);Fe^{2+}浓度检测试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司(批号I291);免疫组化试剂盒、DAB显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司(批号分别为PV-9000、ZLI-9018);兔抗GAPDH多克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司(批号60004-1);兔抗小鼠Nrf2、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin,α-SMA)单克隆抗体购自美国CST公司(批号分别为12721T、19245S);兔抗小鼠纤连蛋白(fibronectin,Fn)、GPx4、溶质载体家族7成员11(SLC7A11)多克隆抗体购自美国Abcam公司(批号分别为ab2413、ab125066、ab216876)。本研究所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列及扩增产物长度见表1。

表1 引物序列及扩增产物长度

基因	引物序列(5′→3′)	扩增产物长度/bp
Fn	上游引物:CCCTATCTCTAGTACCGTTGTCC	145
	下游引物:TGCCGCAACTACTGTGATTCGG	
α-SMA	上游引物:TGCTGACAGAGGCACCACTGAA	138
	下游引物:CAGTTGTACGTCCAGAGGCATAG	
Nrf2	上游引物:CAGCATAGAGCAGGACATGGAG	107
	下游引物:GAACAGCGGTAGTATCAGCCAG	
GPx4	上游引物:CCTCTGCTGCAAGAGCCTCCC	144
	下游引物:CTTATCCAGGCAGACCATGTGC	
SLC7A11	上游引物:CTTTGTTGCCCTCTCCTGCTTC	136
	下游引物:CAGAGGAGTGTGCTTGTGGACA	
GAPDH	上游引物:TGGCCTTCCGTGTTCCTAC	178
	下游引物:GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA	

1.3 动物

本研究所用动物为健康SPF级雄性C57BL/6小鼠,体质量22～25 g,6～8周龄,购自成都药康生物科技有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(川)2020-034。小鼠于12 h光照、12 h黑暗环境中常规饲养,自由摄食、饮水。本实验过程严格按照《实验动物福利伦理审查指南(GB/T 35892-2018)》要求执行,经西南医科大学实验动物伦理委员会批准,批准号为swmu20220107。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将30只小鼠随机分为假手术组、模型组、厄贝沙坦组（阳性对照，20 mg/kg，剂量为临床等效剂量）和黄柏酮低、高剂量组（10、40 mg/kg，低剂量参考文献[11]设置），每组6只。除假手术组外，其余各组小鼠均通过结扎单侧输尿管建立UUO模型，具体造模方法参考文献[12]：小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠进行麻醉，以75%乙醇消毒右侧背部毛发及皮肤，从小鼠背部右侧靠近肾脏位置切开1～2 cm的切口；逐层切开皮肤、肌肉各层，暴露并分离右侧肾脏及输尿管，使用手术线4-0对输尿管近肾端进行双结扎，中间剪断，逐层缝合。假手术组除不结扎、不剪断输尿管外，其余操作相同。术后，给药组小鼠腹腔注射相应药物，假手术组、模型组小鼠腹腔注射等体积生理盐水，每天1次，连续7 d。

2.2 样本采集

术后第8天，小鼠腹腔注射1%戊巴比妥钠麻醉，心脏取血，室温放置30 min，于4 ℃条件下以3 500 r/min离心10 min，取上层血清，用于检测Cr、BUN水平，MDA含量以及T-SOD活力。取血完成后，采用颈椎脱臼法处死小鼠，摘取右侧肾脏，去除包膜并用磷酸盐缓冲液（PBS）冲洗后将其分为2份：一份放入10%甲醛溶液中固定，用于病理切片染色和免疫组化分析；一份保存于－80 ℃，用于Fe^{2+}浓度测定及Western blot、实时定量PCR检测。

2.3 小鼠肾功能指标的检测

取“2.2”项下各组小鼠血清样品适量，根据相应试剂盒说明书方法操作，检测Cr、BUN的水平。

2.4 小鼠肾脏组织病理形态学观察

取“2.2”项下各组小鼠固定于10%甲醛溶液中的肾脏组织，用水冲洗，经梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后，切片（厚度为4 μm）备用。取部分切片于65 ℃烘烤2 h后用二甲苯脱蜡、梯度酒精复水，经HE染料（苏木精染色5 min，伊红染色40 s）染色后在光学显微镜下观察肾脏组织的病理形态学改变；再取部分切片经脱蜡复水后参照说明书方法进行Masson染色，以评估肾脏组织纤维化情况。

2.5 小鼠肾脏组织中Fe^{2+}浓度及血清中MDA含量、T-SOD活力的检测

取“2.2”项下各组小鼠冻存的肾脏组织适量（约100 mg），以冷PBS洗净，根据Fe^{2+}浓度检测试剂盒说明书方法操作，计算肾脏组织中Fe^{2+}浓度。另取“2.2”项下各组小鼠的血清样品适量，根据MDA、T-SOD试剂盒说明书方法操作，计算小鼠血清中MDA含量及T-SOD活力。

2.6 小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4蛋白阳性表达的检测

采用免疫组化法进行检测。取“2.4”项下各组小鼠剩余部分的切片，经二甲苯脱蜡、水化后，用柠檬酸二钠抗原修复液（pH6.0）热修复10 min，待切片温度降至室温后，根据免疫组化试剂盒说明书进行操作，然后滴加Fn（稀释度为1∶200）、α-SMA（稀释度为1∶200）、Nrf2（稀释度为1∶100）、GPx4（稀释度为1∶200）抗体，4 ℃孵育过夜，使用DAB显色试剂盒显色，终止显色后再以苏木素复染切片3 min，经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后，采用显微镜进行观察，棕色越深表明目的蛋白表达越强。

2.7 小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4、SLC7A11蛋白表达水平的检测

采用Western blot法进行检测。取“2.2”项下各组小鼠冻存的肾脏组织适量（约100 mg），剪碎、冰上研磨，添加预冷的蛋白裂解液冰上裂解20 min，超声（功率200 W，频率20 kHz）处理2 s×5次，于4 ℃条件下以12 000 r/min离心10 min；吸取上清液，采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度后，煮沸变性，进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳；转膜，5%脱脂牛奶封闭，分别加入Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4、SLC7A11、GAPDH抗体（稀释度均为1∶1 000），4℃孵育过夜；TBST洗膜3次，加入二抗（稀释度为1∶10 000），室温孵育1 h；TBST洗膜3次，滴加ECL化学发光液显影，置于凝胶成像系统下成像。采用Image J软件进行灰度值量化分析，以目的蛋白与GAPDH的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4、SLC7A11 mRNA表达水平的检测

采用实时定量PCR法进行检测。取“2.2”项下各组小鼠冻存的肾脏组织适量，使用Trizol试剂提取小鼠肾组织中的总RNA，经酶标仪测定其含量后，逆转录为cDNA，再进行PCR反应。PCR反应体系为上下游引物各1 μL、2×扩增试剂10 μL、cDNA模板2 μL、无酶水6 μL。PCR反应条件为95 ℃预变性10 min；95 ℃变性15 s，60 ℃退火15 s，72 ℃延伸20 s，共40个循环。使用GAPDH作为内参基因，通过$2^{-\Delta\Delta Ct}$方法计算目的基因的表达水平。

2.9 统计学方法

采用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行统计学分析，数据以表示$\bar{x} \pm s$表示。多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 黄柏酮对小鼠肾功能指标的影响

与假手术组比较，模型组小鼠血清中Cr、BUN水平均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，各给药组小鼠血清中Cr、BUN水平均显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

表2 各组小鼠肾功能指标的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Cr/（μmol/L）	BUN/（mmol/L）
假手术组	19.53±1.93	3.92±0.57
模型组	39.93±2.09[a]	8.40±0.94[a]
厄贝沙坦组	30.58±1.46[b]	4.31±0.87[b]
黄柏酮低剂量组	29.57±1.50[b]	4.81±0.60[b]
黄柏酮高剂量组	26.81±2.66[b]	4.68±0.08[b]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.2 黄柏酮对小鼠肾脏组织病理形态学的影响

HE染色结果显示，假手术组小鼠肾脏组织正常无病变，肾小管饱满；模型组小鼠肾脏组织中肾小管扩张，肾小管上皮细胞可见疏松、肿胀和空泡变性，肾间质炎症细胞浸润明显；经厄贝沙坦、黄柏酮干预后，小鼠肾小管扩张、上皮细胞空泡变性，肾间质炎症细胞浸润均较模型组减少，病变程度减轻，且黄柏酮高剂量组减轻得更明显。Masson染色结果显示，假手术组小鼠肾脏组织结构完整，基本无蓝色胶原阳性着色区域；模型组小鼠肾脏出现了明显的胶原沉积，纤维条索较粗且着色较深；经厄贝沙坦、黄柏酮干预后，小鼠肾脏胶原沉积均较模型组减少，且黄柏酮高剂量组减少更明显。结果见图1（黄柏酮低剂量组略）。

3.3 黄柏酮对小鼠肾脏组织中Fe^{2+}浓度和血清中MDA含量、T-SOD活力的影响

与假手术组比较，模型组小鼠肾脏组织中Fe^{2+}浓度和血清中MDA含量均显著升高（$P<0.05$），血清中T-SOD活力显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，厄贝沙坦组和黄柏酮各剂量组小鼠肾脏组织中上述指标均显著逆转（$P<0.05$）。结果见表3。

表3 各组大鼠肾脏组织中Fe^{2+}及血清MDA含量、T-SOD活力的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Fe^{2+}浓度/（nmol/mg prot）	MDA/（nmol/L）	T-SOD/（U/mL）
假手术组	0.07±0.012	5.65±0.20	117.09±1.64
模型组	0.31±0.008[a]	11.31±0.27[a]	71.18±1.59[a]
厄贝沙坦组	0.22±0.008[b]	9.76±0.17[b]	99.80±1.94[b]
黄柏酮低剂量组	0.14±0.005[b]	7.62±0.56[b]	105.51±3.06[b]
黄柏酮高剂量组	0.10±0.005[b]	6.55±0.27[b]	111.55±2.74[b]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

3.4 黄柏酮对小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4蛋白阳性表达的影响

假手术组小鼠肾脏组织中有少量Fn、α-SMA表达，有大量Nrf2、GPx4表达；与假手术组相比，模型组小鼠肾脏组织中可见大量Fn、α-SMA表达，少量Nrf2、GPx4表达；与模型组相比，厄贝沙坦组和黄柏酮各剂量组小鼠肾脏组织中上述蛋白表达均明显逆转。结果见图2（黄柏酮低剂量组略）。

3.5 黄柏酮对小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4、SLC7A11蛋白表达的影响

与假手术组比较，模型组小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$），Nrf2、GPx4、SLC7A11蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，厄贝沙坦组和黄柏酮各剂量组小鼠肾脏组织中上述蛋白（厄贝沙坦组Fn、GPx4除外）表达水平均显著逆转（$P<0.05$）。结果见图3、表4。

3.6 黄柏酮对小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4、SLC7A11 mRNA表达的影响

与假手术组比较，模型组小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA mRNA的表达水平均显著升高（$P<0.05$），Nrf2、GPx4、SLC7A11 mRNA的表达水平均显著降低（$P<0.05$）。与模型组比较，厄贝沙坦组和黄柏酮各剂量组小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA mRNA表达水平均显著降低（$P<0.05$），GPx4 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）；黄柏酮各剂量组Nrf2 mRNA和高剂量组SLC7A11 mRNA表达水平均显著升高（$P<0.05$）。结果见表5。

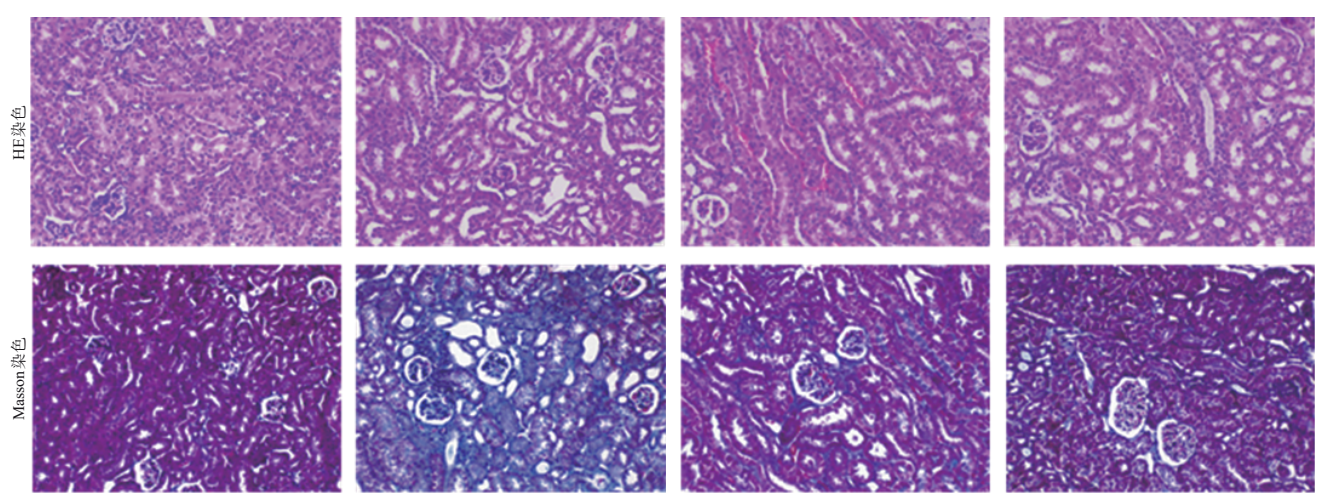


图1 各组小鼠肾脏组织病理形态学观察结果（×400）

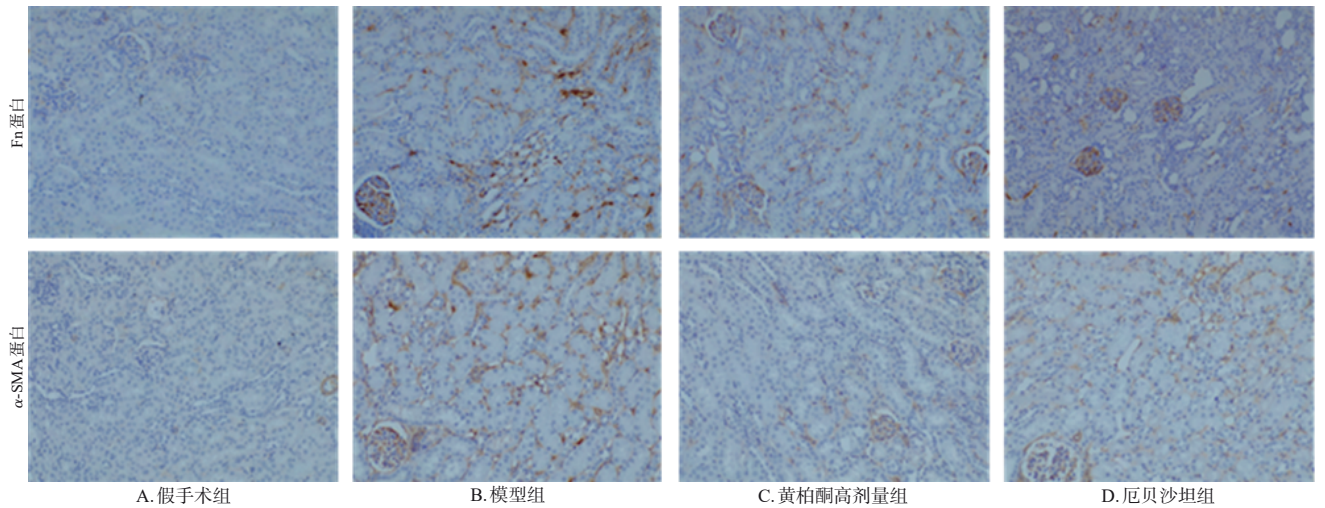


图2　各组小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4蛋白表达的免疫组化图（×400）

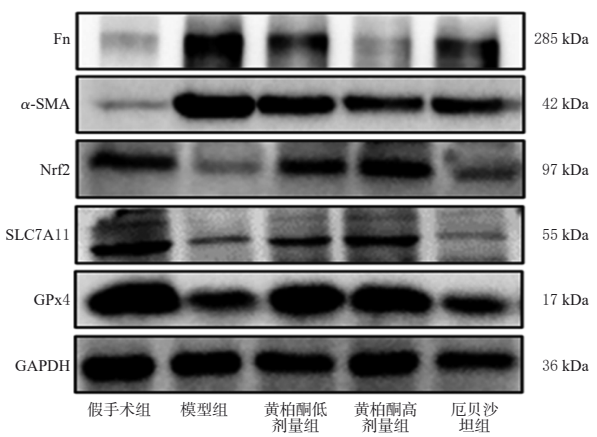


图3　各组小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4、SLC7A11蛋白表达的电泳图

表4　各组小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4、SLC7A11蛋白表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Fn/GAPDH	α-SMA/GAPDH	Nrf2/GAPDH	GPx4/GAPDH	SLC7A11/GAPDH
假手术组	0.22±0.05	0.22±0.02	1.14±0.01	1.42±0.03	1.27±0.03
模型组	0.86±0.02[a]	1.08±0.04[a]	0.39±0.01[a]	0.79±0.02[a]	0.48±0.02[a]
厄贝沙坦组	0.72±0.08	0.76±0.02[b]	0.79±0.02[b]	0.64±0.02[b]	0.55±0.02[b]
黄柏酮低剂量组	0.58±0.07[b]	0.77±0.02[b]	0.84±0.01[b]	1.01±0.03[b]	0.65±0.03[b]
黄柏酮高剂量组	0.34±0.07[b]	0.62±0.05[b]	1.12±0.03[b]	1.08±0.04[b]	0.94±0.01[b]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

表5　各组小鼠肾脏组织中Fn、α-SMA、Nrf2、GPx4、SLC7A11 mRNA表达水平的测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	Fn mRNA	α-SMA mRNA	Nrf2 mRNA	GPx4 mRNA	SLC7A11 mRNA
假手术组	1.06±0.08	1.04±0.05	1.03±0.03	1.02±0.06	1.01±0.11
模型组	28.28±1.41[a]	20.99±0.90[a]	0.06±0.01[a]	0.24±0.01[a]	0.21±0.01[a]
厄贝沙坦组	5.09±0.99[b]	8.96±1.04[b]	0.14±0.02	0.42±0.02[b]	0.28±0.03
黄柏酮低剂量组	19.1±3.73[b]	9.76±0.29[b]	0.64±0.04[b]	0.47±0.02[b]	0.34±0.03
黄柏酮高剂量组	1.56±0.17[b]	5.45±0.45[b]	0.73±0.06[b]	0.78±0.11[b]	0.42±0.03[b]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$

4　讨论

众所周知，CKD因具有患病率高、知晓率低、医疗花费高的特点，早已成为全球范围内危害人类健康的公共卫生问题，其中肾间质纤维化是CKD的主要病理表现[2]。目前，临床上抗肾纤维化的常规化学药物不能有效阻止肾纤维化的进展，因此，常用含中药成分的药物进行辅助治疗，这已成为CKD一体化治疗方案不可或缺的补充治疗手段之一[13-14]。

黄柏酮是从黄柏、白鲜皮植物中提取的天然化合物，有研究证明，黄柏酮对四氯化碳诱导的肝纤维化、博来霉素诱导的肺纤维化具有改善作用[9-10]。由此可知，黄柏酮对纤维化具有较好的改善作用。基于此，本研究建立经典的UUO小鼠模型，观察黄柏酮对小鼠肾间质纤维化的影响。Fn是一种主要的细胞外基质糖蛋白，与纤维化程度密切相关，其表达水平越高，纤维化程度越重[15]；α-SMA是肌成纤维细胞的特征蛋白，常作为评估纤维化程度的重要指标[16]。本研究病理学形态观察和相关指标检测结果显示，经黄柏酮干预后，UUO模型小鼠肾脏组织病理形态及胶原沉积明显改善，同时小鼠血清中Cr、BUN水平，Fn、α-SMA蛋白和mRNA表达水平均显著降低。这表明，黄柏酮对UUO模型小鼠的肾脏功能具有保护作用，且可改善其肾间质纤维化。

铁死亡涉及包括肿瘤、心血管疾病、神经退行性变、肝病等多种疾病的病理过程，有望成为研发药物和治疗疾病的有效靶点[17]。相关研究证明，铁死亡与糖尿病肾病中的肾小管细胞死亡相关[18]，抑制铁死亡可以减轻UUO模型小鼠的肾纤维化[19]。铁死亡的主要生化特征包括Fe^{2+}浓度升高、活性氧（reactive oxygen species，ROS）堆积、脂质过氧化物积累，其中ROS堆积常伴有MDA含量增加和T-SOD活力降低[3]。Nrf2是一种碱性亮氨酸拉链转录因子，当其受到外界氧化应激因子刺激后，活化进入细胞核，从而与抗氧化反应元件结合发挥抗氧化作用[20]。Nrf2还可以启动其下游与铁死亡密切相关的靶基因*SLC7A11*、*GPx4*等[21]。*SLC7A11*又名*xCT*，属于溶质转运家族，其编码的胱氨酸/谷氨酸反向转运体（cystine/glutamate antiporter，System Xc-）通过维持氧化还原的稳定状态来充当铁死亡的负向调节剂；

System Xc-还可介导胱氨酸和谷氨酸在细胞内外的交换作用，其中胱氨酸在细胞内可先被还原为半胱氨酸，再合成谷胱甘肽[22]。GPx4又名磷脂过氧化氢谷胱甘肽过氧化物酶，是已知的唯一能够直接清除脂质过氧化物的酶，可在谷胱甘肽的辅助作用下，将有害的脂质过氧化物还原为无害的物质，从而阻断脂质过氧化反应的发生，进而抑制铁死亡[23]。本研究结果显示，模型组小鼠肾脏组织中Fe^{2+}浓度和血清中MDA含量均显著升高，血清中T-SOD活力显著降低，提示铁死亡的发生；经黄柏酮干预后，小鼠肾脏组织中Fe^{2+}浓度和血清中MDA含量均显著降低，血清中T-SOD活力显著升高，肾脏组织中Nrf2、GPx4、SLC7A11 mRNA（黄柏酮低剂量组SLC7A11 mRNA除外）和蛋白的表达水平均显著升高。这表明黄柏酮可通过激活Nrf2/GPx4信号通路来抑制铁死亡，从而改善UUO模型小鼠肾间质纤维化。

综上所述，黄柏酮可改善UUO模型小鼠的肾间质纤维化，具体作用机制可能与激活Nrf2/GPx4信号通路、抑制铁死亡有关。

参考文献

[1] 上海市肾内科临床质量控制中心专家组. 慢性肾脏病早期筛查、诊断及防治指南：2022年版[J]. 中华肾脏病杂志，2022，38(5)：453-464.

[2] BREYER M D，SUSZTAK K. The next generation of therapeutics for chronic kidney disease[J]. Nat Rev Drug Discov，2016，15(8)：568-588.

[3] 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.

[4] WANG J Y，LIU Y，WANG Y Q，et al. The cross-link between ferroptosis and kidney diseases[J]. Oxid Med Cell Longev，2021，2021：6654887.

[5] GAO Y，HOU R，LIU F，et al. Obacunone causes sustained expression of MKP-1 thus inactivating p38 MAPK to suppress pro-inflammatory mediators through intracellular MIF[J]. J Cell Biochem，2018，119(1)：837-849.

[6] ZHOU J，WANG T Y，WANG H Z，et al. Obacunone attenuates high glucose-induced oxidative damage in NRK-52E cells by inhibiting the activity of GSK-3β[J]. Biochem Biophys Res Commun，2019，513(1)：226-233.

[7] MURTHY K N，JAYAPRAKASHA G K. Cytotoxicity of obacunone and obacunone glucoside in human prostate cancer cells involves Akt-mediated programmed cell death [J]. Toxicology，2015，329：88-97.

[8] QIU Z W，HE J Z，SHAO G Y，et al. Obacunone retards renal cyst development in autosomal dominant polycystic kidney disease by activating NRF_2[J]. Antioxidants（Basel），2021，11(1)：38.

[9] XU S M，CHEN W M，XIE Q F，et al. Obacunone activates the Nrf2-dependent antioxidant responses[J]. Protein Cell，2016，7(9)：684-688.

[10] BAI Y Q，WANG W W，WANG L，et al. Obacunone attenuates liver fibrosis with enhancing anti-oxidant effects of GPx4 and inhibition of EMT[J]. Molecules，2021，26(2)：318.

[11] LI J，DENG S H，LI J，et al. Obacunone alleviates ferroptosis during lipopolysaccharide-induced acute lung injury by upregulating Nrf2-dependent antioxidant responses[J]. Cell Mol Biol Lett，2022，27(1)：29.

[12] LIU M N，LIU T L，SHANG P J，et al. Acetyl-11-keto-β-boswellic acid ameliorates renal interstitial fibrosis via Klotho/TGF-β/Smad signalling pathway[J]. J Cell Mol Med，2018，22(10)：4997-5007.

[13] WEBSTER A C，NAGLER E V，MORTON R L，et al. Chronic kidney disease[J]. Lancet，2017，389(10075)：1238-1252.

[14] 《中成药治疗优势病种临床应用指南》标准化项目组. 中成药治疗慢性肾脏病3～5期（非透析）临床应用指南：2020年[J]. 中国中西医结合杂志，2021，41(3)：261-272.

[15] 程红新，杨晓萍，蒋雅红，等. 纤维连接蛋白在肾间质纤维化大鼠肾组织中的表达[J]. 中国组织工程研究，2012，16(31)：5837-5842.

[16] 杨晓萍，张焕巧，赵瑾，等. 整合素连接激酶和α-平滑肌肌动蛋白的表达与肾间质纤维化关系的研究[J]. 北京医学，2007，29(10)：600-603.

[17] STOCKWELL B R，ANGELI J P F，BAYIR H，et al. Ferroptosis：a regulated cell death nexus linking metabolism，redox biology，and disease[J]. Cell，2017，171(2)：273-285.

[18] LI S W，ZHENG L S，ZHANG J，et al. Inhibition of ferroptosis by up-regulating Nrf2 delayed the progression of diabetic nephropathy[J]. Free Radic Biol Med，2021，162：435-449.

[19] YANG L，GUO J，YU N，et al. Tocilizumab mimotope alleviates kidney injury and fibrosis by inhibiting IL-6 signaling and ferroptosis in UUO model[J]. Life Sci，2020，261：118487.

[20] KERINS M J，OOI A. The roles of Nrf_2 in modulating cellular iron homeostasis[J]. Antioxid Redox Signal，2018，29(17)：1756-1773.

[21] ZHANG J，LIU L，LI F R，et al. Treatment with catalpol protects against cisplatin-induced renal injury through Nrf2 and NF-κB signaling pathways[J]. Exp Ther Med，2020，20(4)：3025-3032.

[22] SHIN C S，MISHRA P，WATROUS J D，et al. The glutamate/cystine xCT antiporter antagonizes glutamine metabolism and reduces nutrient flexibility[J]. Nat Commun，2017，8：15074.

[23] IMAI H，MATSUOKA M，KUMAGAI T，et al. Lipid peroxidation-dependent cell death regulated by GPx4 and ferroptosis[J]. Curr Top Microbiol Immunol，2017，403：143-170.

（收稿日期：2022-08-18　修回日期：2023-01-20）
（编辑：唐晓莲）