

铁抑素 -1 上调 Nrf2/HO-1/GCLC 信号通路 对敌草快诱导小鼠急性肾损伤的保护作用

彭亮¹ 周满红² 王建红¹

¹ 贵州航天医院急诊科, 贵州遵义 563099; ² 贵州茅台医院急诊科, 贵州遵义 564599

通信作者: 王建红, Email: 407897384@qq.com

【摘要】 目的 探讨铁抑素 -1 (Fer-1) 对敌草快中毒致小鼠急性肾损伤 (AKI) 的保护作用及其可能机制。**方法** 选择 60 只 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠, 按随机数字表法分为对照组、敌草快模型组、Fer-1 干预组、Fer-1 对照组, 每组 15 只。采用一次性腹腔注射 40 mg/kg 敌草快溶液 1 mL 的方法复制敌草快中毒小鼠 AKI 模型。制模后对照组和 Fer-1 对照组腹腔注射相同剂量的双蒸水 (ddH₂O)。制模 4 h 后, 对照组、敌草快模型组给予 0.5 mL ddH₂O, Fer-1 干预组、Fer-1 对照组分别给予 0.5 mL Fer-1 (1 mg/kg), 连续干预 7 d, 给药 7 d 后处死小鼠, 检测各组血清尿素氮 (BUN)、血肌酐 (SCr)、肾损伤分子 -1 (KIM-1) 水平; 同时取肾组织, 测定肾组织中还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA)、肿瘤坏死因子 - α (TNF- α)、白细胞介素 -6 (IL-6) 含量; 于透射电镜下观察肾脏结构变化; 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 测定肾组织中磷酸化核因子 E2 相关因子 (p-Nrf2)、血红素加氧酶 -1 (HO-1)、铁蛋白 -1、谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基 (GCLC) 的蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, 敌草快模型组血清 BUN、SCr、KIM-1 以及肾组织中 TNF- α 、IL-6 和 MDA 水平均明显升高 [BUN (mmol/L): 13.90 ± 1.14 比 7.93 ± 1.00 , SCr ($\mu\text{mol/L}$): 64.18 ± 2.96 比 30.48 ± 2.21 , KIM-1 (ng/L): 83.40 ± 3.22 比 24.56 ± 1.26 , TNF- α (ng/L): 98.72 ± 2.67 比 32.79 ± 2.78 , IL-6 (ng/L): 86.92 ± 4.61 比 56.16 ± 3.36 , MDA (nmol/mg): 9.77 ± 1.80 比 4.35 ± 0.76 , 均 $P < 0.05$], 而 GSH 活性明显下降 ($\mu\text{mol/mg}$: 22.62 ± 2.41 比 31.82 ± 1.59 , $P < 0.05$); 与敌草快模型组比较, Fer-1 干预组 BUN、SCr、KIM-1 及肾组织 TNF- α 、IL-6 和 MDA 水平明显下降 [血清 BUN (mmol/L): 9.93 ± 1.20 比 13.90 ± 1.14 , SCr ($\mu\text{mol/L}$): 48.15 ± 3.23 比 64.18 ± 2.96 , KIM-1 (ng/L): 77.35 ± 3.28 比 83.40 ± 3.22 ; 肾组织 TNF- α (ng/L): 80.03 ± 5.77 比 98.72 ± 2.67 , IL-6 (ng/L): 77.64 ± 3.43 比 86.92 ± 4.61 , MDA (nmol/mg): 8.12 ± 1.75 比 9.77 ± 1.80], 肾组织 GSH 活性明显升高 ($\mu\text{mol/mg}$: 26.13 ± 1.49 比 22.62 ± 2.41), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。透射电镜下可见敌草快模型组肾组织基底膜 3 层结构模糊, 厚薄不均, 足突排列紊乱, 线粒体明显肿胀, 基质溶解, 嵴断裂, 较对照组明显受损; Fer-1 干预组肾组织基底膜、足突、线粒体损伤较敌草快明显减轻。Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 敌草快模型组肾组织中铁蛋白 -1、GCLC、HO-1、p-Nrf2 的蛋白表达水平明显下降 [铁蛋白 -1 蛋白表达 (铁蛋白 -1/ β -actin): 0.589 ± 0.156 比 1.086 ± 0.165 , GCLC 蛋白表达 (GCLC/ β -actin): 0.644 ± 0.155 比 1.062 ± 0.144 , HO-1 蛋白表达 (HO-1/ β -actin): 0.584 ± 0.142 比 1.016 ± 0.144 , p-Nrf2 蛋白表达 (p-Nrf2/ β -actin): 0.874 ± 0.069 比 1.115 ± 0.162 , 均 $P < 0.05$]; 与敌草快模型组比较, Fer-1 干预组铁蛋白 -1、GCLC、HO-1、p-Nrf2 的蛋白表达均明显增加 [铁蛋白 -1 蛋白表达 (铁蛋白 -1/ β -actin): 1.168 ± 0.149 比 0.589 ± 0.156 , GCLC 蛋白表达 (GCLC/ β -actin): 1.063 ± 0.188 比 0.644 ± 0.155 , HO-1 蛋白表达 (HO-1/ β -actin): 1.359 ± 0.266 比 0.584 ± 0.142 , p-Nrf2 蛋白表达 (p-Nrf2/ β -actin): 1.142 ± 0.139 比 0.874 ± 0.069], 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** Fer-1 可通过上调 Nrf2/HO-1/GCLC 信号通路水平抑制铁死亡, 减轻敌草快诱导的小鼠 AKI。

【关键词】 铁抑素 -1; 敌草快; 核因子 E2 相关因子 2; 急性肾损伤

基金项目: 国家自然科学基金 (82060346); 贵州省遵义市科技计划项目 (2023-414, 2024-130)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2026.03.011

Ferrostatin-1 alleviates diquat-induced acute kidney injury in mice via upregulating the nuclear factor-E2-related factor 2/heme oxygenase-1/glutamate-cysteine ligase catalytic subunit signaling pathway

Peng Liang¹, Zhou Manhong², Wang Jianhong¹

¹Department of Emergency, Guizhou Aerospace Hospital, Zunyi 563003, Guizhou, China; ²Department of Emergency, Kweichow Moutai Hospital, Zunyi 564500, Guizhou, China

Corresponding author: Wang Jianhong, Email: 407897384@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect and possible mechanism of ferrostatin-1 (Fer-1) on acute kidney injury (AKI) in mice induced by diquat poisoning. **Methods** A total of 60 SPF-grade healthy male C57BL/6 mice were selected and divided into a control group, a diquat group, a Fer-1 intervention group, and a Fer-1 control group according to a random number table method, with 15 mice in each group. The AKI model of diquat-poisoned mice was replicated by injecting 1 mL of 40 mg/kg diquat solution into the peritoneal cavity once. After modeling, the control group and Fer-1 control group were injected with the same dose of distilled water (ddH₂O) into the peritoneal cavity. Four hours after mold establishment, the control group and the model group were given

0.5 mL of ddH₂O, whereas the Fer-1 intervention group and the Fer-1 control group received 0.5 mL of Fer-1 (1 mg/kg), respectively. The intervention was carried out continuously for 7 days. Following 7 days of drug administration, the mice were euthanized, and the serum concentrations of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), and kidney injury molecule-1 (KIM-1) were quantified. Concurrently, renal tissues were harvested to assess the levels of reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and interleukin-6 (IL-6) within the kidneys. Structural changes in the kidney were observed under transmission electron microscopy; the protein expression levels of phosphorylated nuclear factor E2-related factor (p-Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), ferritin-1, and the glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) in renal tissue were quantified using Western blotting. **Results** Compared with the control group, the levels of BUN, SCr, KIM-1, as well as TNF- α , IL-6, and MDA in kidney tissue were significantly elevated in the diquat group [BUN (mmol/L): 13.90 ± 1.14 vs. 7.93 ± 1.00 , SCr ($\mu\text{mol/L}$): 64.18 ± 2.96 vs. 30.48 ± 2.21 , KIM-1 (ng/L): 83.40 ± 3.22 vs. 24.56 ± 1.26 , TNF- α (ng/L): 98.72 ± 2.67 vs. 32.79 ± 2.78 , IL-6 (ng/L): 86.92 ± 4.61 vs. 56.16 ± 3.36 , MDA (nmol/mg): 9.77 ± 1.80 vs. 4.35 ± 0.76 , all $P < 0.05$], while GSH activity was significantly decreased ($\mu\text{mol/mg}$: 22.62 ± 2.41 vs. 31.82 ± 1.59 , $P < 0.05$); Compared with the diquat group, the levels of BUN, SCr, KIM-1, as well as TNF- α , IL-6, and MDA in renal tissue were significantly decreased in the Fer-1 intervention group [serum BUN (mmol/L): 9.93 ± 1.20 vs. 13.90 ± 1.14 , SCr ($\mu\text{mol/L}$): 48.15 ± 3.23 vs. 64.18 ± 2.96 , KIM-1 (ng/L): 77.35 ± 3.28 vs. 83.40 ± 3.22 ; renal tissue TNF- α (ng/L): 80.03 ± 5.77 vs. 98.72 ± 2.67 , IL-6 (ng/L): 77.64 ± 3.43 vs. 86.92 ± 4.61 , MDA (nmol/mg): 8.12 ± 1.75 vs. 9.77 ± 1.80], and the activity of GSH in renal tissue was significantly increased ($\mu\text{mol/mg}$: 26.13 ± 1.49 vs. 22.62 ± 2.41). All differences were statistically significant (all $P < 0.01$). Transmission electron microscopy revealed blurred three-layer structure of renal basement membrane, uneven thickness, disordered podocyte foot processes, severe mitochondrial swelling, matrix dissolution and cristae rupture in the diquat model group, which indicated severe renal damage relative to controls. By contrast, ultrastructural injuries of renal basement membrane, podocytes and mitochondria were greatly alleviated in the Fer-1 intervention group. Western blotting results showed that compared with the control group, the protein expression levels of ferritin-1, GCLC, HO-1, and p-Nrf2 in the kidney tissue of the diquat group were significantly decreased [ferritin-1 protein expression (ferritin-1/ β -actin): 0.589 ± 0.156 vs. 1.086 ± 0.165 , GCLC protein expression (GCLC/ β -actin): 0.644 ± 0.155 vs. 1.062 ± 0.144 , HO-1 protein expression (HO-1/ β -actin): 0.584 ± 0.142 vs. 1.016 ± 0.144 , p-Nrf2 protein expression (p-Nrf2/ β -actin): 0.874 ± 0.069 vs. 1.115 ± 0.162 , all $P < 0.05$]; Compared with the diquat group, the protein expression of ferritin-1, GCLC, HO-1, and p-Nrf2 increased in the Fer-1 intervention group [ferritin-1 protein expression (ferritin-1/ β -actin): 1.168 ± 0.149 vs. 0.589 ± 0.156 , GCLC protein expression (GCLC/ β -actin): 1.063 ± 0.188 vs. 0.644 ± 0.155 , HO-1 protein expression (HO-1/ β -actin): 1.359 ± 0.266 vs. 0.584 ± 0.142 , p-Nrf2 protein expression (p-Nrf2/ β -actin): 1.142 ± 0.139 vs. 0.874 ± 0.069], with statistically significant differences (all $P < 0.05$). **Conclusion** Fer-1 can inhibit ferroptosis by upregulating the Nrf2/HO-1/GCLC signaling pathway, thereby alleviating diquat-induced AKI in mice.

【Key words】 Ferrostatin-1; Diquat; Nuclear factor-E2-related factor 2; Acute kidney injury

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82060346); Science and Technology Plan Project of Zunyi City, Guizhou Province (2023-414, 2024-130)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2026.03.011

敌草快属于联吡啶类非选择性触杀型除草剂^[1]。在临床上,每年有患者服用敌草快后死亡,敌草快通常为水溶制剂,致死量约 6~12 g,中毒后主要损害肺、肝、肾等重要器官,严重者出现多器官功能衰竭^[2]。敌草快的中毒机制主要是通过激活细胞连续循环氧化还原反应过程产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)导致氧化应激^[3]。然而,随着细胞内 ROS 和 RNS 的大量增加,细胞内的抗氧化酶等还原型物质一旦被耗尽,就会导致细胞死亡^[4]。有研究表明,敌草快对人体可造成严重的肾毒性作用,主要表现为急性肾小管损伤、脂质变性、细胞质内远行空泡形成以及肾脏功能衰竭^[5]。肾功能损害后可常见临床症状有少尿、无尿、蛋白尿、洗肉水样血尿、足部及颜面部水肿、腹痛、腰痛、电解质紊乱、血压升高、心力衰竭、心律失常等临床表现;

此外部分患者出现意识疲惫感、休克、多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)、弥散性血管内凝血(disseminated intravascular coagulation, DIC)最终导致死亡^[6]。因此,为了减轻敌草快患者的急性肾损伤(acute kidney injury, AKI),寻找一种新的临床策略是非常有必要的。

铁死亡是一种非凋亡性细胞死亡方式,其核心机制是细胞内铁离子依赖的脂质过氧化反应失衡。游离铁离子浓度升高会通过芬顿反应生成 ROS,攻击细胞膜上的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化链式反应,使脂质过氧化物累积。细胞内抗氧化系统主要是谷胱甘肽-谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 轴,若谷胱甘肽合成减少或 GPX4 活性被抑制,细胞防御能力下降,导致细胞膜结构破坏、细胞器功能紊乱,引发细胞死亡。与凋亡不同,铁死亡细胞表现为细胞体积增大、线

粒体皱缩、嵴减少或消失及细胞膜完整性丧失。铁死亡属于非凋亡性细胞程序性死亡,铁死亡的特征性表现包括亚铁离子参与的芬顿反应形成更强的羟自由基(hydroxyl radical, HO·),导致细胞氧化应激反应及脂质过氧化^[7]。GPX4 参与调节的胱氨酸转运和谷氨酸半胱氨酸连接酶催化亚基(glutamate-cysteine ligase catalytic subunit, GCLC)在铁死亡过程中具有关键作用^[8]。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor-E2-related factor 2, Nrf2)在氧化应激时通过调节氧化型谷胱甘肽(glutathione oxidized, GSSG)、GPX4、GCLC 和溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)等相关基因来维持氧化还原平衡,并作为铁稳态中调节靶基因的主要转录因子^[9]。Chen 等^[10]的研究显示, Nrf2 进入细胞核可通过促进 GCLC 基因表达、抑制细胞死亡来减轻敌草快中毒导致的器官功能损害。有研究表明,抑制 Nrf2 信号通路可促进铁死亡过程,促进 Nrf2 表达可改善细胞铁死亡^[11]。因此,人们推测敌草快可能通过抑制 Nrf2/ 血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)信号通路及 GPX4 合成来触发铁死亡,从而诱发肾损伤。

已有研究显示,铁死亡抑制剂——铁抑素-1(ferrostatin-1, Fer-1)在抑制铁死亡的同时可显著降低缺血/再灌注和草酸盐晶体诱导的 AKI 模型中肾小管损伤指数、血肌酐(serum creatinine, SCr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平,说明铁死亡在调节 AKI 后肾小管细胞损伤的病理生理过程中起着至关重要的作用^[12]。敌草快中毒导致的肾损伤是否与铁死亡有关,目前鲜见报告,随着铁死亡在 AKI 中的作用被逐渐认识,通过抑制铁死亡来治疗 AKI 成为肾脏病学界的研究热点。本课题组前期对敌草快染毒小鼠模型进行了研究,结果显示,小鼠肾损伤模型中代表发生铁死亡的标志物之一 Fe^{2+} 水平明显升高,提示敌草快导致的肾损伤可能与铁死亡密切相关。因此,本研究拟通过构建敌草快中毒模型,观察抑制铁死亡对敌草快中毒所致 AKI 的作用及可能机制,并探究 Nrf2/HO-1 信号通路是否为其主要信号通路,以期为临床治疗和研究提供新的理论依据。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要药品、试剂:敌草快二溴化物、Fer-1 均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;BUN 和 SCr 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;肾

损伤分子 1(kidney injury molecule-1, KIM-1)检测试剂盒购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;Nrf2 抗体、HO-1 抗体、铁蛋白抗体、GCLC 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗鼠和抗兔免疫球蛋白 G 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 实验分组及处理:选择 6~8 周龄 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠 60 只,体质量(20 ± 3)g,购自遵义医科大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(黔)2021-0004。实验前至少按照动物实验中心饲养标准适应性饲养 1 周。将小鼠按随机数字表法分为对照组、敌草快模型组、Fer-1 干预组、Fer-1 对照组,每组 15 只。采用一次性腹腔注射 1 mL 浓度为 40 mg/kg 的敌草快溶液的方法复制敌草快中毒小鼠模型。对照组和 Fer-1 对照组腹腔注射相同剂量的双蒸馏水(double distilled water, ddH₂O)。制模 4 h 后,对照组、敌草快模型组给予 0.5 mL ddH₂O, Fer-1 干预组、Fer-1 对照组给予 0.5 mL Fer-1 (1 mg/kg),连续干预 7 d。

1.3 伦理学:本研究符合医学伦理学标准,动物处置方法符合动物伦理学要求,设计方案获得遵义医科大学附属贵州航天医院生物医学研究伦理委员会批准(审批号:伦审 2025-KY-001)。

1.4 检测指标及方法:给药 7 d 后用异氟烷麻醉小鼠并安乐死,仰卧位固定于恒温手术台上,开腹充分暴露双肾脏,快速剪取左肾下极组织于电镜固定液中固定后,在透射电镜下观察肾组织结构变化;取左肾上极组织及右肾组织置于 -80 ℃ 冰箱保存备用;摘除小鼠眼球取血收集血液样本检测 BUN、SCr、KIM-1 水平。

1.4.1 透射电镜下观察肾脏组织的病理结构改变:取小鼠左肾下极组织,剪成直径小于 1 mm³ 组织块,固定后行脱水、渗透、包埋、切片、染色等处理,置于透射电镜下拍照收集图像并分析结果。

1.4.2 采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测 SCr、BUN 和 KIM-1 水平:麻醉小鼠后摘除眼球取血,3 000 r/min(离心半径 8.6 cm)离心 10 min 后,收集上清液存于 -20 ℃ 冰箱备用。操作严格按试剂盒说明书步骤,各组 SCr 水平在波长 546 nm 处测定各孔吸光度(absorbance, A)值, BUN 在波长 640 nm 处测定各孔 A 值,计算 SCr、BUN 水平;按 KIM-1 试剂盒操作说

明书检测 KIM-1 水平。

1.4.3 氧化应激反应指标测定：将存于 -20°C 的肾组织样本取出。根据试剂盒说明书步骤操作，采用硫代巴比妥酸 (thiobarbituric acid, TBA) 法测定肾组织中丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量；采用 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸) [5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 定量法测定肾组织中还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量。

1.4.4 炎症指标测定：将存于 -20°C 的肾组织样本取出，预冷磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 充分冲洗肾脏，去除残留血液，称重，加含蛋白酶抑制剂的放射免疫沉淀法 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液冰上充分匀浆， $12\,000\text{ r/min}$ 4°C 离心 15 min ，取上清，二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 测总蛋白浓度进行标准化定量，按 ELISA 试剂盒说明书操作，分别检测肿瘤坏死因子 $-\alpha$ (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和白细胞介素 -6 (interleukin-6, IL-6) 的含量。

1.4.5 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测肾组织中铁蛋白-1、GCLC、HO-1、磷酸化 Nrf2 (phosphorylated Nrf2, p-Nrf2) 的蛋白表达水平：从 -80°C 冰箱中取右肾组织，将小离心管置于冰上。向肾组织中加入适量 RIPA、苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 及蛋白磷酸酶抑制剂，依次进行研磨、裂解、匀浆机研磨操作后，置于冰上裂解 20 min ；在 4°C 条件下，以 $12\,000\text{ r/min}$ (离心半径 8.6 cm) 离心 30 min 。取上清液，进行蛋白定量、蛋白变性处理，将标本置于 -20°C 冰箱储存备用，根据测定的蛋白质相对分子质量大小，选择不同浓度的分离胶与浓缩胶，配制后进行电泳，聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene difluoride, PVDF) 膜上转膜、封闭等处理。加入一抗 4°C 孵育过夜，用三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液 (Tris-buffered saline with Tween 20, TBST) 洗涤 3 次，每次 10 min 。再加入二抗室温振荡 2 h 后，用 TBST 洗涤 3 次，每次 10 min 。用电化学发光 (electrochemiluminescent immunoassay, ECL) 显影液曝光显影，使用 Image J 软件测定各条带灰度值，以目的蛋白与 β -actin 的比值表示目的蛋白的蛋白表达水平。

1.5 统计学方法：使用 SPSS 29.0 统计软件分析数据。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)；组间两两比较时，若方差齐性则使用

LSD 检验，若方差不齐则采用 Dunnett T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾组织结构变化 (图 1)：透射电镜下可见对照组肾小球基底膜厚薄均匀，完整连续，足突排列较好，线粒体未见明显肿胀，体积小，基质均匀，嵴排列可。敌草快模型组肾小球基底膜三层结构模糊，厚薄不均，足突排列紊乱且部分融合；细胞核染色质分布不均；线粒体显著肿胀，基质部分溶解，嵴大量断裂。Fer-1 干预组肾小球基底膜局部模糊，厚薄不均，未见明显断裂，足突排列大部分较好，极少融合；细胞核染色质均匀；线粒体轻微肿胀，嵴排列尚可，基质均匀；线粒体损害较敌草快模型组明显改善。Fer-1 对照组肾组织基底膜厚薄均匀，完整连续，线粒体未见明显肿胀，基质均匀，嵴排列尚可。上述结果表明 Fer-1 减轻了敌草快导致的肾损伤。

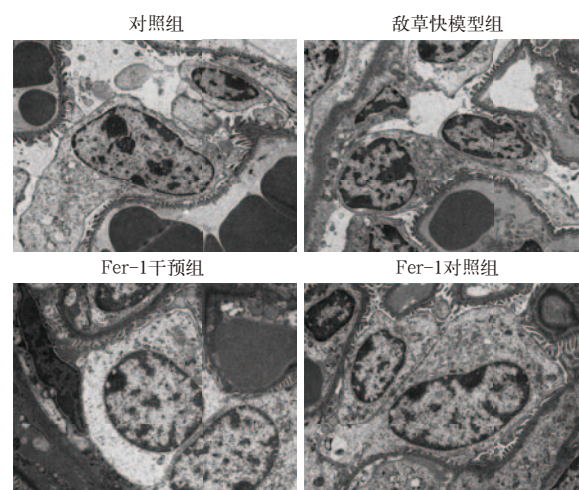


图 1 透射电镜下观察各组小鼠肾组织细胞肾小球结构改变 铀-铅双染 高倍放大

2.2 各组小鼠血清中 BUN、SCr 和 KIM-1 水平比较 (表 1)：与对照组比较，敌草快模型组血清 BUN、SCr 和 KIM-1 水平均明显升高 (均 $P < 0.01$)；Fer-1 干预组血清 BUN、Cr 和 KIM-1 水平较敌草快模型组均明显下降 (均 $P < 0.01$)。提示 Fer-1 可降低敌草快中毒小鼠 BUN、SCr 和 KIM-1 水平。

表 1 各组小鼠血清中 BUN、SCr 和 KIM-1 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	BUN (mmol/L)	SCr ($\mu\text{mol/L}$)	KIM-1 (ng/L)
对照组	6	7.93 ± 1.00	30.48 ± 2.21	24.56 ± 1.26
敌草快模型组	6	13.90 ± 1.14^a	64.18 ± 2.96^a	83.40 ± 3.22^a
Fer-1 干预组	6	9.93 ± 1.20^b	48.15 ± 3.23^b	77.35 ± 3.28^b
Fer-1 对照组	6	7.41 ± 0.61	28.05 ± 1.74	24.83 ± 2.54

注：与对照组比较， $^aP < 0.01$ ；与敌草快模型组比较， $^bP < 0.01$

2.3 各组小鼠肾组织中 GSH 和 MDA 含量比较(表 2): 敌草快模型组肾组织中 MDA 水平较对照组明显增加, Fer-1 干预组肾脏组织 MDA 水平较敌草快模型组明显下降($P<0.01$); 而敌草快模型组 GSH 活性较对照组明显下降; Fer-1 干预组 GSH 活性较敌草快模型组明显升高(均 $P<0.01$)。提示 Fer-1 可增加敌草快中毒小鼠 GSH 活性,降低 MDA 水平。

表 2 各组小鼠肾组织 GSH 和 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	GSH($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	MDA(nmol/mg)
对照组	6	31.82 $\pm$ 1.59	4.35 $\pm$ 0.76
敌草快模型组	6	22.62 $\pm$ 2.41 ^a	9.77 $\pm$ 1.80 ^a
Fer-1 干预组	6	26.13 $\pm$ 1.49 ^b	8.12 $\pm$ 1.75 ^b
Fer-1 对照组	6	31.84 $\pm$ 1.41	4.49 $\pm$ 0.65

注: 与对照组比较, ^a $P<0.01$; 与敌草快模型组比较, ^b $P<0.01$

2.4 各组小鼠肾组织中 TNF- α 和 IL-6 水平比较(表 3): 敌草快模型组肾组织中 TNF- α 和 IL-6 含量较对照组明显增加, Fer-1 干预组肾组织中 TNF- α 和 IL-6 水平较敌草快模型组明显降低(均 $P<0.01$)。提示 Fer-1 可降低敌草快中毒小鼠体内炎症反应水平。

表 3 各组小鼠肾组织 TNF- α 、IL-6 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)
对照组	6	32.79 $\pm$ 2.78	56.16 $\pm$ 3.36
敌草快模型组	6	98.72 $\pm$ 2.67 ^a	86.92 $\pm$ 4.61 ^a
Fer-1 干预组	6	80.03 $\pm$ 5.77 ^b	77.64 $\pm$ 3.43 ^b
Fer-1 对照组	6	31.21 $\pm$ 2.48	52.64 $\pm$ 3.04

注: 与对照组比较, ^a $P<0.01$; 与敌草快模型组比较, ^b $P<0.01$

2.5 各组小鼠肾组织氧化应激和铁死亡相关蛋白的表达水平比较(表 4; 图 2): 敌草快模型组肾组织中铁蛋白-1、GCLC、HO-1、p-Nrf2 的蛋白表达水平均较对照组明显降低(均 $P<0.05$); Fer-1 干预组铁蛋白-1、GCLC、HO-1 和 p-Nrf2 的蛋白表达水平均较敌草快模型组明显增加(均 $P<0.05$)。说明 Fer-1 可促进铁蛋白-1、GCLC、HO-1、p-Nrf2 的表达,减轻氧化应激反应及抑制铁死亡,改善敌草快诱导的小鼠肾损伤。

3 讨论

目前临床工作中因各种途径导致的敌草快中毒病例数量显著增加^[13]。敌草快中毒可对肾脏、肝脏、心脏、脑、肺、胰腺等多个器官的功能造成损害。其中,肾脏作为敌草快的主要排泄器官,也是

表 4 各组小鼠肾组织氧化应激、铁死亡相关蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	铁蛋白表达 (铁蛋白-1/ β -actin)	GCLC 蛋白表达 (GCLC/ β -actin)
对照组	4	1.086 $\pm$ 0.165	1.062 $\pm$ 0.144
敌草快模型组	4	0.589 $\pm$ 0.156 ^a	0.644 $\pm$ 0.155 ^a
Fer-1 干预组	4	1.168 $\pm$ 0.149 ^c	1.063 $\pm$ 0.188 ^c
Fer-1 对照组	4	1.060 $\pm$ 0.192	0.773 $\pm$ 0.191

组别	动物数(只)	HO-1 蛋白表达 (HO-1/ β -actin)	p-Nrf2 蛋白表达 (p-Nrf2/ β -actin)
对照组	4	1.016 $\pm$ 0.144	1.115 $\pm$ 0.162
敌草快模型组	4	0.584 $\pm$ 0.142 ^a	0.874 $\pm$ 0.069 ^b
Fer-1 干预组	4	1.359 $\pm$ 0.266 ^c	1.142 $\pm$ 0.139 ^d
Fer-1 对照组	4	0.855 $\pm$ 0.168	1.294 $\pm$ 0.172

注: 与对照组比较, ^a $P<0.01$, ^b $P<0.05$; 与敌草快模型组比较, ^c $P<0.01$, ^d $P<0.05$

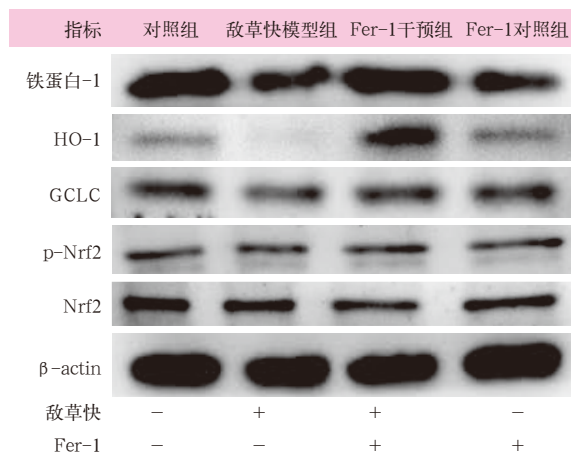


图 2 Western blotting 检测各组小鼠肾脏组织中铁蛋白-1、GCLC、HO-1、p-Nrf2 的蛋白表达水平

其主要作用靶点,常引发 AKI,严重时可能导致急性肾衰竭(acute renal failure, ARF),甚至导致患者死亡^[14]。敌草快中毒的主要病理生理机制: 敌草快主要通过扩散的方式进入细胞内^[15],通过氧化应激反应和脂质过氧化反应消耗细胞 GSH 及抗氧化酶[如 GPX4、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)等],一旦抗氧化物质被消耗殆尽,细胞将会受到损伤甚至出现死亡^[4]。此外,有研究表明,敌草快可促进铁蛋白中的 Fe^{3+} 转化为 Fe^{2+} ,使体内铁储量增加, Fe^{2+} 与过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2) 发生芬顿反应,形成强氧化剂 $\text{HO}\cdot$, ROS 经过脂质过氧化物(lipid hydroperoxide, LPO)反应形成大量脂质氢过氧化物(lipid hydroperoxide, LOOH),加重组织和细胞损害,进一步增强敌草快毒性作用^[16]。肾脏细胞基质中富含脂肪酸,在 ROS 的作用下可生成大量 LOOH,

而 LOOH 会进一步加剧氧化应激损伤,因此敌草快中毒会造成肾脏损害。铁死亡是近年来新发现的一种细胞程序性死亡形式,其主要机制是由 LPO 引发的铁依赖性调节性细胞死亡,主要特征为线粒体形态改变及细胞内脂质过氧化物大量积累;当铁离子催化的代谢过程出现异常时, LPO 会大量堆积,导致细胞膜破裂,进而诱发铁死亡^[17]。已有研究表明,通过上调抗氧化蛋白 HO-1 的表达水平来抑制铁死亡,可预防小鼠精子死亡,并减轻敌草快引起的生殖功能障碍^[18]。上述结果表明抑制铁死亡可能减轻敌草快引起的 AKI。

本研究通过构建敌草快诱导的小鼠 AKI 模型,透射电镜下观察显示,对照组肾小球基底膜厚薄均匀、完整连续,未见明显断裂或增厚,足突排列大多规整,线粒体亦无显著异常;而敌草快模型组肾小球基底膜结构模糊、厚薄不均,足突排列紊乱,线粒体嵴明显断裂,基质溶解,损伤相较于对照组明显。Fer-1 干预组肾组织基底膜、足突、线粒体损伤明显减轻。与对照组比较,敌草快模型组血清 BUN、SCr 和 KIM-1 水平明显升高,肾组织中 MDA、TNF- α 和 IL-6 水平明显增加,GSH 活性降低;给予 Fer-1 处理后,血清 BUN、SCr 和 KIM-1 水平均明显降低,肾组织中 MDA、TNF- α 和 IL-6 含量明显下降,GSH 活性明显增加。以上结果提示抑制铁死亡可促进敌草快中毒小鼠肾脏生成 GSH,降低 BUN、SCr、KIM-1、TNF- α 和 IL-6 含量,从而改善小鼠肾功能、氧化应激和炎症反应。与其他学者研究结果一致^[19-20]。

Fer-1 作为铁死亡抑制剂,可增加细胞内 GSH 生成,抑制氧化应激反应、脂质过氧化及抑制铁死亡,从而改善肾小管上皮细胞损伤^[12]。既往研究表明,敌草快可促进亚铁离子在细胞内的过度积聚导致铁超载,促进芬顿反应发生,激活铁死亡过程,从而导致雄性小鼠精原细胞死亡和精子生成障碍^[18]。本研究结果显示,敌草快可导致 C57BL/6 小鼠铁代谢水平增加,细胞内亚铁离子增加,铁死亡相关蛋白(铁蛋白-1、GCLC)表达水平明显降低,促进铁死亡;肾脏内抗氧化蛋白 HO-1、p-Nrf2 的蛋白表达水平明显降低进一步增加氧化应激反应;加用铁死亡抑制剂 Fer-1 后可明显减轻铁代谢,铁蛋白含量明显增加,肾脏组织中抗氧化蛋白表达增加,提示 Fer-1 可能通过抑制铁死亡,减轻氧化应激与脂质过氧化反应,从而改善敌草快中毒小鼠的 AKI。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王建红,彭亮,吴淦章,等. 莱菔硫烷通过激活 Keap1/Nrf2 信号通路减轻敌草快诱导的小鼠急性肝损伤[J]. 中华危重病急救医学, 2024, 36 (11): 1183-1189. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230628-00474.
- [2] Fussell KC, Udasin RG, Gray JP, et al. Redox cycling and increased oxygen utilization contribute to diquat-induced oxidative stress and cytotoxicity in Chinese hamster ovary cells overexpressing NADPH-cytochrome P450 reductase [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50 (7): 874-882. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.035.
- [3] Circu ML, Maloney RE, Aw TY. Diquat-induced cellular pyridine nucleotide redox changes and alteration of metabolic enzyme activities in colonic carcinoma cells [J]. Chem Biol Interact, 2017, 264: 43-51. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.01.007.
- [4] Yin J, Liu MF, Ren WK, et al. Effects of dietary supplementation with glutamate and aspartate on diquat-induced oxidative stress in piglets [J]. PLoS One, 2015, 10 (4): e0122893. DOI: 10.1371/journal.pone.0122893.
- [5] Xia Z, Liu W, Liu L. Clinical and pathological characteristics of diquat poisoning-related acute kidney injury [J]. Ren Fail, 2023, 45 (2): 2283590. DOI: 10.1080/0886022X.2023.2283590.
- [6] Tao YQ, Zheng JY, Xie ZC, et al. Thinking induced by acute kidney injury of diquat poisoning: cases report [J]. Clin Med Insights Case Rep, 2024, 17: 11795476241288840. DOI: 10.1177/11795476241288840.
- [7] Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. Cell, 2022, 185 (14): 2401-2421. DOI: 10.1016/j.cell.2022.06.003.
- [8] Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice [J]. Nat Cell Biol, 2014, 16 (12): 1180-1191. DOI: 10.1038/ncb3064.
- [9] Tang D, Chen X, Kang R, et al. Ferroptosis: molecular mechanisms and health implications [J]. Cell Res, 2021, 31 (2): 107-125. DOI: 10.1038/s41422-020-00441-1.
- [10] Chen YN, Chen YP, Zhang H, et al. Pterostilbene as a protective antioxidant attenuates diquat-induced liver injury and oxidative stress in 21-day-old broiler chickens [J]. Poult Sci, 2020, 99 (6): 3158-3167. DOI: 10.1016/j.psj.2020.01.021.
- [11] Li SW, Zheng LS, 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. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.323.
- [12] Gao M, Monian P, Quadri N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis [J]. Mol Cell, 2015, 59 (2): 298-308. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.011.
- [13] 孟娜,孙艺青,刘亮,等. 急性敌草快中毒 86 例临床分析[J]. 中华危重病急救医学, 2022, 34 (3): 301-305. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220128-00105.
- [14] 急性敌草快中毒诊断与治疗专家共识组. 急性敌草快中毒诊断与治疗专家共识[J]. 中华急诊医学杂志, 2020, 29 (10): 1282-1289. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2020.10.002.
- [15] Moreton ML, Marlatt VL. Toxicity of the aquatic herbicide, reward®, to the northwestern salamander [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2019, 26 (30): 31077-31085. DOI: 10.1007/s11356-019-06234-3.
- [16] Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2006, 64 (2): 178-189. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.
- [17] Stockwell BR, Friedmann Angeli JP, Bayir H, et al. Ferroptosis: a regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. Cell, 2017, 171 (2): 273-285. DOI: 10.1016/j.cell.2017.09.021.
- [18] Cheng J, Yang L, Zhang ZL, et al. Diquat causes mouse testis injury through inducing heme oxygenase-1-mediated ferroptosis in spermatogonia [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2024, 280: 116562. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.116562.
- [19] Liu L, Wei Q, Wang R, et al. Rab7-regulated ferroptosis contributes to tubular epithelial cells injury by degradation of GPX4 via chaperone-mediated autophagy in AKI [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2025, 328 (2): C699-C709. DOI: 10.1152/ajpcell.00636.2023.
- [20] He L, Shi Y. Reduced glutathione ameliorates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis [J]. Mol Med Rep, 2023, 27 (6): DOI: 10.3892/mmr.2023.13011.

(收稿日期: 2025-09-24)

(责任编辑: 邸美仙)