

本文引文格式:吴军,覃俊凯,黄华武.缺血再灌注导致急性肾损伤中的细胞死亡形式初探[J].右江民族医学院学报,2022,44(2):200-204,210.

【论著与临床报道】

缺血再灌注导致急性肾损伤中的细胞死亡形式初探

吴军^{1,2},覃俊凯²,黄华武²

(1. 右江民族医学院研究生学院,广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院泌尿外科,广西 百色 533000)

摘要:目的 探究在肾缺血再灌注损伤(IRI)模型中存在的细胞死亡形式。方法 将24只Wistar大鼠随机分为4组:正常组(NC组)、假手术组(Sham组)、肾缺血组(RI组)、肾缺血再灌注组(RIR组)。RI组及RIR组通过钳夹双肾动脉行30 min双肾动脉阻断,诱导肾缺血,RIR组阻断30 min后松开钳夹恢复血流180 min制成肾缺血再灌注模型。NC组不处理,Sham组开腹但不阻断双侧肾动脉。再灌注180 min结束后收集血清和肾组织。免疫组化、免疫印迹法对肾组织中混合系列蛋白激酶样结构域蛋白(MLKL)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)进行定位及表达水平检测,TUNEL法分析肾小管细胞凋亡情况。定量分析超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的变化。**结果** TUNEL法显示肾脏细胞凋亡明显增加。Western blot检测显示RIR组与NC组相比,MLKL表达上升,GPX4表达降低($P < 0.05$),免疫组化病理切片结果与之一致。SOD活力显著下降($P < 0.05$),MDA水平明显上升($P < 0.05$)。**结论** RIR模型中肾小管细胞死亡数增加,抗氧化能力下降,RIR中有坏死性凋亡(necroptosis)和铁坏死(ferroptosis)两种细胞死亡形式的参与。

关键词:缺血再灌注;急性肾损伤;坏死性凋亡;铁坏死;氧化

中图分类号:R692.5;R361.3

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2022)02-0200-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2022.02.012

Forms of cell death in acute renal injury induced by ischemia reperfusion

Wu Jun^{1,2}, Qin Junkai², Huang Huawu²

(1. Graduate School, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000,

Guangxi, China; 2. Department of Urology, the Affiliated Hospital of Youjiang

Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the forms of cell death in the model of renal ischemia reperfusion injury (IRI). **Methods** Twenty-four Wistar rats were randomly divided into four groups: the normal group (NC group), the Sham group (Sham group), the renal ischemia group (RI group) and renal ischemia reperfusion group (RIR group). Renal ischemia was induced in RI group and RIR group by clamping bilateral renal artery for 30 min. In the RIR group, the renal ischemia-reperfusion model was established after loosening the clamp for 180 min to restore the blood flow. The NC group received no treatment, while the Sham group underwent laparotomy without clamping bilateral renal arteries. The serum and renal tissues were collected after 180 min of reperfusion. Immunohistochemistry and western blotting were employed to detect the localization and expressions of the mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in kidney tissues. TUNEL assay was adopted to analyze the apoptosis of renal tubular cells. The changes of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were quantitatively analyzed. **Results** TUNEL assay showed that the apoptosis of renal cells increased significantly. Western blot analysis showed that, compared with the NC group, the RIR group had increased expression of MLKL and decreased expression of GPX4

第一作者简介:吴军(1974—),男,在读硕士研究生,主任医师,研究方向:急性肾损伤中的细胞死亡形式,E-mail:3355785452@qq.com

通讯作者简介:黄华武(1966—),男,本科,主任医师,研究方向:泌尿系统疾病,E-mail:huawu701@126.com

($P < 0.05$). The results of immunohistochemical pathological section were consistent between two groups. The SOD activity decreased significantly ($P < 0.05$) and the level of MDA increased significantly ($P < 0.05$).

Conclusion In the renal RIR model, there is an increase in the death number of renal tubule cells and an decrease in the antioxidant capacity. Necroptosis and ferroptosis are two forms of cell death involved in RIR.

Key words: ischemia reperfusion; acute kidney injury; necroptosis; ferroptosis; oxidation

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是一种常见的临床综合征,据统计,大约有 3%~18%住院患者出现 AKI,并导致住院死亡率的提升^[1]。AKI 的特点是肾功能急剧下降,体内液体和代谢废物的积累及电解质失衡,并可进展至慢性肾病和终末期肾病。研究显示,肾脏对缺血缺氧高度敏感,肾缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是导致内源性 AKI 主要原因^[2]。肾 IRI 的病理表现包括线粒体功能障碍、氧化应激和炎症等,但主要病理改变是发生在肾近端小管上皮细胞(tubular epithelial cells, TECs),它对缺血非常敏感,主要表现为细胞极性丧失、刷状边界损伤、细胞-细胞黏附破坏,引发细胞死亡^[3-4]。到目前为止,由于肾 IRI 引起 AKI 的机制未完全明确,且没有有效的药物来治疗 AKI^[5]。以往研究认为,在 AKI 病理微环境下,依赖半胱天冬酶(caspase)的细胞凋亡(apoptosis)是程序性细胞死亡的唯一形式,然而越来越多的证据表明调控细胞坏死已成为可能,其中坏死性凋亡(necroptosis)和铁坏死(ferroptosis)成为近年研究热点^[6-7]。necroptosis 结合了坏死与凋亡的特征,在 AKI 的发展中起着重要作用,ferroptosis,一种以铁依赖性脂质过氧化物积累为特征的调控性坏死,也是肾 TECs 细胞死亡的主要模式^[8-9]。本研究通过建立肾 IRI 模型,探索参与肾 IRI 的细胞坏死形式,从而为改善 AKI 患者的治疗策略铺平道路。

1 材料和方法

1.1 动物和试剂 体重 400~500 g 的 24 只雄性 Wistar 大鼠,由长沙市天勤生物技术有限公司提供。实验大鼠饲养于右江民族医学院实验动物中心,温度 25°、12 h 光照/黑暗交替、45%湿度的环境中,自由饮水,进食标准普通饲料。实验方案经右江民族医学院动物实验伦理委员会批准。所有大鼠术前禁食 8 h,自由饮水。标记荧光素抗体的 HRP、MLKL 兔多克隆抗体购自 Bioworld 公司(Catalog:BS7639),GPX4 兔多克隆抗体购自 Bioworld 公司(Catalog:BS7323),混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)兔多克隆抗体购自 Bioworld 公司(Catalog:BS7639),谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)兔多克隆抗体购自 Bioworld 公司(Catalog:BS7323),总超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒购自碧云天公司(货号 S0107),脂质氧化丙二醛(MDA)检测试剂盒购自碧云天公司(货号

S0131)。

1.2 肾 IRI 模型建立 将大鼠随机分为 4 个组,包括正常组(NC 组, $n = 6$)、假手术组(Sham 组, $n = 6$)、肾缺血组(RI 组, $n = 6$)和肾缺血再灌注组(RIR 组, $n = 6$),NC 组不做处理,用 10%水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉,将大鼠仰卧位固定于鼠台上,纵行切开皮肤,分离脂肪暴露双肾及肾蒂,Sham 组开腹后游离双肾,RI 组分离肾动脉并用动脉夹钳夹,观察肾脏由鲜红色变为暗紫色,计时 30 min 后松开动脉夹,同时收集以上 3 组血清和肾组织。RIR 肾脏恢复为鲜红色表明再灌注成功(180 min),再灌注 180 min 后收集血清和肾组织。

1.3 血清生化指标检测 各组分别经腹主动脉抽取 5 ml 血液,低速 4 °C 离心取上清,根据总 SOD 活性检测试剂盒和 MDA 检测试剂盒操作指示检测血清中 SOD、MDA。

1.4 免疫组化病理切片 肾脏纵行切开,福尔马林固定石蜡包埋的组织,切片厚 3~4 μm ,经过脱蜡、抗原修复、阻断、滴加抗体、显色、衬染、封片等操作,在显微镜下观察 MLKL/GPX4 蛋白表达情况。

1.5 TUNEL 法检测肾细胞死亡 采用脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的末端标记法(TUNEL 法)检测每组肾细胞凋亡情况,具体步骤按 TUNEL 检测试剂盒说明书操作。在显微镜下观察每张切片约 200 个细胞死亡情况并拍照。

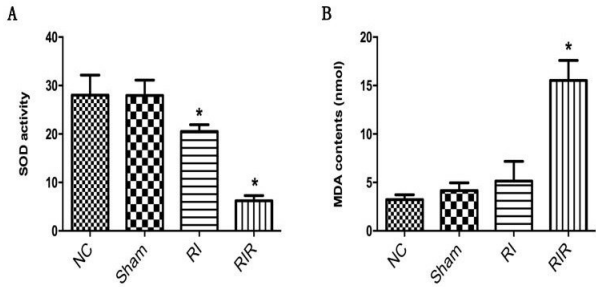
1.6 肾组织 MLKL/GPX4 蛋白 采用 Western blot 检测,取肾组织进行总蛋白抽提,将提取的蛋白溶液与 5×上样 buffer 按 5:1 比例混合均匀,煮沸 5 min,待冷却,配置电泳胶,胶凝后用 1×电泳缓冲液清洗胶孔上样,80 V 恒压电泳 50 min,120 V 恒压电泳,至溴酚蓝刚出胶底部时停止电泳等,最后将膜放至暗盒显影。

1.7 统计学方法 数据均采用 SPSS 22.0 软件包进行统计学分析。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示。多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行检验,方差齐时采 LSD 检验,方差不齐时采用 Tamhane's T2 检验。两组间比较采用 t 检验。当 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清抗氧化指标 与 NC 组比较,RI、RIR 两组中的 SOD 活力均明显下降($P < 0.05$),且 RIR 下降

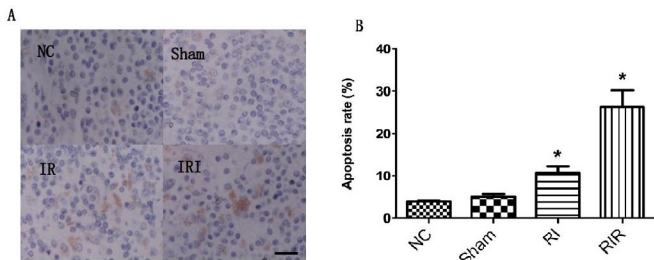
更为明显,见图 1A;RIR 组的 MAD 含量明显上升($P < 0.05$),见图 1B。



A: 血液中 SOD 活力;B: 血液中 MDA 含量。NC 代表正常组; Sham 代表假手术组;RI 代表缺血组;RIR 代表缺血再灌注损伤组。与 NC 组相比,*表示 $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠血液中 SOD 活力及 MAD 含量

2.2 TUNEL 法检测肾细胞坏死结果 RI 组、RIR 组的肾细胞死亡数明显增多,TUNEL 法显示 RIR 组中可以观察到部分细胞发生肿胀、变圆甚至出现凋亡小体,见图 2A;RIR 组中细胞死亡数量明显上升($P < 0.05$),柱状图细胞死亡比率与之相符合,见图 2B。



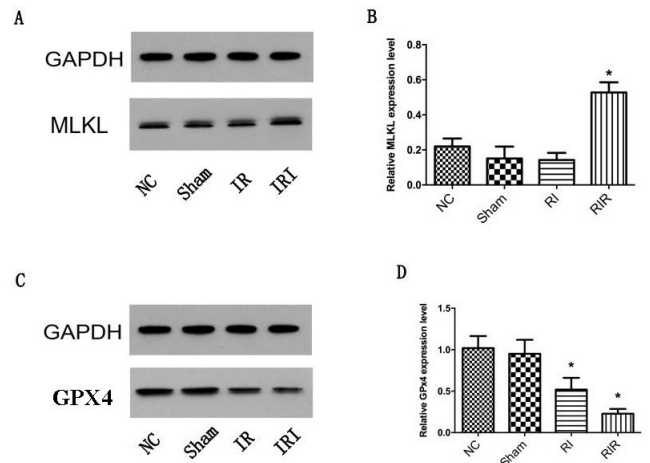
A: TUNEL 法检测各组大鼠肾脏细胞在光学显微镜下形态,标尺为 $50 \mu\text{m}$;B: 对应柱状图显示各组小鼠细胞死亡比率。NC 代表正常组;Sham 代表假手术组;RI 代表缺血组;RIR 代表缺血再灌注组。与 NC 组相比,*表示 $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠肾脏 TUNEL 病理结果

2.3 Western blot 检测肾脏组织中 MLKL、GPX4 蛋白的表达结果 RIR 组肾脏组织中 MLKL 蛋白的表达较其他 3 组显著升高,见图 3A、图 3B;RI 组、RIR 组 GPX4 蛋白的表达显著降低,与 NC 组及 sham 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 3C、图 3D, RIR 下降更明显。

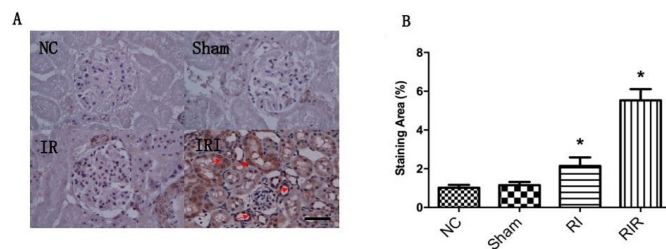
2.4 免疫组化

2.4.1 MLKL 蛋白免疫组化结果 免疫组化病理切片显示 MLKL 蛋白在 RIR 中棕黄色阳性细胞数量明显增加(尤其是箭头所指的肾小管上皮细胞,见图 4A),说明 MLKL 蛋白表达在 RI/RIR 中显著上升($P < 0.05$),见图 4B。



A、C 为 MLKL、GPX4 蛋白与各自内参 GAPDH 的 Western blot 检测代表性蛋白条带图片;B、D 为定量分析的 MLKL、GPX4 蛋白表达水平。与 NC 组相比,*表示 $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠肾脏中 MLKL、GPX4 蛋白的表达结果



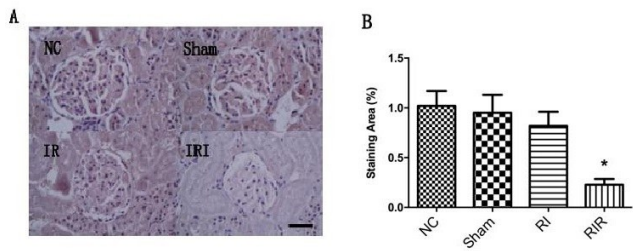
A: 免疫组化病理切片显示各组大鼠肾细胞中 MLKL 蛋白的表达,箭头所指为肾小管上皮细胞,与其他各组相比,RIR 组中含 MLKL 蛋白的阳性棕黄色细胞数显增加,标尺为 $50 \mu\text{m}$ 。B: 显示各组小鼠肾脏切片 MLKL 蛋白占比的数据柱状统计图,结果与 A 一致。NC 代表正常组;Sham 代表假手术组;RI 代表缺血组;RIR 代表缺血再灌注组。与 NC 组相比,*表示 $P < 0.05$ 。

图 4 MLKL 蛋白免疫组化结果

2.4.2 GPX4 蛋白免疫组化结果 GPX4 免疫组化病理切片显示,与其他各组相比,RIR 组 GPX4 蛋白表达区域占比明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

3 讨论

AKI 是一种以短期肾功能突然下降,引起血肌酐上升和水电解质、酸碱平衡紊乱,导致全身各个系统发生障碍的临床综合征。非重症住院患者患 AKI 的死亡率甚至高达 $10\% \sim 20\%$ ^[10]。导致 AKI 的原因有多种,包括肾灌注不足、休克或败血症引起的肾缺血再灌注损伤,而肾缺血-再灌注损伤是导致内源性 AKI 主要原因^[2]。线粒体功能障碍、氧化应激和炎症也可促成 AKI 的发生,但主要病理改变是发生在 TECs,它对缺血非常敏感,主要表现为细胞极性丧失、刷状边界损



A: 免疫组化病理切片显示各组大鼠肾细胞中 GPX4 蛋白的表达, 与其他各组相比, RIR 组含 GPX4 蛋白细胞数明显减少, 标尺为 50 μm 。B: 显示各组小鼠肾脏切片 GPX4 蛋白表达区域占比, 结果与 A 一致。NC 代表正常组; Sham 代表假手术组; RI 代表缺血组; RIR 代表缺血再灌注组。与 NC 组相比, * 表示 $P < 0.05$ 。

图 5 GPX4 蛋白免疫组化结果

伤、细胞-细胞黏附破坏, 引发细胞死亡^[3-4]。necroptosis 的发现使调控细胞坏死成为可能, 从而对 AKI 的未来治疗产生潜在的影响^[11-12]。有相当多的证据表明, necroptosis 是一种与坏死形态相似的程序性细胞死亡, 在 AKI 和肾纤维化的发展中起着重要作用^[13]。此外, 最近的证据表明, ferroptosis, 一种以铁依赖的脂质过氧化物积累为特征的调控性坏死, 可能是肾 TECs 细胞死亡的主要模式^[7,9]。随着对细胞死亡形式的研究, 多种细胞死亡途径被发现, 但对 AKI 中所发生的细胞坏死形式的研究尚不全面, 本文旨在通过建立肾 IRI 模型, 研究参与由肾 IRI 导致 AKI 的细胞坏死形式。

本研究中通过 TUNEL 检测, 观察到在 NC 组和 Sham 组中基本未出现肾细胞死亡而在 RI 组及 RIR 组中细胞死亡数量明显上升, 肿胀、变圆细胞数增多, 而在 RIR 组中细胞死亡更为明显, 有些细胞已经发生染色质浓缩、边缘化、核膜裂解等明显细胞死亡形态。TUNEL 阳性细胞数的增多表明 RIR 模型建立成功。

Necroptosis 是一种不同于细胞程序性死亡的细胞死亡方式, 最早由 Degterev A 等^[14]通过对大鼠缺血性损伤研究中所注意到的。当发生 necroptosis 时, 配体与死亡受体结合, 各种下游分子被有序招募^[15]。所启动的下游通路作用于受体反应蛋白激酶 1 (receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1) 和 3 (RIPK3), 其磷酸化后形成坏死小体 (necrosome)^[15-16]。坏死小体磷酸化 MLKL, 磷酸化的 MLKL 随之经历寡聚反应与质膜中的磷脂酰肌醇磷酸盐结合导致膜穿孔, 继而发生 necroptosis^[17-20]。此外激活的 MLKL 也被招募到线粒体膜上, 导致线粒体功能障碍^[21]。所以可以把磷酸化的 MLKL 看作为 necroptosis 的执行者, 通过检测 MLKL 的水平可以反映出是否发生了 necroptosis, 免疫组化结果显示 MLKL 蛋白在 NC

组、Sham 组、RI 组中未见明显的棕黄色阳性的细胞, 而在 RIR 组中棕黄色阳性细胞数量显著上升, 这说明在 RIR 模型中有 necroptosis 的参与。在大多数细胞发生 necroptosis 的同时也伴随着活性氧 (ROS) 的生成, ROS 大量产生超过机体的清除能力使体内抗氧化活性被消耗, ROS 激增合并线粒体过氧化, 导致线粒体膜通透性增加, 释放毒性蛋白到胞质中, 引起 DNA 链损伤, 对于 necroptosis 就产生了一个前馈效应, ROS 已被证明在包括肾 I/R 损伤等多种情况下会触发坏死性凋亡^[22-24]。血液 SOD 活力的高低反应了细胞的抗氧化能力, MDA 的含量则反应出细胞膜过氧化程度, 他们都可以作为氧化损伤程度的标志, 下一步, 随着研究的进行, 我们将进一步增加对 ROS 及其他指标的检测。在图 1 中, 与其他各组相比, RIR 组中的 SOD 活力明显降低, MDA 的含量明显升高。除 necroptosis 发生了氧化应激, ferroptosis 的发生也依赖于 ROS, 由于 I/R 损伤也诱导了大量 ROS 的产生^[25], 因此铁死亡可能也参与了肾 I/R 损伤的发病机制^[26-27], 此外, 在指部死亡组织研究中, 有明显的 ROS 上升及 GPX4 水平的下降, 也暗示存在 ferroptosis 的激活^[28]。RIR 模型中总抗氧化能力 SOD 的下降以及氧化指标 MDA 的上升都为上述两种细胞死亡形式的发生提供了依据。

Ferroptosis 是一种新型调控细胞死亡途径, 最早是由 Dixon SJ 等^[29]发现的, 其特征是依赖铁反应的脂质过氧化物的积累。谷胱甘肽 (GSH) 是一种天然抗氧化剂, 可以保护细胞免受氧化应激影响, GSH 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GPX) 一起, 通过催化过氧化氢生成氧和水来消除过氧化氢^[30]。在哺乳动物中, 存在 8 种 GPX, 而在这之中只有 GPX4 具有催化过氧化氢脂质的功能, 使其成为 GSH 抗氧化作用的核心调控酶^[31]。在正常情况下, GPX4 可以通过还原磷脂氢过氧化物来阻止脂质的氧化, 若表达减少或降低都可发生 ferroptosis, 它充当了铁死亡守门人的角色, 可以作为判断铁死亡的主要指标^[32]。因此, 我们通过 Western blot 检测了各组大鼠中的 GPX4, 发现在 RIR 中 GPX4 蛋白表达对比 NC、Sham、RI 3 组中的 GPX4 蛋白表达明显下降, 差异有显著性; 免疫组化的结果也与 Western blot 检测结果相符。这反映出在 RIR 中有 ferroptosis 参与。

综上所述, 本研究通过建立大鼠 RIR 模型, 通过对细胞凋亡、氧化应激及 RIPK3、GPX4 的研究, 确定了 IR 引起的细胞死亡不仅是凋亡, 还有 necroptosis 和 ferroptosis。两种细胞死亡伴随着 ROS 的产生, 而 ROS 也可进一步推动两种细胞死亡的进程, 同时钙离子参与了 necroptosis 和 ferroptosis 发生过程也有报

道,尽管 necroptosis 和 ferroptosis 的下游调控方式存在相通之处,但对于这两种死亡方式的机制并未研究透彻,一个疾病的发生发展,往往是多种通路共同调控的,进一步探究 AKI 中细胞死亡机制将为 AKI 的治疗奠定扎实基础。

参考文献:

- [1] Hoste EAJ, Kellum JA, Selby NM, et al. Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(10): 607-625.
- [2] Hwang SH, Jeong MH, Ahmed K, et al. Different clinical outcomes of acute kidney injury according to acute kidney injury network criteria in patients between ST elevation and non-ST elevation myocardial infarction[J]. *Int J Cardiol*, 2011, 150(1): 99-101.
- [3] Bonventre JV, Yang L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(11): 4210-4221.
- [4] Martin JL, Gruszczyk AV, Beach TE, et al. Mitochondrial mechanisms and therapeutics in ischaemia reperfusion injury[J]. *Pediatr Nephrol*, 2019, 34(7): 1167-1174.
- [5] Alsabbagh MM, Asmar A, Ejaz NI, et al. Update on clinical trials for the prevention of acute kidney injury in patients undergoing cardiac surgery[J]. *Am J Surg*, 2013, 206(1): 86-95.
- [6] Ashkenazi A, Salvesen G. Regulated cell death: signaling and mechanisms[J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2014, 30: 337-356.
- [7] Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death[J]. *Trends Microbiol*, 2001, 9(3): 113-114.
- [8] Linkermann A, Skouta R, Himmerkus N, et al. Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(47): 16836-16841.
- [9] Muller T, Dewitz C, Schmitz J, et al. Necroptosis and ferroptosis are alternative cell death pathways that operate in acute kidney failure[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(19): 3631-3645.
- [10] 王利华, 苏晓乐. 急性肾损伤的诊断和早期预警[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2019, 8(4): 145-149.
- [11] Linkermann A, Bräsen JH, Himmerkus N, et al. Rip1 (receptor-interacting protein kinase 1) mediates necroptosis and contributes to renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2012, 81(8): 751-761.
- [12] Linkermann A, De Zen F, Weinberg J, et al. Programmed necrosis in acute kidney injury[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2012, 27(9): 3412-3419.
- [13] Choi ME, Price DR, Ryter SW, et al. Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease[J]. *JCI Insight*, 2019, 4(15): e128834.
- [14] Degtarev A, Huang ZH, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(2): 112-119.
- [15] Conrad M, Angeli JP, Vandenabeele P, et al. Regulated necrosis: disease relevance and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5): 348-366.
- [16] He S, Wang L, Miao L, et al. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha[J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1100-1111.
- [17] Zhang DW, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis[J]. *Science*, 2009, 325(5938): 332-336.
- [18] Hildebrand JM, Lucet IS, Murphy JM. Flicking the molecular switch underlying MLKL-mediated necroptosis [J]. *Molecular & cellular oncology*, 2015, 2(3): e985550.
- [19] Sun L, Wang H, Wang Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase [J]. *Cell*, 2012, 148(1-2): 213-227.
- [20] Dondelinger Y, Declercq W, Montessuit S, et al. MLKL compromises plasma membrane integrity by binding to phosphatidylinositol phosphates [J]. *Cell Rep*, 2014, 7(4): 971-981.
- [21] Wang HY, Sun LM, Su LJ, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3[J]. *Mol Cell*, 2014, 54(1): 133-146.
- [22] Fulda S. Regulation of necroptosis signaling and cell death by reactive oxygen species [J]. *Biol Chem*, 2016, 397(7): 657-660.
- [23] Radogna F, Cerella C, Gaigneaux A, et al. Cell type-dependent ROS and mitophagy response leads to apoptosis or necroptosis in neuroblastoma[J]. *Oncogene*, 2016, 35(29): 3839-3853.
- [24] Qian YY, Guo XJ, Che L, et al. Klotho Reduces Necroptosis by Targeting Oxidative Stress Involved in Renal Ischemic-Reperfusion Injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 45(6): 2268-2282.
- [25] Stoner JD, Clanton TL, Aune SE, et al. O₂ delivery and redox state are determinants of compartment-specific reactive O₂ species in myocardial reperfusion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(1): H109-H116.
- [26] 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.

(下转第 210 页)

- [3] Biet M, Dansereau MA, Sarret P, et al. The neuronal potassium current I(A) is a potential target for pain during chronic inflammation [J]. *Physiol Rep*, 2021, 9 (16): e14975.
- [4] Lariviere WR, Melzack R. The bee venom test: a new tonic-pain test [J]. *Pain*, 1996, 66(2-3): 271-277.
- [5] Ma QP, Woolf CJ. Basal and touch-evoked fos-like immunoreactivity during experimental inflammation in the rat [J]. *Pain*, 1996, 67(2-3): 307-316.
- [6] Yamanashi Y, Ohmichi M, Ohmichi Y, et al. Efficacy of Methotrexate on Rat Knee Osteoarthritis Induced by Monosodium Iodoacetate [J]. *J Inflamm Res*, 2021, 14: 3247-3259.
- [7] Cheng F, Yan FF, Liu YP, et al. Dexmedetomidine inhibits the NF-kappaB pathway and NLRP3 inflammasome to attenuate papain-induced osteoarthritis in rats [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 649-659.
- [8] Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway [J]. *Nature*, 1997, 389(6653): 816-824.
- [9] Uta D, Yoshimura M, Koga K. Chronic pain models amplify transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor responses in adult rat spinal dorsal horn [J]. *Neuropharmacology*, 2019, 160: 107753.
- [10] Sondermann JR, Barry AM, Jahn O, et al. Vt1b promotes TRPV1 sensitization during inflammatory pain [J]. *Pain*, 2019, 160(2): 508-527.
- [11] Martínez-Rojas VA, Barragán-Iglesias P, Rocha-González HI, et al. Role of TRPV1 and ASIC3 in formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia [J]. *Pharmacol Rep*, 2014, 66(6): 964-971.
- [12] Kang SY, Seo SY, Bang SK, et al. Inhibition of Spinal TRPV1 Reduces NMDA Receptor 2B Phosphorylation and Produces Anti-Nociceptive Effects in Mice with Inflammatory Pain [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (20): 11177.
- [13] Fang JF, Du JY, Xiang XE, et al. SNI and CFA induce similar changes in TRPV1 and P2X3 expressions in the acute phase but not in the chronic phase of pain [J]. *Exp Brain Res*, 2021, 239(3): 983-995.
- [14] Chen J, Luo C, Li HL, et al. Primary hyperalgesia to mechanical and heat stimuli following subcutaneous bee venom injection into the plantar surface of hindpaw in the conscious rat: a comparative study with the formalin test [J]. *Pain*, 1999, 83(1): 67-76.
- [15] Colditz IG, Paull DR, Lloyd JB, et al. Efficacy of meloxicam in a pain model in sheep [J]. *Aust Vet J*, 2019, 97 (1-2): 23-32.

收稿日期: 2022-02-19; 修回日期: 2022-03-06

(上接第 204 页)

- [27] Yang WS, Stockwell BR. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells [J]. *Chem Biol*, 2008, 15(3): 234-245.
- [28] Williams GB, Elder EM, Sussman M. Modulation of the cAMP relay in *Dictyostelium discoideum* by ammonia and other metabolites: possible morphogenetic consequence [J]. *Dev Biol*, 1984, 105(2): 377-388.
- [29] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [30] Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(7): 1957-1997.
- [31] 程峰, 张庸, 王祥, 等. 谷胱甘肽过氧化物酶 GPX4 在铁死亡中的作用与机制研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2021, 29(7): 1254-1258.
- [32] Stockwell BR, Jiang X, Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis [J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(6): 478-490.

收稿日期: 2022-02-17; 修回日期: 2022-02-22