

本文引文格式:叶伟,忻钰棋,朱文君,等.二甲双胍通过调节 GPX4/ACSL4 轴改善高糖高脂诱导的足细胞铁死亡[J].右江民族医学院学报,2025,47(2):200-206.

【论著与临床报道】

二甲双胍通过调节 GPX4/ACSL4 轴改善 高糖高脂诱导的足细胞铁死亡

叶伟^{1,2},忻钰棋¹,朱文君^{1,2},俞诗琦^{1,2},何冲¹,孔祥²,姚新明²

(1. 皖南医学院研究生学院,安徽 芜湖 241002;

2. 皖南医学院第一附属医院内分泌科,安徽 芜湖 241001)

摘要:目的 探究高糖高脂诱导小鼠足细胞发生铁死亡的作用机制以及二甲双胍(Met)能否通过抑制铁死亡改善足细胞损伤。方法 ①将小鼠肾足细胞(MPC-5细胞)分组:MPC-5细胞分别在正常组(葡萄糖浓度为5.6 mM的DMEM培养基,Con组)、高糖组(葡萄糖浓度为33.3 mM的DMEM培养基,HG组)、高脂组(葡萄糖浓度为5.6 mM,棕榈酸钠浓度为0.25 mM的DMEM培养基,HP组)、高糖高脂组(葡萄糖浓度为33.3 mM,棕榈酸钠浓度为0.25 mM的DMEM培养基,GP组),孵育24 h。②加入铁死亡抑制剂 Fer-1 处理:MPC-5细胞分别在 Con组、GP组、GP+Fer-1组(MPC-5细胞于铁死亡抑制剂 Fer-1 浓度为10 μ M的DMEM培养基中预处理2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为33.3 mM、Fer-1浓度为10 μ M的DMEM培养基),孵育24 h。③加入降糖药物处理:MPC-5细胞分别在 Con组、GP组、GP+Met组(MPC-5细胞于 Met 浓度为0.5 mM的DMEM培养基中预处理2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为33.3 mM、Met浓度为0.5 mM的DMEM培养基)、GP+沙格列汀(Sax)组(MPC-5细胞于 Sax浓度为100 nM的DMEM培养基中预处理2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为33.3 mM、Sax浓度为100 nM的DMEM培养基)、GP+达格列净(Dap)组(MPC-5细胞于 Dap浓度为2 μ M的DMEM培养基中预处理2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为33.3 mM、Dap浓度为2 μ M的DMEM培养基),孵育24 h。分别检测各组细胞生存率、GSH/GSSG比值、脂质过氧化物含量、铁离子浓度以及铁死亡相关蛋白(xCT、GPX4及ACSL4)的表达。结果 ①与Con组相比,HP组、GP组MPC-5细胞生存率降低,GSH/GSSG比值下降,脂质过氧化物含量升高,铁离子浓度增加,GPX4表达下降,ACSL4表达上升。②GP组MPC-5细胞在Fer-1作用下,细胞生存率增加,GSH/GSSG比值上升,脂质过氧化物水平下降,铁离子浓度降低,GPX4表达增加而ACSL4表达下降。③GP组MPC-5细胞在3种降糖药作用下,细胞生存率均增加,GSH/GSSG比值上升,脂质过氧化物水平下降,铁离子浓度降低,GPX4表达增加而ACSL4表达下降,而其中Met的作用效果最为明显。结论 铁死亡参与了GP引起的足细胞损伤过程, Met可通过GPX4/ACSL4轴抑制铁死亡改善足细胞损伤。

关键词:铁死亡;足细胞;糖尿病肾病;二甲双胍

中图分类号:R587.24

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2025)02-0200-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2025.02.002

Metformin ameliorates ferroptosis in podocytes induced by high glucose and high fat through regulation of the GPX4/ACSL4 axis

YE Wei^{1,2}, XIN Yuqi¹, ZHU Wenjun^{1,2}, YU Shiqi^{1,2}, HE Chong¹, KONG Xiang², YAO Xinming²

(1. Graduate School, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China;

2. Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Wannan Medical College, Wuhu 241001, Anhui, China)

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism underlying ferroptosis in mouse podocytes induced by high glucose and high fat and to determine whether metformin (Met) can ameliorate podocyte injury by inhibi-

基金项目:国家自然科学基金项目(81970699);安徽省自然科学基金项目(2308085MH252);芜湖市科技项目(2023jc27)

第一作者:叶伟,住院医师,研究方向:内分泌学,E-mail: yw8155@sina.com

通讯作者:姚新明,博士,主任医师,研究方向:内分泌学,E-mail: yxm6965@sina.com

ting ferroptosis. **Methods** ① Mouse podocytes (MPC-5 cells) were divided into five groups: control (Con group, DMEM medium with glucose at 5.6 mM), high glucose (HG group, DMEM medium with glucose at 33.3 mM), high fat (HP group, DMEM medium with glucose at 5.6 mM and sodium palmitate at 0.25 mM), and high glucose + high fat group (GP group, DMEM medium with glucose at 33.3 mM and sodium palmitate at 0.25 mM), followed by 24-hour incubation. ② Ferroptosis inhibitor Fer-1 treatment: MPC-5 cells were divided into Con, GP, and GP + Fer-1 groups (MPC-5 cells were pretreated with Fer-1 at a concentration of 10 μM in DMEM medium for 2 hours, after which the medium was replaced with DMEM containing a glucose concentration of 33.3 mM and a Fer-1 concentration of 10 μM), followed by 24-hour incubation. ③ Antidiabetic drug treatment: MPC-5 cells were divided into Con, GP, GP + Met groups (MPC-5 cells were pretreated with Met at a concentration of 0.5 mM in DMEM medium for 2 hours, after which the medium was replaced with DMEM medium containing a glucose concentration of 33.3 mM and a Met concentration of 0.5 mM), GP + saxagliptin (Sax) group (MPC-5 cells were pretreated with Sax at a concentration of 100 nM in DMEM medium for 2 hours, after which the medium was replaced with DMEM medium containing a glucose concentration of 33.3 mM and a Sax concentration of 100 nM), GP + dapagliflozin (Dap) group (MPC-5 cells were pretreated with Dap at a concentration of 2 μM in DMEM medium for 2 hours, after which the medium was replaced with DMEM medium containing a glucose concentration of 33.3 mM and a Dap concentration of 2 μM), followed by 24-hour incubation. Cell viability, GSH/GSSG ratio, lipid peroxide content, iron ion concentration, and expression of ferroptosis-related proteins (xCT, GPX4, and ACSL4) were measured in each group. **Results** ① Compared with the Con group, MPC-5 cells in the HP and GP groups showed decreased cell viability, reduced GSH/GSSG ratio, increased lipid peroxide levels, elevated iron ion concentration, decreased GPX4 expression, while increased ACSL4 expression. ② MPC-5 cells in the GP group showed increased cell viability treated with Fer-1, increased GSH/GSSG ratio, decreased lipid peroxidation and iron concentration, and increased GPX4 expression but decreased ACSL4 expression. ③ Under the action of the three antidiabetic drugs in the GP group, MPC-5 cells showed increased cell viability, elevated GSH/GSSG ratio, decreased lipid peroxide levels, reduced iron ion concentration, increased GPX4 expression, and decreased ACSL4 expression. Among them, Met exhibited the most significant effect. **Conclusion** Ferroptosis contributes to podocyte damage induced by GP, and Met can ameliorate podocyte damage by inhibiting ferroptosis through the GPX4/ACSL4 axis.

Key words: ferroptosis; podocytes; diabetic nephropathy; metformin

近年来,随着社会发展,人们饮食结构、生活习惯发生变化,肥胖人群增多,全球 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)患病率逐年升高,已成为当今世界备受瞩目的公共卫生问题^[1]。糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)作为糖尿病最严重的微血管并发症之一,是进展为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)的主要原因之一,也是导致心血管疾病发生的危险因素,增加患者死亡风险^[2-3]。DKD 的病理变化复杂,最初为肾脏肥大,肾小球滤过率增加,随着病情进展,肾小球系膜细胞增殖、系膜细胞外基质增多、基底膜增厚最后发展成肾小球硬化。有研究发现链脲佐菌素诱导的 DKD 大鼠肾脏组织中有铁死亡的发生,加重了肾脏损伤^[4]。而足细胞是肾脏组织中重要的固有细胞,与内皮细胞、肾小球基底膜构成了肾小球的 3 层滤过屏障,研究发现,足细胞的特殊形态和结构对于维持肾小球滤过屏障的完整性起到重要作用^[5]。因此,足细胞的铁死亡严重影响肾小球滤过功能,探究足细胞铁死亡对 DKD 的诊治具有深远意义。DIXON S J 等^[6]在研究中首次提出把铁死

亡和其他死亡方式加以区别,不同于细胞凋亡、坏死、焦亡和自噬,其主要特征是铁离子的积累和脂质过氧化物的发生;形态学上主要表现为包膜破裂,线粒体密度增加,体积减小等。目前常用的降血糖药物对缓解或者逆转 DKD,延缓其发展成 ESRD 收效甚微^[7]。因此,迫切需要探索一种降血糖同时保护肾脏的药物。

1 材料与仪器

1.1 细胞 实验用小鼠肾足细胞 MPC-5 购自商城北纳创联生物科技有限公司,编号为 BNCC342021。在 37 °C、5% CO₂、10% 血清、1% 双抗条件下增殖,10~14 d 后分化成熟。

1.2 药物 二甲双胍(批号 H20023370)购自中美上海施贵宝制药有限公司,沙格列汀(批号 H20160088)购自阿斯利康制药有限公司,达格列净(批号 H20234464)购自阿斯利康制药有限公司,上述药物均用 DMSO 配制。

1.3 试剂 Ferrostatin-1(货号:A4371)购自于上海伟寰生物科技有限公司;棕榈酸钠(货号:P9767)购自于默克生命科学;10×PBS 缓冲液(货号:BL316A)、

SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(5X)(货号:BL502A)购自于安徽碧云天生物技术有限公司;铁离子比色法检测试剂盒(货号:E1042-100)购自于北京普利莱基因技术有限公司;总谷胱甘肽(GSH)/氧化型谷胱甘肽(GSSG)测定试剂盒(货号:A-061-1)购自于南京建成生物工程研究所有限公司;BODIPY 581/591 C11(货号:D3861)购自于赛默飞世尔科技公司;彩虹 130 广谱蛋白 marker(货号:PR1910)购自于北京索莱宝科技有限公司;CCK-8 试剂盒(货号:C0037)、SDS-PAGE 凝胶快速试剂盒(产品编号:P0012AC)购自于安徽碧云天生物技术有限公司;GPX4 蛋白抗体(Ab125066)、xCT 蛋白抗体(Ab175186)、ACSL4 蛋白抗体(Ab155282)购自于艾博抗(上海)贸易有限公司; β -actin 抗体(AF7018)购自于爱必信(上海)生物科技有限公司;山羊抗兔 IgG(货号:G1213-100UL)、山羊抗鼠 IgG(货号:G1214-100UL)购自于武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.4 仪器 超净工作台[安泰生物工程(上海)有限公司];超纯水制备仪(默克密理博);多功能酶标仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];电泳仪电源[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];垂直电源设备[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];转印设备[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];化学发光仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司];高速冷冻离心机(赛默飞尔科技公司);细胞培养箱(赛默飞尔科技公司);高压蒸汽灭菌器(松下三洋);生物安全柜[安泰生物工程(上海)有限公司]。

2 方法

2.1 实验分组 ①将小鼠肾足细胞(MPC-5 细胞)分组:MPC-5 细胞分别在正常组(葡萄糖浓度为 5.6 mM 的 DMEM 培养基,Con 组)、高糖组(葡萄糖浓度为 33.3 mM 的 DMEM 培养基,HG 组)、高脂组(葡萄糖浓度为 5.6 mM、棕榈酸钠浓度为 0.25 mM 的 DMEM 培养基,HP 组)、高糖高脂组(葡萄糖浓度为 33.3 mM、棕榈酸钠浓度为 0.25 mM 的 DMEM 培养基,GP 组),孵育 24 h。检测各组 MPC-5 细胞的细胞生存率、GSH/GSSG 比值、脂质过氧化物含量、铁离子浓度以及铁死亡相关蛋白(xCT、GPX4 及 ACSL4)的表达。②将 MPC-5 细胞置于 GP 下孵育 0 h、12 h、24 h、36 h,检测各组细胞的细胞生存率变化情况以及铁死亡相关蛋白的表达。③加入铁死亡抑制剂 Fer-1 处理:MPC-5 细胞分别在 Con 组、GP 组、GP+Fer-1 组(MPC-5 细胞于铁死亡抑制剂 Fer-1 浓度为 10 μ mol/L 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Fer-1 浓度为 10 μ mol/L 的 DMEM 培养基),孵育 24 h。检测各组细胞的细胞生存率、GSH/GSSG 比值、脂质过氧化物含量、铁离子

浓度以及铁死亡相关蛋白的表达。④加入降糖药物处理:MPC-5 细胞分别在 Con 组、GP 组、GP+二甲双胍(Met)组(MPC-5 细胞于 Met 浓度为 0.5 mM 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Met 浓度为 0.5 mM 的 DMEM 培养基)、GP+沙格列汀(Sax)组(MPC-5 细胞于 Sax 浓度为 100 nM 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Sax 浓度为 100 nM 的 DMEM 培养基)、GP+达格列净(Dap)组(MPC-5 细胞于 Dap 浓度为 2 μ M 的 DMEM 培养基中预处理 2 h,随后将培养基更换为葡萄糖浓度为 33.3 mM、Dap 浓度为 2 μ M 的 DMEM 培养基),孵育 24 h。检测各组细胞的细胞生存率、GSH/GSSG 比值、脂质过氧化物含量、铁离子浓度以及铁死亡相关蛋白的表达。

2.2 实验方法

2.2.1 MPC-5 细胞活性检测 于 96 孔板中接种 MPC-5 细胞,每孔加入约 2 000 个细胞 100 μ L。37 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 细胞培养箱内孵育 24 h。镜下观察细胞贴壁情况,根据不同实验需求,对细胞进行相应处理。37 $^{\circ}$ C 培养 24 h,每孔直接加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液并继续 37 $^{\circ}$ C 孵育 1~4 h。孵育完成后酶标仪检测各孔在 450 nm 处的 OD 值,并计算出各组细胞的活性值。

2.2.2 脂质过氧化的测定 将 MPC-5 细胞按适当密度接种到 6 孔板中,7 $^{\circ}$ C 5%CO₂ 细胞培养箱内培养 24 h 后,继续 37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h 后,按照每孔 50 μ mol/L 的浓度,加入脂质过氧化荧光探针 C11-BODIPY581/591,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。吸弃陈旧培养基,PBS 洗涤 2 遍,胰酶消化液收集各孔细胞,做好标记,1 000 r/min 5 min 离心弃去上清液,加入含 5%血清的 PBS,轻轻吹打使其变成均匀的单细胞悬液,使用流式细胞仪进行检测。

2.2.3 GSH/GSSG 比值的测定 收集各组细胞,并对各组细胞样本进行处理:加入 4 倍新配制的试剂四,旋涡混匀 30 s 后,4 $^{\circ}$ C 静置 5 min。随后 3 000 r/min 10 min 取上清液。按试剂盒说明加入相应试剂后,使用酶标仪测定 A405,计算出各组 GSH、GSSG 含量。

2.2.4 Western Blot 测定 xCT、GPX4、ACSL4 蛋白表达 取出 6 孔板,将陈旧培养基吸弃,PBS 清洗。每孔加入 150 μ L 含 1%PMSF 的裂解液,冰上裂解 10 min,4 $^{\circ}$ C,14 000 r/min 10 min,收集上清液,取少量样本用于 BCA 法测定蛋白浓度。于各组中的蛋白上清液中,加入 5X 上样缓冲液,100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min。SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳:配置 12%分离胶和 5%浓缩胶,上样后按照 S1:80 V 30 min,S2:120 V 90 min 进行电泳。PVDF 膜经甲醇浸泡活化 1 min,按照 115 V 75 min 进行转膜。封闭:5%脱脂牛奶室温水平摇

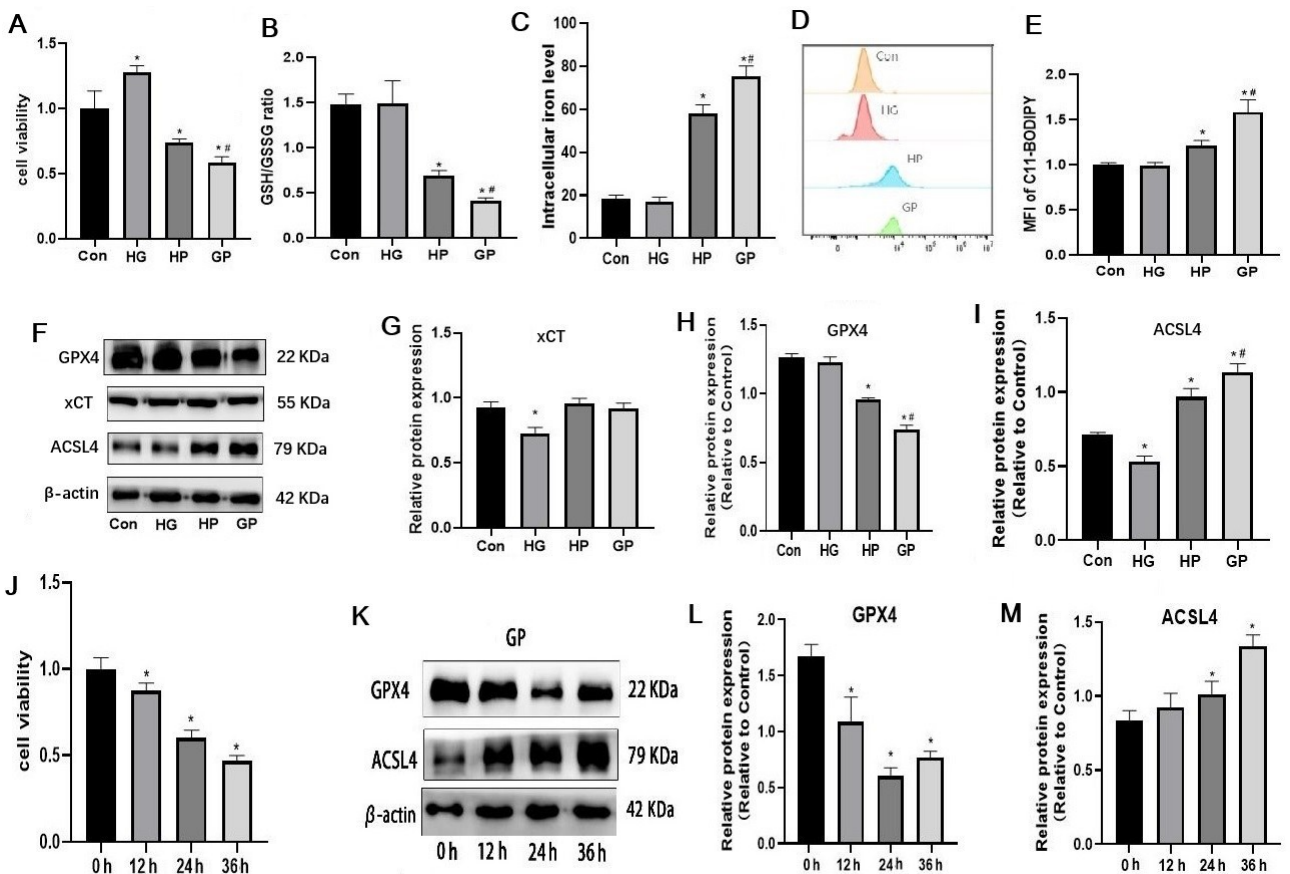
床上封闭 2 h。抗体孵育:封闭完成后,弃去封闭液, TBST 溶液漂洗 3 次,每次 10 min,裁剪所需条带,放入相应的一抗中,4 °C 水平摇床孵育过夜。次日取出条带,将条带转移至 TBST 溶液中,洗涤 3 次,每次 10 min。按照一抗来源选择相应的二抗,水平摇床温室孵育 1~2 h。显影:取出条带,二抗回收,同样于 TBST 溶液中,洗涤 3 次,每次 10 min,ECL 发光显影。统计分析:ImageJ 软件处理相应的条带灰度值和内参,进行灰度值分析。

2.2.5 细胞铁离子浓度检测 将各组细胞收集起来,然后用预冷的 PBS 清洗,吸弃,加入 100~200 μL 裂解液,震荡、裂解,12 000 r/min 5 min 高速离心取上清液。按照试剂盒说明倍比稀释标准品,并设置空白对照管,标准品管和样品管。60 °C 孵育 1 h。冷却至室温,加入 30 μL 铁离子检测剂,混匀,温室孵育 30 min,12 000 r/min 5 min 离心取上清液。取 200 μL 于 96 孔板中,用酶标仪在 550 nm 测定吸光度。根据标准品绘制标准曲线,得出计算公式,计算各组的 Fe^{2+} 含量。

2.2.6 统计学方法 实验数据均以($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,本研究采用 SPSS 23.0 对实验数据进行统计分析,用 GraphPad prism 8.0 作图,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 高脂、高糖高脂诱导 MPC-5 细胞发生铁死亡结果显示高糖(HG 组)并未诱导足细胞铁死亡的发生,高脂(HP 组)、高糖高脂(GP 组)均导致 MPC-5 细胞生存率和 GSH/GSSG 比值降低(见图 1A、图 1B),细胞亚铁离子浓度升高(见图 1C),脂质过氧化物含量也相应增多(见图 1D、图 1E),GPX4 表达下降,ACSL4 表达上升(P 均 < 0.05),xCT 未见明显的变化(图 1F~图 1I)。而高糖高脂相较于高脂加重了足细胞铁死亡的发生,因此选择高糖高脂进行后续实验。随着高糖高脂孵育时间延长,MPC-5 细胞生存率呈进行性下降(见图 1J),同时 GPX4 表达逐渐下降,ACSL4 与之相反则呈现上升趋势(P 均 < 0.05 ,见图 1K~图 1M)。



注:A为CCK-8检测MPC-5细胞生存率的变化;B为GSH/GSSG比值变化;C为MPC-5细胞中铁离子浓度变化;

D、E为BYDIPY581/591探针检测MPC-5细胞中的脂质过氧化物含量及其相对平均荧光强度;

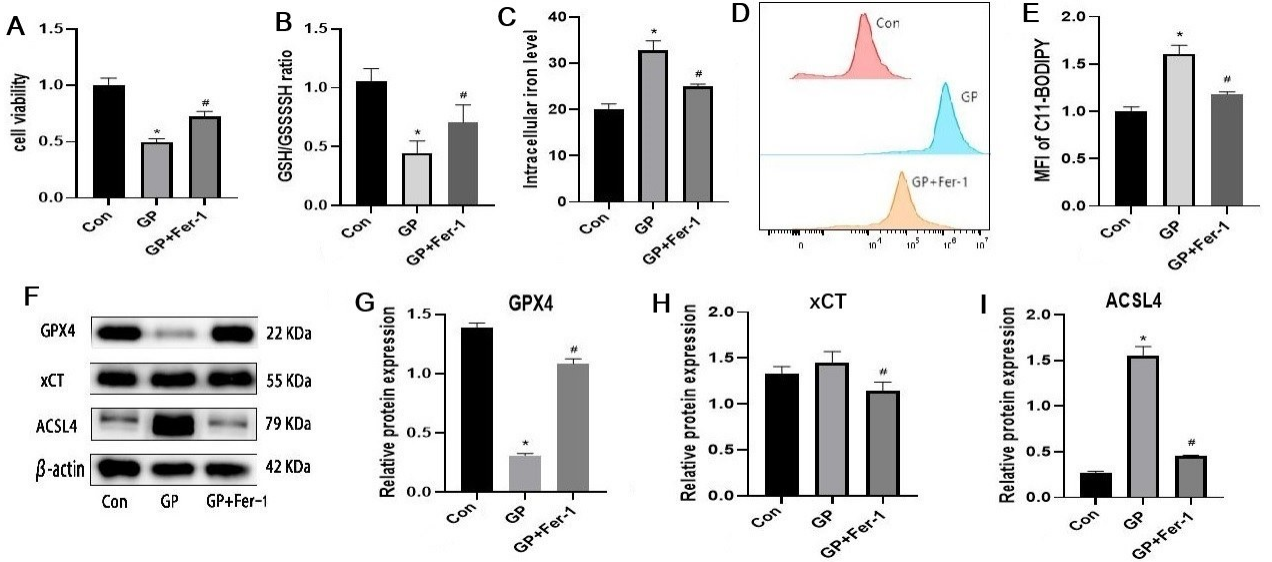
F、G、H、I为WB检测MPC-5细胞中铁死亡相关蛋白xCT、GPX4和ACSL4表达水平;

J为GP孵育0h、12h、24h、36h细胞生存率的变化;K、L、M为WB检测GP孵育0h、12h、24h、36h后,MPC-5细胞中铁死亡相关蛋白GPX4和ACSL4表达水平。* $P < 0.05$, # $P < 0.05$ 。

图1 HP、GP诱导MPC-5细胞产生铁死亡

3.2 Fer-1 抑制高糖高脂诱导 MPC-5 细胞铁死亡
 如图 2 所示, Fer-1 能够上调高糖高脂引起的 MPC-5 细胞活性和 GSH/GSSG 比值的降低 ($P < 0.05$, 见图 2A 和图 2B); 而下调高糖高脂引起的 MPC-5 细胞亚

铁离子浓度和脂质过氧化物水平的升高 ($P < 0.05$, 见图 2C~图 2E); 另外 Fer-1 增加 GPX4 蛋白表达, 同时下降 ACSL4 蛋白表达 ($P < 0.05$, 见图 2F~图 2I)。

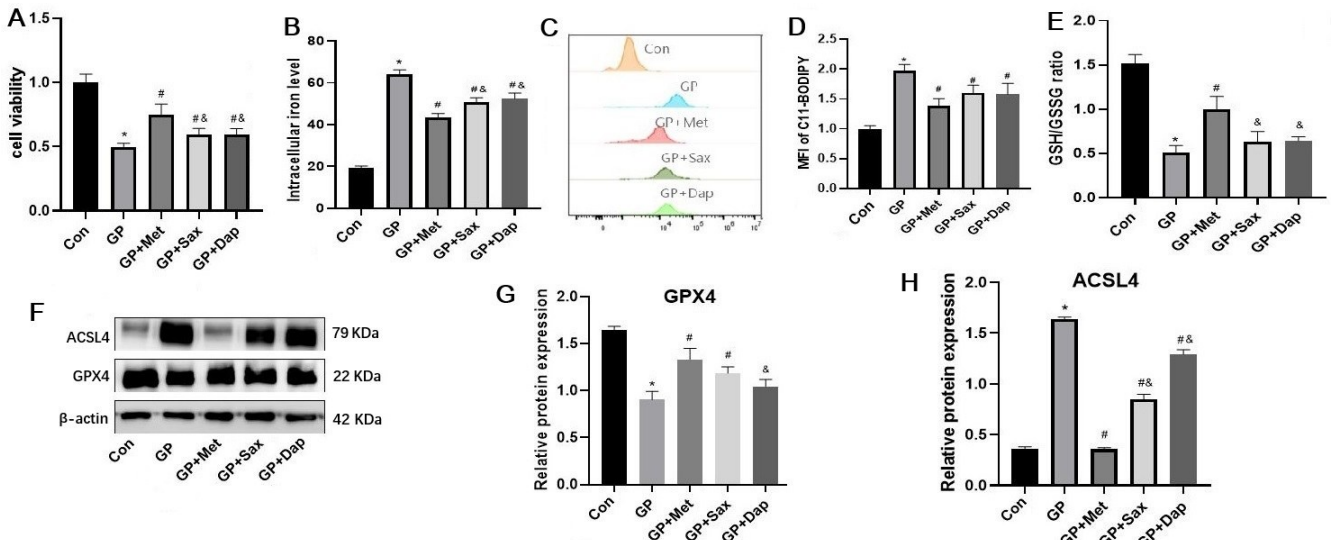


注: A 为 MPC-5 细胞分别和 GP、GP+Fer-1 共孵育 24 h 细胞活性的变化; B 为 GSH/GSSG 比值变化; C 为 MPC-5 细胞中铁离子浓度变化; D、E 为 C11-BODIPY581/591 探针检测 MPC-5 细胞中的脂质过氧化物含量及其相对平均荧光强度; F、G、H、I 为 WB 检测细胞铁死亡相关蛋白的表达变化。* $P < 0.05$, # $P < 0.05$ 。

图 2 Fer-1 抑制 GP 诱导 MPC-5 细胞铁死亡

3.3 Met 对小鼠足细胞铁死亡发挥保护作用 Met、Sax、Dap 均对高糖高脂引起的 MPC-5 细胞死亡具有保护作用(见图 3A), 同时降低 MPC-5 细胞亚铁离子浓度(见图 3B)和脂质过氧化物浓度(见图 3C、图 3D),

提高 GSH/GSSG 比值(见图 3E), 另外上调 GPX4 表达和下调 ACSL4 表达(见图 3F~图 3H), 其中 Met 的效果最强, P 均 < 0.05 。



注: A 为 CCK-8 检测在 0.5 mM Met, 100 nM Sax, 2 μM Dap 和 GP 共同孵育 24 h 下 MPC-5 细胞生存率的变化; B 为铁离子浓度变化; C、D 为 C11-BODIPY581/591 探针检测 MPC-5 细胞中的脂质过氧化物含量及其相对平均荧光强度; E 为 GSH/GSSG 比值变化; F、G、H 为 WB 检测在 3 种降糖药 2 μM Dap, 100 nM Sax, 0.5 mM Met 和 GP 共同孵育 24 h 下 MPC-5 细胞中 GPX4 和 ACSL4 蛋白表达情况。* $P < 0.05$, # $P < 0.05$, & $P < 0.05$ 。

图 3 Met 对小鼠足细胞铁死亡发挥保护作用

4 讨论

糖尿病肾脏足细胞的抗氧化防御能力比较弱,较容易受到氧化应激的影响而发生损伤。据文献报道,在高糖环境中,足细胞会发生铁死亡,而小檗碱可以抑制铁死亡,其机制可能与调控 NRF2/HO-1/GPX4 信号通路有关^[8]。关于高糖、高脂对足细胞的损伤作用和铁死亡效应的关联研究并不多,有研究发现高糖、高脂可促进足细胞转化生长因子- β 和血管内皮生长因子的表达,同时增多的转化生长因子- β 又可诱导足细胞表达血管内皮生长因子,导致胶原产生增多,造成肾小球基底膜增厚^[9]。慢性高血糖和血清高水平游离脂肪酸通常是导致足细胞损伤的原因^[10]。高血糖可加重脂毒性诱导的细胞功能障碍(糖脂毒性)^[11]。在本研究中,高糖环境作用下,并未诱导足细胞铁死亡发生,这可能与本细胞株特性有关,高脂诱导了足细胞铁死亡的发生,而高糖高脂明显加重了此诱导作用。同时,在 MPC-5 细胞中检测到铁死亡的生化特征^[12],如铁积累、GSH/GSSG 比率降低和脂质活性氧过量产生。此外,Fer-1 具有防止活性氧蓄积和抑制脂质过氧化的作用,是特异性铁死亡抑制剂,其显著逆转了糖脂毒性诱导 MPC-5 细胞铁死亡的作用。这些数据表明,铁死亡与高糖高脂诱导的 MPC-5 细胞损伤有关。

xCT 是胱氨酸/谷氨酸反向转运系统的重要组成部分,已被证明可介导细胞外胱氨酸与细胞内谷氨酸的交换^[13]。胱氨酸进入细胞,还原生成半胱氨酸,然后由谷氨酸-半胱氨酸连接酶和谷胱甘肽合酶催化合成谷胱甘肽(GSH)^[14]。而 GSH 是 GPX4 降解过氧化脂质的必需反应底物。GPX4 利用 GSH 将脂质过氧化的过氧化键转化为羟基,失去脂质过氧化活性^[15]。作为氧化应激和细胞死亡信号的感应器,GPX4 被认为是触发铁死亡程序的重要靶点,其表达量的降低会导致体内活性氧的显著增加。因此,抑制 GSH/GPX4 通道会引起过脂质活性氧的蓄积,造成铁死亡现象的发生。ACSL4 是多不饱和脂肪酸代谢的重要同工酶,通过催化以花生四烯酸为代表的多聚不饱和脂肪酸产生脂质过氧化物,使细胞对铁死亡的敏感性提高^[16]。然而,在糖尿病相关代谢产物影响下,MPC-5 细胞中的 xCT 表达情况是有争议的,既有补偿性增加^[17],也有减少^[18]的报道。在本研究中,GP 处理的 MPC-5 细胞中 xCT 表达没有显著变化,这表明糖脂毒性诱导的足细胞铁死亡可能不是由胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白的变化引起的。xCT 表达的差异可能与不同的细胞类型和加工因子有关,这些需要进一步研究。在本研究中,GP 促进 MPC-5 细胞死亡,同时 MPC-5 细胞中 GPX4 的表达降低,ACSL4 的表达增加。这表明糖脂毒性诱导的足细胞铁死亡可能归因于异常表达的

GPX4/ACSL4 轴。

作为常用的降血糖药物,Met、Sax 和 Dap 已被发现具有明显的肾脏保护作用^[19-22]。然而,目前尚不清楚这些药物的保护作用是否与抑制细胞铁死亡相关。有研究发现,Met 在高脂联合链脉菌素诱导的 2 型糖尿病小鼠中,通过抑制铁死亡,使胰岛 β 细胞损伤得到改善^[23]。另有报道称^[24],Met 可通过减少铁死亡来改善高脂血症相关的血管钙化,以及通过 LncRNA sox2ot/Nrf2/SLC7A11 改善细胞氧化应激和铁死亡^[25],这些证据表明,Met 具有抑制细胞铁死亡作用。在进一步的实验中,发现 Met、Sax 及 Dap 均降低 MPC-5 细胞亚铁离子浓度和脂质过氧化物浓度,同时提高细胞活性,且 Met 相较于 Sax 和 Dap 具有更强的抗铁死亡作用。GPX4 和 ASCL4 在调节细胞铁死亡中的核心作用已得到肯定^[26]。本研究结果表明,Met 通过增加 GPX4 的表达和减少 ASCL4 的表达来抑制铁死亡,有效减轻糖脂毒性诱导细胞损伤。

综上,本研究阐明了铁死亡在高糖高脂导致足细胞损伤中发挥的作用,Met 可能通过影响 GPX4 和 ASCL4 表达进行抗铁死亡,进而发挥细胞保护作用,为 DKD 的治疗提供了新的手段。本研究着眼于 Met 抑制细胞铁死亡现象研究,但未更加深入的探究 Met、GPX4、铁死亡这三者之间深层次的联系,有待于进行进一步的分子机制研究。

参考文献:

- [1] TEO Z L, THAM Y C, YU M, et al. Global prevalence of diabetic retinopathy and projection of burden through 2045: systematic review and meta-analysis[J]. *Ophthalmology*, 2021, 128(11): 1580-1591.
- [2] THOMAS M C, BROWNLEE M, SUSZTAK K, et al. Diabetic kidney disease [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15018.
- [3] ALICIC R Z, ROONEY M T, TUTTLE K R. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12(12): 2032-2045.
- [4] 韩佳瑞, 彭紫凝, 王学艺, 等. 糖尿病肾病血瘀证大鼠铁死亡相关基因 GPX4、ACSL4 表达水平变化[J]. *安徽中医药大学学报*, 2023, 42 (2): 78-84.
- [5] GASSLER N, ELGER M, KRÄNZLIN B, et al. Podocyte injury underlies the progression of focal segmental glomerulosclerosis in the fa/fa Zucker rat [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(1): 106-116.
- [6] 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.
- [7] LV M, CHEN Z, HU G Y, et al. Therapeutic strategies of diabetic nephropathy: recent progress and future perspectives [J]. *Diabetes*, 2023, 72(12): 2100-2115.

- tives[J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(3):332-346.
- [8] 关锡梅,解勇圣,倪伟建,等. Nrf2/HO-1/GPX4 对高糖诱导足细胞铁死亡的影响及小檗碱的干预机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2021, 37(3):396-403.
- [9] SAITO D, MAESHIMA Y, NASU T, et al. Amelioration of renal alterations in obese type 2 diabetic mice by vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(4):F873-886.
- [10] ECONOMOU C G, KITSIOU P V, TZINIA A K, et al. Enhanced podocalyxin expression alters the structure of podocyte basal surface[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt15):3281-3294.
- [11] CIREGIA F, BUGLIANI M, RONCI M, et al. Palmitate-induced lipotoxicity alters acetylation of multiple proteins in clonal β cells and human pancreatic islets[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):13445.
- [12] CHEN X, COMISH P B, TANG D L, et al. Characteristics and biomarkers of ferroptosis [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9:637162.
- [13] KOPPULA P, ZHUANG L, GAN B Y. Cystine transporter SLC7A11/xCT in cancer: ferroptosis, nutrient dependency, and cancer therapy[J]. *Protein Cell*, 2021, 12(8):599-620.
- [14] BOTTA D, WHITE C C, VLIET-GREGG P, et al. Modulating GSH synthesis using glutamate cysteine ligase transgenic and gene-targeted mice[J]. *Drug Metab Rev*, 2008, 40(3):465-477.
- [15] ZHOU Y. The protective effects of cryptochlorogenic acid on β -cells function in diabetes in vivo and vitro via inhibition of ferroptosis [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2020, 13:1921-1931.
- [16] YANG W S, STOCKWELL B R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, non-apoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells[J]. *Chem Biol*, 2008, 15(3):234-245.
- [17] KOULAJIAN K, IVOVIC A, YE K T, et al. Overexpression of glutathione peroxidase 4 prevents β -cell dysfunction induced by prolonged elevation of lipids *in vivo* [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013, 305(2):E254-E262.
- [18] STANCIC A, SAKSIDA T, MARKELIC M, et al. Ferroptosis as a novel determinant of β -Cell death in diabetic conditions [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022:3873420.
- [19] LEHTONEN S. Metformin protects against podocyte injury in diabetic kidney disease[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13(12):452.
- [20] KIM J, SHON E, KIM C S, et al. Renal podocyte injury in a rat model of type 2 diabetes is prevented by metformin[J]. *Exp Diabetes Res*, 2012, 2012:210821.
- [21] HU Y Y, YE S D, XING Y, et al. Saxagliptin attenuates glomerular podocyte injury by increasing the expression of renal nephrin and podocin in type 2 diabetic rats[J]. *Acta diabetologica*, 2020, 57(3):279-286.
- [22] SUN J S, ZHANG X Y, WANG S M, et al. Dapagliflozin improves podocytes injury in diabetic nephropathy via regulating cholesterol balance through KLF5 targeting the ABCA1 signalling pathway[J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2024, 16(1):38.
- [23] SUN Y, BAI Y P, WANG D G, et al. Protective effects of metformin on pancreatic β -cell ferroptosis in type 2 diabetes *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 168:115835.
- [24] MA W Q, SUN X J, ZHU Y, et al. Metformin attenuates hyperlipidaemia-associated vascular calcification through anti-ferroptotic effects[J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 165:229-242.
- [25] 李晓萌. 二甲双胍通过 LncRNA sox2ot/Nrf2/SLC7A11 改善高糖培养小鼠肾小球系膜细胞氧化应激和铁死亡[D]. 沈阳:中国医科大学, 2022.
- [26] KRÜMMEL B, PLÖTZ T, JÖRNS A, et al. The central role of glutathione peroxidase 4 in the regulation of ferroptosis and its implications for pro-inflammatory cytokine-mediated beta-cell death[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(6):166114.

收稿日期:2024-10-29;修回日期:2025-01-01

(本文编辑 钟琳)