

# 鸢尾素通过 Nrf2/HO-1 信号通路抑制铁死亡减轻脓毒症相关急性肾损伤的作用机制研究

王博青<sup>1</sup> 唐源<sup>2</sup> 王毅<sup>1</sup> 于湘友<sup>1</sup>

<sup>1</sup>新疆医科大学第一附属医院重症医学中心, 乌鲁木齐 830000; <sup>2</sup>新疆医科大学第五附属医院重症医学科, 乌鲁木齐 830000

王博青现在新疆医科大学第五附属医院重症医学科, 乌鲁木齐 830000

通信作者: 于湘友, Email: yu2796@163.com

**【摘要】** **目的** 探讨鸢尾素调控核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)/ 血红素加氧酶-1 (HO-1) 信号通路抑制细胞铁死亡对脓毒症相关急性肾损伤 (SA-AKI) 的改善作用。**方法** 采用随机数字表法将 60 只 C57BL/6 小鼠分为对照组、脂多糖 (LPS) 组、LPS+ 鸢尾素组、LPS+ 鸢尾素+Nrf2 抑制剂 (ML385) 组, 每组 15 只。腹腔注射 LPS 溶液 10 mg/kg 制备 SA-AKI 模型; 对照组注射等量生理盐水。LPS+ 鸢尾素组于 LPS 注射前 30 min 静脉注射鸢尾素 1 μg/kg; LPS+ 鸢尾素+ML385 组于 LPS 注射前 60 min 腹腔注射 ML385 30 mg/kg, 再于 LPS 注射前 30 min 注射鸢尾素。各组于建模后 24 h 麻醉小鼠眼球采血并处死取肾脏组织, 采用全自动生化分析仪检测血清肌酐 (SCr) 和血尿素氮 (BUN) 水平; 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测肾脏组织白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色于光镜下观察肾脏组织病理学改变; 采用醋酸铀染色于透射电镜下观察肾脏组织线粒体形态改变; 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测肾脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、长链脂肪酸酰基辅酶 A 合成酶 4 (ACSL4)、Nrf2、HO-1 蛋白表达; 同时测定肾脏组织 Fe<sup>2+</sup>、丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 的含量及活性氧 (ROS) 的相对荧光强度。**结果** ① LPS 组、LPS+ 鸢尾素组、LPS+ 鸢尾素+ML385 组 SCr、BUN、IL-6 和 TNF-α 含量均较对照组升高 (均  $P < 0.05$ )。与 LPS 组比较, LPS+ 鸢尾素组 SCr、BUN、IL-6 和 TNF-α 含量降低 [SCr (μmol/L): 31.70 ± 3.94 比 65.75 ± 7.02, BUN (mmol/L): 11.03 ± 2.25 比 29.23 ± 2.58, IL-6 (ng/L): 239.96 ± 14.93 比 1 080.40 ± 20.06, TNF-α (ng/L): 105.85 ± 14.92 比 299.12 ± 19.94, 均  $P < 0.05$ ]。而 LPS+ 鸢尾素+ML385 组各指标含量均较 LPS+ 鸢尾素组升高 (均  $P < 0.05$ )。② 光镜下观察, 与对照组相比, LPS 组、LPS+ 鸢尾素组、LPS+ 鸢尾素+ML385 组均出现不同程度的肾小管扩张, 肾小管细胞脱落, 细胞空泡化, 肾小管内出现管型, 其中 LPS 组损伤最重, LPS+ 鸢尾素组损伤最轻。③ 透射电镜下观察, 与对照组相比, 其余 3 组均出现不同程度的线粒体增大、变圆肿胀, 膜内基质稀疏、溶解, 嵴减少, 其中 LPS 组最为明显, 而 LPS+ 鸢尾素组线粒体形态改变较轻。④ 与对照组比较, LPS 组、LPS+ 鸢尾素组、LPS+ 鸢尾素+ML385 组中 GPX4 蛋白表达减弱, Nrf2、HO-1 和 ACSL4 蛋白表达增强 (均  $P < 0.05$ )。与 LPS 组相比, LPS+ 鸢尾素组 GPX4、Nrf2、HO-1 表达增强, ACSL4 表达减弱 (GPX4/GAPDH: 0.68 ± 0.07 比 0.49 ± 0.03, Nrf2/Lamin B: 1.03 ± 0.04 比 0.82 ± 0.06, HO-1/GAPDH: 0.93 ± 0.02 比 0.66 ± 0.04, ACSL4/GAPDH: 0.69 ± 0.02 比 0.93 ± 0.07, 均  $P < 0.05$ )。与 LPS+ 鸢尾素组相比, LPS+ 鸢尾素+ML385 组 GPX4、Nrf2、HO-1 表达下降, ACSL4 表达增强 (均  $P < 0.05$ )。⑤ 与对照组相比, LPS 组、LPS+ 鸢尾素组、LPS+ 鸢尾素+ML385 组 MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup> 表达水平升高, GSH 表达水平降低 (均  $P < 0.05$ )。与 LPS 组相比, LPS+ 鸢尾素组 MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup> 表达水平降低, GSH 表达水平升高 [MDA (nmol/mg): 9.35 ± 2.07 比 15.65 ± 4.03, ROS (相对荧光强度): 584.26 ± 74.48 比 1 655.68 ± 405.71, Fe<sup>2+</sup> (nmol/mg): 9.24 ± 3.82 比 26.99 ± 7.95, GSH (nmol/mg): 91.50 ± 7.99 比 43.13 ± 11.85, 均  $P < 0.05$ ]。与 LPS+ 鸢尾素组相比, LPS+ 鸢尾素+ML385 组 MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup> 表达水平升高, GSH 表达水平降低 (均  $P < 0.05$ )。**结论** 鸢尾素通过 Nrf2/HO-1 信号通路抑制细胞铁死亡对 SA-AKI 有改善作用, 鸢尾素可能为脓毒症的器官功能保护治疗提供新的方向。

**【关键词】** 鸢尾素; 脓毒症相关急性肾损伤; 核因子 E2 相关因子 2; 血红素加氧酶-1; 铁死亡

**基金项目:** 新疆维吾尔自治区卫生健康青年医学科技人才专项 (WJWY-202434)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250923-00491

## Mechanism of irisin in alleviating sepsis-associated acute kidney injury by inhibiting ferroptosis via the Nrf2/HO-1 signaling pathway

Wang Boqing<sup>1</sup>, Tang Yuan<sup>2</sup>, Wang Yi<sup>1</sup>, Yu Xiangyou<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China;

<sup>2</sup>Department of Intensive Care Unit, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Wang Boqing is working on the Department of Intensive Care Unit, the Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China

Corresponding author: Yu Xiangyou, Email: yu2796@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the ameliorative effect of irisin on sepsis-associated acute kidney injury (SA-AKI) by inhibiting ferroptosis through the regulation of the nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling pathway. **Methods** Sixty C57BL/6 mice were divided into four groups using a random number table method: control group, lipopolysaccharide (LPS) group, LPS+irisin group, and LPS+irisin+ML385 (Nrf2 inhibitor) group, with 15 mice in each group. The SA-AKI model was established by intraperitoneal injection of LPS at a dose of 10 mg/kg, while the control group received an equal volume of normal saline. In the LPS+irisin group, irisin (1 μg/kg) was intravenously injected 30 minutes prior to LPS administration. In the LPS+irisin+ML385 group, ML385 (30 mg/kg) was intraperitoneally injected 60 minutes before LPS injection, followed by irisin injection 30 minutes before LPS. All mice were anesthetized and sacrificed 24 hours after modeling. Blood samples were collected from the eyeballs for serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) measurement using an automatic biochemical analyzer. Renal tissues were harvested for the following assessments: the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); histopathological changes were observed under light microscope after hematoxylin-eosin (HE) staining; mitochondrial morphology was observed under transmission electron microscope after uranium acetate staining; protein expressions of glutathione peroxidase 4 (GPX4), acyl-CoA synthetase long-chain family member 4 (ACSL4), Nrf2, and HO-1 were detected by Western blotting; the contents of Fe<sup>2+</sup>, malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH), and relative fluorescence intensity of reactive oxygen species (ROS) were also measured in renal tissues. **Results** 1) The levels of SCr, BUN, IL-6, and TNF-α in the LPS, LPS+irisin, and LPS+irisin+ML385 groups were higher than those in the control group (all *P*<0.05). Compared with the LPS group, the LPS+irisin group showed decreased levels of SCr, BUN, IL-6, and TNF-α [SCr (μmol/L): 31.70 ± 3.94 vs. 65.75 ± 7.02, BUN (mmol/L): 11.03 ± 2.25 vs. 29.23 ± 2.58, IL-6 (ng/L): 239.96 ± 14.93 vs. 1 080.40 ± 20.06, TNF-α (ng/L): 105.85 ± 14.92 vs. 299.12 ± 19.94, all *P*<0.05]. However, the levels of these indicators in the LPS+irisin+ML385 group were higher than those in the LPS+irisin group (all *P*<0.05). 2) Light microscopy revealed that compared with the control group, the LPS, LPS+irisin, and LPS+irisin+ML385 groups exhibited varying degrees of renal tubular dilation, tubular cell shedding, cellular vacuolization, and intratubular cast formation, with the most severe damage observed in the LPS group and the mildest damage in the LPS+irisin group. 3) Transmission electron microscopy showed that compared with the control group, the other three groups displayed varying degrees of mitochondrial enlargement, rounding and swelling, sparse and dissolved matrix, and reduced cristae, with the most pronounced changes in the LPS group, while mitochondrial morphology was only mildly altered in the LPS+irisin group. 4) Compared with the control group, the protein expression of GPX4 was decreased, while the protein expressions of Nrf2, HO-1, and ACSL4 were increased in the LPS, LPS+irisin, and LPS+irisin+ML385 groups (all *P*<0.05). Compared with the LPS group, the LPS+irisin group exhibited increased expression of GPX4, Nrf2, and HO-1, and decreased expression of ACSL4 (GPX4/GAPDH: 0.68 ± 0.07 vs. 0.49 ± 0.03, Nrf2/Lamin B: 1.03 ± 0.04 vs. 0.82 ± 0.06, HO-1/GAPDH: 0.93 ± 0.02 vs. 0.66 ± 0.04, ACSL4/GAPDH: 0.69 ± 0.02 vs. 0.93 ± 0.07, all *P*<0.05). Compared with the LPS+irisin group, the LPS+irisin+ML385 group showed decreased expressions of GPX4, Nrf2, and HO-1, and increased expression of ACSL4 (all *P*<0.05). 5) Compared with the control group, the levels of MDA, ROS, and Fe<sup>2+</sup> were increased, while the level of GSH was decreased in the LPS, LPS+irisin, and LPS+irisin+ML385 groups (all *P*<0.05). Compared with the LPS group, the LPS+irisin group exhibited decreased levels of MDA, ROS, and Fe<sup>2+</sup>, and increased level of GSH [MDA (nmol/mg): 9.35 ± 2.07 vs. 15.65 ± 4.03, ROS (relative fluorescence intensity): 584.26 ± 74.48 vs. 1 655.68 ± 405.71, Fe<sup>2+</sup> (nmol/mg): 9.24 ± 3.82 vs. 26.99 ± 7.95, GSH (nmol/mg): 91.50 ± 7.99 vs. 43.13 ± 11.85, all *P*<0.05]. Compared with the LPS+irisin group, the LPS+irisin+ML385 group showed increased levels of MDA, ROS, and Fe<sup>2+</sup>, and decreased level of GSH (all *P*<0.05). **Conclusion** Irisin ameliorates LPS-induced SA-AKI in mice by inhibiting ferroptosis through the Nrf2/HO-1 signaling pathway, suggesting that irisin may serve as a potential therapeutic strategy for organ protection in sepsis.

**【Key words】** Irisin; Sepsis-associated acute kidney injury; Nuclear factor E2-related factor 2; Hemeoxygenase-1; Ferroptosis

**Fund program:** Xinjiang Uygur Autonomous Region Health Commission Young Medical Science and Technology Talents Special Project (WJWY-202434)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20250923-00491

脓毒症是一种与严重感染、重大创伤、休克和外科手术相关的常见并发症,具有高发病率、高病死率、高医疗费用等特点<sup>[1]</sup>。2017 年全球脓毒症总发病率每年(3 000 ~ 4 890)万人,导致 1 100 万患者死亡<sup>[2]</sup>。我国重症研究团队发起的一项覆盖我国 44 家 ICU 的脓毒症多中心横断面调查显示,ICU 患者中脓毒症约占 1/5,病死率达 35.5%,脓毒性休

克病死率达 51.9%,年医疗费用超 300 亿元,对生存患者进行 2 年随访发现,约 30% 的患者死亡<sup>[3]</sup>。脓毒症相关急性肾损伤(sepsis-associated acute kidney injury, SA-AKI)是脓毒症住院和危重症患者常见的、危及生命的并发症。研究表明,谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 调控的铁死亡(ferroptosis)可能是脓毒症的一种新的病理生

理机制,铁代谢紊乱在急性肾损伤的病理生理过程中起着重要的作用<sup>[4]</sup>。核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2) 是一种转录因子,激活后可诱导抗氧化蛋白表达,减轻氧化损伤<sup>[5]</sup>。血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1) 是 Nrf2 调控的下游抗氧化酶,可催化血红素分解为铁离子、胆绿素和一氧化碳等来维持氧化还原稳态<sup>[6]</sup>。已有研究表明,激活 Nrf2/HO-1 信号通路可以降低脓毒症大鼠的死亡率并减轻器官损伤<sup>[7]</sup>。本课题组前期实验也证明,激活 Nrf2/HO-1 信号通路可以抑制促炎因子的释放,减轻细胞氧化损伤,缓解脓毒症肝损伤<sup>[8]</sup>。最近研究表明, Nrf2 是脂质过氧化和铁死亡的缓解剂,而 Nrf2/HO-1 轴也被证明与线粒体氧化应激和铁死亡有关<sup>[9]</sup>。另有研究表明, Nrf2 信号通路能被诱导并参与细胞内铁代谢和铁浓度的调节,保护细胞免受氧化损伤以及铁死亡<sup>[10]</sup>。鸢尾素(irisin)通过某些机制在糖尿病、肥胖、恶性肿瘤、心血管疾病等疾病中起到治疗作用,成为多个医学领域的研究热点<sup>[11]</sup>。已有研究表明,鸢尾素通过抑制铁死亡并恢复线粒体功能改善脓毒症相关性肝损伤,而抑制铁死亡核心调控因子 GPX4 的表达会削弱鸢尾素对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)处理的肝细胞及脓毒症小鼠的保护作用<sup>[12]</sup>。但目前关于鸢尾素与 SA-AKI 的研究较少,鸢尾素在 SA-AKI 中铁死亡和线粒体功能障碍中的作用机制尚不完全清楚。本研究拟探讨鸢尾素通过 Nrf2/HO-1 信号通路调控细胞铁死亡在 SA-AKI 中的作用与机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及主要试剂:**60 只 SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠,8~12 周龄,由新疆医科大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(新)2018-0003。小鼠在控温环境(22±2)℃进行饲养,12 h 光/12 h 暗交替循环,并自由摄取标准鼠粮和自来水。LPS(*Escherichia coli* O55:B5, HY-D1056)、鸢尾素(HY-P70664)、Nrf2 抑制剂 ML385(HY-100523)为美国 MedChemExpress 公司产品;白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(E-EL-M0044)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)ELISA 试剂盒(E-EL-M3063)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)比色法测试盒(E-BC-K030-M)均为中国 Elabscience 公司产品;二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试

剂盒(PC0020)、Fe<sup>2+</sup> 含量检测试剂盒(BC5415)均购自北京索莱宝生物科技有限公司;GPX4(30388-1-AP)、长链脂肪酸酰基辅酶 A 合成酶 4(acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4; 22401-1-AP)、Nrf2(16396-1-AP)、HO-1(10701-1-AP)、核纤层蛋白 B(Lamin B; 12987-1-AP)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH; 60004-1-Ig)一抗均为美国 Proteintech 公司产品;羊抗兔二抗(111-035-003)、羊抗鼠二抗(115-035-003)为美国 Jackson 公司产品;增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂(NCI5079)为美国 Thermo 公司产品;丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(A003-1)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定试剂盒(E004-1-1)均购自南京建成生物工程研究所。

**1.2 动物分组及给药方式:**按随机数字表法将小鼠分为对照组、LPS 组、LPS+鸢尾素组、LPS+鸢尾素+ML385 组,每组 15 只。腹腔注射 LPS(溶于生理盐水,1 mg/mL)10 mg/kg 制备 SA-AKI 动物模型;对照组腹腔注射等量生理盐水。LPS+鸢尾素组于 LPS 注射前 30 min 静脉注射鸢尾素 1 μg/kg<sup>[13]</sup>;LPS+鸢尾素+ML385 组于 LPS 注射前 60 min 腹腔注射 30 mg/kg 的 Nrf2 抑制剂 ML385<sup>[14]</sup>,再于 LPS 注射前 30 min 静脉注射鸢尾素。本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并经过新疆医科大学伦理委员会审批通过(审批号:IACUC-20250305-230)。

**1.3 检测指标及方法:**制模后 24 h,充分麻醉后摘除眼球取血并处死小鼠,采集肾脏标本备用。

**1.3.1 肾功能指标检测:**采用全自动生化分析仪检测小鼠血清肌酐(serum creatinine, SCr)和血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤分别定量测定小鼠肾脏组织中 IL-6 和 TNF-α 水平。

**1.3.2 肾脏组织病理学观察:**每组随机选取 6 只小鼠,取左侧肾脏组织,用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,经常规脱水、石蜡包埋、切片(片厚约 5 μm),脱蜡水化后进行苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色、封片等步骤,于光镜下观察肾脏组织病理形态学改变。

**1.3.3 肾脏线粒体观察:**取右肾标本,存于装有预冷的 2.5% 戊二醛中,4℃ 冰箱过夜,次日进行样本固定、磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗、2% 锇酸固定、再次 PBS 清洗、梯度乙醇

(50%、75%、90%)及无水乙醇脱水、树脂包埋、切片、醋酸铀染色等步骤后,透射电镜下观察线粒体改变情况。

**1.3.4 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)** 测定铁死亡通路蛋白表达:将肾脏组织在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的 RIPA 缓冲液中裂解。使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量,每组取 50 μg 蛋白样品(Nrf2 在细胞核,HO-1 在细胞质,以及来自两个部分的其他蛋白),经 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)并转移到聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜上;用 5% 脱脂干乳阻断后,将 GPX4(1:800)、ACSL4(1:5 000)、Nrf2(1:5 000)、HO-1(1:3 000)、Lamin B(1:5 000)或 GAPDH(1:5 000)一抗于 4 °C 孵育过夜;随后在含吐温 20 的 Tris 盐缓冲液(Tris Buffered Saline with Tween-20, TBST)中洗涤,并与羊抗兔二抗(1:10 000)或羊抗鼠二抗(1:10 000)在室温下孵育 2 h;使用 ECL 法对各蛋白条带进行显影,并使用 Image J 软件检测各蛋白条带灰度值,以目标蛋白/内参蛋白灰度值比值表示蛋白相对表达量。

**1.3.5 肾组织裂解液中 Fe<sup>2+</sup>、MDA、GSH 含量测定:**按照试剂盒说明书步骤分别测定肾脏组织中 Fe<sup>2+</sup>、MDA、GSH 的含量。

**1.3.6 肾组织裂解液中 ROS 荧光强度测定:**取新鲜肾脏组织 1 g,组织匀浆后用 4 °C 预冷的 PBS 反复清洗并收集细胞沉淀,按照试剂盒说明书步骤检测 ROS 荧光强度,细胞密度为 1×10<sup>6</sup>/mL。

**1.4 统计学处理:**使用 GraphPad Prism 9.0 软件对蛋白表达数据进行处理,用 SPSS 25.0 软件对其他数据进行处理。计量资料均呈正态分布,采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较时,方差齐用单因素方差分析,方差不齐则用 Dunnett *t* 检验;采用 SNK 法进行两两比较。检验水准  $\alpha = 0.05$  (双侧)。

## 2 结果

**2.1 鸢尾素对脓毒症小鼠肾损伤的影响:**表 1 结果显示,LPS 组血清 SCr、BUN 及肾组织 IL-6、TNF- $\alpha$  的含量均较对照组升高(均  $P < 0.05$ ),提示 SA-AKI 动物模型制备成功。LPS+鸢尾素组血清 SCr、BUN 及肾组织 IL-6、TNF- $\alpha$  的含量均较 LPS 组降低(均  $P < 0.05$ )。LPS+鸢尾素+ML385 组血清 SCr、BUN 及肾组织 IL-6、TNF- $\alpha$  的含量均较 LPS+鸢尾素组

升高(均  $P < 0.05$ ),提示 ML385 可能部分阻断了鸢尾素的肾脏保护及抗炎作用。

表 1 各组小鼠肾功能指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	血清 SCr ( $\mu\text{mol/L}$ )	血清 BUN (mmol/L)
对照组	15	21.02 ± 3.83	5.67 ± 0.90
LPS 组	9	65.75 ± 7.02 <sup>a</sup>	29.23 ± 2.58 <sup>a</sup>
LPS+鸢尾素组	13	31.70 ± 3.94 <sup>ab</sup>	11.03 ± 2.25 <sup>ab</sup>
LPS+鸢尾素+ML385 组	11	44.72 ± 6.13 <sup>abc</sup>	23.72 ± 3.37 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值		162.34	148.76
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001
组别	动物数(只)	肾组织 IL-6 (ng/L)	肾组织 TNF- $\alpha$ (ng/L)
对照组	15	64.07 ± 14.88	44.85 ± 9.97
LPS 组	9	1 080.40 ± 20.06 <sup>a</sup>	299.12 ± 19.94 <sup>a</sup>
LPS+鸢尾素组	13	239.96 ± 14.93 <sup>ab</sup>	105.85 ± 14.92 <sup>ab</sup>
LPS+鸢尾素+ML385 组	11	737.92 ± 17.98 <sup>abc</sup>	191.50 ± 11.37 <sup>abc</sup>
<i>F</i> 值		1 245.82	361.45
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001

注:LPS 为脂多糖,ML385 为核因子 E2 相关因子 2 抑制剂,SCr 为血清肌酐,BUN 为血尿素氮,IL-6 为白细胞介素-6,TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;<sup>a</sup> 与对照组比较, $P < 0.05$ ;<sup>b</sup> 与 LPS 组比较, $P < 0.05$ ;<sup>c</sup> 与 LPS+鸢尾素组比较, $P < 0.05$

**2.2 各组小鼠肾脏组织病理学改变:**图 1 显示,制模后 24 h,对照组肾脏组织肾小管形态结构清晰,细胞形态正常,未见明显炎症细胞浸润、肾小管扩张、肾小管管型,肾小球结构清晰完整。LPS 组、LPS+鸢尾素组、LPS+鸢尾素+ML385 组均出现不同程度的肾小管扩张、肾小管细胞脱落、细胞空泡化、肾小管管型,其中 LPS 组最重,LPS+鸢尾素组最轻。

**2.3 鸢尾素对肾脏组织中线粒体的影响:**图 2 显示,对照组线粒体数量较多,基质均匀,嵴较为丰富且结构清晰、呈平行排列。LPS 组线粒体出现增大、变圆肿胀,膜内基质稀疏、溶解,嵴减少。LPS+鸢尾素组线粒体大小相对均匀,基质略微不均,嵴偶有减少。LPS+鸢尾素+ML385 组线粒体轻度异形、伸长,基质小区域溶解,嵴减少。

**2.4 鸢尾素对 Nrf2/HO-1 通道蛋白及铁死亡相关蛋白表达的影响:**图 3 和表 2 显示,与对照组相比,LPS 组小鼠 Nrf2、HO-1 和 ACSL4 表达增强,GPX4 表达减弱(均  $P < 0.05$ )。与 LPS 组相比,LPS+鸢尾素组小鼠 Nrf2、HO-1、GPX4 表达增强,ACSL4 表达减弱(均  $P < 0.05$ )。与 LPS+鸢尾素组相比,LPS+鸢尾素+ML385 组小鼠 Nrf2、HO-1、GPX4 表达减弱,ACSL4 表达增强(均  $P < 0.05$ )。

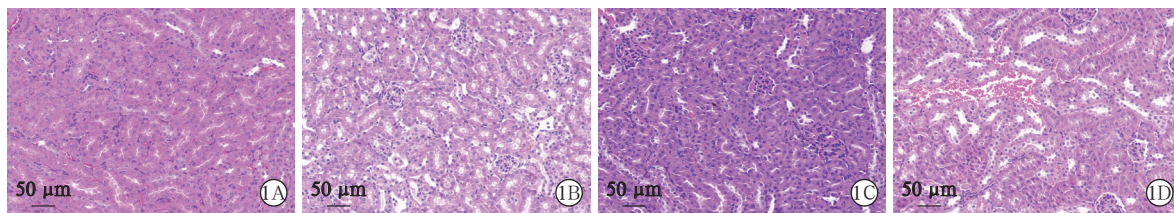


图 1 光镜下观察各组小鼠肾脏组织病理学改变 对照组(A)肾小管形态结构清晰,细胞形态正常,未见明显炎症细胞浸润、肾小管扩张、肾小管管型,肾小球结构清晰完整;脂多糖(LPS)致脓毒症肾损伤模型组(B)肾小管扩张明显,肾小管消融,结构不清晰,大量肾小管细胞脱落,肾小管、肾小球细胞空泡化严重,肾小管管型明显;LPS+鸢尾素组(C)有少量肾小管扩张,组织间隙可见部分充血,少量肾小管上皮细胞脱落、肾小管管型;LPS+鸢尾素+核因子E2相关因子2抑制剂(ML385)组(D)肾小管部分扩张,部分肾小管细胞脱落,部分细胞空泡化,部分肾小管内出现管型 苏木素-伊红(HE)染色 低倍放大

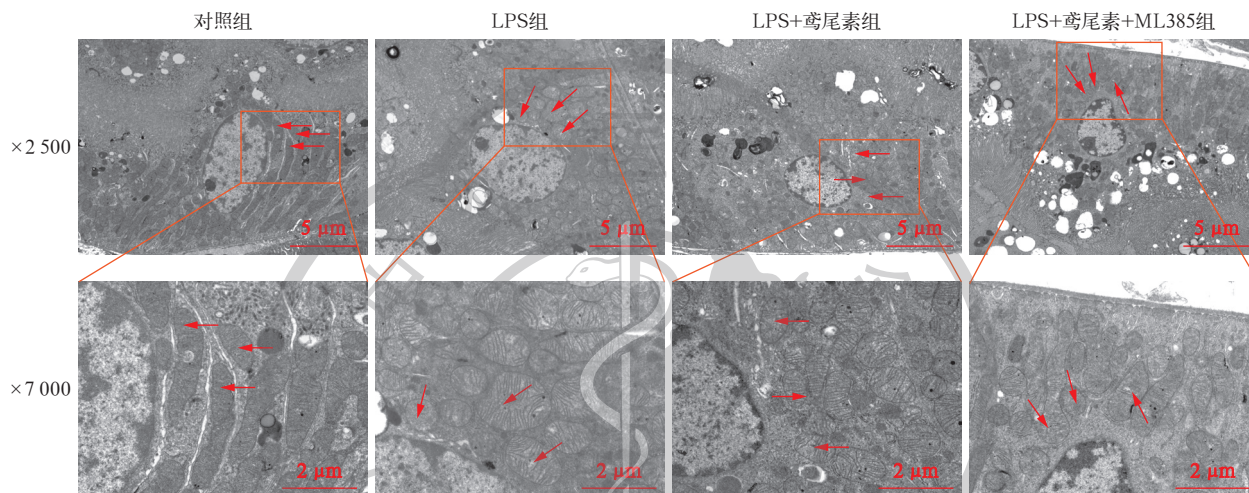


图 2 电镜下观察各组小鼠肾脏组织中线粒体改变 上图为单个细胞的完整图片,下图为橙色框选范围的局部放大图。对照组肾小管上皮细胞轻度水肿,细胞膜完整,线粒体(箭头所示)基本正常,数量较多,大小均匀,膜完整,膜内基质丰富、均匀,嵴多数平行排列;脂多糖(LPS)致脓毒症肾损伤模型组(LPS组)肾小管上皮细胞轻度水肿,细胞膜完整,线粒体(箭头所示)明显变圆、增大肿胀,膜完整,膜内基质小区域溶解、变淡,嵴多数平行排列、减少;LPS+鸢尾素组肾小管上皮细胞轻度水肿,细胞膜完整,线粒体(箭头所示)大小均匀,多呈椭圆形,膜完整,膜内基质丰富、均匀,嵴多数模糊、不清晰;LPS+鸢尾素+核因子E2相关因子2抑制剂(ML385)组肾小管上皮细胞轻度水肿,细胞膜完整,线粒体(箭头所示)大小、形态不均,少数伸长,膜完整,膜内基质小区域变淡、不均,嵴减少 2% 醋酸铀饱和和乙醇溶液染色



注:LPS为脂多糖,ML385为核因子E2相关因子2(Nrf2)抑制剂,HO-1为血红素加氧酶-1,GPX4为谷胱甘肽过氧化物酶4,ACSL4是长链脂肪酸酰基辅酶A合成酶4,Lamin B为核纤层蛋白B,GAPDH是3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 3 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测各组小鼠肾脏组织Nrf2、HO-1、GPX4及ACSL4蛋白表达

表 2 各组小鼠肾脏组织中Nrf2、HO-1、GPX4、ACSL4蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	Nrf2/Lamin B	HO-1/GAPDH
对照组	15	0.30 ± 0.05	0.28 ± 0.08
LPS组	9	0.82 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.66 ± 0.04 <sup>a</sup>
LPS+鸢尾素组	13	1.03 ± 0.04 <sup>ab</sup>	0.93 ± 0.02 <sup>ab</sup>
LPS+鸢尾素+ML385组	11	0.72 ± 0.05 <sup>abc</sup>	0.70 ± 0.10 <sup>abc</sup>
F值		267.14	124.58
P值		<0.001	<0.001
组别	动物数(只)	GPX4/GAPDH	ACSL4/GAPDH
对照组	15	0.90 ± 0.06	0.51 ± 0.06
LPS组	9	0.49 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.07 <sup>a</sup>
LPS+鸢尾素组	13	0.68 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.69 ± 0.02 <sup>ab</sup>
LPS+鸢尾素+ML385组	11	0.60 ± 0.01 <sup>abc</sup>	0.81 ± 0.08 <sup>abc</sup>
F值		73.89	92.47
P值		<0.001	<0.001

注:LPS为脂多糖,ML385为核因子E2相关因子2(Nrf2)抑制剂,HO-1为血红素加氧酶-1,GPX4为谷胱甘肽过氧化物酶4,ACSL4是长链脂肪酸酰基辅酶A合成酶4,Lamin B为核纤层蛋白B,GAPDH是3-磷酸甘油醛脱氢酶;<sup>a</sup>与对照组比较, $P < 0.05$ ;<sup>b</sup>与LPS组比较, $P < 0.05$ ;<sup>c</sup>与LPS+鸢尾素组比较, $P < 0.05$

2.5 鸢尾素对铁死亡相关指标的影响:表 3 显示,LPS组MDA、ROS和Fe<sup>2+</sup>水平较对照组升高,GSH水平较对照组降低(均 $P < 0.05$ )。与LPS组比较,

LPS+鸢尾素组 MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup>水平降低, GSH 水平升高(均  $P < 0.05$ )。与 LPS+鸢尾素组比较, LPS+鸢尾素+ML385 组 MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup>水平升高, GSH 水平降低(均  $P < 0.05$ )。

表 3 各组小鼠肾脏组织中 MDA、ROS、Fe<sup>2+</sup> 和 GSH 表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	MDA (nmol/mg)	ROS (相对荧光强度)
对照组	15	5.37 ± 0.42	113.08 ± 20.73
LPS 组	9	15.65 ± 4.03 <sup>a</sup>	1 655.68 ± 405.71 <sup>a</sup>
LPS+鸢尾素组	13	9.35 ± 2.07 <sup>ab</sup>	584.26 ± 74.48 <sup>ab</sup>
LPS+鸢尾素+ML385 组	11	13.90 ± 1.62 <sup>abc</sup>	1 057.02 ± 139.95 <sup>abc</sup>
F 值		31.86	69.52
P 值		<0.001	<0.001

组别	动物数(只)	Fe <sup>2+</sup> (nmol/mg)	GSH (nmol/mg)
对照组	15	5.14 ± 1.41	107.63 ± 19.21
LPS 组	9	26.99 ± 7.95 <sup>a</sup>	43.13 ± 11.85 <sup>a</sup>
LPS+鸢尾素组	13	9.24 ± 3.82 <sup>ab</sup>	91.50 ± 7.99 <sup>ab</sup>
LPS+鸢尾素+ML385 组	11	19.79 ± 5.18 <sup>abc</sup>	53.57 ± 15.56 <sup>abc</sup>
F 值		36.41	43.27
P 值		<0.001	<0.001

注: LPS 为脂多糖, ML385 为核因子 E2 相关因子 2 抑制剂, MDA 为丙二醛, ROS 为活性氧, GSH 为还原型谷胱甘肽; <sup>a</sup> 与对照组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>b</sup> 与 LPS 组比较,  $P < 0.05$ ; <sup>c</sup> 与 LPS+鸢尾素组比较,  $P < 0.05$

### 3 讨论

本研究结果显示, 相较于对照组, LPS 组血清 SCr、BUN 及肾脏组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  含量均增加, 结合光镜下肾脏组织病理学改变及电镜下线粒体改变结果, 提示 SA-AKI 小鼠模型制备成功。与 LPS 组比较, LPS+鸢尾素组血清 SCr、BUN 及肾脏组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  含量降低, 肾脏组织病理学改变及线粒体损伤均减轻, 提示鸢尾素预处理可减轻 SA-AKI 小鼠的炎症反应及病理损伤。

铁死亡在形态学、遗传学、代谢和分子生物学等方面均不同于凋亡、自噬和坏死, 是一种铁依赖的非凋亡形式的细胞死亡方式, 其主要表现为膜脂过氧化、细胞亚铁聚集和抗氧化防御的丧失<sup>[15]</sup>。铁含量、脂质过氧化物水平以及铁死亡相关蛋白(ACSL4、GPX4)的表达是评估铁死亡的常用指标<sup>[16]</sup>。本研究结果显示, 与对照组比较, LPS 组小鼠肾脏组织中 MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup>水平升高, GSH 水平下降, GPX4 表达降低, 而 ACSL4 表达增加, 表明铁死亡参与了 SA-AKI 的致病过程。

鸢尾素是由哈佛大学 Boström 等<sup>[17]</sup>发现的一

种肌肉因子, 是一种含有 112 个氨基酸的多肽类激素, 相对分子质量 12 000, 由其前体 III 型纤维蛋白结构域结合蛋白 5 经剪切、修饰后形成, 广泛分布于血液、体液和全身各个组织器官并产生某种程度的保护作用。已有研究表明, 鸢尾素能够在多种器官损伤模型中发挥明确的保护作用, 且未观察到明显毒性反应<sup>[18]</sup>。研究表明, 鸢尾素可以减少 ROS 的产生, 改善线粒体功能, 并在多种疾病中提供器官保护作用, 包括阿尔茨海默病、胰腺炎和缺血再灌注损伤诱导的肠、肺、脑、心脏、肝损伤<sup>[19]</sup>。同时, 鸢尾素的抗炎、抗凋亡和抗氧化特性也受到了科学界的广泛关注。已有研究表明, 鸢尾素通过 Nrf2/GPX4 信号通路减轻 LPS 诱导的大鼠急性肺损伤<sup>[20]</sup>。鸢尾素通过激活 Nrf2/GPX4 信号通路来抑制铁死亡, 从而预防与改善脓毒症相关性脑病<sup>[21]</sup>。鸢尾素通过 Nrf2/HO-1 信号通路减轻铁死亡, 从而改善缺氧心肌细胞线粒体功能障碍<sup>[22]</sup>。Zhang 等<sup>[23]</sup>通过建立小鼠肾脏缺血再灌注损伤模型, 表明鸢尾素可通过上调 GPX4, 下调炎症反应, 改善线粒体功能, 降低内质网应激和氧化应激, 从而减轻肾缺血再灌注损伤。以上研究均表明鸢尾素可能通过 Nrf2/HO-1 信号通路抑制铁死亡, 为急性肾损伤提供新的治疗方向。

本研究显示, 与 LPS 组比较, LPS+鸢尾素组小鼠肾脏组织中 MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup>水平下降, GSH 水平上升, GPX4 表达增加, 而 ACSL4 表达下降, 肾脏组织病理改变及线粒体功能损害均减轻, 提示鸢尾素预处理可能通过抑制铁死亡减轻 SA-AKI; 而经 Nrf2 抑制剂 ML385 处理后, MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup>水平上升, GSH 水平下降, GPX4 表达下降, 而 ACSL4 表达上升, 表明抑制 Nrf2/HO-1 通路活性可能部分逆转鸢尾素预处理产生的肾脏保护效应以及铁死亡抑制效应, 提示鸢尾素对 SA-AKI 的保护作用可能至少有一部分与激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制铁死亡有关。

本研究的不足之处: ① 本研究采用在 LPS 注射前 30 min 给予鸢尾素的预处理方案, 虽然为鸢尾素的保护作用提供了部分证据, 但面临临床转化困难的挑战, 同时未验证鸢尾素不同干预方式、剂量的影响。有研究表明鸢尾素预处理 72 h 可以改善脓毒症引起的心脏功能障碍<sup>[24]</sup>, 亦有研究表明鸢尾素后处理可改善脓毒症肝损伤<sup>[12]</sup>。② 本研究只在各组制模后 24 h 进行了指标对比, 原因在于本课题

组前期研究已发现建立 SA-AKI 模型后 24 h 小鼠出现明显肾脏病理性损伤<sup>[25]</sup>,而本研究未进行 48 h 甚至更长时间的观察。目前已有研究表明,制模后 72 h 鸢尾素可以改善脓毒症相关性脑病<sup>[21]</sup>。后续可进一步验证鸢尾素不同干预方式、时间及剂量关系,探讨其对脓毒症各器官功能的保护作用机制,进一步挖掘鸢尾素改善脓毒症相关器官损害的潜力,推动其走向临床转化。

综上所述,本研究中通过脓毒症小鼠模型探讨了 SA-AKI 的铁死亡现象,鸢尾素预处理后从炎症指标、肾脏损伤指标、肾脏病理学改变、铁死亡的线粒体形态及相关通路蛋白表达、铁死亡标志物水平等多个层面说明了 SA-AKI 中存在铁死亡,也初步证明了鸢尾素可能部分通过调控 Nrf2/HO-1 通路、抑制铁死亡,从而在 SA-AKI 中发挥肾脏保护作用,鸢尾素可能为脓毒症导致的器官功能保护治疗提供新的方向。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 王博青: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析、获取研究经费;唐源: 实施研究、采集数据、起草文章、统计分析;王毅: 分析/解释数据,对文章的知识性内容作批评性审阅,行政、技术或材料支持;于湘友: 酝酿和设计实验,对文章的知识性内容作批评性审阅,行政、技术或材料支持,指导

## 参考文献

[1] Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021[J]. *Intensive Care Med*, 2021, 47(11): 1181-1247. DOI: 10.1007/s00134-021-06506-y.

[2] Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study[J]. *Lancet*, 2020, 395(10219): 200-211. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.

[3] CHinese Epidemiological Study of Sepsis (CHESS) Study Investigators. The epidemiology of sepsis in Chinese ICUs: a national cross-sectional survey[J]. *Crit Care Med*, 2020, 48(3): e209-e218. DOI: 10.1097/CCM.0000000000004155.

[4] 张阳,何繁漪,孙孔春,等.铁死亡在急性肾损伤中的分子机制及治疗靶点研究进展[J]. *器官移植*, 2025, 16(2): 315-321. DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2024304.

[5] Hong MK, Hu LL, Zhang YX, et al. 6-Gingerol ameliorates sepsis-induced liver injury through the Nrf2 pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106196. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106196.

[6] Dai CS, Li B, Zhou Y, et al. Curcumin attenuates quinocetone induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF- $\kappa$ B pathway in human hepatocyte L02 cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2016, 95: 52-63. DOI: 10.1016/j.fct.2016.06.025.

[7] 王敬杰,任彤,高子翔,等. SIRT1 调控 Nrf2/HO-1 信号通路在脓毒症急性肾损伤中的作用机制[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2025, 39(9): 796-803. DOI: 10.13507/j.issn.1674-3474.2025.09.005.

[8] 陈梦晓,张怡人,王毅,等. SIRT1 调控 Nrf2/HO-1 信号通

路在脓毒症肝损伤中的作用及其机制研究[J]. *中华危重病急救医学*, 2023, 35(6): 598-603. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220815-00744.

- [9] 孙饶,周金瑶,焦阳,等. 非瑟酮通过 Nrf2/HO-1/GPX4 通路抑制神经元铁死亡减轻脓毒症相关性脑损伤[J]. *中华危重病急救医学*, 2025, 37(5): 452-457. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20241231-01080.
- [10] Huang Y, Wu HG, Hu YM, et al. Puerarin attenuates oxidative stress and ferroptosis via AMPK/PGC1 $\alpha$ /Nrf2 pathway after subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(7): 1259. DOI: 10.3390/antiox11071259.
- [11] Bao JF, She QY, Hu PP, et al. Irisin, a fascinating field in our times[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2022, 33(9): 601-613. DOI: 10.1016/j.tem.2022.06.003.
- [12] Wei SS, Bi JB, Yang LF, et al. Serum irisin levels are decreased in patients with sepsis, and exogenous irisin suppresses ferroptosis in the liver of septic mice[J]. *Clin Transl Med*, 2020, 10(5): e173. DOI: 10.1002/ctm2.173.
- [13] Wang Z, Chen K, Han Y, et al. Irisin protects heart against ischemia-reperfusion injury through a SOD2-dependent mitochondria mechanism[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2018, 72(6): 259-269. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000608.
- [14] Jin SZ, Zhu TT, Deng SX, et al. Dioscin ameliorates cisplatin-induced intestinal toxicity by mitigating oxidative stress and inflammation[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 111: 109111. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.109111.
- [15] Wang F, He JY, Xing RX, et al. Molecular mechanisms of ferroptosis and their role in inflammation[J]. *Int Rev Immunol*, 2023, 42(1): 71-81. DOI: 10.1080/08830185.2021.2016739.
- [16] Jiang XJ, Stockwell BR, Conrad M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266-282. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.
- [17] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- $\alpha$ -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis[J]. *Nature*, 2012, 481(7382): 463-468. DOI: 10.1038/nature10777.
- [18] Ciałowicz M, Woźniowski M, Murawska-Ciałowicz E, et al. The influence of irisin on selected organs. The liver, kidneys, and lungs: the role of physical exercise[J]. *Cells*, 2025, 14 (16): 1228. DOI: 10.3390/cells14161228.
- [19] Ren YF, Zhang J, Wang MZ, et al. Identification of irisin as a therapeutic agent that inhibits oxidative stress and fibrosis in a murine model of chronic pancreatitis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 126: 110101. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110101.
- [20] 罗晶,彭君,张静,等. 鸢尾素通过 Nrf2/GPX4 信号通路减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤的作用机制[J]. *医学新知*, 2023, 33(2): 83-90. DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202209046.
- [21] Wang J, Zhu Q, Wang Y, et al. Irisin protects against sepsis-associated encephalopathy by suppressing ferroptosis via activation of the Nrf2/GPX4 signal axis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2022, 187: 171-184. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.05.023. Erratum in: *Free Radic Biol Med*, 2022, 193(Pt 2): 676. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.11.024.
- [22] Cao GY, Yang C, Jin ZT, et al. FNDC5/irisin reduces ferroptosis and improves mitochondrial dysfunction in hypoxic cardiomyocytes by Nrf2/HO-1 axis[J]. *Cell Biol Int*, 2022, 46(5): 723-736. DOI: 10.1002/cbin.11763.
- [23] Zhang J, Bi JB, Ren YF, et al. Involvement of GPX4 in irisin's protection against ischemia reperfusion-induced acute kidney injury[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(2): 931-945. DOI: 10.1002/jcp.29903.
- [24] Xiong X, Lu LH, Wang ZY, et al. Irisin attenuates sepsis-induced cardiac dysfunction by attenuating inflammation-induced pyroptosis through a mitochondrial ubiquitin ligase-dependent mechanism[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 152: 113199. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113199.
- [25] 王博青,李岩,杨健,等. 基于 PI3K/AKT/Bax 通路探讨丁酸钠改善脓毒症急性肾损伤的实验研究[J]. *医学分子生物学杂志*, 2025, 22(5): 469-475. DOI: 10.3870/j.issn.1672-8009.2025.05.008.

(收稿日期: 2025-09-23)

(本文编辑: 保健媛 张耘菲)