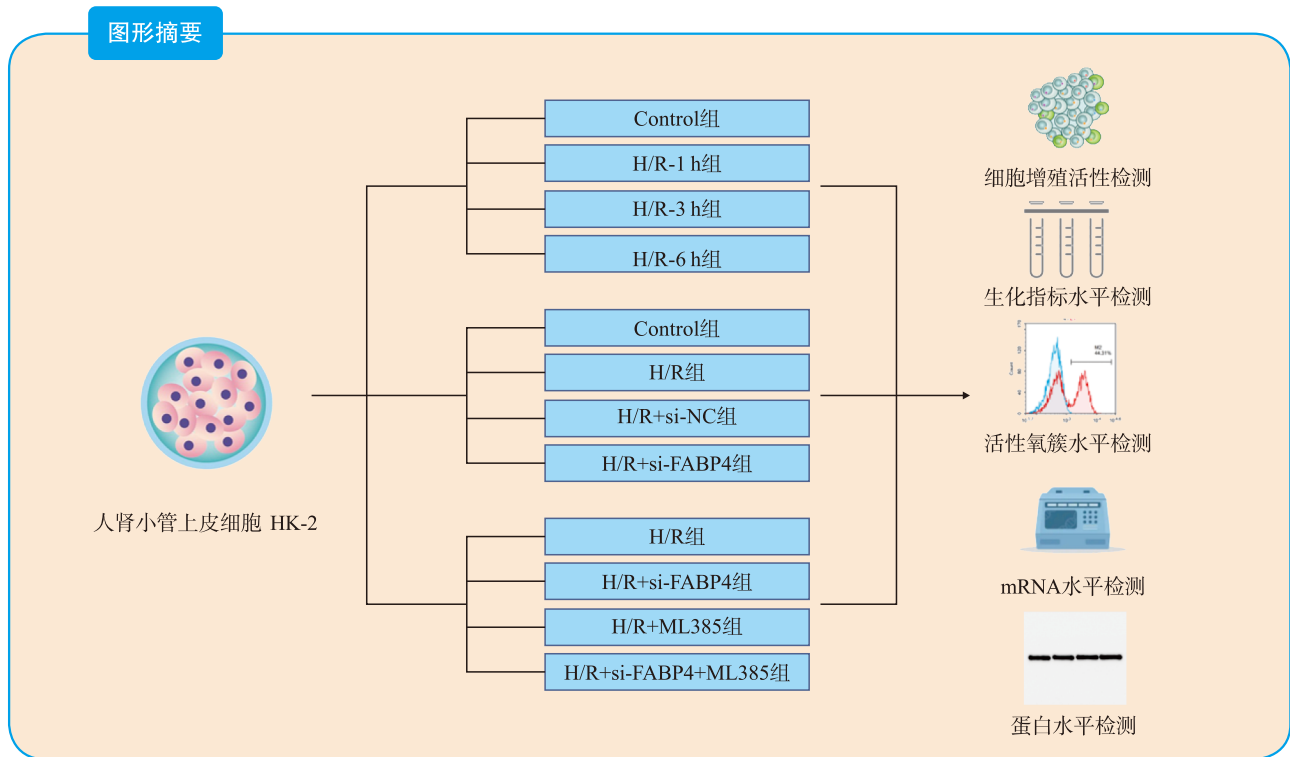


· 论著 ·

# 沉默 FABP4 通过调节 Nrf2/GPX4 轴减轻缺氧/复氧诱导的肾小管上皮细胞铁死亡

白冰 谭州科 石彬 蒲涛 杨亦彬



**【摘要】** **目的** 探讨脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4) 对缺氧/复氧 (H/R) 处理的人肾小管上皮细胞 (HK-2) 铁死亡的影响及作用机制。**方法** 体外培养 HK-2 细胞, 经缺氧处理 24 h 后再复氧不同时间 (1、3、6 h), 实时荧光定量聚合酶链反应和蛋白质印迹法检测各时间点 HK-2 细胞中脂肪酸结合蛋白 4 (FABP4) 信使 RNA (mRNA) 和蛋白水平。采用小干扰 RNA 技术沉默 HK-2 细胞中 FABP4 基因表达, 再进行 H/R (缺氧 24 h 复氧 6 h) 处理, 或联合 Nrf2 抑制剂 ML385 处理。采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 检测各组细胞增殖活性, 酶联免疫吸附试验检测乳酸脱氢酶 (LDH) 水平, 生化法检测丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 和亚铁离子 ( $Fe^{2+}$ ) 水平, 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸钠酯荧光探针法检测活性氧簇 (ROS) 水平, 蛋白质印迹法检测 FABP4、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶-1 (HO-1)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 和溶质载体家族 7 成员

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2025141

基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金项目 (82360154); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础-ZK[2023]一般 568); 遵义市科技与大数据项目 [遵市科合 HZ 字 (2022) 358 号]

作者单位: 563000 贵州遵义, 遵义医科大学附属医院肾内科 (白冰、蒲涛、杨亦彬), 肾移植科 (谭州科), 检验科 (石彬)

作者简介: 白冰 (ORCID 0009-0007-5863-3184), 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为肾脏病, Email: 262936801@qq.com

通信作者: 杨亦彬 (ORCID 0009-0008-8277-7863), 博士, 主任医师, 研究方向为肾脏病, Email: bb12124@163.com

11 (SLC7A11) 蛋白表达水平。结果 随着复氧时间的延长, HK-2 细胞中 FABP4 mRNA 和蛋白水平均升高 (均为  $P<0.05$ )。H/R 处理可降低细胞增殖活性, 升高细胞上清液中 LDH 水平, 同时升高 HK-2 细胞中 MDA、 $Fe^{2+}$  及 ROS 水平, 降低 GSH 水平, 降低 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平 (均为  $P<0.05$ )。沉默 FABP4 可升高 H/R 处理的 HK-2 细胞增殖活性 ( $P<0.05$ ), 降低细胞中 MDA、 $Fe^{2+}$  及 ROS 水平, 升高 GSH 水平, 同时升高 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平 (均为  $P<0.05$ )。而联合 ML385 处理后可逆转 FABP4 基因沉默对 H/R 处理的 HK-2 细胞铁死亡的改善作用。结论 沉默 FABP4 可减轻 H/R 诱导的 HK-2 细胞铁死亡, 其机制可能与激活 Nrf2/GPX4 轴有关。

【关键词】 脂肪酸结合蛋白 4; 核因子 E2 相关因子 2/谷胱甘肽过氧化物酶 4 轴; 缺氧/复氧; 肾小管上皮细胞; 铁死亡; 细胞增殖活性; 活性氧簇; 急性肾损伤

【中图分类号】 R617, R692 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2025) 05-0006-10

**Silencing FABP4 alleviated ferroptosis of renal tubular epithelial cells induced by hypoxia/reoxygenation through regulating Nrf2/GPX4 axis** Bai Bing\*, Tan Zhouke, Shi Bin, Pu Tao, Yang Yibin. \*Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000, China

Corresponding author: Yang Yibin, Email: bb12124@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects and mechanisms of fatty acid binding protein 4 (FABP4) on ferroptosis in human renal tubular epithelial cells (HK-2) treated with hypoxia/reoxygenation (H/R). **Methods** HK-2 cells were cultured *in vitro* and subjected to hypoxia for 24 hours followed by reoxygenation for different durations (1, 3, 6 h). The messenger RNA (mRNA) and protein levels of FABP4 in HK-2 cells were detected at each time point using real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction and Western blotting. Small interfering RNA (siRNA) technology was used to silence the expression of FABP4 gene in HK-2 cells, which were then treated with H/R (24 h of hypoxia and 6 h of reoxygenation) or treated with the Nrf2 inhibitor ML385. Cell proliferation activity was assessed using cell counting kit-8 (CCK-8). Lactate dehydrogenase (LDH) levels were measured by enzyme-linked immune absorbent assay. Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and ferrous ion ( $Fe^{2+}$ ) levels were determined by biochemical technology. Reactive oxygen species (ROS) levels were detected using the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate fluorescence probe. Protein expression levels of FABP4, nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), glutathione peroxidase 4 (GPX4) and solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) were measured by Western blotting. **Results** The mRNA and protein levels of FABP4 in HK-2 cells increased with prolonged reoxygenation time (all  $P<0.05$ ). H/R treatment reduced cell proliferation activity, increased LDH levels in the cell supernatant, and elevated MDA,  $Fe^{2+}$  and ROS levels in HK-2 cells while decreasing GSH levels and the protein levels of Nrf2, HO-1, GPX4 and SLC7A11 (all  $P<0.05$ ). Silencing FABP4 enhanced the proliferation activity of H/R-treated HK-2 cells ( $P<0.05$ ), reduced MDA,  $Fe^{2+}$  and ROS levels, increased GSH levels, and elevated the protein levels of Nrf2, HO-1, GPX4 and SLC7A11 (all  $P<0.05$ ). However, these beneficial effects of FABP4 silencing on H/R-induced ferroptosis in HK-2 cells were reversed by co-treatment with ML385. **Conclusions** Silencing FABP4 alleviated H/R-induced ferroptosis in HK-2 cells, possibly by activating the Nrf2/GPX4 axis.

【Key words】 Fatty acid binding protein 4; Nuclear factor E2-related factor 2/glutathione peroxidase 4 axis; Hypoxia/reoxygenation; Renal tubular epithelial cell; Ferroptosis; Cell proliferation activity; Reactive oxygen species; Acute kidney injury

肾脏缺血-再灌注损伤 (renal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是肾移植临床中常见的并发症之一, 易引发急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI), 导致移植肾功能及存活率下降, 严重影响受者预后<sup>[1-2]</sup>。目前, 针对 RIRI 的治疗选择仍是世界性公共卫生问题之一, 亟需开发更为有效的治疗策略, 以减轻肾组

织损伤并改善肾功能。RIRI 的重要病理特征表现为肾小管上皮细胞坏死和脱落<sup>[3]</sup>。铁死亡是近年研究较多的一种可调控性细胞死亡类型, 研究证实抑制铁死亡可显著改善人肾小管上皮细胞的病理损伤<sup>[4-5]</sup>。在缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 诱导的 AKI 小鼠模型中, 通过提高铁死亡关键调控因子谷胱甘肽

过氧化酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 的表达水平,能有效缓解小鼠肾组织病理损伤及功能障碍<sup>[6]</sup>。因此,靶向调控铁死亡或成为治疗 RIRI 的有效途径。脂肪酸结合蛋白 4 (fatty acid binding protein 4, FABP4) 是一种新发现的细胞内脂肪酸转运蛋白,参与脂肪酸的摄取、储存和代谢,影响细胞能量平衡。FABP4 被认为是多种疾病中铁死亡的关键调节剂, Fan 等<sup>[7]</sup> 研究发现,抑制 FABP4 表达可以通过调节过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  介导的铁死亡来减轻糖尿病视网膜病变中的脂质过氧化和氧化应激。Chen 等<sup>[8]</sup> 根据活组织检查结果分析得出, FABP4 在糖尿病肾病患者肾小管和肾小球中表达上调,且对高糖诱导的人肾小管上皮细胞 (HK-2) 模型采用 FABP4 抑制剂 BMS309403 干预后, HK-2 细胞内活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 和铁离子水平降低,铁死亡进程被抑制。由此推测, FABP4 可能通过调控细胞铁死亡参与 RIRI 的病理过程。因此,本研究拟建立 RIRI 体外细胞模型,采用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 技术沉默 FABP4 基因的表达,探讨 FABP4 基因沉默对缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 暴露下 HK-2 细胞铁死亡的影响及可能作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料与试剂

HK-2 细胞购自中国典型培养物保藏中心细胞库。FABP4 siRNA 干扰质粒 (si-FABP4) 及阴性对照质粒 (si-NC) 均购自汉恒生物科技 (上海) 有限公司; Opti-MEM 培养基和 Lipofectamine™ 3000 转染试剂均购自美国 Thermo Scientific 公司; 细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA) 试剂盒购自武汉灵思生物技术有限公司; 逆转录试剂盒购自上海翌圣生物科技股份有限公司; 2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯 (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 购自美国 MedChemExpress 有限公司; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、亚铁离子 ( $\text{Fe}^{2+}$ ) 检测试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司; FABP4、核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2-related factor 2,

Nrf2)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1)、GPX4、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体均购自英国 abcam 公司。本研究经遵义医科大学附属医院伦理委员会审批,符合免除伦理审查要求。

### 1.2 实验方法

1.2.1 H/R 模型建立 待细胞融合率达到 80% 左右时更换为无血清培养基,置于缺氧条件下 (94%  $\text{N}_2$ 、5%  $\text{CO}_2$  和 1%  $\text{O}_2$ ) 培养 24 h<sup>[9]</sup>,然后更换新鲜完全培养基并置于常规培养箱中复氧培养 6 h。

1.2.2 实验分组 (1) 将对数生长期 HK-2 细胞分为 Control 组 (正常条件培养)、H/R-1 h 组 (缺氧 24 h 复氧 1 h)、H/R-3 h 组 (缺氧 24 h 复氧 3 h)、H/R-6 h 组 (缺氧 24 h 复氧 6 h); (2) 将对数生长期 HK-2 细胞分为 Control 组 (正常条件培养)、H/R 组 (缺氧 24 h 复氧 6 h)、H/R+si-NC 组 (将 si-NC 转染至 HK-2 细胞后进行 H/R 处理)、H/R+si-FABP4 组 (将 si-FABP4 转染至 HK-2 细胞后进行 H/R 处理); (3) 将对数生长期 HK-2 细胞分为 H/R 组 (缺氧 24 h 复氧 6 h)、H/R+si-FABP4 组 (将 si-FABP4 转染至 HK-2 细胞后进行 H/R 处理)、H/R+Nrf2 抑制剂 (ML385) 组 (H/R 处理,开始复氧培养时加入 5  $\mu\text{mol/L}$  ML385 进行共孵育)、H/R+si-FABP4+ML385 组 (将 si-FABP4 转染至 HK-2 细胞后进行 H/R 处理,开始复氧培养时加入 5  $\mu\text{mol/L}$  ML385 进行共孵育)<sup>[10-11]</sup>。

1.2.3 细胞培养与转染 HK-2 细胞培养于含有 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基/F12 培养基中,培养条件为 5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^{\circ}\text{C}$ 。细胞融合率达到约 80% 时,按 1:2 进行传代,取对数生长期细胞用于后续实验。转染前,将 HK-2 细胞按每孔  $5 \times 10^5$  个细胞的密度接种至 6 孔板,按照说明书将 si-FABP4、si-NC 与 Lipofectamine™ 3000 分别加入到 250  $\mu\text{L}$  Opti-MEM 培养基中,等体积混合后室温孵育 15 min,加入至含 1.5 mL 无血清培养基的孔中,培养 8 h 后更换新鲜培养基,继续培养 48 h,通过实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 或蛋白质印迹法验证转染效率。

1.2.4 CCK-8 检测细胞增殖活性 收集细胞接种至 96 孔板中,每组 3 个复孔,设置空白对照组。培养

过夜后按照实验需求分组处理, 处理结束时每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂, 孵育 1 h 后在酶标仪上检测 450 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值, 计算各组细胞增殖活性。细胞增殖活性 =  $(A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}}) \times 100\%$ 。

1.2.5 ELISA 检测细胞上清液 LDH 收集各组细胞培养液, 离心后取上清。设置空白对照孔, 按照试剂盒说明书进行操作, 检测各组细胞上清液中 LDH 水平。

1.2.6 生化法检测细胞 MDA、GSH、 $\text{Fe}^{2+}$  收集各组细胞, 超声破碎后离心, 取上清液置于冰上, 按照试剂盒说明书进行操作, 检测各组细胞中 MDA、GSH、 $\text{Fe}^{2+}$  水平。

1.2.7 DCFH-DA 荧光探针法检测细胞 ROS 收集细胞接种至 12 孔板中, 处理结束后离心收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次。加入 DCFH-DA 染料工作液 (终浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ), 培养箱避光孵育 20 min, 离心弃上清, 用 PBS 洗涤 2 次后重悬细胞, 使用流式细胞仪检测细胞中 ROS 水平。

1.2.8 RT-qPCR 检测细胞 FABP4 信使 RNA 水平 收集各组细胞, 加入 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 采用逆转录试剂盒将总 RNA 逆转录合成 cDNA。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算各组细胞中 FABP4 信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 表达水平。引物序列: FABP4 上游引物 5'-CGCAGACGACAGGAAGGTGA-3', 下游引物 5'-TCCACCACCAGCTTGTCACC-3'; GAPDH 上游引物 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3', 下游引物 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'。

1.2.9 蛋白质印迹法检测细胞中 FABP4、Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 表达水平 收集各组细胞, 裂解提取总蛋白, 测定蛋白浓度后进行电泳。电泳结束后移膜, 室温封闭 2 h, 之后置于一抗 (FABP4、Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11、GAPDH 抗体均 1:1000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。洗膜后二抗室温孵育 1 h。洗膜后滴加化学发光试剂显影曝光, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内参, 计算蛋白表达水平。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 及 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料采用均数 $\pm$ 标准差表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析法, 两组间数据比较采用 LSD- $t$  法,  $P < 0.05$  为差异有统计

学意义。

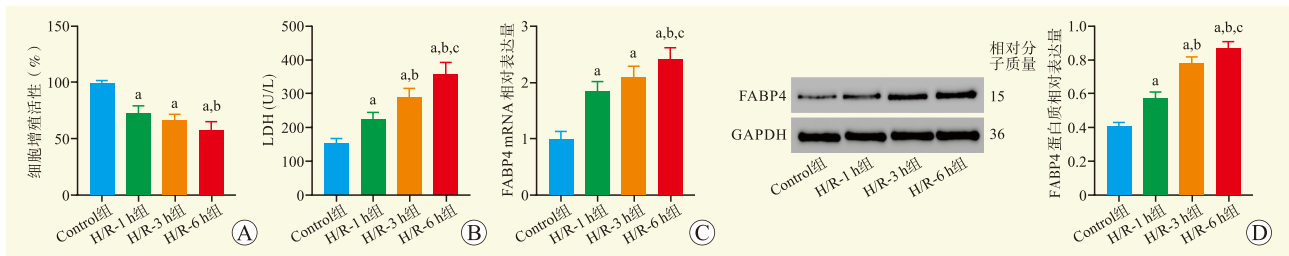
## 2 结果

### 2.1 FABP4 在 H/R 处理的 HK-2 细胞中表达上升

随着复氧时间的延长, 与 Control 组比较, H/R-1 h 组、H/R-3 h 组和 H/R-6 h 组细胞增殖活性均降低 (均为  $P < 0.05$ ); 与 H/R-1 h 组比较, H/R-3 h 组细胞增殖活性降低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), H/R-6 h 组细胞增殖活性降低 ( $P < 0.05$ ); 与 H/R-3 h 组比较, H/R-6 h 组细胞增殖活性降低, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1A)。与 Control 组比较, H/R-1 h 组、H/R-3 h 组和 H/R-6 h 组细胞上清液中 LDH 水平均升高 (均为  $P < 0.05$ ); 与 H/R-1 h 组比较, H/R-3 h 组和 H/R-6 h 组细胞上清液中 LDH 水平均升高 (均为  $P < 0.05$ ); 与 H/R-3 h 组比较, H/R-6 h 组细胞上清液中 LDH 水平升高 ( $P < 0.05$ , 图 1B)。与 Control 组比较, H/R-1 h 组、H/R-3 h 组和 H/R-6 h 组细胞 FABP4 mRNA 水平均升高 (均为  $P < 0.05$ ); 与 H/R-1 h 组比较, H/R-3 h 组细胞 FABP4 mRNA 水平升高, 但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), H/R-6 h 组细胞 FABP4 mRNA 水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 H/R-3 h 组比较, H/R-6 h 组细胞 FABP4 mRNA 水平升高 ( $P < 0.05$ , 图 1C)。与 Control 组比较, H/R-1 h 组、H/R-3 h 组和 H/R-6 h 组细胞 FABP4 蛋白水平均升高 (均为  $P < 0.05$ ); 与 H/R-1 h 组比较, H/R-3 h 组和 H/R-6 h 组细胞 FABP4 蛋白水平均升高 (均为  $P < 0.05$ ); 与 H/R-3 h 组比较, H/R-6 h 组细胞 FABP4 蛋白水平升高 ( $P < 0.05$ , 图 1D)。

### 2.2 H/R 处理可诱导 HK-2 细胞铁死亡并抑制 Nrf2/GPX4 信号通路

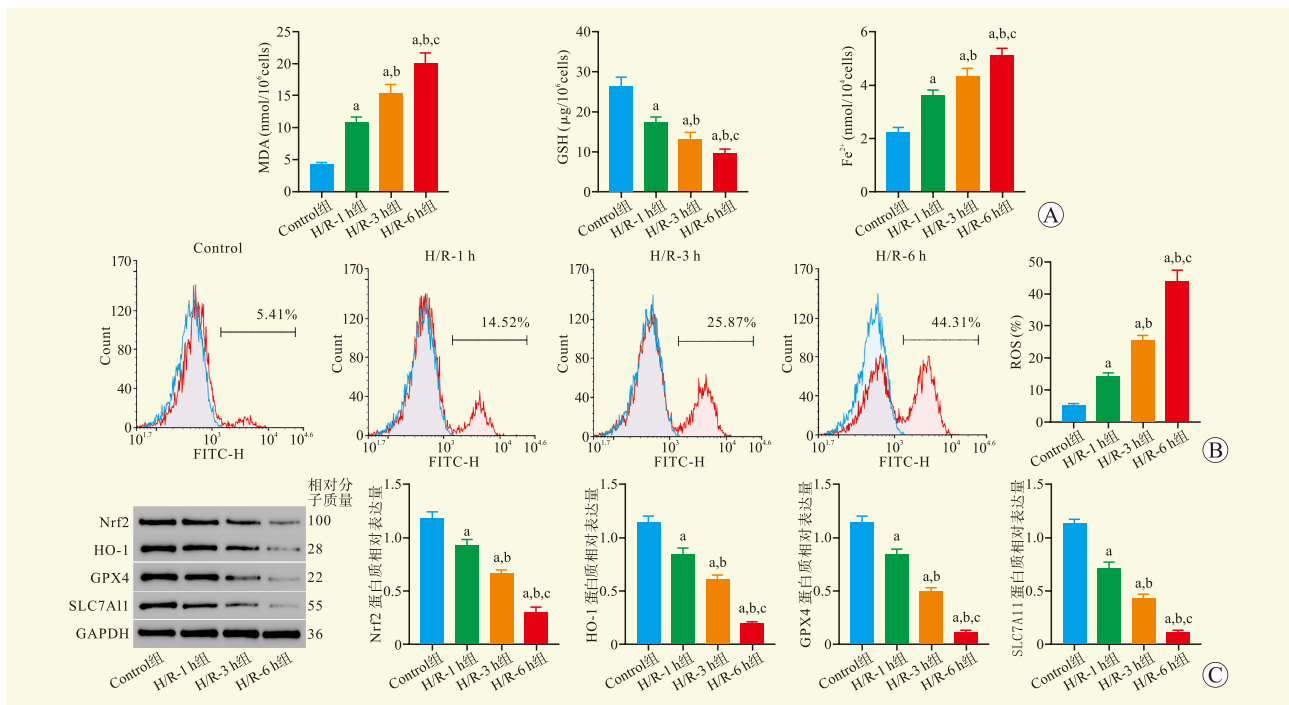
随着复氧时间的延长, 与 Control 组比较, H/R-1 h 组、H/R-3 h 组和 H/R-6 h 组细胞中 MDA、 $\text{Fe}^{2+}$  和 ROS 水平均升高, GSH 水平则降低 (均为  $P < 0.05$ , 图 2A、B); 与 H/R-1 h 组比较, H/R-3 h 组和 H/R-6 h 组细胞中 MDA、 $\text{Fe}^{2+}$  和 ROS 水平均升高, GSH 水平则降低 (均为  $P < 0.05$ ); 与 H/R-3 h 组比较, H/R-6 h 组细胞中 MDA、 $\text{Fe}^{2+}$  和 ROS 水平均升高, GSH 水平则降低 ( $P < 0.05$ )。与 Control 组比较, H/R-1 h 组、H/R-3 h 组和 H/R-6 h 组细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平均降低 (均为  $P < 0.05$ , 图 2C); 与 H/R-1 h 组比较, H/R-3 h 组和 H/R-6 h



注：A 图为各组细胞增殖活性；B 图为各组细胞上清液 LDH 水平；C 图为各组细胞 FABP4 mRNA 表达水平；D 图为蛋白质印迹法检测各组细胞 FABP4 蛋白的表达水平及其量化结果。与 Control 组比较，<sup>a</sup> $P<0.05$ ；与 H/R-1 h 组比较，<sup>b</sup> $P<0.05$ ；与 H/R-3 h 组比较，<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

图 1 H/R 处理对 HK-2 细胞的影响及 FABP4 的表达

Figure 1 The effect of H/R treatment on HK-2 cell and the expression of FABP4



注：A 图为各组细胞 MDA、GSH 和 Fe<sup>2+</sup>水平；B 图为各组细胞 ROS 水平；C 图为蛋白质印迹法检测各组细胞 Nrf2/GPX4 通路相关蛋白的表达水平及其量化结果。与 Control 组比较，<sup>a</sup> $P<0.05$ ；与 H/R-1 h 组比较，<sup>b</sup> $P<0.05$ ；与 H/R-3 h 组比较，<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

图 2 H/R 处理的 HK-2 细胞铁死亡相关指标及 Nrf2/GPX4 信号通路的检测

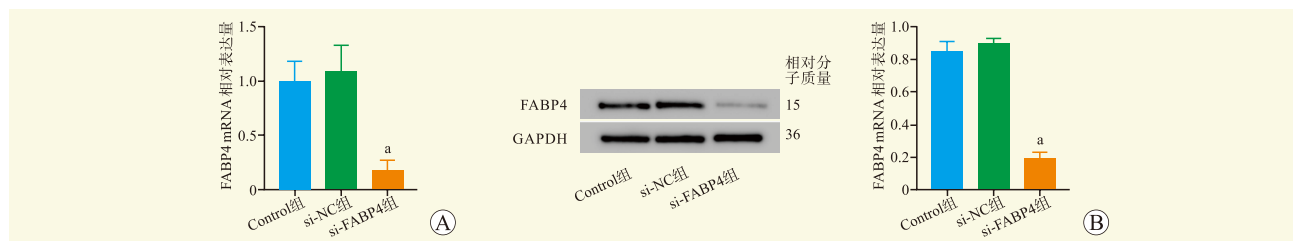
Figure 2 Detection of ferroptosis related indicators and the Nrf2/GPX4 signaling pathway in HK-2 cell treated with H/R

组细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平均降低（均为  $P<0.05$ ）；与 H/R-3 h 组比较，H/R-6 h 组细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平均降低（均为  $P<0.05$ ）。

### 2.3 沉默 FABP4 可抑制 H/R 处理的 HK-2 细胞铁死亡

与 Control 组比较，si-FABP4 组 HK-2 细胞 FABP4 mRNA 和蛋白水平均降低（均为  $P<0.05$ ，图 3），而 si-NC 组差异均无统计学意义（ $P>0.05$ ），提示干扰质粒转染成功。

与 Control 组比较，H/R 组 HK-2 细胞增殖活性降低（ $P<0.05$ ，图 4A），细胞中 ROS、MDA 和 Fe<sup>2+</sup>水平均升高，GSH 水平降低（均为  $P<0.05$ ，图 4B、C），而 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平均降低，FABP4 蛋白水平升高（均为  $P<0.05$ ，图 4D）；与 H/R 组比较，H/R+si-FABP4 组 HK-2 细胞增殖活性升高（ $P<0.05$ ），细胞中 ROS、MDA 和 Fe<sup>2+</sup>水平均降低，GSH 水平升高（均为  $P<0.05$ ），而 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平均升高，FABP4



注：A 图为各组细胞 FABP4 mRNA 表达水平；B 图为蛋白质印迹法检测各组细胞 FABP4 蛋白的表达水平及其量化结果。与 Control 组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 FABP4 干扰质粒转染效率的验证

Figure 3 Validation of the transfection efficiency of FABP4 interference plasmid

蛋白水平降低（均为  $P < 0.05$ ），而 H/R+si-NC 组差异均无统计学意义（均为  $P > 0.05$ ）。

#### 2.4 阻断 Nrf2/GPX4 轴可逆转 FABP4 沉默对 H/R 诱导 HK-2 细胞铁死亡的改善作用

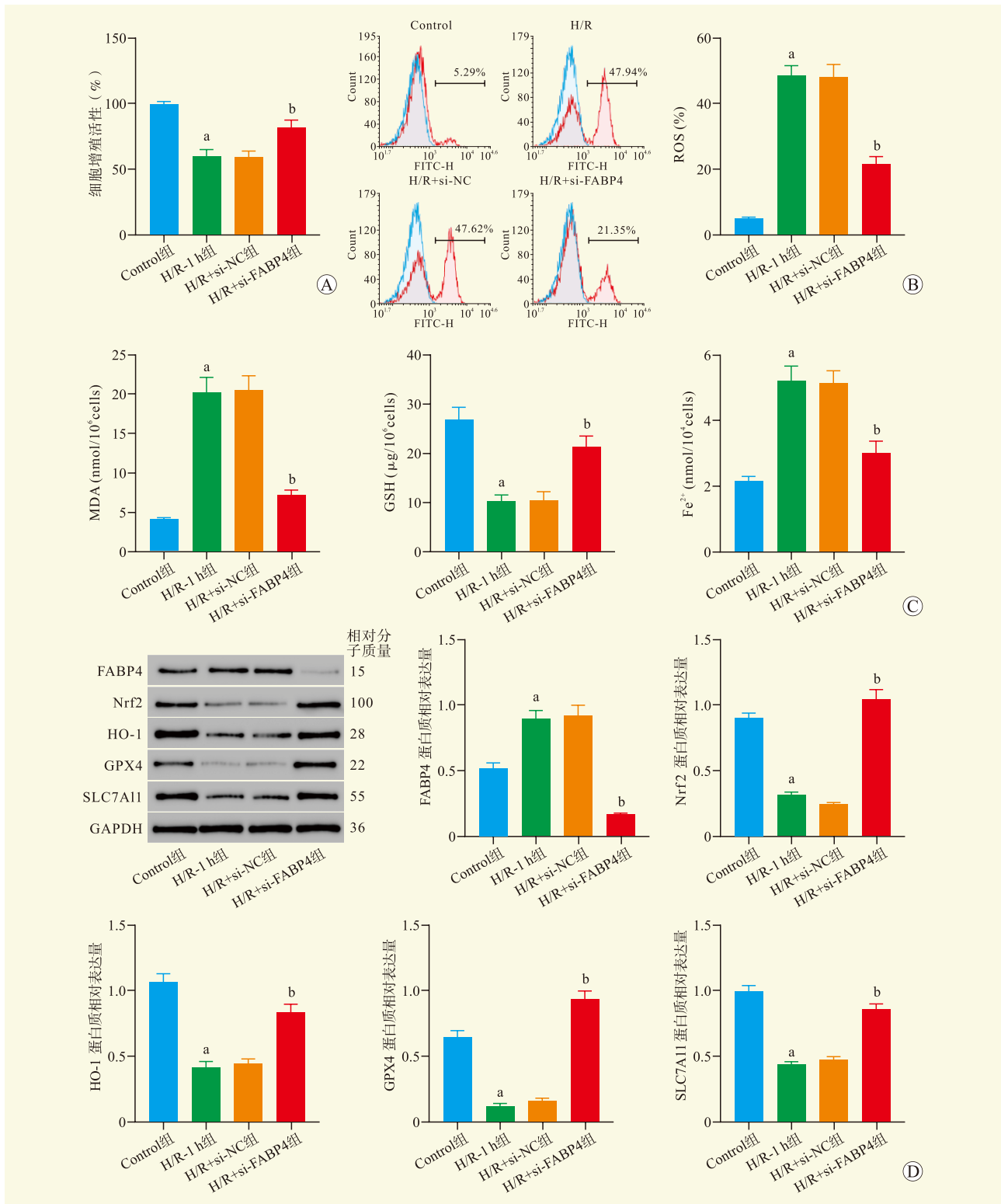
与 H/R 组比较，H/R+si-FABP4 组 HK-2 细胞中 MDA、 $Fe^{2+}$  和 ROS 水平均降低（均为  $P < 0.05$ ），细胞增殖活性和 GSH 水平均升高（均为  $P < 0.05$ ），细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平均升高（均为  $P < 0.05$ ），而 H/R+ML385 组 HK-2 细胞中 MDA、 $Fe^{2+}$  和 ROS 水平均升高，细胞增殖活性和 GSH 水平均降低，细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平均降低（均为  $P < 0.05$ ）；与 H/R+si-FABP4 组比较，H/R+si-FABP4+ML385 组 HK-2 细胞中 MDA、 $Fe^{2+}$  和 ROS 水平均升高，细胞增殖活性和 GSH 水平均降低，细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4、SLC7A11 蛋白水平均降低（均为  $P < 0.05$ ，图 5A~D）。

### 3 讨论

在 RIRI 发生的病理过程中，流向肾脏的血流量突然减少甚至完全中断，当血流恢复后，损伤程度进一步加剧，并可能发展为包括 AKI 在内的严重肾病<sup>[12]</sup>。RIRI 是诱发 AKI 最常见的原因，在心脏、主动脉或移植等大型手术后 AKI 的发生率和病死率较高<sup>[13]</sup>。RIRI 的具体发生机制尚未完全明确，现有研究表明，细胞死亡、氧化应激、内质网应激和线粒体功能障碍均是 RIRI 关键的分子病理机制。FABP4 是一种在巨噬细胞和脂肪细胞中高表达的脂质结合伴侣，参与调节葡萄糖和脂质稳态、炎症反应及 ROS 产生<sup>[14]</sup>。Hu 等<sup>[15]</sup> 提出 FABP4 是一种缺氧诱导基因，体内研究发现 FABP4 抑制剂可以有效减轻肝脏 IRI，提示 FABP4 可能作为治疗相关疾病的潜在靶

点。在氧糖剥夺/再灌注诱导的大鼠肾上腺髓质嗜铬瘤分化细胞 PC-12 模型中同样检测到 FABP4 高表达的现象，且沉默 FABP4 后炎症因子及 ROS 等氧化应激相关指标水平均下降，表明 FABP4 siRNA 能够通过缓解氧化应激减少细胞凋亡<sup>[16]</sup>。Shi 等<sup>[17]</sup> 研究表明，I/R 诱导的 AKI 小鼠的肾小管细胞中 FABP4 表达显著增加，使用 FABP4 抑制剂 BMS309403 后可有效抑制内质网应激导致的细胞凋亡，表明选择性抑制 FABP4 可能是 AKI 的潜在治疗方法，但治疗过程是否涉及其他机制尚不明确。本研究采用 H/R 处理 HK-2 细胞后发现，随着复氧时间的延长，HK-2 细胞中 FABP4 蛋白水平升高，细胞增殖活性降低，LDH 水平上升，表明 FABP4 异常表达可能促进 H/R 条件下 HK-2 细胞受损与死亡。

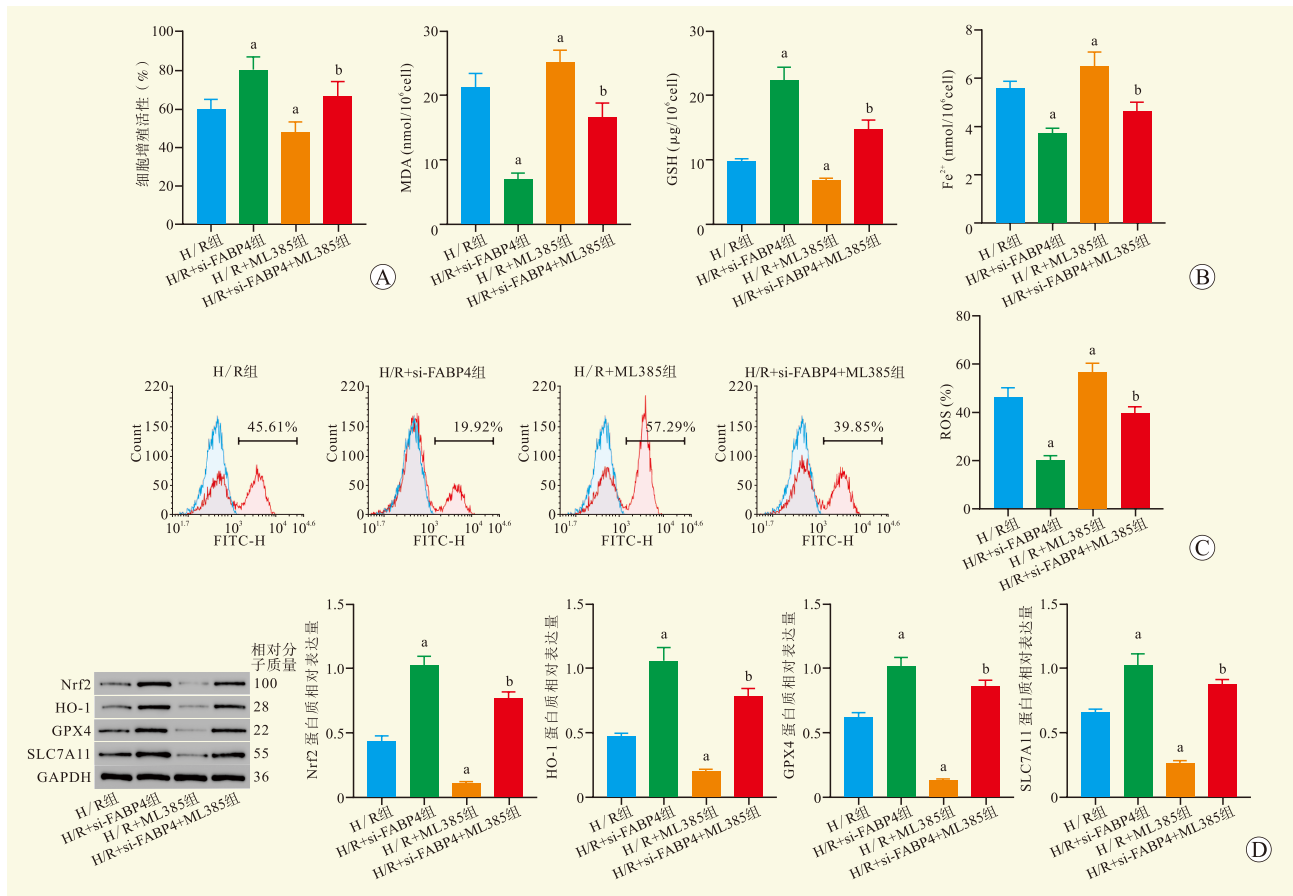
铁死亡是一种非凋亡性细胞死亡形式，既往研究表明，铁死亡抑制剂或靶向调控铁死亡相关基因可有效改善各种器官 IRI<sup>[18-20]</sup>，在 I/R 相关 AKI 的病理生理机制中，细胞铁死亡同样发挥了重要作用<sup>[21-23]</sup>。Xu 等<sup>[24]</sup> 研究发现，FABP4 在脂多糖处理的 HK-2 细胞中表达显著上调，敲除 FABP4 后 Janus 激酶 2/转录激活因子 3 信号通路失活，抑制了 HK-2 细胞中脂多糖刺激诱导的炎症和铁死亡，进而成为治疗脓毒症相关性 AKI 的潜在靶标，提示 FABP4 对细胞铁死亡具有调控作用。铁过载和过度的脂质氧化反应是激活铁死亡的关键因素<sup>[25-26]</sup>，缺血-再灌注损伤期间产生大量 ROS，导致脂质过氧化并促进线粒体损伤，进而致细胞死亡。I/R 常伴有铁稳态失衡<sup>[27-28]</sup>，过量的游离铁加速 ROS 生成并通过芬顿反应催化自由基生成，进一步放大氧化应激信号，加剧铁死亡，形成恶性循环。MDA 作为脂质过氧化的特异性标志物，其水平与铁死亡程度呈正相关。细胞内 GSH 含量减少



注：A 图为各组细胞增殖活性；B 图为各组细胞 ROS 水平；C 图为各组细胞 MDA、GSH 和 Fe<sup>2+</sup> 水平；D 图为蛋白质印迹法检测各组细胞 FABP4 蛋白及 Nrf2/GPX4 通路相关蛋白的表达水平及其量化结果。与 Control 组比较，<sup>a</sup>P<0.05；与 H/R 组比较，<sup>b</sup>P<0.05。

图 4 沉默 FABP4 后 H/R 处理 HK-2 细胞铁死亡相关指标及 Nrf2/GPX4 信号通路的检测

Figure 4 Detection of ferroptosis related indicators and the Nrf2/GPX4 signaling pathway in HK-2 cell treated with H/R after FABP4 silencing



注：A 图为各组细胞增殖活性；B 图为各组细胞中 MDA、GSH 和 Fe<sup>2+</sup> 水平；C 图为各组细胞 ROS 水平；D 图为蛋白质印迹法检测各组细胞 Nrf2/GPX4 通路相关蛋白的表达水平及其量化结果。与 H/R 组比较，<sup>a</sup>P<0.05；与 H/R+si-FABP4 组比较，<sup>b</sup>P<0.05。

图 5 阻断 Nrf2/GPX4 轴沉默 FABP4 后 H/R 处理 HK-2 细胞铁死亡相关指标及 Nrf2/GPX4 信号通路的检测

Figure 5 Detection of ferroptosis related indicators and the Nrf2/GPX4 signaling pathway in HK-2 cell treated with H/R after FABP4 silencing and blocking the Nrf2/GPX4 axis

将直接导致 GPX4 活性降低，削弱其对脂质过氧化物的还原修复能力<sup>[29]</sup>。本研究结果显示，H/R 处理的 HK-2 细胞中 MDA、ROS 和 Fe<sup>2+</sup> 水平较正常组升高，GSH 水平则降低，表明 H/R 可诱导 HK-2 细胞发生铁死亡，通过 siRNA 干扰技术沉默 FABP4 基因表达后，HK-2 细胞铁死亡相关指标水平降低，细胞增殖活性升高，提示下调 FABP4 表达可抑制 H/R 处理的 HK-2 细胞铁死亡。

Nrf2 在调节铁代谢过程中发挥重要作用，已被证实是脂质过氧化和铁死亡的关键调节分子<sup>[30-32]</sup>。Nrf2 激活后，与抗氧化反应元件结合，上调铁死亡相关下游基因 HO-1、GPX4、SLC7A11 的表达<sup>[33-35]</sup>。研究发现，茯苓酸可以改善缺血-再灌注损伤导致的 AKI 小鼠的肾功能并修复肾损伤，保护机制可能与直

接或间接激活 Nrf2 以及上调其下游铁死亡相关蛋白 GPX4、SLC7A11 和 HO-1 抑制铁死亡有关<sup>[36]</sup>。Jiang 等<sup>[37]</sup> 研究表明，蒜氨酸能够通过调节 Nrf2/GPX4 轴抑制铁死亡，提高细胞活力，减缓小鼠 AKI。本研究发现，HK-2 细胞经 H/R 处理细胞中 Nrf2、HO-1、GPX4 和 SLC7A11 蛋白水平随着复氧时间延长而降低，表明 H/R 处理的 HK-2 细胞铁死亡可能与抑制 Nrf2/GPX4 信号通路有关。Kim 等<sup>[38]</sup> 研究显示，甘草根中二苯甲酰甲烷在脂肪生成过程中能够下调前脂肪细胞内 FABP4 等成脂因子表达，并显著增加 Nrf2 和 HO-1 蛋白的表达，有效减少细胞内 ROS 产生，提示 FABP4 可能对 Nrf2 及其下游基因具有调控作用。本研究结果显示，转染 si-FABP4 后经 H/R 处理的 HK-2 细胞中 Nrf2/GPX4 轴相关蛋白表达水平升

高, 铁死亡被抑制。使用 Nrf2 抑制剂 ML385 进行联合干预后, FABP4 沉默对 H/R 处理 HK-2 细胞铁死亡的改善作用被显著逆转, 说明沉默 FABP4 减轻 H/R 诱导的 HK-2 细胞铁死亡可能是通过激活 Nrf2/GPX4 轴实现的。

综上所述, 本研究通过建立 HK-2 细胞 H/R 模型发现沉默 FABP4 可通过激活 Nrf2/GPX4 轴调节细胞内铁稳态, 抑制 H/R 处理的 HK-2 细胞铁死亡, 上调细胞增殖活性。该研究结果为减轻 RIRI 提供了新的研究思路, 未来将继续通过动物实验在体内水平中验证此结论。

#### 参考文献:

- [1] YANG W, LI X, HE L, et al. Empagliflozin improves renal ischemia-reperfusion injury by reducing inflammation and enhancing mitochondrial fusion through AMPK-OPA1 pathway promotion[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2023, 28(1): 42. DOI: 10.1186/s11658-023-00457-6.
- [2] MOHAMED M E, ELMORSY M A, YOUNIS N S. Renal ischemia/reperfusion mitigation via geraniol: the role of nrf-2/HO-1/NQO-1 and TLR2, 4/MYD88/NFκB pathway[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(8): 1568. DOI: 10.3390/antiox11081568.
- [3] WU Q, ZHANG D, DAI S, et al. Desflurane attenuates renal ischemia-reperfusion injury by modulating ITGB1/CD9 and reducing oxidative stress in tubular epithelial cells[J]. *Redox Biol*, 2025, 80: 103490. DOI: 10.1016/j.redox.2025.103490.
- [4] DENG Y, ZENG L, LIU H, et al. Silibinin attenuates ferroptosis in acute kidney injury by targeting FTH1[J]. *Redox Biol*, 2024, 77: 103360. DOI: 10.1016/j.redox.2024.103360.
- [5] LI Y, LI K, ZHAO W, et al. VPA improves ferroptosis in tubular epithelial cells after cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1147772. DOI: 10.3389/fphar.2023.1147772.
- [6] ZHANG J, BI J, REN Y, 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.
- [7] FAN X E, XU M, REN Q, et al. Downregulation of fatty acid binding protein 4 alleviates lipid peroxidation and oxidative stress in diabetic retinopathy by regulating peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -mediated ferroptosis[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10540-10551. DOI: 10.1080/21655979.2022.2062533.
- [8] CHEN J, WU K, LEI Y, et al. Inhibition of fatty acid  $\beta$ -oxidation by fatty acid binding protein 4 induces ferroptosis in HK2 cells under high glucose conditions[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2023, 38(2): 226-244. DOI: 10.3803/EnM.2022.1604.
- [9] 龚水琴, 黄英辉, 赵景宏. 上调 GCLM 改善缺氧复氧诱导的肾小管上皮细胞铁死亡[J]. *陆军军医大学学报*, 2023, 45(7): 639-644. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202301101.
- [10] GONG S Q, HUANG Y H, ZHAO J H. Up-regulation of GCLM alleviates ferroptosis in renal tubular epithelial cells induced by hypoxia reoxygenation injury[J]. *J Army Med Univ*, 2023, 45(7): 639-644. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202301101.
- [11] XING D, MA Y, LU M, et al. Paeoniflorin alleviates hypoxia/reoxygenation injury in HK-2 cells by inhibiting apoptosis and repressing oxidative damage via Keap1/Nrf2/HO-1 pathway[J]. *BMC Nephrol*, 2023, 24(1): 314. DOI: 10.1186/s12882-023-03366-0.
- [12] 张嘉颖, 宿荣允, 王英惠, 等. ACE2 基因通过调控 Nrf2/HO-1 通路改善肾缺血再灌注损伤[J]. *山东大学学报 (医学版)*, 2023, 61(4): 1-9,36. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2022.1226.
- [13] ZHANG J Y, SU R Y, WANG Y H, et al. ACE2 gene protects against renal ischemia-reperfusion injury by regulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *J Shandong Univ (Health Sci)*, 2023, 61(4): 1-9,36. DOI: 10.6040/j.issn.1671-7554.0.2022.1226.
- [14] PEFANIS A, IERINO F L, MURPHY J M, et al. Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(2): 291-301. DOI: 10.1016/j.kint.2019.02.009.
- [15] Ronco C, Bellomo R, Kellum J A. Acute kidney injury[J]. *Lancet (London, England)*, 2019, 394(10212): 1949-1964. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32563-2.
- [16] HERTZEL A V, XU H, DOWNEY M, et al. Fatty acid binding protein 4/aP2-dependent BLT1R expression and signaling[J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(7): 1354-1361. DOI: 10.1194/jlr.M074542.
- [17] HU B, GUO Y, GARBACZ W G, et al. Fatty acid binding protein-4 (FABP4) is a hypoxia inducible gene that sensitizes mice to liver ischemia/reperfusion injury[J]. *J Hepatol*, 2015, 63(4): 855-862. DOI: 10.1016/j.jhep.2015.05.030.
- [18] YANG X L, MI J H, DONG Q. FABP4 alleviates endoplasmic reticulum stress-mediated ischemia-reperfusion injury in PC12 cells via regulation of PPAR $\gamma$ [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 181. DOI: 10.3892/etm.2021.9612.
- [19] SHI M, HUANG R, GUO F, et al. Pharmacological inhibition of fatty acid-binding protein 4 (FABP4) protects against renal ischemia-reperfusion injury[J]. *RSC Adv*, 2018, 8(27): 15207-15214. DOI: 10.1039/c8ra00122g.
- [20] PAN Y, WANG X, LIU X, et al. Targeting ferroptosis as a promising therapeutic strategy for ischemia-reperfusion injury[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(11): 2196. DOI: 10.3390/antiox11112196.
- [21] LI M, MENG Z, YU S, et al. Baicalein ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting ferroptosis via regulating GPX4/ACSL4/ACSL3 axis[J]. *Chem Biol Interact*, 2022, 366: 110137. DOI: 10.1016/j.cbi.2022.110137.
- [22] DENG F, ZHAO B C, YANG X, et al. The gut microbiota metabolite capsiate promotes Gpx4 expression by activating TRPV1 to inhibit intestinal ischemia reperfusion-induced ferroptosis[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1-21. DOI: 10.1080/19490976.

- 2021.1902719.
- [21] ZHOU L, XUE X, HOU Q, et al. Targeting ferroptosis attenuates interstitial inflammation and kidney fibrosis[J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2022, 8(1): 57-71. DOI: 10.1159/000517723.
- [22] TONNUS W, MEYER C, STEINEBACH C, et al. Dysfunction of the key ferroptosis-surveilling systems hypersensitizes mice to tubular necrosis during acute kidney injury[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 4402. DOI: 10.1038/s41467-021-24712-6.
- [23] SUN X, HUANG N, LI P, et al. TRIM21 ubiquitylates GPX4 and promotes ferroptosis to aggravate ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury[J]. *Life Sci*, 2023, 321: 121608. DOI: 10.1016/j.lfs.2023.121608.
- [24] XU S, LUO J, WANG Y, et al. Fatty acid binding protein-4 silencing inhibits ferroptosis to alleviate lipopolysaccharide-induced injury of renal tubular epithelial cells by blocking Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling[J]. *J Physiol Investig*, 2024, 67(1): 47-56. DOI: 10.4103/EJPI.EJPI-D-23-00027.
- [25] 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. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [26] STOJKOVIC L, DJORDJEVIC A, STEFANOVIC M, et al. Circulatory indicators of lipid peroxidation, the driver of ferroptosis, reflect differences between relapsing-remitting and progressive multiple sclerosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(20): 11024. DOI: 10.3390/ijms252011024.
- [27] SCINDIA Y, DEY P, THIRUNAGARI A, et al. Hecidin mitigates renal ischemia-reperfusion injury by modulating systemic iron homeostasis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(11): 2800-2814. DOI: 10.1681/ASN.2014101037.
- [28] SHENG H, XIONG J, YANG D. Protective effect of sevoflurane preconditioning on cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury by modulating iron homeostasis and ferroptosis[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2023, 23(2): 86-92. DOI: 10.1007/s12012-023-09782-w.
- [29] 姜永浩, 刘杨, 李晓, 等. 黄连解毒汤对心肌缺血再灌注损伤大鼠铁死亡和 PPAR $\alpha$  表达的影响[J]. *中成药*, 2025, 47(1): 238-243. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.01.037.
- JIANG Y H, LIU Y, LI X, et al. Effects of Huanglian Jiedu decoction on iron death and PPAR $\alpha$  expression in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2025, 47(1): 238-243. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1528.2025.01.037.
- [30] DODSON M, CASTRO-PORTUGUEZ R, ZHANG D. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2019, 23: 101107. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101107.
- [31] SHU Y J, LAO B, QIU Y Y. Research progress of ferroptosis regulating lipid peroxidation and metabolism in occurrence and development of primary liver cancer[J]. *World J Gastrointest Oncol*, 2024, 16(6): 2335-2349. DOI: 10.4251/wjgo.v16.i6.2335.
- [32] LEE J, ROH J L. Targeting Nrf2 for ferroptosis-based therapy: implications for overcoming ferroptosis evasion and therapy resistance in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2023, 1869(7): 166788. DOI: 10.1016/j.bbadis.2023.166788.
- [33] 吴爱君, 陈乃清, 黄丽华, 等. 益母草碱激活 p62/Nrf2/HO-1 信号通路抑制肾小管上皮细胞铁死亡的作用机制[J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(8): 2176-2183. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20221115.401.
- WU A J, CHEN N Q, HUANG L H, et al. Leonurine inhibits ferroptosis in renal tubular epithelial cells by activating p62/Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *China J Chin Mater Med*, 2023, 48(8): 2176-2183. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20221115.401.
- [34] GENG W, YAN S, LI X, et al. miR-432-5p inhibits the ferroptosis in cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation via activating Nrf2/SLC7A11 axis by degrading Keap1[J]. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2023, 2023: 1293200. DOI: 10.1155/2023/1293200.
- [35] WU H, LI H, HUO H, et al. Effects of terbuthylazine on myocardial oxidative stress and ferroptosis via Nrf2/HO-1 signaling pathway in broilers[J]. *Pestic Biochem Physiol*, 2023, 197: 105698. DOI: 10.1016/j.pestbp.2023.105698.
- [36] JIANG G P, LIAO Y J, HUANG L L, et al. Effects and molecular mechanism of pachymic acid on ferroptosis in renal ischemia reperfusion injury[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(1): 63. DOI: 10.3892/mmr.2020.11704.
- [37] JIANG C, HUANG H, ZHONG C, et al. Alliin mitigates the acute kidney injury by suppressing ferroptosis via regulating the Nrf2/GPX4 axis[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2025, 398(2): 1521-1533. DOI: 10.1007/s00210-024-03343-w.
- [38] KIM J H, KIM C Y, KANG B, et al. Dibenzoylmethane suppresses lipid accumulation and reactive oxygen species production through regulation of nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2 and insulin signaling in adipocytes[J]. *Biol Pharm Bull*, 2018, 41(5): 680-689. DOI: 10.1248/bpb.b17-00837.

(收稿日期: 2025-04-21)

(本文编辑: 谢诗韵 吴秋玲)