

· 实验研究 ·

环泊酚通过上调应激诱导蛋白 2 表达减轻肾脏细胞氧糖剥夺/复糖复氧损伤

刘美言 宋涛 闵洁煜 应流念 刘磊 钟毅

【摘要】 目的 探究环泊酚调控应激诱导蛋白 2 (SESN2) 表达量及其在氧糖剥夺/复糖复氧 (OGD/R) 诱导的 HK-2 细胞铁死亡中的作用。方法 选择野生型及 SESN2 基因敲低的人肾皮质近曲小管上皮细胞 (HK-2 细胞株), 将所选细胞分为五组: 正常培养组 (C 组)、OGD/R 组 (O 组)、OGD/R+环泊酚 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 (OC 组)、SESN2 基因敲低+OGD/R 组 (SO 组) 和 SESN2 敲低+OGD/R+环泊酚 50 $\mu\text{mol/L}$ 组 (SOC 组)。其中 O 组、OC 组、SO 组和 SOC 组建立 OGD/R 细胞损伤模型。采用 CCK-8 法检测细胞存活率, 荧光酶标仪检测 ROS 荧光强度。收集细胞, 采用微板法检测丙二醛 (MDA) 含量, 采用比色法检测谷胱甘肽 (GSH)、半胱氨酸 (Cys) 含量; 收集细胞培养上清液, 采用 ELISA 法检测白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、乳酸脱氢酶 (LDH) 浓度。提取细胞蛋白和细胞 RNA, 分别采用 Western blot 和 qRT-PCR 法检测 SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量和 mRNA 表达量。结果 与 C 组比较, O 组、OC 组、SO 组和 SOC 组细胞存活率、GSH、Cys 含量、GPX4、FSP1 蛋白含量和 mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$), ROS 水平、MDA 含量、细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度、SESN2 蛋白含量和 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$)。与 O 组比较, OC 组细胞存活率、GSH、Cys 含量、SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量和 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$), ROS 水平、MDA 含量、细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度明显降低 ($P < 0.05$); SO 组细胞存活率、GSH、Cys 含量、SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量和 mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$), ROS 水平、MDA 含量、细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度明显升高 ($P < 0.05$)。与 OC 组比较, SOC 组细胞存活率、GSH、Cys 含量、SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量和 mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$), ROS 水平、MDA 含量、细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度明显升高 ($P < 0.05$)。与 SO 组比较, SOC 组细胞存活率、GSH、Cys 含量、SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量和 mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$), ROS 水平、MDA 含量、细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度明显降低 ($P < 0.05$)。结论 环泊酚可以减轻 HK-2 细胞 OGD/R 损伤, 降低铁死亡水平和细胞氧化应激反应, 可能与上调 SESN2 表达量有关。

【关键词】 应激诱导蛋白 2, 人类; 铁死亡; 人肾皮质近曲小管上皮细胞; 氧糖剥夺/复糖复氧; 环泊酚

Ciprofol alleviates injury of oxygen-glucose deprivation/reglucose and reoxygenation in renal cells by up-regulating sestrin 2 expression LIU Meiyang, SONG Tao, MIN Jieyu, YING Liunian, LIU Lei, ZHONG Yi. School of Anesthesiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China
Corresponding author: ZHONG Yi, Email: 490173559@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the regulation of sestrin 2 (SESN2) expression by ciprofol and its role in ferroptosis in HK-2 cells induced by oxygen-glucose deprivation/reglucose and reoxygenation (OGD/R). Methods The wild type and SESN2 knockdown HK-2 cell line were selected and divided into five groups: normal culture group (group C), OGD/R group (group O), OGD/R + ciprofol 50 $\mu\text{mol/L}$ group (OC group), and SESN2 knockdown + OGD/R + ciprofol 50 $\mu\text{mol/L}$ group (SO group), and SESN2 knockdown + OGD/R + ciprofol 50 $\mu\text{mol/L}$ group (SOC group). OGD/R damage model was established in groups O, OC, SO and SOC by OGD/R method. The cell survival rate was detected by CCK-8 method, and the fluorescence intensity of ROS was measured using a fluorescence microplate reader. The cells were collected, and the MDA content was detected by microplate method, and the GSH and Cys contents were detected by colorimetric method. The supernatant of the cell culture was collected, and the con-

DOI: 10.12089/jca.2025.07.013

基金项目: 黔西南州医学科研联合项目 (2023-3-16)

作者单位: 550004 贵阳市, 贵州医科大学附属医院麻醉科 (刘美言、宋涛、闵洁煜、刘磊、钟毅); 贵州医科大学麻醉学院 (应流念)

通信作者: 钟毅, Email: 490173559@qq.com

tents of IL-6, TNF- α , and LDH were detected by ELISA. After extracting cellular proteins and cellular RNA, the protein contents and mRNA expression levels of SESN2, GPX4, and FSP1 were detected by Western blot and qRT-PCR, respectively. **Results** Compared with group C, the cell survival rate, contents of GSH and Cys, and the protein contents and mRNA expression levels of GPX4 and FSP1 in groups O, OC, SO, and SOC were significantly decreased ($P < 0.05$), while the levels of ROS, the content of MDA, the concentrations of IL-6, TNF- α , and LDH in the cell culture supernatant, the protein contents and mRNA expression levels of SESN2 were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group O, the cell survival rate, the contents of GSH and Cys, the protein contents and mRNA expression levels of SESN2, GPX4, and FSP1 in group OC were significantly increased ($P < 0.05$), while the ROS level, the content of MDA, and the concentrations of IL-6, TNF- α , and LDH in the cell culture supernatant were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with group O, the cell survival rate, the contents of GSH and Cys, protein contents and mRNA expression levels of SESN2, GPX4, and FSP1 in group SO were significantly decreased ($P < 0.05$), while the ROS level, the content of MDA, and the concentrations of IL-6, TNF- α , and LDH in the cell culture supernatant were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group OC, the cell survival rate, the contents of GSH and Cys, the protein contents and mRNA expression levels of SESN2, GPX4, and FSP1 in group SOC were significantly decreased ($P < 0.05$), while the ROS level, the content of MDA, and the concentrations of IL-6, TNF- α , and LDH in the cell culture supernatant were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with group SO, the cell survival rate, the contents of GSH and Cys, the protein contents and mRNA expression levels of SESN2, GPX4, and FSP1 in group SOC were significantly increased ($P < 0.05$), while the ROS level, the content of MDA, and the concentrations of IL-6, TNF- α , and LDH in the cell culture supernatant were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Cyclophofol can alleviate OGD/R injury in HK-2 cells, reduce the level of ferroptosis and cellular oxidative stress response, which may be related to the upregulation of SESN2 expression.

【Key words】 Sestrin 2 protein; human; Ferroptosis; Human kidney-2 cells; Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; Ciprofol

缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是器官供血受限,在血流恢复和再氧合后细胞损伤反而加重的病理现象。肾脏主要通过高肾血流量和耗氧量维持肾小球滤过率,是最容易受到 IRI 影响的器官之一。在肾移植、肾动脉栓塞、心脏移植、大血管及肾血管手术、心脏骤停及休克等情况下,均会出现不同程度的肾脏 IRI^[1-3]。不同于传统的细胞死亡过程,铁死亡作为一种新的细胞死亡调控方式,主要由氧化还原失衡引起,其主要特征是谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)生成减少,谷胱甘肽(glutathione, GSH)合成减少,导致脂质过氧化介导的细胞死亡^[4]。铁死亡参与包括代谢性损伤^[5]、IRI^[6]等多种组织、器官损害等多种病理过程中,是目前 IRI 的研究热点之一。应激诱导蛋白 2(sestrin2, SESN2)是一种应激诱导的代谢调节因子和保守的抗氧化蛋白,可以减轻肠道、肾脏 IRI 引起的铁死亡^[6-7]。环泊酚与丙泊酚同属 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)受体激动药,通过激活 GABA 能神经元发挥中枢镇静作用^[8]。环泊酚对 GABA 受体的亲和力优于丙泊酚,对心脏功能的损伤更小、血流动力学更稳定,效价强度是丙泊酚的 4~5 倍,具有起效快、恢复快的优点^[9]。然而,环泊酚对肾脏 IRI 的影响尚不清楚,且目前少有关于环丙酚处理后铁死亡与 IRI 之间联系

的研究报道。本实验研究通过氧糖剥夺/复糖复氧(oxygen-glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R)构建 HK-2 细胞损伤模型,以模拟肾脏 IRI,并观察环泊酚对肾脏细胞 OGD/R 损伤的影响,以期环泊酚对肾脏 IRI 影响的研究提供参考。

材料与方法

细胞培养 人肾皮质近曲小管上皮细胞(HK-2 细胞株),置于含 100 U/ml 青霉素-链霉素溶液和 10%胎牛血清 DMEM 培养基中,培养于 37℃、含 5%CO₂ 的培养箱。待细胞融合度约 80%时,以 0.25%胰蛋白酶消化,按照 1:3 传代培养,选择对数生长期细胞进行实验。

慢病毒转染 采用慢病毒敲低 HK-2 细胞株的 SESN2 基因,并建立稳定传代的 SESN2 基因敲低的 HK-2 细胞,慢病毒转染后在荧光显微镜下可观察转染成功的细胞呈绿色荧光,并采用 Western blot、qRT-PCR 法检测表达效果。

实验分组与处理 将野生型和 SESN2 基因敲低的 HK-2 细胞株正常培养 24 h,进行细胞计数后将其分为五组:正常培养组(C 组)、OGD/R 组(O 组)、OGD/R+环泊酚 50 μ mol/L 组(OC 组)、SESN2 基因敲低+OGD/R 组(SO 组)、SESN2 基因敲低+OGD/R+环泊酚 50 μ mol/L 组(SOC 组)。C 组采用

不含环泊酚的完全培养基,置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中进行正常培养;O 组、OC 组、SO 组和 SOC 组采用 OGD/R 制备模型,氧糖剥夺 4 h 后复氧复糖 20 h,其中 OC 组和 SOC 组全程使用含环泊酚的培养基,造模成功后继续培养 24 h。

细胞存活率检测 将细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板,每组取 3 个复孔,按照实验分组进行处理。处理完毕后每孔加入 CCK8 试剂 10 μ l,孵育 1 h 后置于酶标仪 450 nm 检测 OD 值并计算细胞存活率。细胞存活率(%) = (实验组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) $\div$ (对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

细胞活性氧水平检测 将细胞以 1×10^5 个/孔接种于 96 孔板,每组取 3 个复孔,按照实验分组进行处理。按照 1:1 000 用无血清培养液稀释 DCFH-DA 荧光探针,使终浓度为 10 μ mol/L,加入稀释后的 DCFH-DA 试剂至完全覆盖细胞,37 ℃ 细胞培养箱内孵育 20 min,洗净未进入细胞内的 DCFH-DA 后使用荧光酶标仪检测细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS) 荧光强度。

铁死亡指标的检测 将细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,每组取 3 个复孔,按照实验分组进行处理。经过分组处理后的各组细胞弃去细胞培养上清,用细胞刮将细胞刮下,按说明书要求分别采用玻璃匀浆器使细胞破碎制成悬液待测。参照试剂盒说明书,采用微板法检测丙二醛(malondialdehyde, MDA) 含量,采用比色法检测 GSH、半胱氨酸(cysteine, Cys) 含量。

ELISA 法 将细胞以 1×10^6 个/孔接种于 6 孔板,每组取 3 个复孔,按照实验分组进行处理。收集经过分组处理后的细胞培养上清液,4 000 r/min 离心 5 min,再次去除漂浮于培养基中的细胞得到上清液待测。按照试剂盒说明书检测白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、乳酸脱氢酶(lactic dehydrogenase, LDH) 浓度。

Western blot 法 将细胞以 6×10^6 个/孔接种于 10 cm 细胞培养皿,每组取 3 个复孔,按照实验分组进行处理。细胞经过分组处理后分别加入 RIPA 裂解液 200 μ l 充分裂解,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 8.214 cm),收集上清液,BCA 蛋白定量试剂盒进行定量检测蛋白质浓度,定量后蛋白质经 95 ℃ 煮沸变性。取 15 μ l 进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将分离的蛋白转至 PVDF 膜。封闭 30 min 后,加一抗 SESN2(1:1 500)、GPX4(1:1 000)、

铁死亡抑制蛋白 1(ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)(1:1 000)、GAPDH(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜。第 2 天洗膜后加入二抗(1:6 000) 孵育,室温下轻摇 2 h,洗膜后于 ECL 化学发光法显色,ImageJ 图像分析软件分析细胞中 SESN2、GPX4、FSP1 蛋白相对含量,以 GAPDH 为内参。

qRT-PCR 法 将细胞以 6×10^6 个/孔接种于 10 cm 细胞培养皿,每组取 3 个复孔,按照实验分组进行处理。提取细胞 RNA,采用 10 μ l 的 qPCR 反应体系参照说明书进行操作,采用荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR,2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法计算细胞 SESN2、GPX4、FSP1 mRNA 相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

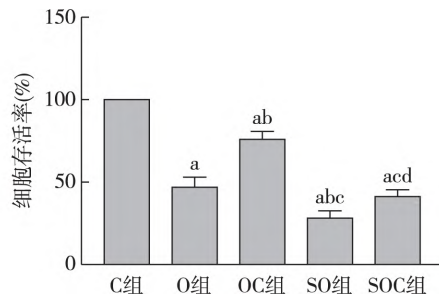
基因	引物序列
SESN2	上游 5'-AAGGACTACCTGCGGTTTCG-3'
	下游 5'-CGCCCAGAGGACATCAGTG-3'
GPX4	上游 5'-GAGGCAAGACCGAAGTAAACTAC-3'
	下游 5'-CCGAACGTGTTACACGGGAA-3'
FSP1	上游 5'-GATGAGCAACTTGGACAGCAA-3'
	下游 5'-CTGGGCTGCTTATCTGGGAAG-3'
GAPDH	上游 5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAT-3'
	下游 5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'

统计分析 采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,GraphPad Prism10 统计作图软件进行统计图制作。正态分布计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差不齐数据采用 Welch 法进行方差分析,多重比较采用 Dunnett T3 法进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

细胞存活率 与 C 组比较,O 组、SO 组、OC 组和 SOC 组细胞存活率明显降低($P < 0.05$)。与 O 组比较,OC 组细胞存活率明显升高,SO 组细胞存活率明显降低($P < 0.05$)。与 OC 组比较,SO 组和 SOC 组细胞存活率明显降低($P < 0.05$)。与 SO 组比较,SOC 组细胞存活率明显升高($P < 0.05$)。O 组和 SOC 组细胞存活率差异无统计学意义(图 1)。

ROS 水平 O 组荧光强度为 1.00,O 组、OC 组、SO 组和 SOC 组相对荧光强度分别为 2.59 ± 0.88 , 1.43 ± 0.02 , 3.70 ± 0.09 , 1.88 ± 0.07 。与 C 组比较,O 组、SO 组、OC 组和 SOC 组 ROS 水平明显升高($P < 0.05$)。



注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 O 组比较,^b $P<0.05$;与 OC 组比较,^c $P<0.05$;与 SO 组比较,^d $P<0.05$ 。

图 1 五组细胞存活率的比较

MDA、GSH、Cys 含量 与 C 组比较,O 组、SO 组、OC 组和 SOC 组 MDA 含量明显升高,GSH、Cys 含量明显降低 ($P<0.05$)。与 O 组比较,OC 组 MDA 含量明显降低,GSH、Cys 含量明显升高 ($P<0.05$) , SO 组 MDA 含量明显升高,GSH、Cys 含量明显降低 ($P<0.05$)。与 OC 组比较,SO 组和 SOC 组 MDA 含量明显升高,GSH、Cys 含量明显降低 ($P<0.05$)。与 SO 组比较,SOC 组 MDA 含量明显降低,Cys、GSH 含量明显升高 ($P<0.05$) (表 2)。

表 2 五组细胞 MDA、GSH、Cys 含量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	MDA (nmol/ml)	GSH (μ mol/L)	Cys (μ mol/L)
C 组	3	3.52 $\pm$ 0.22	0.856 $\pm$ 0.002	4.59 $\pm$ 0.44
O 组	3	9.43 $\pm$ 0.23 ^a	0.478 $\pm$ 0.006 ^a	2.83 $\pm$ 0.13 ^a
OC 组	3	6.51 $\pm$ 0.33 ^{ab}	0.525 $\pm$ 0.022 ^{ab}	3.63 $\pm$ 0.12 ^{ab}
SO 组	3	18.66 $\pm$ 0.58 ^{abc}	0.284 $\pm$ 0.007 ^{abc}	1.64 $\pm$ 0.26 ^{abc}
SOC 组	3	12.10 $\pm$ 0.42 ^{abcd}	0.431 $\pm$ 0.019 ^{abcd}	3.10 $\pm$ 0.01 ^{abcd}

注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 O 组比较,^b $P<0.05$;与 OC 组比较,^c $P<0.05$;与 SO 组比较,^d $P<0.05$ 。

细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度 与 C 组比较,O 组、SO 组、OC 组、SOC 组细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度明显升高 ($P<0.05$)。与 O 组比较,OC 组细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度明显降低 ($P<0.05$) ,SO 组细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度明显升高 ($P<0.05$)。与 OC 组比较,SO 组和 SOC 组细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度明显升高 ($P<0.05$)。与 SO 组比较,SOC 组细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度明显降低 ($P<0.05$) (表 3)。

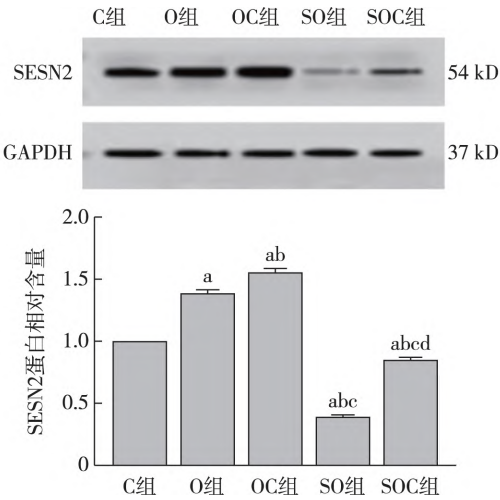
细胞 SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量 与 C 组比较,O 组和 OC 组 SESN2 蛋白含量明显升高,SO 组

表 3 五组细胞培养上清液 IL-6、TNF- α 、LDH 浓度的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	孔数	IL-6 (pg/ml)	TNF- α (pg/ml)	LDH (gprot/ml)
C 组	3	1.23 $\pm$ 0.03	33.18 $\pm$ 0.55	0.49 $\pm$ 0.01
O 组	3	3.26 $\pm$ 0.16 ^a	91.03 $\pm$ 0.81 ^a	2.44 $\pm$ 0.19 ^a
OC 组	3	2.62 $\pm$ 0.05 ^{ab}	55.14 $\pm$ 0.51 ^{ab}	1.04 $\pm$ 0.05 ^{ab}
SO 组	3	8.69 $\pm$ 0.33 ^{abc}	128.19 $\pm$ 0.31 ^{abc}	5.41 $\pm$ 0.23 ^{abc}
SOC 组	3	5.70 $\pm$ 0.41 ^{abcd}	103.13 $\pm$ 1.19 ^{abcd}	2.96 $\pm$ 0.06 ^{abcd}

注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 O 组比较,^b $P<0.05$;与 OC 组比较,^c $P<0.05$;与 SO 组比较,^d $P<0.05$ 。

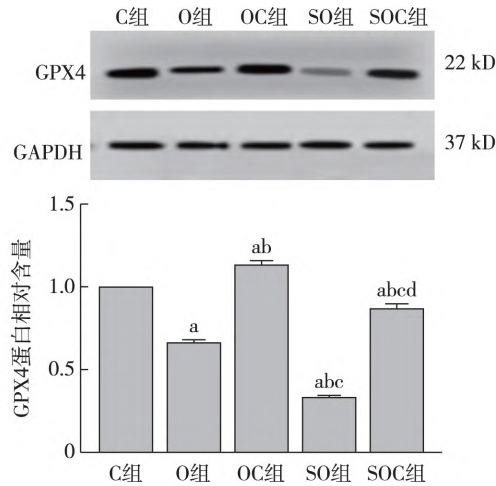
和 SOC 组 SESN2 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$) ; O 组、SO 组、OC 组和 SOC 组 GPX4、FSP1 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$)。与 O 组比较,OC 组 SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量明显升高 ($P<0.05$) ; SO 组 SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$)。与 OC 组比较,SO 组和 SOC 组 SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$)。与 SO 组比较,SOC 组 SESN2、GPX4、FSP1 蛋白含量明显升高 ($P<0.05$) (图 2—4)。



注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 O 组比较,^b $P<0.05$;与 OC 组比较,^c $P<0.05$;与 SO 组比较,^d $P<0.05$ 。

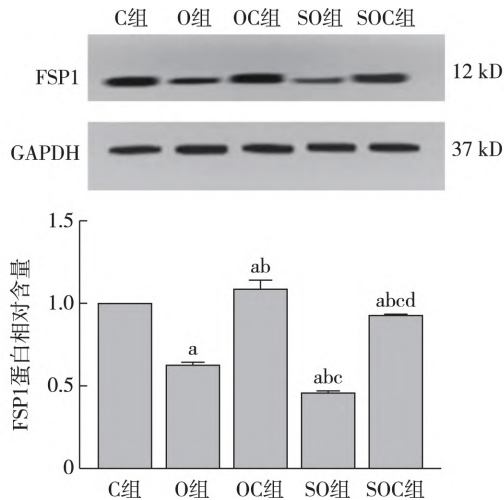
图 2 五组细胞 SESN2 蛋白含量的比较

细胞 SESN2、GPX4、FSP1 mRNA 表达量 与 C 组比较,O 组和 OC 组 SESN2 mRNA 表达量明显升高,SO 组和 SOC 组 SESN2 mRNA 表达量明显降低 ($P<0.05$) ; O 组、SO 组、OC 组、SOC 组 GPX4、FSP1 mRNA 表达量明显降低 ($P<0.05$)。与 O 组比较,



注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 O 组比较,^b $P<0.05$;与 OC 组比较,^c $P<0.05$;与 SO 组比较,^d $P<0.05$ 。

图 3 五组细胞 GPX4 蛋白含量的比较



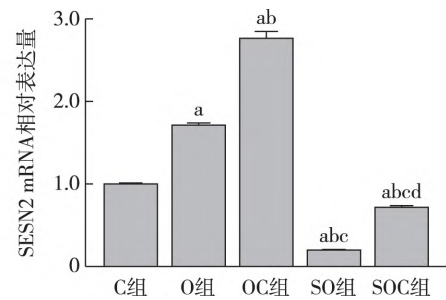
注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 O 组比较,^b $P<0.05$;与 OC 组比较,^c $P<0.05$;与 SO 组比较,^d $P<0.05$ 。

图 4 五组细胞 FSP1 蛋白含量的比较

OC 组 SESN2、GPX4、FSP1 mRNA 表达量明显升高 ($P<0.05$); SO 组 SESN2、GPX4、FSP1 mRNA 表达量明显降低 ($P<0.05$)。与 OC 组比较,SO 组和 SOC 组 SESN2、GPX4、FSP1 mRNA 表达量明显降低 ($P<0.05$)。与 SO 组比较,SOC 组 SESN2、GPX4、FSP1 mRNA 表达量明显升高 ($P<0.05$) (图 5—7)。

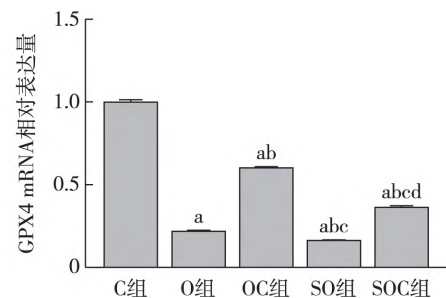
讨 论

肾脏 IRI 的病理机制复杂,涉及细胞自噬、细胞凋亡、铁死亡、细胞代谢异常等诸多方面,围术期麻醉药物处理是目前预防 IRI 的热点。体外研究^[10-12]表明,丙泊酚在临床使用中具有抗炎、抗氧化和抗癌特性。丙泊酚对肾脏 IRI 具有保护作



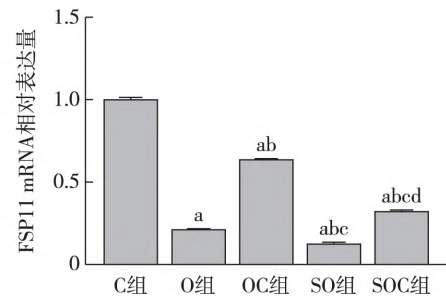
注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 O 组比较,^b $P<0.05$;与 OC 组比较,^c $P<0.05$;与 SO 组比较,^d $P<0.05$ 。

图 5 五组细胞 SESN2 mRNA 表达量的比较



注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 O 组比较,^b $P<0.05$;与 OC 组比较,^c $P<0.05$;与 SO 组比较,^d $P<0.05$ 。

图 6 五组细胞 GPX4 mRNA 表达量的比较



注:与 C 组比较,^a $P<0.05$;与 O 组比较,^b $P<0.05$;与 OC 组比较,^c $P<0.05$;与 SO 组比较,^d $P<0.05$ 。

图 7 五组细胞 FSP1 mRNA 表达量的比较

用^[13-14],已用于临床围术期减轻肾脏 IRI^[13]。环泊酚是在丙泊酚的基础上引入环丙基的一类静脉麻醉药,在心肌 IRI 中的保护作用也已经有研究^[14]证实,但在肾脏 IRI 中的作用鲜有报道。本研究结果显示,OGD/R 处理后的细胞出现 IRI,SESN2 蛋白表达量升高以发挥内源性保护作用,同时抑制 GPX4 和 FSP1 表达,促使细胞发生铁死亡。在 SESN2 敲低后,OGD/R 处理导致的损伤更加显著,而环泊酚处理可以减轻 OGD/R 引起的细胞损伤,减少炎症因子释放、氧化应激反应发生和铁死亡水平,一定程度上逆转 SESN2 敲低后细胞内源性保护作用的

缺失,同时促进 GPX4、FSP1 表达以对抗铁死亡。

铁死亡是细胞死亡的一种调节形式^[1],铁死亡发生时表现出几种氧化还原活性酶的异常表达,其特征铁依赖性脂质过氧化的积累。许多疾病的发生和发展,如神经退行性变^[18]、炎症和感染^[19]等损伤都伴随着铁死亡。铁死亡在肾脏 IRI 过程中发挥关键的调控作用。本课题的前期研究参考文献^[20]方法,在造模过程加入不同细胞死亡途径的抑制剂,包括细胞凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK、铁死亡抑制剂 Fer-1、细胞坏死抑制剂 Nec-1、自噬抑制剂 3-MA,结果提示使用 Fer-1 抑制铁死亡进展后,细胞损伤较抑制其他通路显著减轻,说明铁死亡在 OGD/R 诱导 HK-2 细胞损伤的过程中发挥了重要作用,ODG/R 触发了细胞内铁蓄积,造成氧化应激及细胞损伤,进行 OGD/R 处理的细胞出现显著的氧化应激反应和细胞损伤,表现为 ROS、MDA、LDH、TNF- α 、IL-6 水平升高。基于上述实验结果,本研究在 OGD/R 的同时加入环泊酚处理,结果显示环泊酚可以明显缓解上述损伤。OC 组细胞的损伤程度较未使用环泊酚处理的细胞明显减轻,LDH、TNF- α 、IL-6 水平明显降低,ROS、MDA 水平同样明显降低,而环泊酚处理后一定程度上逆转了上述损伤,同时 SESN2 蛋白含量及 mRNA 表达量也升高,提示环泊酚在肾脏 IRI 过程中产生了保护作用,该保护作用与 SESN2 蛋白表达量上调相关。随着铁死亡发生及细胞损伤加重,刺激细胞 SESN2 蛋白表达量升高,产生内源性保护作用,抑制细胞铁死亡,减轻细胞损伤。

SESN2 是一种应激诱导的代谢调节因子和保守的抗氧化蛋白,在氧化应激^[21-23]、内质网应激^[23]、线粒体功能障碍^[24]等病理情况下,均可使 SESN2 表达上调从而发挥内源性保护作用^[25]。SESN2 可以减轻肠道、肾脏 IRI 引起的铁死亡^[6-7];还可以通过维持肾小管细胞自噬稳态减轻急性肾损伤,通过减轻氧化应激改善糖尿病肾脏损伤^[26]。在脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导的细胞损伤模型中,SESN2 遗传缺陷的小鼠铁死亡损伤加重^[27],表现为 SESN2 敲低后 ROS 升高、GSH 耗竭加剧,最终导致铁死亡损伤加剧,证明 SESN2 抑制了脓毒症所导致的铁死亡。Park 等^[28]关于肝脏铁死亡损伤的研究也表明,SESN2 可减轻 Erastin 诱导的肝细胞铁死亡损伤,表现为 MDA 含量降低,GSH 水平升高,GPX4 蛋白相对表达量升高等。

为验证环泊酚在肾脏 IRI 中的保护作用与

SESN2 表达量的相关性,本实验研究引入慢病毒转染的方法进行 SESN2 基因敲低处理,结果显示 SESN2 基因敲低的 HK-2 细胞进行 OGD/R 处理后损伤较单纯进行 OGD/R 的细胞明显加重,氧化应激水平和炎症因子表达明显升高,GSH、Cys 明显降低,SESN2 蛋白相对表达量明显降低,说明细胞对抗铁死亡的能力有所下降。而环泊酚处理则逆转了该作用,提示环泊酚处理可以减轻细胞氧化应激,降低铁死亡水平以保护 HK-2 细胞免受 OGD/R 损伤,该作用与 SESN2 表达量有关。

GPX4 和 FSP1 构成铁死亡的两大主要防御系统。本实验研究观察了环泊酚对 GPX4 和 FSP1 的影响,ODG/R 处理显著降低 HK-2 细胞中的 GPX4 和 FSP1 蛋白水平,环泊酚处理后细胞中 GPX4 和 FSP1 水平回升。同样地,在 SESN2 敲低的 HK-2 细胞中 GPX4 和 FSP1 的表达量降低,提示细胞对抗铁死亡和氧化应激的能力下降,环泊酚则逆转了 OGD/R 处理导致的 GPX4、FSP1 表达下调。Park 等^[28]研究提出,铁死亡诱导剂 Erastin 处理后 SESN2 表达的升高受转录调控,核转录因子红系 2 相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2)是 SESN2 表达的重要转录因子,Nrf2 缺失则抑制 Erastin 诱导的细胞中 Sesn2 的表达,Nrf2 的表达水平与铁死亡的敏感性直接相关,Nrf2 表达量增加可以抑制铁死亡^[24,29]。因此,还需要进一步的研究来确定铁死亡引起的 SESN2 上调是否介导了 Nrf2 激活发挥保护作用。

本研究不足之处:本实验研究观察到环泊酚与 SESN2 和铁死亡的相关性,但在直接作用机制上未进行进一步探索,且研究局限于体外细胞研究,仍需进行直接通路研究,并在动物、临床试验中加以证明。

综上所述,环泊酚可以改善 HK-2 细胞 OGD/R 损伤,降低铁死亡水平和细胞氧化应激反应,可能与上调 SESN2 表达量有关,其具体作用机制还需要深入研究,环泊酚抑制铁死亡或是减轻肾脏 IRI 的一个有意义的靶点。

参 考 文 献

- [1] Huang R, Zhang C, Xiang Z, et al. Role of mitochondria in renal ischemia-reperfusion injury. FEBS J, 2024, 291(24): 5365-5378.
- [2] Shi L, Song Z, Li Y, et al. MiR-20a-5p alleviates kidney ischemia/reperfusion injury by targeting ACSL4-dependent ferroptosis. Am J Transplant, 2023, 23(1): 11-25.

- [3] Liu J, Kang R, Tang D. Signaling pathways and defense mechanisms of ferroptosis. *FEBS J*, 2022, 289(22) : 7038-7050.
- [4] Li X, Ma N, Xu J, et al. Targeting ferroptosis: pathological mechanism and treatment of ischemia-reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 1587922.
- [5] Feng Q, Yu X, Qiao Y, et al. Ferroptosis and acute kidney injury (AKI) : molecular mechanisms and therapeutic potentials. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 858676.
- [6] Zhang LL, Ding K, Liao SS, et al. Sestrin2 reduces ferroptosis via the Keap1/Nrf2 signaling pathway after intestinal ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 2024, 214: 115-128.
- [7] Shirzad H, Mousavinezhad SA, Panji M, et al. Amlodipine alleviates renal ischemia/reperfusion injury in rats through Nrf2/sestrin2/PGC- α /TFAM Pathway. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2023, 24(1) : 82.
- [8] Liu Y, Peng Z, Liu S, et al. Efficacy and safety of ciprofol sedation in icu patients undergoing mechanical ventilation: a multicenter, single-blind, randomized, noninferiority trial. *Crit Care Med*, 2023, 51(10) : 1318-1327.
- [9] Yang Y, Xia Z, Xu C, et al. Ciprofol attenuates the isoproterenol-induced oxidative damage, inflammatory response and cardiomyocyte apoptosis. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1037151.
- [10] Zhang Y, Yu P, Bian L, et al. Survival benefits of propofol-based versus inhalational anesthesia in non-metastatic breast cancer patients: a comprehensive meta-analysis. *Sci Rep*, 2024, 14(1) : 16354.
- [11] Zhou BW, Zhang WJ, Zhang FL, et al. Propofol improves survival in a murine model of sepsis via inhibiting Rab5a-mediated intracellular trafficking of TLR4. *J Transl Med*, 2024, 22(1) : 316.
- [12] Li L, Liu X, DU J, et al. Propofol mitigates brain injury and oxidative stress, and enhances GABA_A receptor α 1 subunit expression in a rat model of lithium chloride-pilocarpine induced status epilepticus. *Turk J Med Sci*, 53(5) : 1058-1066.
- [13] Liu Z, Meng Y, Miao Y, et al. Propofol ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by enhancing macrophage M2 polarization through PPAR γ /STAT3 signaling. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(11) : 15511-15522.
- [14] Li X, Zhang Z, Li A, et al. Propofol attenuates renal ischemia/reperfusion injury by regulating the MALAT1/miR-126-5p axis. *J Gene Med*, 2021, 23(8) : e3349.
- [15] Wei Q, Zhao J, Zhou X, et al. Propofol can suppress renal ischemia-reperfusion injury through the activation of PI3K/AKT/mTOR signal pathway. *Gene*, 2019, 708: 14-20.
- [16] 李先超, 杨云朝, 喻希, 等. 环泊酚对小鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究. *中国心血管病研究*, 2023, 21(10) : 956-960.
- [17] Alves F, Lane D, Nguyen TPM, et al. In defence of ferroptosis. *Signal Transduct Target Ther*, 2025, 10(1) : 2.
- [18] Jakaria M, Belaidi AA, Bush AI, et al. Ferroptosis as a mechanism of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2021, 159(5) : 804-825.
- [19] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Ferroptosis in infection, inflammation, and immunity. *J Exp Med*, 2021, 218(6) : e20210518.
- [20] Liao S, Apaijai N, Luo Y, et al. Cell death inhibitors protect against brain damage caused by cardiac ischemia/reperfusion injury. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1) : 312.
- [21] Wang A J, Tang Y, Zhang J, et al. Cardiac SIRT1 ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by targeting sestrin 2. *Redox Biol*, 2022, 52: 102310.
- [22] Li Y, Wan TT, Li JX, et al. ACE2 rescues sepsis-associated encephalopathy by reducing inflammation, oxidative stress, and neuronal apoptosis via the Nrf2/Sestrin2 signaling pathway. *Mol Neurobiol*, 2024, 61(11) : 8640-8655.
- [23] Lee S, Shin J, Hong Y, et al. Sestrin2 alleviates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress, apoptosis, and defective invasion of human trophoblast cells. *Am J Reprod Immunol*, 2020, 83(4) : e13222.
- [24] Zhou Y, Zhang Y, Botchway B, et al. Sestrin2 can alleviate endoplasmic reticulum stress to improve traumatic brain injury by activating AMPK/mTORC1 signaling pathway. *Metab Brain Dis*, 2024, 39(3) : 439-452.
- [25] Che X, Chai J, Fang Y, et al. Sestrin2 in hypoxia and hypoxia-related diseases. *Redox Rep*, 2021, 26(1) : 111-116.
- [26] Ishihara M, Urushido M, Hamada K, et al. Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(4) : F495-F509.
- [27] Li JY, Ren C, Wang LX, et al. Sestrin2 protects dendrite cells against ferroptosis induced by sepsis. *Cell Death Dis*, 2021, 12(9) : 834.
- [28] Park SJ, Cho SS, Kim KM, et al. Protective effect of Sestrin2 against iron overload and ferroptosis-induced liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 379: 114665.
- [29] Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis. *Redox Biol*, 2019, 23: 101107.

(收稿日期: 2024 - 10 - 22)