

网络出版时间: 2023-03-07 15:04:38 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230307.1346.006.html>

iPLA2 β 通过调控铁死亡减轻高糖诱导的人肾小管上皮细胞损伤

薛璐¹, 汪靓婧², 胡雪茹², 吴永贵², 齐向明^{1, 2}

摘要 目的 探讨钙离子非依赖型磷酸酯酶 A2 β (iPLA2 β) 在高糖诱导的人肾小管上皮细胞 (HK-2 细胞) 中的表达, iPLA2 β 与铁死亡的关系以及 iPLA2 β 对高糖诱导的 HK-2 细胞损伤的保护机制。方法 用 30 mmol/L 葡萄糖刺激 HK-2 细胞, iPLA2 β 质粒转染构建过表达模型, 铁死亡抑制剂 Fer-1 和铁死亡激活剂 erastin 作为铁死亡对照组。干预 36 h 后, 试剂盒检测细胞内超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、铁含量, DCF 免疫荧光检测细胞内活性氧 (ROS) 水平。Western blot 法检测铁死亡指标 ACSL4、GPX4、LPCAT3、TFR1 的表达。结果 高糖刺激可以降低 HK-2 细胞内 iPLA2 β 的表达, HK-2 细胞内 ROS、MDA 水平升高, GSH、SOD 水平降低。Western blot 结果显示 ACSL4、LPCAT3、TFR1 表达增高, GPX4 表达降低。Fer-1 干预后上述指标改善。过表达 iPLA2 β 后, 可降低 KIM-1 表达, 减轻 HK-2 细胞损伤。进一步研究发现, 过表达 iPLA2 β 后可抑制高糖诱导的 HK-2 细胞的氧化应激和铁死亡。另外, erastin 减弱了 iPLA2 β 对高糖诱导的 HK-2 细胞损伤的保护作用。结论 iPLA2 β 通过调控铁死亡减轻高糖诱导的 HK-2 细胞损伤。

关键词 人肾小管上皮细胞; 糖尿病肾病; 铁死亡; 钙离子非依赖型磷酸酯酶 A2 β

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)03-0379-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.006

糖尿病肾病是糖尿病的主要并发症之一, 并已成为全世界终末期肾脏疾病的主要病因^[1]。目前认为, 糖尿病肾病的发病机制涉及多种因素, 包括高血糖、氧化应激、炎症反应、脂代谢紊乱、糖基化终末产物积聚等^[2]。铁死亡作为一种公认的细胞死亡方式, 游离铁的蓄积以及毒性脂质过氧化物的积累是其两个重要标志。铁死亡在糖尿病肾脏的发生发展过程中起着重要作用, 研究^[3]表明低铁饮食或铁螯合剂可以延缓糖尿病大鼠糖尿病肾病的进展。钙

离子非依赖型磷酸酯酶 A2 β (Ca²⁺-independent phospholipase A2 β , iPLA2 β), 一种新发现的铁死亡调节因子, 因与膜重塑、细胞增殖、细胞死亡和信号转导有关受到广泛的关注^[4]。iPLA2 β 在体内广泛表达, 并且在补体介导的肾小球内皮细胞损伤中起保护作用^[5]。已有文献表明, iPLA2 β 在肿瘤模型中能够通过分解过氧化脂质从而抑制铁死亡^[6], 并且是胎盘滋养层细胞防御铁死亡的中枢^[7]。然而, iPLA2 β 在糖尿病肾病中的作用尚没有被讨论过。该研究旨在探讨 iPLA2 β 通过调控铁死亡减轻高糖诱导的 HK-2 细胞损伤的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人肾小管上皮细胞 (HK-2 细胞) 购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 试剂 抗 β -actin、抗 iPLA2 β 特异性抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。抗 GPX4 特异性抗体购自杭州华安生物技术有限公司。抗 ACSL4、抗 TFR1 特异性抗体购自美国 Santa Cruz 公司。抗 LPCAT3 特异性抗体购自武汉爱博泰克生物技术有限公司。抗 KIM-1 特异性抗体购自美国 Novus 公司。脂质氧化丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒、总超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒、活性氧检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。血清铁检测试剂盒购自北京雷根生物技术有限公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自上海贝博生物技术有限公司。iPLA2 β 质粒购自汉恒生物科技 (上海) 有限公司。Fer-1、erastin 购自美国 Selleck 公司。

1.3 主要仪器 多功能酶标仪购自美国 PE 公司; 电泳仪和湿转仪购自美国伯乐公司; 荧光显影系统 Li-Cor/Odyssey 购自美国 LI-COR Biosciences 公司; 正置荧光显微镜购自德国徕卡公司; 高速冷冻微量离心机购自德国艾本德股份公司。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 HK-2 细胞加入含 10% 胎牛血清的培养基, 将培养瓶置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中

2023-02-27 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 1908085MH245)

作者单位: ¹ 安徽医科大学附属阜阳医院肾脏内科, 阜阳 236000

² 安徽医科大学第一附属医院肾脏内科, 合肥 230022

作者简介: 薛璐, 女, 硕士研究生;

齐向明, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: qxm119@163.com

培养,每天换液1次。

1.4.2 细胞分组 ①为确定高糖刺激HK-2细胞的最佳时间,分别刺激0、6、12、24、36、48 h。②为探究iPLA2β在高糖诱导HK-2细胞损伤中的作用,将HK-2细胞分为6组:NC(正常组)、MG(甘露醇组)、HG(高糖组)、HG+Vectors(高糖+空载体组)、HG+iPLA2β+OE(高糖+iPLA2β过表达组)、HG+Fer1(高糖+铁死亡抑制剂组)。③为进一步研究iPLA2β发挥作用的机制,将HK-2细胞分为4组:NC、HG、HG+iPLA2β+OE、HG+iPLA2β+OE+erastin(高糖+iPLA2β过表达+铁死亡激动剂组)。

1.4.3 细胞转染 使用Lipofectamine™2000将iPLA2β过表达质粒和空载体转染至HK-2细胞,通过Real-time PCR、Western blot检测iPLA2β表达变化。

1.4.4 Western blot 收取细胞,加入裂解液(RIPA:PMSF=100:1)提取蛋白,并进行BCA蛋白定量分析。蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,随后将蛋白转移至PVDF膜上。配制1×快速封闭液,封闭15~30 min。随后将膜分别放入抗β-actin(1:5000)、抗ACSL4(1:500)、抗GPX4(1:1000)、抗LPCAT3(1:500)、抗iPLA2β(1:500)、抗TFR1(1:500)抗KIM-1(1:500)一抗中4℃孵育过夜。用TBST洗膜3次,每次10 min。加入HRP标记的山羊抗兔/小鼠IgG二抗(1:5000)孵育50 min。TBST洗膜3次,滴加ECL发光试剂后使用凝胶成像系统进行显影,并使用Image J测量条带的灰度值。

1.4.5 Real-time PCR 收取细胞,提取总RNA为原料,用Hifair®III SuperMix plus以及反转录仪合成cDNA,再进行扩增。扩增条件设置如下:95℃预变性5 min,95℃变性10 s,60℃退火30 s,40个循环。引物序列,iPLA2β-F:5'-AAGGCCTCATCATC-CAG-3',iPLA2β-R:5'-CGGAACACCTCATCCTTCAT-3';β-actin-F:5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3',β-actin-R:5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'。仪器运行结束后获取各样本Ct值,通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法来计算基因表达量,并对各样本表达进行统计分析。

1.4.6 氧化应激指标检测 收集细胞,用细胞破碎仪破碎细胞取上清液,置冰上待测。使用BCA蛋白浓度检测试剂盒测量样品的蛋白浓度,并使用多功能酶标仪检测吸光度,根据说明书计算结果并统计分析。

1.4.7 细胞内活性氧的检测 用DCFH-DA探针来检测HK-2细胞中的ROS水平。将HK-2细胞(1×10^4 个/孔)接种到6孔板中。细胞转染及培养结束后,在室温避光下用DCFH-DA(Beyotime)染色30 min,并使用正置荧光显微镜观察拍照。

1.4.8 细胞免疫荧光 盖玻片灭菌后置于6孔板中,接种细胞生长于盖玻片上,加入高糖刺激36 h。取出六孔板,弃去培养基加PBS清洗。加入适量多聚甲醛固定细胞,10 min后PBS清洗。滴入10%山羊血清封闭30 min,弃去血清,加入抗iPLA2β(1:500)、抗KIM-1(1:500)一抗,4℃孵育过夜。第二日弃去一抗,PBS清洗。加入适量荧光二抗,37℃避光孵育1 h。取出后PBS清洗,加入DAPI染核,避光孵育10 min。取出盖玻片,滴荧光淬灭剂后封片。于倒置荧光显微镜下拍摄。

1.5 统计学处理 采用SPSS 23.0统计软件,正态分布资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用t检验,多组间差异比较采用方差分析(ANOVA)进行,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高糖刺激时间点的筛选 为了更好地研究iPLA2β在高糖诱导的HK-2细胞损伤中的作用,通过设置不同时间梯度来筛选最佳刺激时间。结果显示,高糖刺激36 h后iPLA2β降低最明显($F_{iPLA2\beta} = 107.6, P < 0.001$),且此时GPX4表达降低($F_{GPX4} = 370.4, P < 0.01$),故选取36 h作为最终刺激时间。见图1。

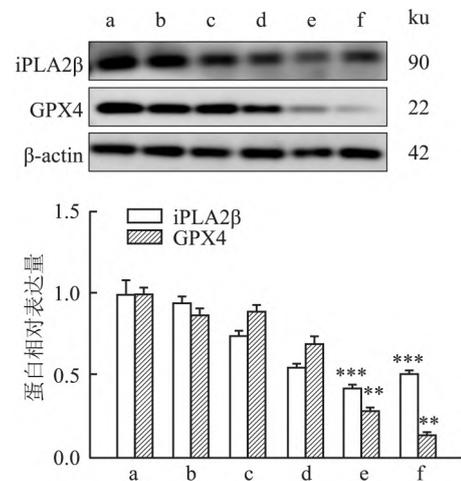


图1 高糖刺激HK-2细胞的最适时间

a: 0 h组; b: 6 h组; c: 12 h组; d: 24 h组; e: 36 h组; f: 48 h组; 与0 h组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 高糖刺激 HK-2 细胞中 iPLA2 β 的表达 高糖刺激 HK-2 细胞 36 h 后, Western blot 检测各组 HK-2 细胞内 iPLA2 β 表达。与 NC 组相比, HG 组 iPLA2 β 表达下降 ($t_{iPLA2\beta} = 14.61, P < 0.001$), 并且免疫荧光结果也证实了这一点。这些结果表明高糖刺激可使 HK-2 细胞内 iPLA2 β 表达降低。见图 2。

2.3 iPLA2 β 过表达可以减轻高糖诱导的 HK-2 细胞损伤 为了研究 iPLA2 β 在高糖诱导的 HK-2 细胞损伤中的作用, 将 iPLA2 β 过表达质粒 (iPLA2 β -OE) 转染入 HK-2 细胞后, Western blot ($t_{iPLA2\beta} = 24.28, P < 0.001$) 和 Real-time PCR ($t_{iPLA2\beta} = 25.29, P < 0.001$) 结果显示, OE 组细胞内 iPLA2 β 表达增加; 并且 Western blot 结果显示, 与 HG 组相比, HG + iPLA2 β -OE 组细胞内 KIM-1 表达下降 ($F_{KIM-1} = 109.8, P < 0.01$), 这说明过表达 iPLA2 β 可以减轻高糖诱导的 HK-2 细胞损伤。见图 3。

2.4 iPLA2 β 过表达可以减轻高糖诱导的 HK-2 细胞铁死亡和氧化应激 本研究进一步检测了铁死亡以及氧化应激相关指标的变化。Western blot 结果显示: HG 组 HK-2 细胞内 ACSL4、LPCAT3 及 TFR1 的表达增加, GPX4 的表达降低 ($F_{ACSL4} = 76.94, F_{LPCAT3} = 41.02, F_{TFR1} = 75.73, F_{GPX4} = 33.75, P < 0.001$) 并且 HG 组 HK-2 细胞内铁含量增高 ($F_{iron} = 187.8, P < 0.001$)。而与 HG 组相比, HG + iPLA2 β -OE 组细胞内 ACSL4、LPCAT3 及 TFR1 的表达减少 ($P < 0.001$), GPX4 表达增加 ($P < 0.01$), 且铁含量降低 ($P < 0.001$)。这些结果说明高糖可以诱导 HK-2 细胞内铁死亡发生, 并且 iPLA2 β 过表达

可以减轻这一现象。接着进一步检测了氧化应激相关指标的变化, 试剂盒结果显示, NC 组与 HG 组, HG 组与 HG + iPLA2 β -OE 组间 SOD、GSH、MDA 水平比较差异均有统计学意义 ($F_{SOD} = 33.54, P < 0.001, F_{GSH} = 15.44, F_{MDA} = 19.37, P < 0.01$)。与 NC 组 SOD (11.60 ± 0.94) u/mg prot、GSH (7.72 ± 1.30) umol/mg prot、MDA (4.78 ± 0.22) umol/mg prot 相比, HG 组 SOD 水平 (6.93 ± 0.44) u/mg prot 降低, GSH (4.01 ± 0.51) umol/mg prot 降低 ($P < 0.001$), MDA (5.57 ± 0.18) umol/mg prot 水平增高。与 HG 组相比, HG + iPLA2 β -OE 组 SOD 水平 (11.17 ± 0.90) u/mg prot 增高, GSH (7.23 ± 0.82) umol/mg prot 水平增高 ($P < 0.01$), MDA (4.81 ± 0.17) umol/mg prot 水平降低。且 NC 组与 HG 组相比, HG 组 ROS 水平增高。HG 组与 HG + iPLA2 β -OE 组相比, HG + iPLA2 β -OE 组 ROS 水平降低。这些结果提示高糖诱导 HK-2 细胞内氧化应激发生, 然而 iPLA2 β 过表达可减轻这一现象。综上所述, iPLA2 β 过表达可以减轻高糖诱导的 HK-2 细胞铁死亡以及氧化应激。见图 4。

2.5 Erastin 可以减弱 iPLA2 β 对高糖诱导的 HK-2 细胞损伤的保护 本研究通过使用铁死亡激动剂 erastin 来进行进一步验证。Western blot 结果显示, 与 HG + iPLA2 β -OE 组相比, HG + iPLA2 β -OE + erastin 组内 ACSL4、LPCAT3 及 TFR1 的表达增加, GPX4 的表达降低 ($F_{ACSL4} = 80.22, F_{LPCAT3} = 22.07, P < 0.01, F_{TFR1} = 40.90, F_{GPX4} = 43.79, P < 0.001$) 并且 HG + iPLA2 β -OE + erastin 组内铁含量增高 (F_{iron}

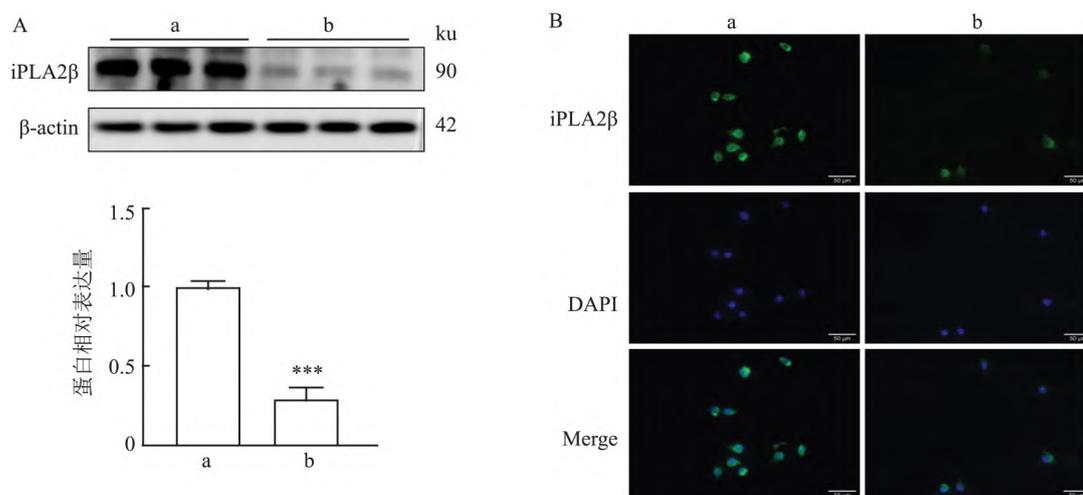


图2 高糖刺激 HK-2 细胞内 iPLA2 β 的表达

A: Western blot 法检测各组细胞内 iPLA2 β 的表达; B: 免疫荧光检测各组细胞内 iPLA2 β 的表达; a: NC 组; b: HG 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

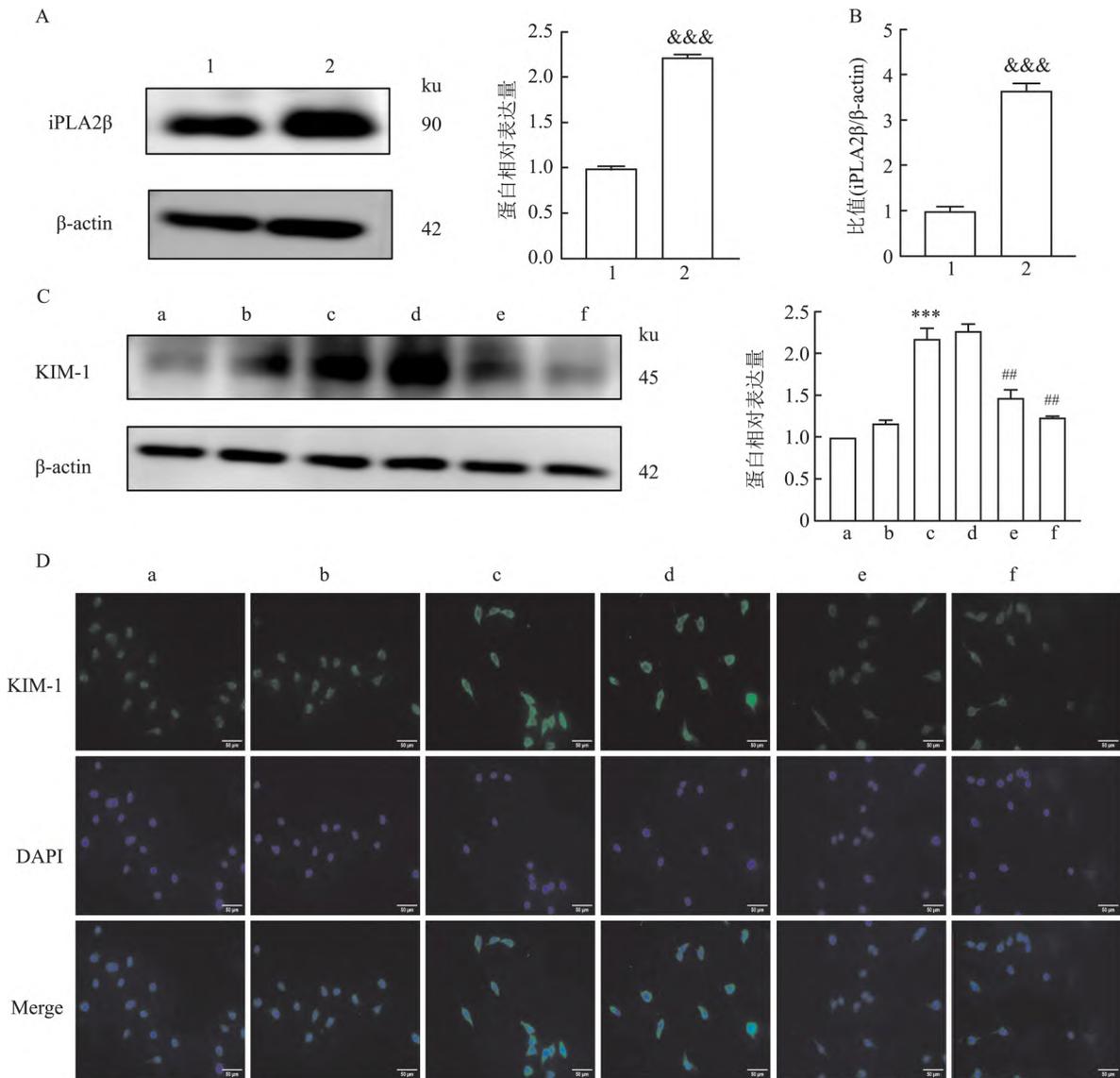


图3 iPLA2β减轻高糖诱导的HK-2细胞损伤

A: Western blot 法检测 iPLA2β 过表达质粒转染成功 B: Real-time PCR 显示 iPLA2β 过表达质粒转染成功; 1: Vector(空载体)组; 2: OE(过表达)组; C: Western blot 法检测各组细胞内 KIM-1 表达水平; D: 免疫荧光检测各组细胞内 KIM-1 的表达; a: NC 组; b: MG 组; c: HG 组; d: HG + Vectors 组; e: HG + iPLA2β + OE 组; f: HG + Fer-1 组; 与空载体组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HG 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

= 1 056, $P < 0.001$)。试剂盒结果显示, HG + iPLA2β-OE 组与 HG + iPLA2β-OE + erastin 组间 SOD、GSH、MDA 水平比较差异均有统计学意义 ($F_{SOD} = 18.9, P < 0.01, F_{GSH} = 101.6, P < 0.001, F_{MDA} = 373.2, P < 0.001$)。与 HG + iPLA2β-OE 组 SOD (8.47 ± 0.10) u/mg prot、GSH (10.24 ± 0.35) umol/mg prot、MDA (5.76 ± 0.92) umol/mg prot 相比, HG + iPLA2β-OE + erastin 组 SOD 水平 (7.13 ± 0.45) u/mg prot 降低, GSH 水平 (6.61 ± 0.09) umol/mg prot 降低, MDA 水平 (10.97 ± 0.07) umol/mg prot 增高。且与 HG + iPLA2β-OE 组相比, HG +

iPLA2β-OE + erastin 组 ROS 含量增高。这些结果提示在 erastin 处理下, iPLA2β 对铁死亡以及氧化应激指标的改善作用均被减弱。见图 5。

3 讨论

糖尿病肾病已经成为终末期肾脏病的主要原因之一, 占慢性肾脏病患者死亡率的 20% ~ 30% [8]。既往对糖尿病肾病的研究主要集中在肾小球, 然而越来越多的研究表明, 肾小管损伤与糖尿病肾病的发生密切相关。肾小管易受到糖尿病代谢紊乱的影响, 高血糖、氧化应激、晚期糖基化终末产物积聚、脂

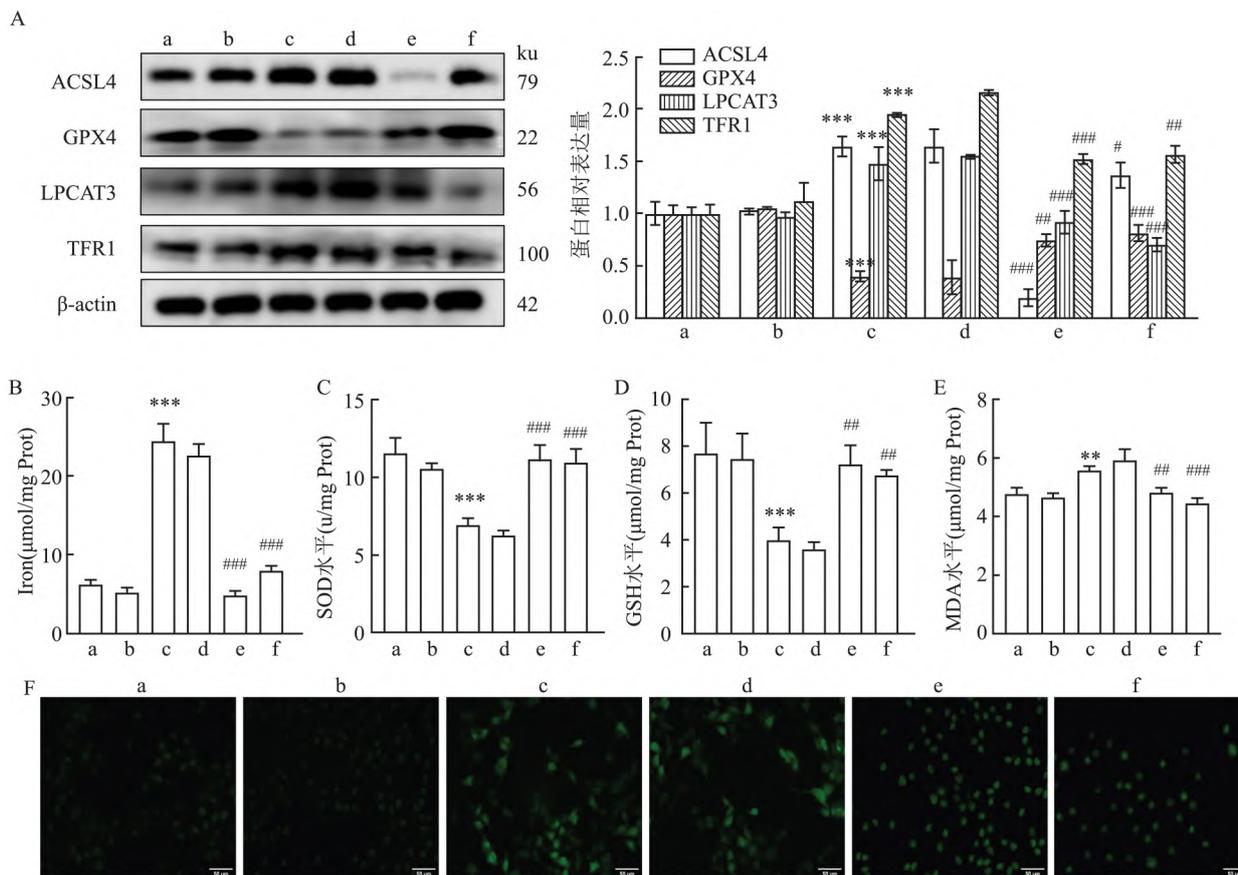


图4 iPLA2β减轻高糖诱导的铁死亡和氧化应激损伤

A: Western blot 法检测各组细胞内 ACSL4、LPCAT3、TFR1、GPX4 的表达水平; B: 铁离子试剂盒检测各组细胞内铁含量; C: SOD 试剂盒检测各组细胞内 SOD 水平; D: GSH 试剂盒检测各组细胞内 GSH 水平; E: MDA 试剂盒检测各组细胞内 MDA 水平; F: DCFH-DA 探针检测各组细胞内 ROS 水平; a: NC 组; b: MG 组; c: HG 组; d: HG + Vectors 组; e: HG + iPLA2β + OE 组; f: HG + Fer-1 组; 与 NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HG 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

代谢紊乱都会导致小管上皮细胞衰老或发生不同形式的细胞死亡^[9]。因此对肾小管细胞损伤相关机制的探究可能为糖尿病肾病的诊治提供新的思路。

铁死亡是一种以铁超载、活性氧积累和脂质过氧化为特征,在遗传、生化和形态上不同于其他类型的细胞死亡。其中脂质过氧化物生成关键酶 ACSL4、LPCAT3 和铁代谢关键介质 TFR1 能够有效反映铁死亡的发生。GPX4 是铁死亡负性调控因子,可与谷胱甘肽(GSH)协同将脂质过氧化产物转变为无毒的脂质醇。本研究中,高糖可以诱导 HK-2 细胞内 ACSL4、LPCAT3、TFR1 表达增高,并且 GPX4、GSH 表达降低。同时,高糖还可以诱导 HK-2 细胞中氧化应激水平增加,主要表现为 ROS 的蓄积及 MDA 含量的增多。由此可见,高糖环境下小管细胞内发生的铁死亡,可能与糖尿病肾病的发病机制有着密切联系。

iPLA2β 作为磷脂酶 A2 家族中的一员,参与多

种生物学过程,包括膜重塑、细胞增殖、骨形成、男性生育、细胞死亡和信号转导等^[10]。已有研究显示 iPLA2β 可以保护不同的细胞免受氧化应激损伤,如在 INS-1 胰岛素瘤细胞中过表达 iPLA2β 可增强心磷脂的修复。iPLA2β 可以优先降解过氧化的磷脂,而氧化的含多不饱和脂肪酸的磷脂是铁死亡的关键执行者。iPLA2β 能够从脂质的甘油骨架上切割酰基尾巴,并从膜磷脂中释放氧化脂肪酸而发挥作用。考虑到 iPLA2β 的抗氧化以及对于过氧化脂质的消除作用,推测其在高糖诱导的 HK-2 细胞损伤中的作用可能与铁死亡相关^[11-12]。本研究中,在高糖诱导的 HK-2 细胞中 iPLA2β 表达降低,氧化应激及铁死亡增加,肾脏损伤因子 KIM-1 表达增高提示细胞损伤加重。而在过表达 iPLA2β 后,上述现象得到了明显改善,这说明过表达 iPLA2β 可以减弱高糖刺激诱导的铁死亡。此外,进一步使用铁死亡激动剂 erastin 来进行验证,表明 erastin 可以减弱 iPLA2β

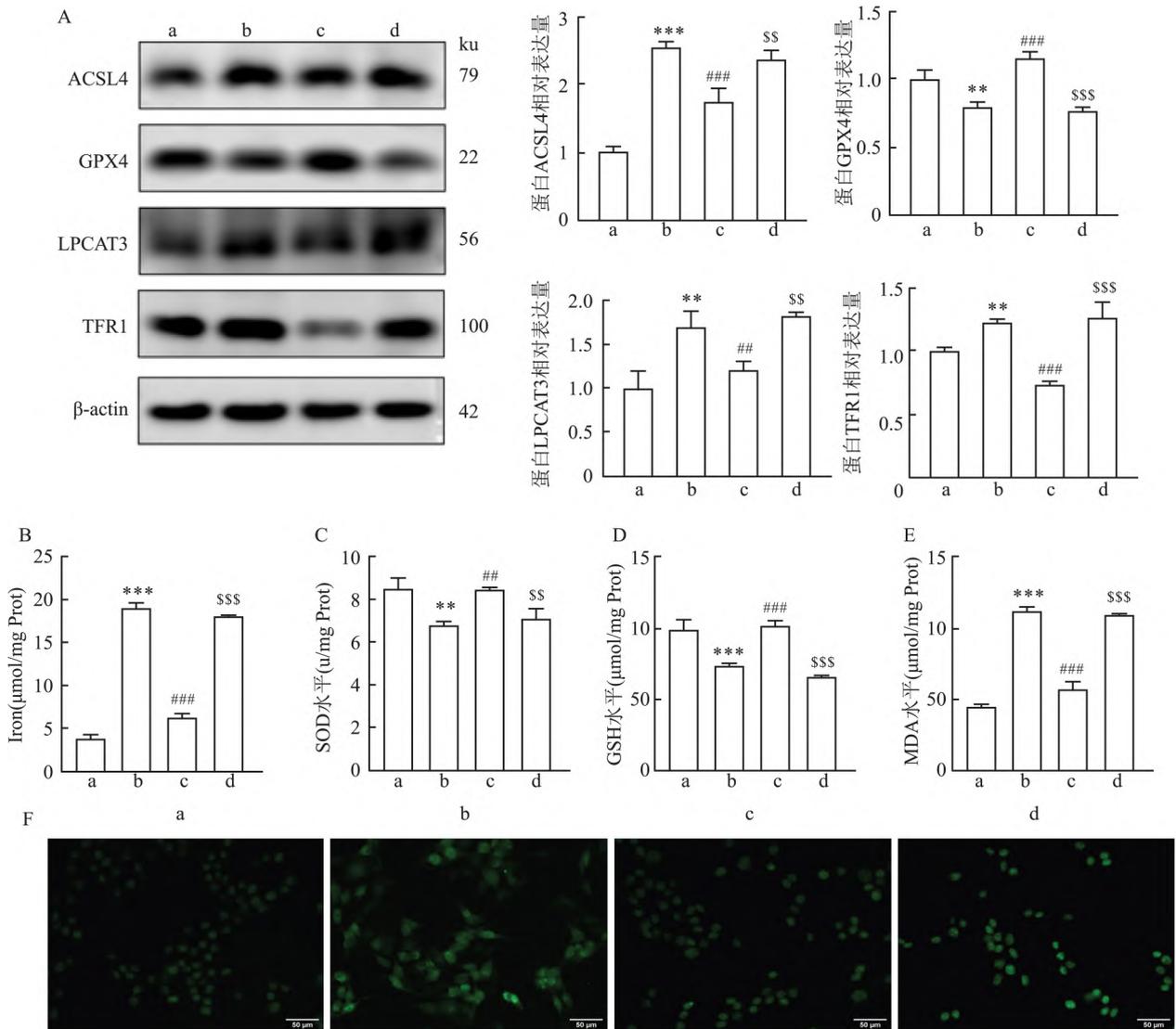


图5 Erastin 减弱 iPLA2β 对高糖诱导的 HK-2 细胞损伤的保护作用

A: Western blot 法检测各组细胞内 ACSL4、LPCAT3、TFR1、GPX4 的表达水平; B: 铁离子试剂盒检测各组细胞内铁含量; C: SOD 试剂盒检测各组细胞内 SOD 水平; D: GSH 试剂盒检测各组细胞内 GSH 水平; E: MDA 试剂盒检测各组细胞内 MDA 水平; F: DCFH-DA 探针来检测各组细胞内 ROS 水平; a: NC 组; b: HG 组; c: HG + iPLA2β + OE 组; d: HG + iPLA2β + OE + erastin 组; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 HG 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$; 与 HG + iPLA2β-OE 组相比: § $P < 0.05$, §§ $P < 0.01$, §§§ $P < 0.001$

对于铁死亡以及氧化应激指标的改善作用,提示 iPLA2β 是铁死亡的负性调控因子。

综上所述,高糖环境下 HK-2 细胞内铁死亡增加,GSH 消耗,脂质过氧化物及活性氧堆积。而过表达 iPLA2β 后,细胞内铁离子含量降低,铁死亡相关指标均有改善,同时细胞内 MDA 以及 ROS 水平降低,GSH 及 SOD 含量均有增高,从而减轻了高糖诱导的 HK-2 细胞损伤。本研究为糖尿病肾病的防治提供了新的思路,但仅从体外实验初步探讨 iPLA2β 对高糖环境下小管细胞的保护作用,并且 iPLA2β 调控铁死亡的具体机制尚不明确,有待进一步深入探讨。

参考文献

[1] 聂振勇,赵 晶,孙璇君,等. 糖尿病肾病患者肾脏巨噬细胞 Bruton 酪氨酸激酶激活与肾功能的相关性研究 [J]. 安徽医科大学学报,2021,56(12): 1897-7.

[2] Zhang Q, Hu Y, Hu J E, et al. Sp1-mediated upregulation of Prdx6 expression prevents podocyte injury in diabetic nephropathy via mitigation of oxidative stress and ferroptosis [J]. Life Sci, 2021,278: 119529.

[3] Matsumoto M, Sasaki N, Tsujino T, et al. Iron restriction prevents diabetic nephropathy in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rat [J]. Ren Fail,2013,35(8): 1156-62.

[4] Turk J, White T D, Nelson A J, et al. iPLA(2) β and its role in

- male fertility , neurological disorders , metabolic disorders , and inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids* , 2019 , 1864(6) : 846 – 60.
- [5] Cohen D , Papillon J , Aoudjit L , et al. Role of calcium-independent phospholipase A2 in complement-mediated glomerular epithelial cell injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* , 2008 , 294(3) : F469 – 79.
- [6] Chen D , Chu B , Yang X , et al. iPLA2beta-mediated lipid detoxification controls p53-driven ferroptosis independent of GPX4 [J]. *Nat Commun* , 2021 , 12(1) : 3644.
- [7] Beharier O , Tyurin V A , Goff J P , et al. PLA2G6 guards placental trophoblasts against ferroptotic injury [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 2020 , 117(44) : 27319 – 28.
- [8] Wang W J , Jiang X , Gao C C , et al. Salusinbeta participates in high glucose induced HK2 cell ferroptosis in a Nrf2 dependent manner [J]. *Mol Med Rep* , 2021 , 24(3) : 674.
- [9] Shen S , Ji C and Wei K. Cellular senescence and regulated cell death of tubular epithelial cells in diabetic kidney disease [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)* , 2022 , 13: 924299.
- [10] White T D , Almutairi A , Tusing Y G , et al. The impact of the Ca⁽²⁺⁾-independent phospholipase A2beta (iPLA2beta) on immune cells [J]. *Biomolecules* , 2021 , 11(4) : 577.
- [11] Sun W Y , Tyurin V A , Mikulska-Ruminska K , et al. Phospholipase iPLA(2) β averts ferroptosis by eliminating a redox lipid death signal [J]. *Nat Chem Biol* , 2021 , 17(4) : 465 – 76.
- [12] Chen V , Bo C and Gu W. The roads to ferroptosis under homeostatic versus pathological conditions [J]. *Mol Cell Oncol* , 2021 , 8(5) : 1970477.

iPLA2β prevents high glucose – induced injury of human renal tubular epithelial cells *via* regulating ferroptosis

Xue Lu¹ , Wang Jingjing² , Hu Xueru² , Wu Yonggui² , Qi Xiangming^{1,2}

¹Dept of Nephrology , Fuyang Hospital Affiliated to Anhui Medical University , Fuyang 236000;

²Dept of Nephrology , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the expression of Ca²⁺-independent phospholipase A2β (iPLA2β) in human renal tubular epithelial cells (HK-2) induced by high glucose(HG) , the relationship between iPLA2β and ferroptosis and the protective mechanism of HG treated HK-2 cells. **Methods** The HK-2 cells were treated with 30 mmol/L glucose , the overexpression model was constructed by transfection of iPLA2β plasmid. Ferrostatin-1 (Fer-1) (an inhibitor of ferroptosis) and erastin (an activator of ferroptosis) were used as controls. After 36 hours of intervention , the kit detected the levels of superoxide (SOD) , malonaldehyde(MDA) and iron in HK-2 cells. DCF immunofluorescence was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) . The expression of ACSL4 , GPX4 , LPCAT3 , TFR1 in HK-2 cells were measured by Western blot. **Results** The expression of iPLA2β down-regulated in HG-induced injury of HK-2 cells. The levels of ROS and MDA in HK-2 cells increased , while the levels of GSH and SOD decreased. The expression of ACSL4 , LPCAT3 and TFR1 decreased , and the expression of GPX4 increased in HK-2 cells. However , these indexes were improved after Fer-1 intervention. iPLA2β overexpression could reduce the injury of HK-2 cells *via* attenuation of KIM-1. Further research revealed that iPLA2β overexpression inhibited oxidative stress and ferroptosis in HK-2 cells injury induced by high glucose. Meanwhile , the improvement effect of iPLA2β on HG-induced HK-2 cells damage could be eliminated by erastin. **Conclusion** iPLA2β prevents HG-induced injury of HK-2 cells *via* regulating ferroptosis.

Key words human renal tubular epithelial cells; diabetic kidney disease; ferroptosis; iPLA2β