

肌肽对链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠肾脏铁死亡和炎症的影响

张 崧,刘雪琪,姜 玲,吴永贵

摘要 目的 探讨肌肽(CAR)对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病小鼠肾脏铁死亡和炎症的影响。方法 以 STZ 诱导 C57 小鼠构建 1 型糖尿病小鼠模型(STZ 模型),以正常 C57 小鼠作为正常对照。小鼠分为 5 组(每组 6~8 只):正常对照(NC)组、肌肽(CAR)组、STZ 模型(STZ)组、STZ 模型 + 肌肽(STZ + CAR)组、STZ 模型 + 铁死亡抑制剂(STZ + Fer-1)组。喂养小鼠 16 周后,收集小鼠血清检测血肌酐(CRE)和尿素氮(BUN)水平,尿液检测小鼠 24 h 尿蛋白水平。HE 染色、PAS 染色观察肾脏病理损伤程度。透射电镜观察肾脏线粒体的形态。PCR 检测小鼠肾脏组织炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达。免疫荧光法检测小鼠肾脏活性氧(ROS)的表达。Western blot 法检测肾脏组织铁死亡指标谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX 4)和长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(ACSL 4)蛋白表达水平的改变。对小鼠肾脏组织进行丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)和 Fe²⁺含量的测定。结果 与 NC 组相比,STZ 组 CRE 和 BUN 水平升高($P < 0.001$);与 STZ 组相比,STZ + CAR 组 CRE 和 BUN 水平降低($P < 0.001$, $P < 0.01$)。肾脏组织病理学检查显示,与 NC 组相

比,STZ 组小鼠肾脏组织肾小管扩张明显、炎症细胞浸润和糖原沉积增加;与 STZ 组相比,STZ + CAR 组肾小管扩张、炎症细胞浸润和糖原沉积减少。透射电镜检测结果显示 STZ 组小鼠肾脏线粒体肿胀,膜密度增加,线粒体脊减少或缺失,STZ + CAR 组和 STZ + Fer-1 组肾小管扩张明显改善、炎症细胞浸润减少。Real-time PCR 检测结果显示,与 NC 组相比,STZ 组小鼠肾脏炎症因子(IL-1 β 、IL-6、MCP-1 和 TNF- α)的 mRNA 表达水平升高($P < 0.001$ 或 $P < 0.01$);与 STZ 组相比,STZ + CAR 组 IL-1 β 、IL-6、MCP-1 和 TNF- α 的 mRNA 表达下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。免疫荧光结果显示,与 NC 组相比,STZ 组小鼠肾脏组织 ROS 水平升高($P < 0.001$);与 STZ 组相比,STZ + CAR 组小鼠肾脏组织 ROS 水平表达下降($P < 0.01$)。与 NC 组相比,STZ 组小鼠肾脏 GPX4 表达与 GSH 含量下降($P < 0.001$),ACSL4 蛋白表达、MDA 和 Fe²⁺含量增加($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),STZ + CAR 组 GPX4 表达与 GSH 含量增加($P < 0.01$),ACSL4 蛋白表达、MDA 和 Fe²⁺含量下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。结论 CAR 能够抑制 STZ 诱导的糖尿病小鼠的铁死亡和炎症,改善糖尿病小鼠肾脏病理损伤。

关键词 糖尿病肾病;铁死亡;炎症;肌肽

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)08-1322-07
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.08.013

2023-06-17 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81761138042)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肾脏内科,合肥 230022

作者简介:张 崧,女,硕士研究生;

吴永贵,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

糖尿病肾病是糖尿病常见的微血管并发症,也

CD161⁺, MPO⁺ and CD3⁺ cells in the hippocampus at 21 days after HI. Immunohistochemistry was used to detect ICAM-1 and C3a expression in the hippocampal CA1 region; and Western blot was used to detect tumor necrosis factor interleukin IL-1 β , TNF- α and IL-10 expression. **Results** Compared with control group, significantly raised TLR4 expression was observed in the left hippocampal CA1, CA3 and DG regions($P < 0.01$ or $P < 0.05$), while the expression in the TAK-242 group lowered compared to the HI group ($P < 0.05$). The number of GFAP⁺ cells in the CA1 area of the hippocampus in the TAK-242 group of neonatal rats decreased compared to which in the HI group at 21 days after HI($P < 0.05$), but the number of CD3⁺T lymphocytes in the hippocampal CA1 area of new born rats in the HI group increased compared to which in the Control group ($P < 0.05$), but the difference between TAK-242 and the Control group was not statistically significant. The number of Iba-1⁺ cells, MPO⁺ cells, CD161⁺ cells, the expression of ICAM-1 and C3a in hippocampal CA1 region, and the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-10 in hippocampus of rats were not different among groups at 21 days after HIBD. **Conclusion** Early inhibition of TLR4 may ameliorate adolescent neuroimmune disorders by reducing the increase of hippocampal astrocytes after neonatal HIBD.

Key words hypoxic-ischemic brain damage; hippocampus; TLR4; rat; neuroimmune

是导致终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)的主要原因之一^[1-2]。其特征是蛋白尿及肾功能的进行性减退,延缓其进展仍然是一个全球性难题。肌肽(carnosine, CAR)是一种由 β -丙氨酸和L-组氨酸组成的水溶性二肽,天然存在于骨骼肌、大脑和心脏中。CAR在体内广泛分布,且具有多种生物学活性如抗炎、抗氧化应激、抑制RAS系统活性、抑制AGEs及ALEs和缓冲生理酸碱度^[3]。课题组前期研究^[4]表明CAR可以通过抑制焦亡减轻糖尿病肾病中的足细胞损伤。近期研究^[5-6]表明铁死亡在糖尿病肾病发生发展中起关键作用,通过上调核因子E2相关因子2(nuclear factor E2 related factor 2, NRF2)可以抑制铁死亡,从而延缓糖尿病肾病进展^[7]。该研究旨在探讨CAR对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病小鼠肾脏铁死亡和炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 本实验使用STZ诱导C57BL/6J(约6~8周龄)小鼠构建1型糖尿病小鼠模型,正常雄性C57BL/6J小鼠作为对照。雄性C57BL/6J小鼠(约6~8周龄)购自安徽医科大学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(皖)2017-001,使用许可证号:SYXK(皖)2017-006,并在安徽医科大学动物中心SPF级动物房饲养。实验小鼠在标准条件下的笼子中进行饲养,并在恒温(22 ± 2)℃、湿度为60%、光暗周期为12 h/12 h的房间中,可以自由获取食物和水。禁食12 h后,根据小鼠体质量,给予小鼠腹腔注射50 mg/kg的STZ,连续5 d。在1周后取小鼠尾静脉血,用血糖仪测量血糖,高于16.7 mmol/L则造模成功为糖尿病模型。所有小鼠被随机分为5组(每组6~8只):正常对照(NC)组、肌肽(CAR)组、STZ模型(STZ)组、STZ模型+肌肽(STZ+CAR)组、STZ模型+铁死亡抑制剂组(STZ+Fer-1组)。根据每笼小鼠体质量,称计算好的量的CAR粉末于EP管中,给药前估算好每笼老鼠每天饮用水总量,将称好的CAR粉末溶于饮用水中。CAR组和STZ+CAR组小鼠均同样给药,CAR给药浓度为1 g/kg。每日给药共16周,并且每天测量每笼小鼠的饮水量和体质量。将Fer-1粉末溶解在DMSO中,用生理盐水稀释,使DMSO的最终浓度为1%,根据每只小鼠体质量计算注射量,Fer-1溶液每天经腹腔注射给药,浓度为5 mg/kg,共给药16周。实验动物均经过安徽医科大学动物研究伦

理委员会批准(编号:LLSC20170487)。

1.2 主要仪器 石蜡包埋机、石蜡切片机和冰冻切片机购自德国Lecia公司;多功能酶标仪购自美国PE公司;BX 50光学显微镜购自日本OLYMPUS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;NanoDrop 2000超微量分光光度计购自上海Thermo公司;透射电镜(JEM 1400)购自日本电子公司。

1.3 方法

1.3.1 一般生化指标的检测 称量并记录小鼠的体质量。剪去小鼠尾尖,采小鼠尾尖血通过血糖仪测量小鼠血糖。小鼠灌胃CAR 16周后,吸入5%异氟醚麻醉小鼠,用剪刀剪去小鼠眼球周围的胡子,以免影响取血。用弯镊子摘取小鼠右侧眼球进行眼球取血,同时左手轻轻按压小鼠心脏,将血收集在标记好的EP管中,约700 μ l。将收集好的小鼠血液放置在室温静置2 h,然后放入离心机离心20 min,转速为2 000 r/min,收集血清样本,按照说明书检测血清CRE和BUN水平。取出小鼠肾脏组织,用纱布吸干组织表明多余水分,称量肾脏的质量并计算肾质量与体质量的比值。进行动物实验前,先在SPF动物房绑好代谢笼,将每只小鼠放入,给予食物和水,24 h后,收集每只小鼠的尿液,离心机离心尽可能去除尿液里的粪便,记录尿量,按照说明书步骤检测小鼠24 h尿蛋白含量。

1.3.2 肾脏组织病理形态学观察 肾脏组织用4%多聚甲醛固定,脱水后包埋在石蜡中,切成4 μ m厚切片,按照说明书进行苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色和糖原染色(periodic acid-schiff, PAS)染色。

1.3.3 肾脏组织电镜观察 将肾脏组织切成2 mm $\times$ 2 mm大小,先依次放置于3%戊二醛和1%锇酸中进行固定处理,用丙酮对其脱水,最后用环氧树脂对组织进行包埋。定位,制作超薄切片。用醋酸铀和枸橼酸铅对切片进行双重染色。然后在透射电镜下观察肾脏细胞线粒体形态和结构并拍照。

1.3.4 免疫荧光染色 石蜡切片于烘箱中70℃加热至蜡融化,依次浸泡于二甲苯和梯度乙醇中。滴加内源性过氧化氢酶阻断剂覆盖组织,室温静置20 min。使用枸橼酸盐进行微波加热修复抗原。随后10%山羊血清在37℃封闭1 h。使用活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒检测小鼠肾脏ROS,并在显微镜下观察载玻片并拍照。使用Image J分析图片,计算阳性面积百分比。

1.3.5 Real-time PCR 实验 使用 TRIzol 试剂从肾组织中提取总 RNA。使用 NanoDrop 2000 分光光度计评估 RNA 的浓度和纯度。将 RNA 逆转录成 cDNA 并进行扩增。PCR 循环条件如下:95 ℃、1 min, 95 ℃、15 s, 60 ℃、15 s, 72 ℃、45 s, 共 40 个循环。采用 SYBR® Green RT-PCR 检测白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、IL-6、 β -actin 的 mRNA 水平。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析测定基因表达水平。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 目的基因引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
IL-1 β	F:CTTTGAAGTTGACGGACCC R:TGAGTGATACTGCCTGCCTG
IL-6	F:CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA R:TGCAAGTGCATCATCGTTGTTC
TNF- α	F:CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA R:TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
MCP-1	F:CTTCTGGGCTGCTGTTC R:CCAGCCTACTCATTTGGGATCA
β -actin	F:AGTGTGACGTTGACATCCGT R:TGCTAGGAGCCAGAGCACTA

1.3.6 Western blot 实验 取适量肾脏组织,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-聚丙烯酰胺凝胶电泳,随后将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。配制 1 $\times$ 快速封闭液,封闭 15~30 min。随后将膜分别放入抗 β -actin (1:5 000)、抗 GPX4 (1:500) 和抗 ACSL4 (1:1 000) 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 (1:5 000) 孵育 50 min。TBST 洗膜 3 次,使用化学发光系统曝光条带。使用 Image J 测量条带的灰度值。

1.3.7 MDA、GSH 和 Fe²⁺ 含量测定 每组均切除肾组织 (50 mg),置于冷生理盐水中。用振动均质器将肾组织均质。离心 10 min 后收集上清液,测定

细胞和组织的 GSH、MDA 和铁浓度。按照说明书操作,将工作试剂和样品添加到 96 孔板中进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行分析,所有实验数据采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较行 LSD 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CAR 对小鼠一般指标的影响 与 NC 组相比,STZ 组小鼠肾质量/体质量 ($P<0.01$) 和血糖 ($P<0.001$) 升高;与 STZ 组相比,STZ + CAR 组肾质量/体质量和血糖无明显变化。与 NC 组相比,STZ 组 CRE、BUN 上升 ($P<0.001$);与 STZ 组相比,STZ + CAR 组和 STZ + Fer-1 组 CRE ($P<0.001$, $P<0.01$)、BUN ($P<0.01$) 水平下降。见表 2。

2.2 CAR 对小鼠肾组织病理形态的影响 HE 染色结果显示,NC 组小鼠肾小管形态正常,无扩张,无明显炎症细胞浸润,细胞形态清晰,而 STZ 组小鼠肾小管明显扩张、大量炎症细胞浸润。与 STZ 组相比,STZ + CAR 组小鼠肾小管扩张明显改善、炎症细胞浸润减少,见图 1A,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。PAS 染色结果显示,STZ 组小鼠糖原沉积明显,肾小管扩张,而 STZ + CAR 组小鼠肾脏糖原沉积减少,肾小管扩张改善,见图 1B,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。

2.3 CAR 对小鼠肾组织炎症的影响 Real-time PCR 检测显示,与 NC 组相比,CAR 组肾脏组织中 IL-1 β 、IL-6、MCP-1 和 TNF- α mRNA 表达差异无统计学意义,而 STZ 组中的表达均升高 ($P<0.001$, $P<0.01$, $P<0.001$, $P<0.01$);与 STZ 组相比,STZ + CAR 组 IL-1 β 、IL-6、MCP-1 和 TNF- α 的 mRNA 表达下降 ($P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.05$)。结果表明 STZ 小鼠肾脏组织炎症反应增加,CAR 可以减轻 STZ 小鼠肾脏炎症反应。见图 2。

2.4 CAR 对小鼠肾组织 ROS 的影响 免疫荧光检测结果显示,与 NC 组相比,CAR 组肾脏组织 ROS

表 2 CAR 对 STZ 小鼠一般指标的影响 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

项目	NC 组	CAR 组	STZ 组	STZ + CAR 组	STZ + Fer-1 组
肾质量/体质量 (g/100 g)	0.62 $\pm$ 0.17	0.66 $\pm$ 0.19	1.16 $\pm$ 0.44**	0.78 $\pm$ 0.57###	0.84 $\pm$ 0.69##
血糖 (mmol/L)	7.12 $\pm$ 0.47	6.76 $\pm$ 0.64	23.58 $\pm$ 3.55***	22.28 $\pm$ 4.27	22.50 $\pm$ 5.32
血清 CRE (μ mol/L)	50.52 $\pm$ 3.57	44.23 $\pm$ 2.97	191.85 $\pm$ 12.73***	86.22 $\pm$ 4.69###	130.31 $\pm$ 4.26##
血清 BUN (mmol/L)	4.71 $\pm$ 1.13	4.80 $\pm$ 1.21	10.25 $\pm$ 1.52***	6.23 $\pm$ 1.93##	7.57 $\pm$ 1.43##
24 h 尿白蛋白 (mg/24 h)	18.27 $\pm$ 1.03	17.33 $\pm$ 1.25	431.46 $\pm$ 19.57***	168.37 $\pm$ 16.28##	194.76 $\pm$ 17.45##

与 NC 组比较:** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与 STZ 组比较:## $P<0.01$, ### $P<0.001$

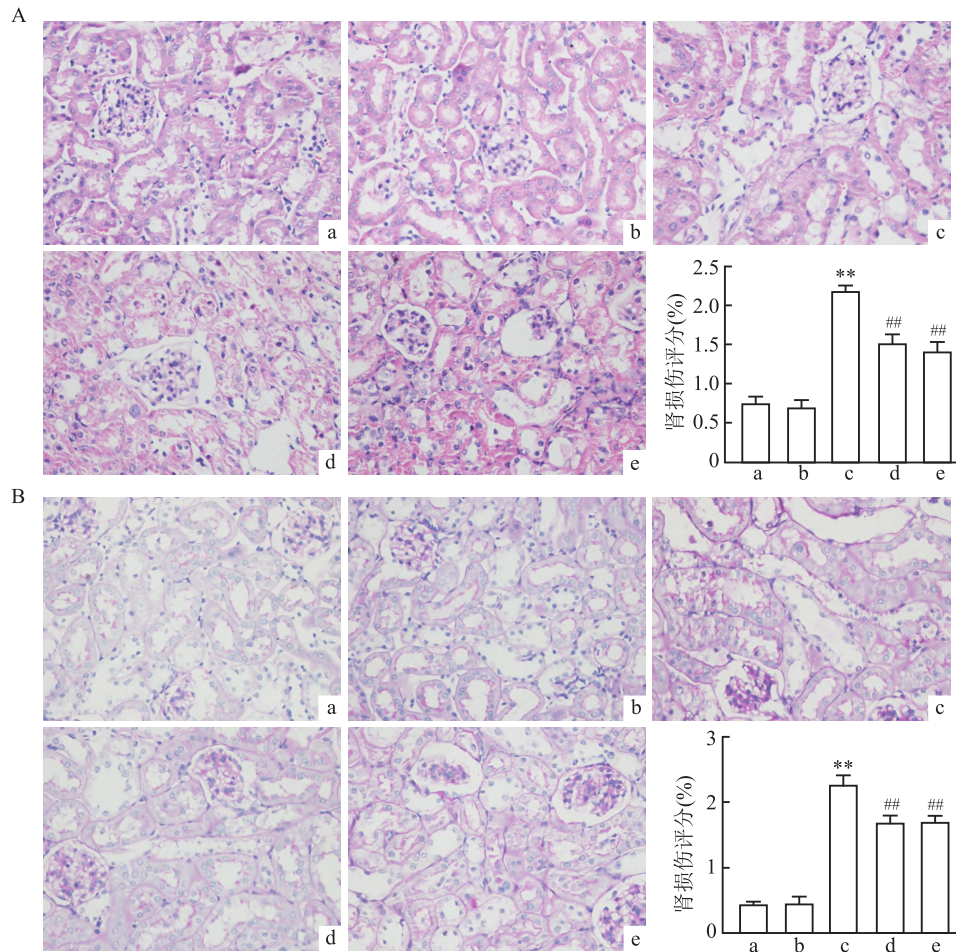


图1 CAR对STZ小鼠肾脏组织病理改变的影响 ×400

A: HE染色各组肾脏病理损伤图片观察及其直方图分析; B: PAS染色观察CAR对STZ小鼠肾脏组织糖原沉积的影响及其直方图分析; a: NC组; b: CAR组; c: STZ组; d: STZ + CAR组; e: STZ + Fer-1组; 与NC组比较: ** $P < 0.01$; 与STZ组比较: ## $P < 0.01$

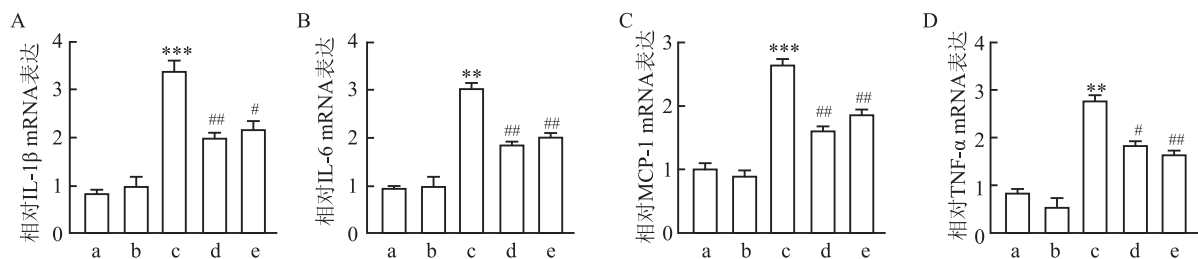


图2 Real-time PCR法检测CAR对STZ小鼠肾脏组织IL-1β、IL-6、MCP-1和TNF-α表达的影响

A: Real-time PCR法检测小鼠肾脏组织中IL-1β的表达; B: Real-time PCR法检测小鼠肾脏组织中IL-6的表达; C: Real-time PCR法检测小鼠肾脏组织中MCP-1的表达; D: Real-time PCR法检测小鼠肾脏组织中TNF-α的表达; a: NC组; b: CAR组; c: STZ组; d: STZ + CAR组; e: STZ + Fer-1组; 与NC组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与STZ组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表达差异无统计学意义, STZ组小鼠肾脏中ROS水平升高($P < 0.001$); 与STZ比较, STZ + CAR组和STZ + Fer-1组ROS水平下降($P < 0.01$)。见图3。

2.5 CAR对小鼠肾脏线粒体形态的影响 透射电镜检测小鼠肾脏线粒体形态, 与NC组相比, STZ小鼠线粒体肿胀, 膜密度增加, 线粒体脊减少或缺失,

然而, STZ + CAR组和STZ + Fer-1组小鼠线粒体肿胀减轻, 膜密度降低, 线粒体脊增加, 说明STZ小鼠肾脏的线粒体发生了铁死亡样改变, CAR可以抑制STZ小鼠肾脏线粒体形态的改变。见图4。

2.6 CAR对STZ诱导的小鼠肾脏铁死亡的影响

Western blot检测各组肾脏组织GPX4以及ACSL4

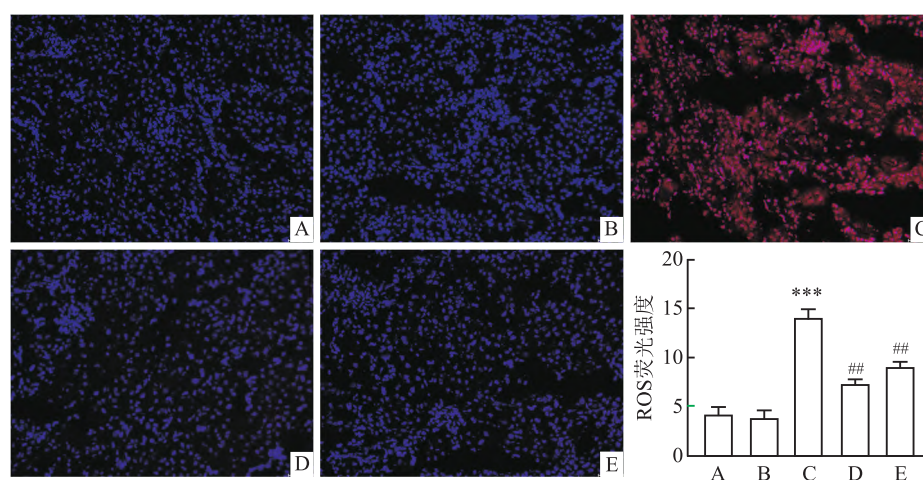


图3 免疫荧光法检测 CAR 对 STZ 小鼠肾脏组织 ROS 表达的影响 ×400

A: NC 组; B: CAR 组; C: STZ 组; D: STZ + CAR 组; E: STZ + Fer-1 组; 与 NC 组比较: *** $P < 0.001$; 与 STZ 组比较: ## $P < 0.01$

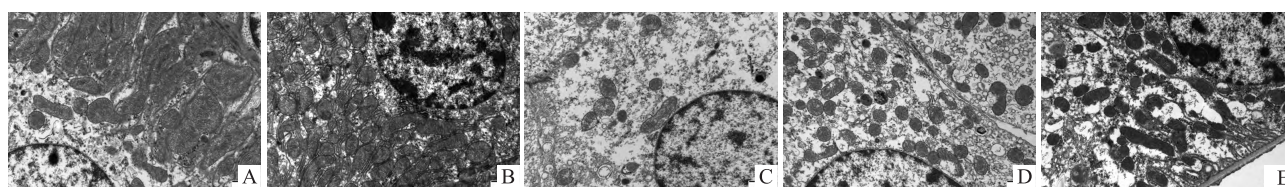


图4 透射电镜检测 CAR 对 STZ 小鼠肾脏组织线粒体形态的影响 ×10 000

A: NC 组; B: CAR 组; C: STZ 组; D: STZ + CAR 组; E: STZ + Fer-1 组

蛋白水平的表达,与 NC 组相比,NC + CAR 组肾脏组织 GPX4 和 ACSL4 表达差异无统计学意义,STZ 组肾脏组织 GPX4 的表达下降($P < 0.001$),ACSL4 表达升高($P < 0.01$);与 STZ 组相比,STZ + CAR 组和 STZ + Fer-1 组肾脏组织 GPX4 表达升高,ACSL4 表达下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。MDA、GSH 和 Fe^{2+} 检测结果显示,与 NC 组相比,STZ 组肾脏组织 MDA 和 Fe^{2+} 含量表达升高,GSH 含量表达下降($P < 0.001$);与 STZ 组相比,STZ + CAR 组和 STZ + Fer-1 组肾脏组织 GSH 含量表达升高,MDA 和 Fe^{2+} 含量表达下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。上述结果提示 STZ 小鼠肾脏组织发生了铁死亡,而 CAR 抑制了糖尿病肾病的铁死亡。见图 5。

3 讨论

糖尿病肾病的发病机制复杂,既往对糖尿病肾病的研究主要集中在自噬、凋亡、纤维化等,糖尿病肾病仍缺乏有效的治疗,因此,寻找新的机制及新的干预靶点十分重要。糖尿病肾病在临床上是以蛋白尿和肾功能的进行性失代偿为特征。研究^[2-3,8]表明汉黄芩素通过抑制 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路来

改善糖尿病肾病中的肾小管上皮细胞损伤,小檗碱抑制 JAK2/STAT3 信号通路缓解高糖诱导的足细胞 EMT 和凋亡。

铁死亡是一种新型的 Fe^{2+} 依赖的细胞调节性死亡,其主要特征是铁超载和细胞内 ROS 的持续积累,导致细胞内脂质过氧化物的致命堆积。谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 是导致铁死亡的关键酶,细胞内谷胱甘肽(GSH)消耗或 GPX4 失活可诱导铁死亡^[9]。铁死亡与许多生理和病理过程有关,包括癌症、神经退行性疾病、器官缺血再灌注损伤和肾功能衰竭^[10]。越来越多的研究^[11]表明铁死亡可能是糖尿病肾病的治疗靶点,铁死亡可能通过 HIF-1 α /HO-1 通路引起肾小管损伤。

CAR 作为天然的二肽,在体内广泛分布,且具有多种生物学活性,如抗炎、抗氧化应激、抑制 RAS 系统活性、抑制 AGEs 及 ALEs 和缓冲生理酸碱度等^[12]。CAR 具有较强的抗氧化能力,能清除氧化应激条件下细胞膜中过度脂肪酸氧化产生的 ROS 和 α, β -不饱和醛。该研究表明,CAR 治疗后糖尿病小鼠的 CRE 和 BUN 下降,然而 CAR 不改变 STZ 小鼠血糖,表明 CAR 不是通过降低血糖来发挥保护肾脏的作用。此外,CAR 还能改善肾脏组织的病理损

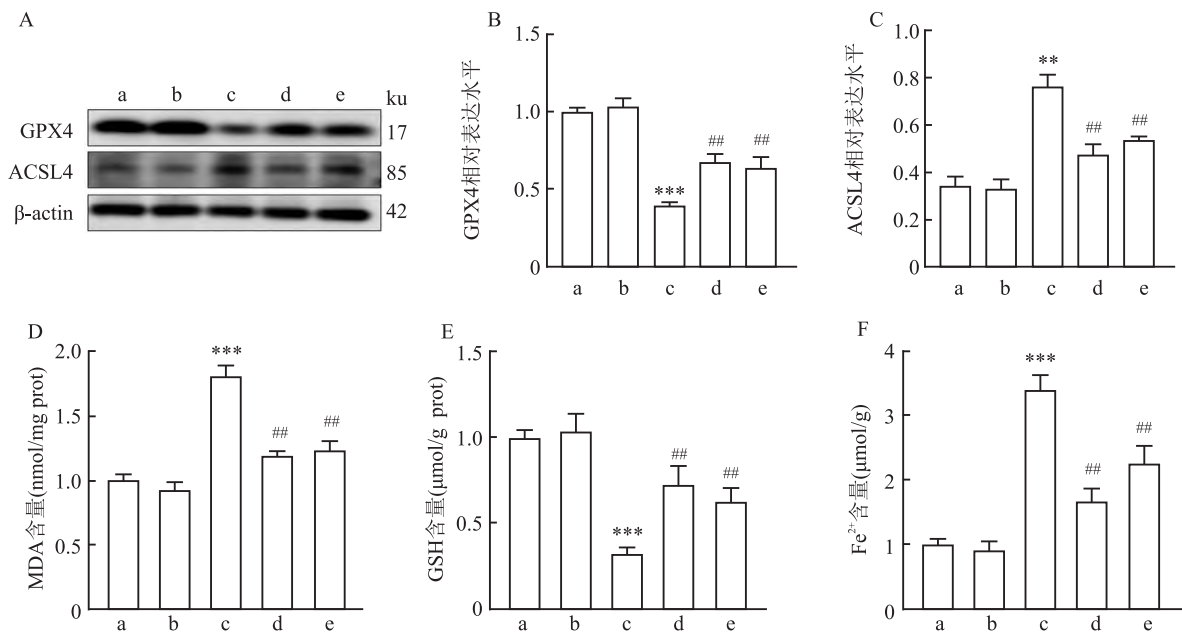


图5 小鼠肾脏组织 GPX4 和 ACSL4 蛋白水平表达及 MDA、GSH 和 Fe^{2+} 含量测定

A~C: Western blot 法检测 CAR 对 STZ 小鼠肾脏组织 GPX4 和 ACSL4 蛋白水平表达灰带图及直方图; D: 小鼠肾脏 MDA 含量; E: 小鼠肾脏 GSH 含量; F: 小鼠肾脏 Fe^{2+} 含量; a: NC 组; b: CAR 组; c: STZ 组; d: STZ + CAR 组; e: STZ + Fer-1 组; 与 NC 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 STZ 组比较: ## $P < 0.01$

伤。进一步研究表明, CAR 能够降低糖尿病小鼠肾脏炎症细胞因子 (IL-1 β 、IL-6、MCP-1、TNF- α) 的水平。透射电镜结果也显示, CAR 改善了 STZ 小鼠肾脏线粒体的肿胀, 膜密度增加, 线粒体脊减少或缺失。同时, 该研究结果显示, STZ 小鼠肾脏组织 GPX4 表达下降、ACSL4 表达升高, CAR 处理后逆转了这些改变。这些结果说明 CAR 对 STZ 小鼠肾脏损伤具有抗炎和抗铁死亡作用。

据报道, CAR 可以通过降低脂质过氧化来改善低氧诱导的心肌损伤^[13], CAR 可通过抑制焦亡改善糖尿病肾病中足细胞的损伤^[4]。该研究评估了 CAR 对铁死亡的影响, 结果证实了 CAR 可以抑制 STZ 小鼠肾脏中铁死亡的激活。

综上所述, 该研究表明 CAR 抑制了 STZ 诱导的糖尿病小鼠肾脏组织的铁死亡和炎症。同时, CAR 治疗后明显改善了 STZ 小鼠的肾功能和肾脏病理损伤。因此, CAR 在糖尿病性肾损伤的治疗上有潜在的可能性。该研究仅从体内实验初步探讨 CAR 对糖尿病性肾损伤具有保护作用, 但 CAR 调控铁死亡具体机制尚不明确, 有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Zhu Q J, Zhu M, Xu X X, et al. Exosomes from high glucose-treated macrophages activate glomerular mesangial cells via TGF- β 1/Smad3 pathway in vivo and in vitro [J]. FASEB J, 2019, 33 (8): 9279-90.
- [2] Lei L, Zhao J, Liu X Q, et al. Wogonin alleviates kidney tubular epithelial injury in diabetic nephropathy by inhibiting PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathways [J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 3131-50.
- [3] Feehan J, Hariharan R, Buckenham T, et al. Carnosine as a potential therapeutic for the management of peripheral vascular disease [J]. NMCD, 2022, 32 (10): 2289-96.
- [4] Zhu W, Li Y Y, Zeng H X, et al. Carnosine alleviates podocyte injury in diabetic nephropathy by targeting caspase-1-mediated pyroptosis [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101 (Pt B): 108236.
- [5] Kim S, Kang S W, Joo J, et al. Characterization of ferroptosis in kidney tubular cell death under diabetic conditions [J]. Cell Death Dis, 2021, 12 (2): 160.
- [6] Wang Y, Bi R, Quan F, et al. Ferroptosis involves in renal tubular cell death in diabetic nephropathy [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 888: 1735-74.
- [7] Li S, Zheng L, Zhang J, et al. Inhibition of ferroptosis by up-regulating Nrf2 delayed the progression of diabetic nephropathy [J]. Free Radical Bio Med, 2021, 162: 435-49.
- [8] 吴昊, 杨琳, 唐丽琴, 等. 小檗碱抑制 JAK2/STAT3 信号通路缓解高糖诱导的足细胞 EMT 和凋亡 [J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57 (8): 1189-94.
- [9] Stockwell B R, Jiang X, Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis [J]. Trends Cell Biol, 2020, 30 (6): 478-90.
- [10] Li Q, Liao J, Chen W, et al. NAC alleviate ferroptosis in diabetic nephropathy via maintaining mitochondrial redox homeostasis through activating SIRT3-SOD2/Gpx4 pathway [J]. Free Radical

Bio Med, 2022, 187:158 – 70.

[11] Feng X, Wang S, Sun Z, et al. Ferroptosis enhanced diabetic renal tubular injury *via* HIF-1 α /HO-1 pathway in db/db mice[J].

Front Endocrinol, 2021, 12:6263 – 90.

[12] Kilis-Pstrusinska K. Carnosine and kidney diseases: what we cur-

rently know? [J]. Curr Med Chem, 2020, 27(11):1764 – 81.

[13] Zhao J, Posa D K, Kumar V, et al. Carnosine protects cardiac myocytes against lipid peroxidation products [J]. Amino Acids, 2019, 51(1): 123 – 38.

Effects of carnosine on ferroptosis and inflammatory responses in STZ-induced diabetic mice

Zhang Song, Liu Xueqi, Jiang Ling, Wu Yonggui

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

Abstract Objective To investigate the effects of carnosine (CAR) on streptozotocin (STZ) induced renal ferroptosis and inflammation in diabetic mice. **Methods** Type 1 diabetes mice model were induced by STZ, and normal C57 mice were used as normal control group. The C57 mice were divided into 5 groups (6 – 8 mice in each group): normal control group (NC), normal control + carnosine group (NC + CAR), STZ model group (STZ), STZ model + carnosine group (STZ + CAR), STZ model + ferroptosis inhibitor group (STZ + Fer-1). After feeding the mice for 16 weeks, serum samples were collected to detect blood creatinine (CRE) and urea nitrogen (BUN) levels. The urine of mice was collected to detect the 24 – hour urinary albumin level. HE staining and PAS staining were performed to observe the degree of renal pathological injury. Real-time PCR was used to detect the expression of interleukin (IL)-1 β , IL-6, monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in mouse kidney tissue. The expression of reactive oxygen species (ROS) in mouse kidney was detected by immunofluorescence. Morphology of renal mitochondria was observed by transmission electron microscopy. The protein expression levels of glutathione peroxidase 4 (GPX 4) and long-chain lipoacyl-CoA synthetase 4 (ACSL4), which are ferroptosis indexes, were detected by Western blot. The contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) and Fe²⁺ in mouse kidney tissue were determined. **Results** Compared with NC group, CRE and BUN levels in STZ group increased ($P < 0.001$); and compared with STZ group, these indexes decreased in STZ + CAR group ($P < 0.001$, $P < 0.01$). Renal histopathological examination showed that compared with NC group, renal tubule dilatation, inflammatory cell infiltration and glycogen deposition significantly increased in STZ group; and compared with STZ group, tubule dilatation, inflammatory cell infiltration and glycogen deposition decreased in STZ + CAR group. Electron microscope results showed that the renal mitochondria in STZ group were swollen, membrane density increased, mitochondrial ridges decreased or absent, renal tubule dilation was improved significantly in the STZ + CAR group and STZ + Fer-1 group, and inflammatory cell infiltration was reduced. Real-time PCR test results showed that compared with NC group, mRNA expression levels of inflammatory factor (IL-1 β , IL-6, MCP-1 and TNF- α) increased in STZ group ($P < 0.001$ or $P < 0.01$); and mRNA expressions of IL-1 β , IL-6, MCP-1 and TNF- α were decreased in STZ + CAR group compared with STZ group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). Immunofluorescence results showed that compared with NC group, ROS level in kidney tissue of mice in STZ group increased ($P < 0.001$); and compared with STZ group, the expression of ROS in kidney tissue of STZ + CAR group decreased while ROS expression in STZ + CAR group decreased ($P < 0.01$). Compared with NC group, GPX4 expression and GSH content in kidney of STZ group decreased ($P < 0.001$), and ACSL4 protein expression and MDA and Fe²⁺ contents increased ($P < 0.01$ or $P < 0.001$), GPX4 expression and GSH content increased ($P < 0.01$), ACSL4 protein expression and MDA and Fe²⁺ content decreased in STZ + CAR group ($P < 0.01$ or $P < 0.001$). **Conclusion** CAR inhibits ferroptosis and inflammation in the kidney in diabetic mice induced by STZ, and improved renal pathological injury in diabetic mice.

Key words diabetic nephropathy; ferroptosis; inflammation; carnosine