

安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: 辛伐他汀通过抑制铁死亡减轻肾脏缺血再灌注损伤
作者: 付志辉, 刘忠忠, 叶启发, 肖琦, 邓琴, 肖建生, 符碧琪
收稿日期: 2025-08-17
网络首发日期: 2025-12-18
引用格式: 付志辉, 刘忠忠, 叶启发, 肖琦, 邓琴, 肖建生, 符碧琪. 辛伐他汀通过抑制铁死亡减轻肾脏缺血再灌注损伤[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251217.1830.006>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

辛伐他汀通过抑制铁死亡减轻肾脏缺血再灌注损伤

付志辉¹, 刘忠忠², 叶启发², 肖琦¹, 邓琴¹, 肖建生¹, 符碧琪³

(南昌大学第一附属医院¹ 器官移植科、³ 免疫科, 南昌 330006; ² 武汉大学中南医院肝胆疾病研究院, 武汉 430000)

摘要 **目的** 探讨辛伐他汀预处理对小鼠肾脏缺血再灌注损伤 (IRI) 的作用及机制。**方法** 将 15 只 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠均分为 3 组: 假手术 (Sham) 组、肾脏 IRI (IR) 组、辛伐他汀预处理+肾脏 IRI (SIM) 组。对肾脏组织行苏木精-伊红 (HE) 染色, 检测血清肌酐 (Scr)、乳酸脱氢酶 (LDH) 评估肾脏损伤情况; 检测超氧化物歧化酶 (SOD)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、脂质过氧化物丙二醛 (MDA) 含量和活性氧 (ROS) 水平评估氧化应激水平; 检测肾脏组织二价铁离子 (Fe^{2+}) 及三价铁离子 (Fe^{3+}) 含量及采用透射电镜观察线粒体形态学变化; 检测肾脏组织 Krüppel 样因子 2 (KLF2)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4)、溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (ACSL4) 蛋白的相对表达量评估铁死亡。**结果** 与 IR 组相比, SIM 组肾小管损伤明显减轻, 血清中 Scr 和 LDH 的含量降低 ($P < 0.001$); 抗氧化应激物质 SOD 和 GSH 的表达增加, 氧化应激物质 MDA 和 ROS 的表达减少 ($P < 0.01$); 辛伐他汀预处理降低组织中的 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 的含量 ($P < 0.01$) 及减轻线粒体损伤; 促进 KLF2 的表达 ($P < 0.01$), 上调铁死亡相关保护蛋白 GPX4 和 SLC7A11 的表达, 下调铁死亡相关损伤蛋白 ACSL4 的表达 ($P < 0.05$)。**结论** 辛伐他汀预处理可能通过促进 KLF2 的表达抑制肾脏铁死亡, 进而减轻肾脏 IRI。

关键词 辛伐他汀; 肾脏; 缺血再灌注损伤; Krüppel 样因子 2; 铁死亡; 线粒体损伤

中图分类号 R 699.2

文献标志码 A

Simvastatin alleviates kidney ischemia reperfusion injury by inhibiting Ferroptosis

Fu Zhihui¹, Liu Zhongzhong², Ye Qifa², Xiao Qi¹, Deng Qin¹, Xiao Jiansheng¹, Fu Biqi^{3Δ}

(¹Department of Transplantation, ³Department of Immunology, The first affiliated hospital,

Jiangxi Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006; ²Institute of Hepatobiliary

2025-08-17 接收

基金项目: 江西省自然科学基金项目 (编号: 20212BAB206027、20232BAB206056)

作者简介: 付志辉, 男, 硕士研究生;

符碧琪, 女, 副主任医师, 通信作者, E-mail: fubiqi@ncu.edu.com

Abstract *Objective* To investigate the effect and mechanism of simvastatin pretreatment on kidney ischemia reperfusion injury (IRI) in mice. *Methods* Fifteen male C57BL/6 mice aged 6-8 weeks were divided into three groups: Sham operation group (Sham group), kidney IRI group (IR group), and simvastatin pretreatment+kidney IRI group (SIM group). Hematoxylin-eosin (HE) staining of kidney tissue and detection of serum creatinine (SCr) and lactate dehydrogenase (LDH) were used to evaluate kidney injury. The levels of superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and reactive oxygen species (ROS) were detected to evaluate oxidative stress. The contents of ferrous iron (Fe^{2+}) and ferric iron (Fe^{3+}) in kidney tissue were detected, and the morphological changes of mitochondria were observed by transmission electron microscope. The relative expression levels of Kruppel-like factor 2 (KLF2), glutathione peroxidase 4 (GPX4), solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11), and acyl-coa synthetase long chain family member 4 (ACSL4) protein in kidney tissue were detected to evaluate ferroptosis. *Results* Compared with the IR group, the SIM group had significantly reduced renal tubular injury and decreased contents of Scr and LDH in serum ($P < 0.001$). It also showed increased expression of SOD and GSH and decreased expression of MDA and ROS ($P < 0.01$). Simvastatin pretreatment reduced the contents of Fe^{2+} and Fe^{3+} in the tissues ($P < 0.01$) and alleviated mitochondrial damage. It also promoted the expression of KLF2 ($P < 0.01$), up-regulated the expression of ferroptosis-related protective proteins GPX4 and SLC7A11, and down-regulated the expression of ferroptosis-related damage protein ACSL4 ($P < 0.05$). *Conclusion* Simvastatin pretreatment may inhibit kidney ferroptosis by promoting the expression of KLF2 to alleviate kidney IRI.

Key words simvastatin; kidney; ischemia reperfusion injury; Kruppel-like factor 2; ferroptosis; mitochondrial damage

Fund programs Natural Science Foundation of Jiangxi Province (Nos. 20212BAB206027, 20232BAB206056)

Corresponding author Fu Biqi, E-mail: fubiqi@ncu.edu.com

终末期肾病严重危害患者生命健康，而肾脏移植是最有效的治疗手段之一。与脑死亡供体（donation after brain death, DBD）相比，心脏死亡供体（donation after cardiac death, DCD）器官存在更长的热缺血时间，致缺血再灌注损伤（ischemic reperfusion injury, IRI）

更加严重，是影响移植物长期存活的关键因素之一^[1]。研究^[2]表明铁死亡主要依赖铁过载和活性氧（reactive oxygen species, ROS）聚积，肾小管上皮细胞富含线粒体和细胞内铁，活性氧和铁离子在该区域功能极其活跃，对缺血缺氧表现出高度敏感性，因此肾小管上皮细胞可能以铁死亡方式参与肾损伤。研究^[3]显示，使用铁死亡抑制剂 Ferrostatin-1 可显著减轻急性肾损伤，而过表达谷胱甘肽过氧化物酶 4（glutathione Peroxidase 4, GPX4）则能够抑制铁死亡诱导剂 Erastin 引起的细胞死亡。表明通过药物预处理抑制铁死亡，能够有效减轻肾脏 IRI。辛伐他汀是羟甲基戊二酸单酰辅酶 A（hydroxy methylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA）还原酶抑制剂，是竞争性抑制内源性胆固醇生物合成的关键酶，通过诱导 Krüppel 样因子 2（Kruppel like factor 2, KLF2）表达，产生抗炎、抗血栓、抗脂质 ROS 生成等作用^[4-5]。在结肠癌中，KLF2 过表达显著提升铁死亡关键分子 GPX4 的表达^[6]。该研究探讨辛伐他汀预处理在减轻肾脏 IRI 中的作用及分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

15 只 6~8 周龄成年雄性 C57BL/6 小鼠，体质量（18~22）g，购自湖北省实验动物研究中心[合格证书：SCXK（鄂）2020-0018]。小鼠被养在标准无特定病原体（specific pathogen free, SPF）级动物房，购入后适应性饲养 1 周，饲养环境为恒温 23 °C、相对湿度（65±5）%、12 h 光照/12 h 黑暗。小鼠可自由获得食物和清洁饮水。动物实验按照《实验动物饲养管理和使用指南》进行，并经南昌大学第一附属医院动物伦理委员会批准（批号：CDYFY-IACUC-202404QR007）。

1.1.2 实验耗材

辛伐他汀（货号：abs817897）购自爱必信（上海）生物科技有限公司；苏木精-伊红（hematoxylin Eosin, HE；货号：G1076）染色试剂盒购自武汉塞维尔生物技术有限公司；还原型谷胱甘肽（glutathione, GSH；货号：A006-2-1）、丙二醛（malondialdehyde, MDA；货号：A003-1）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD；货号：A001-3）标准检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所；Cy3 酪胺（Cy3 tyramide；货号：11065）购自美国 AAT Bioquest 公司；DAPI 染液（货号：D4080KB）购自武汉百赛生物科技有限公司；DHE 染液（货号：S0063）购自上海碧云天生物有限公司；二氨基联苯胺（diaminobenzidine, DAB；货号：D0078）染液购自上海 TCI 公司；亚铁氰化钾（货号：P112418）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；盐酸（货号：10011008）购自上海国药

集团化学试剂有限公司；二价铁离子检测试剂盒（货号：E-BC-K773-M）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司； β -actin 抗体（货号：AC026）购自武汉爱博泰克生物科技有限公司；KLF2 抗体（货号：ab314430）购自英国 Abcam；GPX4 抗体（货号：T56959）、溶质载体家族 7 成员 11（solute carrier family 7 Member 11, SLC7A11；货号：T57046）抗体、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4（acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4；货号：T510198）抗体均购自艾比玛特医药科技（上海）有限公司；二抗：辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase, HRP）-IgG（货号：LF102）购自上海雅酶生物医药科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物实验

实验前，15 只 C57BL/6 小鼠禁食 12 h，可自由饮水。小鼠被随机分为 3 组（ $n=5$ ）：假手术（Sham）组、肾脏 IRI（IR）组、辛伐他汀预处理+肾脏 IRI（SIM）组。IR 组：腹腔注射 1%戊巴比妥（50 mg/kg），麻醉后，仰卧于有加热垫的操作台上，维持体温在（ 37 ± 0.5 ） $^{\circ}\text{C}$ 。沿腹中线剃毛并消毒，暴露腹腔后，游离左侧肾蒂，用无创血管夹夹闭左侧肾动脉和肾静脉，使肾脏缺血。用止血钳夹闭手术切口，使腹腔暂时闭合，适当补充 0.1~0.2 mL 温生理盐水，以减少体内水分及热量散失。缺血 30 min 后重新打开腹腔，迅速取出血管夹，恢复缺血肾脏血流。同时结扎缝合右侧肾动脉、肾静脉、输尿管，摘取右侧肾脏，随后逐层缝合，关闭腹腔。关闭腹腔前再补充 0.2 mL 左右温生理盐水，以弥补因开腹散失的体液。Sham 组：除不夹闭左侧肾动静脉血流外，其余处理同 IR 组。SIM 组：缺血前 30 min，予以腹腔注射辛伐他汀（2 mg/kg），其余同 IR 组。各组手术结束，待小鼠恢复行动能力后，放回原动物房饲养。密切关注小鼠的生存状况并做好记录。

1.2.2 标本采集及处理

再灌注 24 h 后，再次给予小鼠腹腔注射 50 mg/kg 戊巴比妥钠麻醉。取下腔静脉血，采集 0.5~0.8 mL 血液后处死小鼠。随后从腹主动脉缓慢灌注 1~2 mL 肝素水，再摘除左侧肾脏。将采集的血液标本室温静置 1 h 后，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心（3 500 r/min，10 min），取上清液保存在 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱用于后续检测。摘除的左肾分装置于液氮、4%多聚甲醛及 2.5%戊二醛中保存，进行后续相关指标检测。

1.2.3 肾功能评估

采用武汉大学中南医院临床实验室的自动生化分析仪（日本东京日立公司）测定血清样本中血清肌酐（serum creatinine, Scr）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）的

水平，以评估肾功能。

1.2.4 HE 染色

小鼠肾组织经 4%多聚甲醛溶液固定 24 h 以上后进行石蜡包埋、切片。切片经二甲苯脱蜡两次（每次 10 min）后，用梯度乙醇（100%、90%、70%）脱水，而后用苏木精染色 7 min。流水冲洗 10 min 后，用伊红染色 1 min，随后梯度乙醇（100%、95%、75%、50%）再次脱水，二甲苯透明。将切片风干，用封片剂封片，并在光学显微镜下观察，同时采用 paller 病理学评分评估肾脏损伤程度。

1.2.5 Western blot 检测

称量肾脏组织，加入 RIPA 裂解液提取蛋白质样品，并通过 BCA 法测定各组组织蛋白质的含量。对蛋白质样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），电泳结束后进行聚偏二氟乙烯（PVDF）转膜，随后使用 5%脱脂奶粉室温封闭 2 h。再用含吐温-20 的磷酸盐溶液缓冲液（TBST）洗膜 4 次，每次 5 min。随后丢入相应的 β -actin（1:10 000）、KLF2（1:1 000）、GPX4（1:1 000）、SLC7A11（1:1 000）、ACSL4（1:1 000）抗体孵育槽内，于 4 °C 冰箱内的摇床上孵育过夜。次日，再次用 TBST 洗膜，次数与时间同第 1 次。加入种属相匹配的二抗，在室温环境下孵育 120 min。孵育完毕后，第 3 次用 TBST 清洗，次数与时间同第 1 次。清洗完后显影，最后用 ImageJ 软件分析条带的灰度值。

1.2.6 普鲁士蓝染色

肾脏组织石蜡包埋、切片，常规脱蜡至水，依次将切片放入下列试剂中：二甲苯I（20 min）→二甲苯II（20 min）→无水乙醇I（5 min）→无水乙醇II（5 min）→75%酒精（5 min），结束后蒸馏水清洗 3 次。随后进行普鲁士蓝染色：浓度为 2%亚铁氢化钾与 2%盐酸 1:1 混合，将切片放入其中染色，30 min 后取出，并用蒸馏水清洗 2 次。然后进行 DAB 染色：DAB 显色液滴染约 5~10 min，具体时间依染色程度而定，结束后用磷酸盐缓冲液（PBS）和蒸馏水依次进行清洗，次数分别为 1 次和 3 次。后续染核、脱水、封片同 HE 染色。最后，光学显微镜下对各组切片进行观察并拍照，采集图像。

1.2.7 氧化水平测定

肾脏样本称重后用 0.1 mol/L PBS 匀浆。按照试剂盒说明书，分别采用相应试剂盒对肾组织进行 GSH、MDA 和 SOD 水平测定。

1.2.8 免疫荧光分析

将冻存于液氮的各组新鲜肾脏组织进行冷冻切片，每个切片的厚度约为 4~20 μ m，粘

贴于事先处理好的载玻片上。然后进行室温复温（约 10 min），使组织干燥。再用组化笔沿着组织四周画圈，以达到封闭效果。再加入自发荧光淬灭剂，避光条件下孵育 5 min，结束后流水清洗 10 min。在封闭区域内滴加 ROS 染液，即 DHE 染料。避光 37 °C 孵育 30 分钟。孵育结束后用 PBS 晃动洗涤 3 次，每次 5 min。随后，滴加 DAPI 染液，避光室温孵育 10 min。结束后再次用 PBS 洗涤，次数和时间同第 1 次。最后用封片剂封片，盖好盖玻片。将完成上述步骤的切片放于 4 °C 避光保存，使用荧光显微镜在高倍视野捕捉阳性染色细胞图像，最后用 ImageJ 软件分析平均荧光强度。

1.2.9 透射电镜检测

取各组肾脏组织样本，先切成大小约为 1 mm ×1 mm 的组织块，经电镜固定液（2.5% 戊二醛）固定。24 h 后，用 PBS 进行漂洗 2~3 次，随后使用浓度为 1% 的锇酸溶液固定组织块。2 h 后，再次用 PBS 清洗，清洗结束后进行脱水处理，依次将组织块放入不同梯度的乙醇溶液中（50%→70%→80%→90%→95%→100%），每个浓度梯度停留时间均为 15 min。脱水完成后进行包埋。之后进行切片处理，使用切片机对组织块进行切片，厚度约为 70 nm。最后进行染色，使用枸橼酸铅和醋酸铀分别对切片进行染色，每次持续时间为 15 min 左右。染色结束后，利用专门的透射电镜对肾脏组织线粒体超微结构进行观察、拍照并保存。

1.3 统计学处理

所有数值均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析，SNK-Q 检验用于比较组间差异。全部数据都采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计学分析并作图， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辛伐他汀预处理可减轻肾脏 IRI

通过检测血清 Scr、LDH 和肾脏组织 HE 来评估辛伐他汀预处理对肾脏 IRI 的影响。结果显示：与 Sham 组相比，IR 组 Scr 和 LDH 显著上升（ $P < 0.001$ ）；而 SIM 组的 Scr 和 LDH 明显降低（图 1A、1B， $F = 80.02、45.15$ ，均 $P < 0.001$ ）。各组肾脏组织 HE 结果显示：Sham 组小鼠的肾脏样本形态正常，无明显损伤；IR 组出现大面积肾小管明显扩张、刷状缘损伤或脱落、细胞间质水肿、空泡变性、脱落和坏死等，部分肾小管正常结构消失；SIM 组损伤面积、损伤严重程度均低于 IR 组（图 1D）。通过对各组肾脏组织 HE 染色进行 Paller 损伤评分，结果显示，IR 组和 SIM 组均高于 Sham 组，而 SIM 组损伤显著低于 IR 组（图 1C， $F = 234.6$ ， $P < 0.001$ ）。上述结果表明，辛伐他汀预处理可减轻肾脏 IRI。

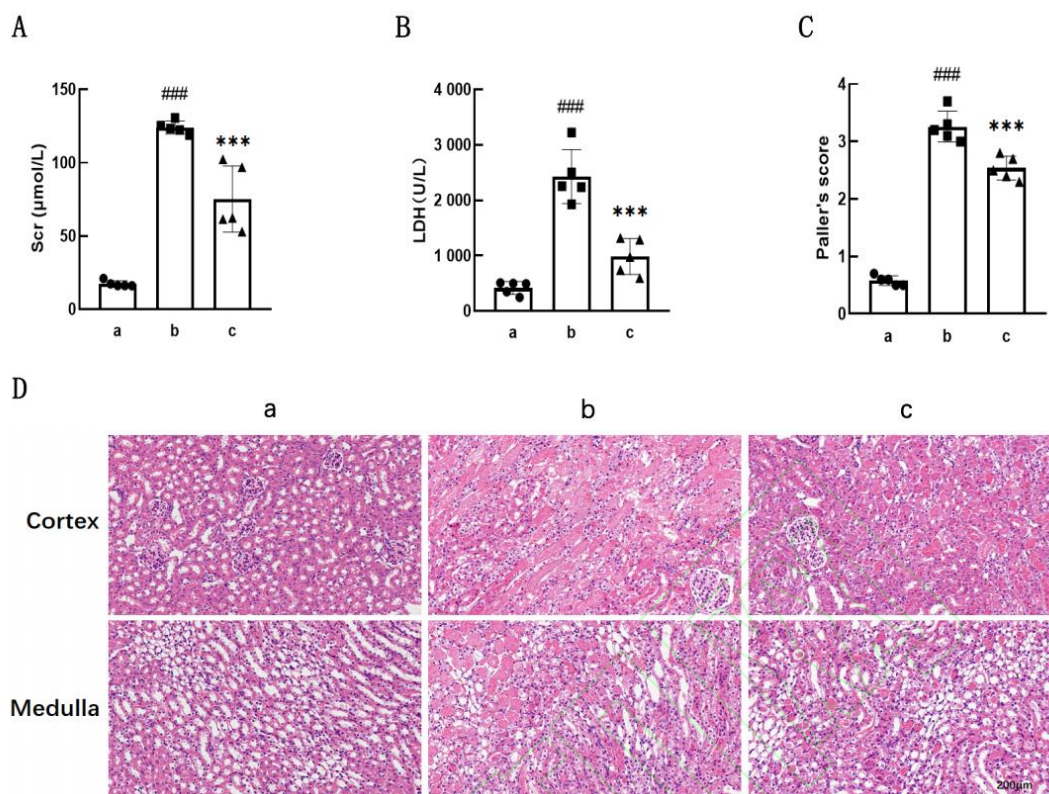


图 1 辛伐他汀预处理对肾脏 IRI 的影响

Fig. 1 The effects of simvastatin pretreatment on kidney IRI

A: 各组血清 Scr 水平; **B:** 各组血清 LDH 水平; **C:** 各组 Paller 评分; **D:** 各组肾脏组织 HE 染色, 比例尺=200 μm (×40); a: Sham 组; b: IR 组; c: SIM 组; 与 Sham 组相比: ### $P < 0.001$; 与 IR 组相比: *** $P < 0.001$ 。

注: A: Serum Scr level in each group; B: Serum LDH level in each group; C: Paller scores of each group; D: HE staining of kidney tissue in each group ×40; a: Sham group; b: IR group; c: SIM group; ### $P < 0.001$ vs Sham group; *** $P < 0.001$ vs IR group.

2.2 辛伐他汀预处理可减轻肾脏 IRI 的氧化应激反应

检测各组小鼠肾脏组织中抗氧化应激物质 (SOD 和 GSH) 和氧化应激物质 (MDA 和 ROS) 的水平。结果显示, 与 Sham 组抗氧化应激物质相比, IR 组 SOD 和 GSH 水平明显降低 ($P < 0.001$); 而与 IR 组相比, SIM 组 SOD 和 GSH 水平显著增加 (图 2A、2B, $F = 72.94、43.46$, $P < 0.01$); 此外, 各组氧化应激物质 (MDA 和 ROS) 的表达情况显示, 与 Sham 组相比, IR 组升高 ($P < 0.001$), 而 SIM 组降低 (图 2C、2D、2E, $F = 56.61、134.1$, 均 $P < 0.001$)。结果表明, 辛伐他汀预处理可以减轻肾脏 IRI 的氧化应激反应。

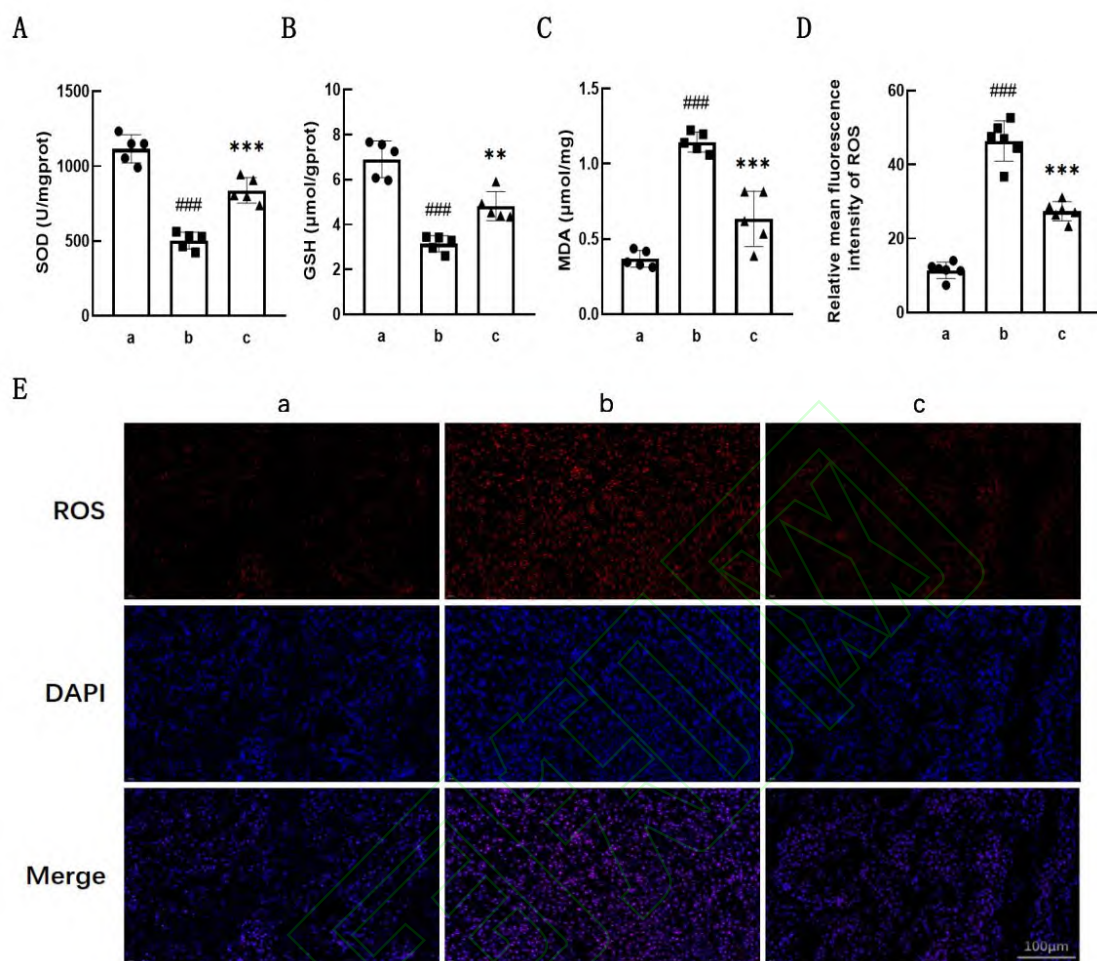


图 2 辛伐他汀预处理对肾脏 IRI 的氧化应激反应的影响

Fig. 2 The effects of simvastatin pretreatment on oxidative stress response in kidney IRI

A: 各组肾脏组织 SOD 水平; B: 各组肾脏组织 GSH 水平; C: 各组肾脏组织 MDA 水平; D: 各组肾脏组织 ROS 相对平均荧光强度; E: 各组肾脏组织 ROS 荧光染色, 比例尺 = 200 μm (×40); a: Sham 组; b: IR 组; c: SIM 组; 与 Sham 组相比: ### $P < 0.001$; 与 IR 组相比: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

注: A: SOD level in kidney tissue in each group; B: GSH level in kidney tissue in each group; C: MDA level in kidney tissue in each group; D: Relative mean fluorescence intensity of ROS in kidney tissue in each group; E: ROS fluorescence staining of kidney tissue in each group ×40; a: Sham group; b: IR group; c: SIM group; ### $P < 0.001$ vs Sham group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs IR group.

2.3 辛伐他汀预处理通过抑制铁死亡减轻肾脏 IRI

通过普鲁士蓝加强染色检测各组小鼠肾脏组织中 Fe^{3+} 含量，与 Sham 组相比，IR 组 Fe^{3+} 阳性面积明显增加；与 IR 组相比较，SIM 组 Fe^{3+} 阳性面积明显减少（图 3A、3B， $F=202.7$ ， $P<0.001$ ）。检测各组肾脏组织中的 Fe^{2+} 含量结果显示：与 Sham 组相比，IR 组 Fe^{2+} 含量明显增加（ $F=79.49$ ， $P<0.001$ ）；而与 IR 组相比，SIM 组肾脏组织内 Fe^{2+} 含量明显减少（图 3D， $F=79.49$ ， $P<0.001$ ）。此外，透射电镜下观察各组肾脏线粒体损伤情况（红色箭头）；结果显示，与 Sham 组相比，IR 组肾脏线粒体体积减小、外膜破裂、嵴减少，SIM 组较 IR 组线粒体损伤减轻（图 3C）。结果表明，辛伐他汀预处理通过抑制铁死亡减轻肾脏 IRI。

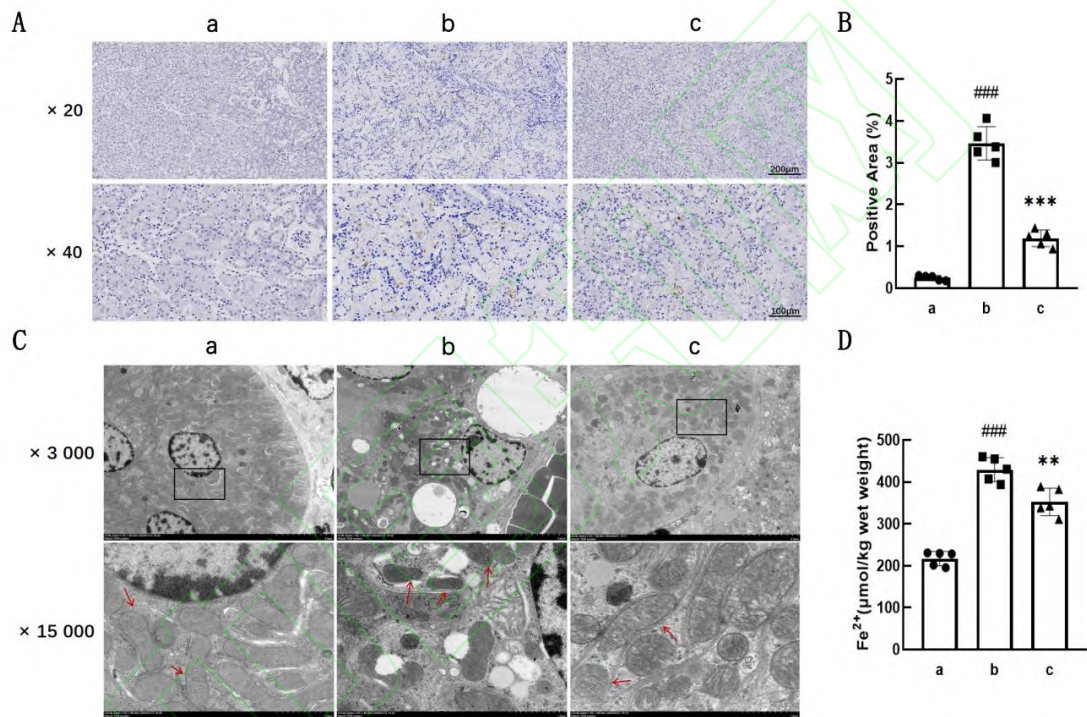


图 3 辛伐他汀预处理对肾脏 IRI 中铁死亡的影响

Fig. 3 The effects of simvastatin pretreatment on ferroptosis in Kidney IRI

A-B: 各组肾脏组织普鲁士蓝加强染色及 Fe^{3+} 阳性面积，比例尺=200 μm ($\times 20$) 和 100 μm ($\times 40$)；C: 各组透射电镜观察肾小管上皮细胞线粒体超微结构情况 ($\times 3\text{K}$ 和 $\times 15\text{K}$)；D: 各组肾脏组织 Fe^{2+} 检测水平；a: Sham 组；b: IR 组；c: SIM 组；与 Sham 组相比：### $P<0.001$ ；与 IR 组相比：** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。

注：A, B: Prussian blue enhanced staining and Fe^{3+} positive area of kidney tissue in each group; C: Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructure of mitochondria in renal tubular epithelial cells; D: Determination of Fe^{2+} level in kidney in each group; a: Sham group; b: IR group; c: SIM group; ### $P<0.001$ vs Sham group; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs IR

group.

2.4 辛伐他汀预处理通过诱导 KLF2 的表达抑制铁死亡减轻肾脏 IRI

检测各组肾脏组织中 KLF2 蛋白以及铁死亡相关蛋白（GPX4、SLC7A11、ACSL4）。结果显示：与 Sham 组相比，IR 组可显著抑制 KLF2 的表达并下调铁死亡保护蛋白 GPX4 和 SLC7A11 表达及上调铁死亡损伤蛋白 ACSL4 的表达（ $P<0.05$ ）；而与 IR 组相比，SIM 组可显著诱导 KLF2 的表达，上调铁死亡保护蛋白 GPX4 和 SLC7A11 的表达及下调铁死亡损伤蛋白 ACSL4 的表达（图 4， $F=19.45、36.69、295.0、170.6$ ，均 $P<0.05$ ）。上述结果表明，辛伐他汀预处理可能通过促进 KLF2 的表达，从而缓解肾脏 IRI 引起的铁死亡。

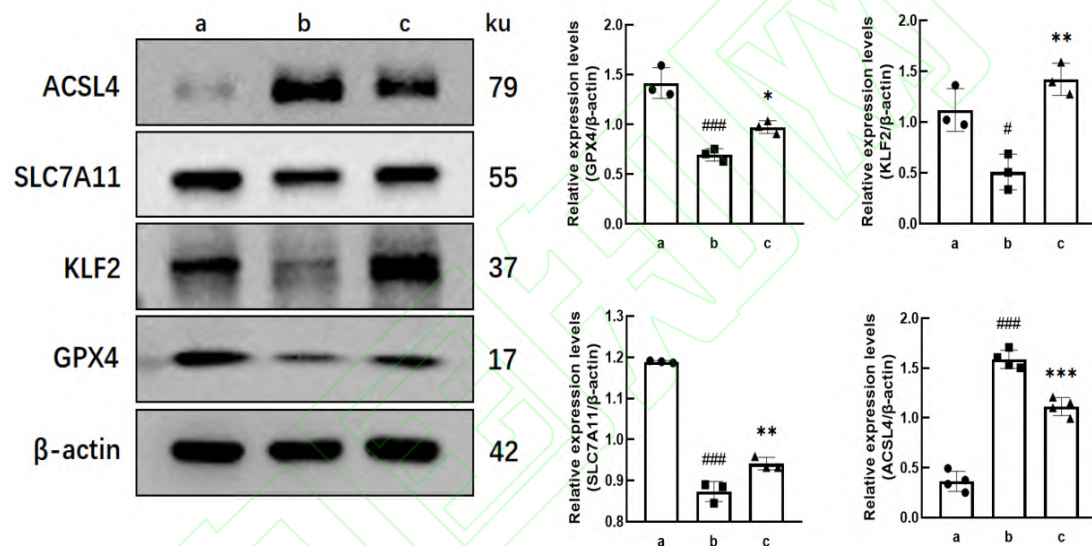


图 4 辛伐他汀预处理对肾脏 IRI 铁死亡相关分子表达的影响

Fig. 4 The effects of simvastatin preconditioning on the expression of ferroptosis-related molecules in renal IRI

a: Sham 组; b: IR 组; c: SIM 组; 与 Sham 组相比: # $P<0.05$, ### $P<0.001$; 与 IR 组相比: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

注: a: Sham group; b: IR group; c: SIM group; # $P<0.05$, ### $P<0.001$ vs Sham group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs IR group.

3 讨论

器官移植是治疗终末期器官功能衰竭最有效的治疗手段，但日益严重的供体匮乏困扰着广大患者及移植医师。除亲属捐献外，公民逝世后器官捐献是我国器官移植供体唯一合法来源。然而与 DBD（donation after brain death）器官相比，DCD 器官存在较长的热缺血

时间，肾移植术后肾功能延迟恢复发生率明显较高^[7]。因此，如何有效降低肾脏 IRI 及术后并发症已成为移植领域的研究热点。通过药物预处理来减轻 DCD 供肾损伤是较有前景的方式之一^[8-9]。辛伐他汀是一种羟甲基戊二酸单酰辅酶 A（hydroxy methylglutaryl coenzyme A，HMG-CoA）还原酶抑制剂，是竞争性抑制内源性胆固醇生物合成的关键酶，常被用于降脂类药物及降低心血管疾病风险；然而其同时具有抑制炎症反应及免疫调节功能，这种调节功能独立于其降脂作用^[10]。课题组之前的研究显示^[11,12]，辛伐他汀预处理可减轻肝脏 IRI，然而其对肾脏 IRI 的保护作用及其相关的分子机制尚未完全阐明。

IRI 在肾脏中诱导多种细胞反应，损伤涉及的机制是缺血后能量代谢的紊乱、炎症反应、自由基损伤和铁沉积等。铁死亡在 2012 年由 Dixon et al^[3]首次提出，其中铁的参与是这种特殊的细胞死亡形成的一个显著特征，广泛参与多种器官疾病如肝、肠等^[13,14]。目前的研究认为铁死亡主要依赖铁过载和脂质的 ROS 聚积，肾小管上皮细胞富含线粒体和细胞内铁，是活性氧和铁离子功能极其活跃的部位，对缺血缺氧极其敏感，因此肾小管上皮细胞极有可能以铁死亡方式参与肾损伤^[2]。本研究结果表明，辛伐他汀预处理对肾脏 IRI 的保护作用与其抗氧化应激作用有关，其特征为提高机体抗氧化应激物质 SOD 和 GSH 含量，减少氧化应激物质 MDA 和 ROS 的含量。进一步对肾脏组织中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 进行检测发现，与 IR 组相比，辛伐他汀预处理肾脏组织中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 含量显著减少；透射电镜观察细胞内线粒体损伤情况，结果提示 IR 组的细胞细胞核固缩变形，染色质聚集，核仁碎裂甚至溶解，细胞器密集化，线粒体明显肿胀、线粒体膜模糊不清，可见明显的嵴疏松溶解；辛伐他汀预处理组细胞细胞核未见明显损伤，线粒体结构及外形基本正常，仅部分视野可见线粒体轻中度肿胀、未见明显的嵴溶解和空泡形成。上述结果提示辛伐他汀预处理可以通过减轻肾脏 IRI 中的铁死亡。

他汀类药物通过抑制小 G 蛋白异戊二烯化和 Rho/ROCK 通路能诱导 KLF2 表达，产生抗炎、抗血栓形成、抗氧化应激、抗凋亡等保护作用^[11,15]，在调节内皮细胞的功能代谢中起重要作用^[16]。Gallinate et al^[17-18]证实供肾热缺血后经脉冲式低温机械灌注保存或者静态冷储后低温机械灌注保存能明显的改善热灌注前 KLF2 的表达。模拟人体动脉血液灌注，低温机械灌注通过脉冲式滚动轴反复向肾动脉灌注保存液，可能对内皮细胞起到物理刺激层流剪切应力作用，诱导内皮细胞表达 KLF2，对供肾保存起到保护效应。本研究显示，与 Sham 组相比，IR 组可显著抑制 KLF2 蛋白的表达，并下调铁死亡保护蛋白 xCT、GPX4 的表达及上调铁死亡损伤蛋白 ACSL4 的表达；而与 IR 组相比，SIM 组可诱导 KLF2 的表达，进而上调铁死亡保护蛋白 xCT、GPX4 的表达及抑制铁死亡损伤蛋白 ACSL4 的表达。

综上所述，辛伐他汀预处理可能通过促进 KLF2 的表达，从而缓解肾脏 IRI 导致的铁死亡。

参考文献

- [1] Rijkse E, Ceuppens S, Qi H, et al. Implementation of donation after circulatory death kidney transplantation can safely enlarge the donor pool: a systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Surg*, 2021, 92: 106021. doi:10.1016/j.ijssu.2021.106021.
- [2] Ye J, Li J, Yu Y, et al. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells *via* ROS-mitochondria pathway[J]. *Regul Pept*, 2010, 161(1-3): 58-66. doi:10.1016/j.regpep.2009.12.024.
- [3] 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): 1060-72. doi:10.1016/j.cell.2012.03.042.
- [4] Li H, Wang Y, Liu J, et al. Endothelial Klf2-Foxp1-TGF β signal mediates the inhibitory effects of simvastatin on maladaptive cardiac remodeling[J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1609-25. doi:10.7150/thno.48153.
- [5] Luo J Y, Cheng C K, Gou L, et al. Induction of KLF2 by exercise activates *ENOS* to improve vasodilatation in diabetic mice[J]. *Diabetes*, 2023, 72(9): 1330-42. doi:10.2337/db23-0070.
- [6] Li J, Jiang J L, Chen Y M, et al. KLF2 inhibits colorectal cancer progression and metastasis by inducing ferroptosis *via* the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *J Pathol Clin Res*, 2023, 9(5): 423-35. doi:10.1002/cjp2.325.
- [7] Gavrilidis P, Inston N G. Recipient and allograft survival following donation after circulatory death versus donation after brain death for renal transplantation: a systematic review and meta-analysis[J]. *Transplant Rev*, 2020, 34(4): 100563. doi:10.1016/j.trre.2020.100563.
- [8] Zou X F, Wu S H, Ma J G, et al. 3-O-methyl-D-glucose blunts cold ischemia damage in kidney *via* inhibiting ferroptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 173: 116262. doi:10.1016/j.biopha.2024.116262.
- [9] Chen Y, Wu M F, Xie M M, et al. Cpd-A1 alleviates acute kidney injury by inhibiting ferroptosis[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, 45(8): 1673-85. doi:10.1038/s41401-024-01277-w.
- [10] Hintermayer M A, Mendelson D, Byun J H. Consideration of T-cell profile in the examination of statin efficacy in inflammatory diseases, neurodegeneration, and neurocognitive performance[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2024, 79(8): glae156. doi:10.1093/gerona/glae156.
- [11] Liu Z, Zhang X, Xiao Q, et al. Pretreatment donors after circulatory death with simvastatin

alleviates liver ischemia reperfusion injury through a KLF2-dependent mechanism in rat[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3861914. doi:10.1155/2017/3861914.

[12] Liu Z, Lai C H, Zhang X, et al. Simvastatin ameliorates total liver ischemia/reperfusion injury *via* KLF2-mediated mechanism in rats[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2019, 43(2): 171-8. doi:10.1016/j.clinre.2018.08.014.

[13] 蒋慰赢, 秦明强, 张 程, 等. ferrostatin-1保护对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(10): 1584-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.015.

[13] Jiang W Y, Qin M Q, Zhang C, et al. Protective effect of ferrostatin-1 on acetaminophen-induced acute liver injury in mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2021, 56(10): 1584-9. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.015.

[14] 黄 铭, 张艺馨, 曹国栋, 等. 穿心莲内酯调控铁死亡中SLC7A11/GPX4轴减轻脓毒症肠损伤[J]. *安徽医科大学学报*, 2023, 58(12): 2094-100. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.016.

[14] Huang M, Zhang Y X, Cao G D, et al. Andrographolide regulates SLC7A11/GPX4 axis in ferroptosis to attenuate intestinal injury in sepsis[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2023, 58(12): 2094-100. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.12.016.

[15] Marrone G, Maeso-Díaz R, García-Cardena G, et al. KLF2 exerts antifibrotic and vasoprotective effects in cirrhotic rat livers: behind the molecular mechanisms of statins[J]. *Gut*, 2015, 64(9): 1434-43. doi:10.1136/gutjnl-2014-308338.

[16] Guixé-Muntet S, de Mesquita F C, Vila S, et al. Cross-talk between autophagy and KLF2 determines endothelial cell phenotype and microvascular function in acute liver injury[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(1): 86-94. doi:10.1016/j.jhep.2016.07.051.

[17] Gallinat A, Fox M, Lürer B, et al. Role of pulsatility in hypothermic reconditioning of porcine kidney grafts by machine perfusion after cold storage[J]. *Transplantation*, 2013, 96(6): 538-42. doi:10.1097/TP.0b013e31829c24e2.

[18] Gallinat A, Efferz P, Paul A, et al. One or 4 h of “in-house” reconditioning by machine perfusion after cold storage improve reperfusion parameters in porcine kidneys[J]. *Transpl Int*, 2014, 27(11): 1214-9. doi:10.1111/tri.12393.