

莫诺昔调控谷胱甘肽过氧化酶 4 介导的铁死亡改善果糖饮食小鼠肾损伤

姜晓杰¹, 熊阳昆², 龚名洋², 罗颖熙³, 张 聪^{2,4*}

1. 杭州市西溪医院制剂室, 浙江 杭州 310063

2. 三峡大学基础医学院, 湖北 宜昌 443002

3. 三峡大学生物与制药学院, 湖北 宜昌 443002

4. 肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室, 湖北 宜昌 443002

摘要: **目的** 探究莫诺昔改善果糖饮食诱导小鼠肾损伤的作用及其机制。**方法** 将 48 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组、别嘌醇 (25 mg/kg) 组及莫诺昔低、高剂量 (25、50 mg/kg) 组和莫诺昔 (50 mg/kg) + 谷胱甘肽过氧化酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抑制剂 RSL3 (5 mg/kg) 组。对照组小鼠正常饮水, 其余各组小鼠均给予 30% 果糖水饲养, 同时各给药组小鼠给予相应药物, 1 次/d, 连续给药 8 周。实验结束后收集各组小鼠血清、尿液和肾脏样本, 记录各组小鼠体质量、肾脏质量, 并计算肾脏指数; 检测各组小鼠血清中肌酐 (creatinine, Cre)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和尿酸 (uric acid, UA) 的含量; 检测各组小鼠尿液中尿蛋白的含量; 同时检测各组小鼠肾脏中活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、总超氧化物歧化酶 (total-superoxide dismutase, T-SOD)、脂质过氧化物 (lipid hydroperoxide, LPO)、总铁和亚铁离子 (Fe^{2+}) 的水平; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色、Masson 染色和普鲁士蓝染色观察肾脏组织病理学变化; 采用 qRT-PCR 检测各组小鼠肾组织中 GPX4 和溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 的 mRNA 表达水平; 采用 Western blotting 和免疫组化法检测各组小鼠肾组织中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白的表达水平。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠体质量、肾脏质量和肾脏指数显著升高 ($P < 0.01$), 血清 Cre、BUN、UA 和尿蛋白含量显著升高 ($P < 0.01$), 肾组织 ROS、MDA、LPO、总铁和 Fe^{2+} 的水平显著升高 ($P < 0.01$), T-SOD 活力均显著降低 ($P < 0.01$), 肾脏 GPX4 和 SLC7A11 的 mRNA 和蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 同时, 模型组小鼠肾脏肾小管扩张、肾小球纤维化并伴有铁沉积。与模型组比较, 莫诺昔给药后显著降低小鼠体质量、肾脏质量和肾脏指数 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著降低血清 Cre、BUN、UA 和尿蛋白的含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著降低肾组织 ROS、MDA、LPO、总铁和 Fe^{2+} 的水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著升高肾组织 T-SOD 活力 ($P < 0.01$)。同时, 莫诺昔能够减轻果糖饮食小鼠肾脏肾小管扩张、肾小球纤维化和铁沉积, 显著升高肾脏 GPX4 和 SLC7A11 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。给予 GPX4 抑制剂干预后能够明显逆转莫诺昔激活 GPX4/SLC7A11 信号通路抑制铁死亡从而改善果糖饮食小鼠肾功能异常和肾脏损伤的作用。**结论** 莫诺昔能通过调控 GPX4 介导的铁死亡从而改善果糖饮食小鼠肾损伤。

关键词: 莫诺昔; 果糖饮食; 肾损伤; 铁死亡; GPX4/SLC7A11 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2025)07-2375-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.014

Morroniside ameliorates kidney injury in fructose-fed mice by regulating glutathione peroxidase 4-mediated ferroptosis

JIANG Xiaojie¹, XIONG Yangkun², GONG Mingyang², LUO Yingxi³, ZHANG Cong^{2,4}

1. Department of Pharmaceutical Preparation, Hangzhou Xixi Hospital, Hangzhou 310063, China

2. College of Basic Medical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

3. College of Biological & Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

4. Hubei Key Laboratory of Tumor Microenvironment and Immunotherapy, China Three Gorges University, Yichang 443002, China

收稿日期: 2024-12-20

基金项目: 湖北省自然科学基金青年基金项目 (2024AFB140); 中药资源与中药化学湖北省重点实验室开放基金重点项目 (KLRCM2401); 武当特色中药研究湖北省重点实验室 (湖北医药学院) 开放课题重点项目 (WDCM2024001)

作者简介: 姜晓杰, 男, 主管药师, 研究方向为分子药理学与毒理学研究。E-mail: jxjxj19842023@163.com

***通信作者:** 张 聪, 男, 讲师, 从事代谢相关疾病发生机制及药物防治研究。E-mail: zzcyc520@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of morroniside on ameliorating kidney injury in fructose-fed mice. **Methods** A total of 48 male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, allopurinol (25 mg/kg) group, morroniside low-dose (25 mg/kg) group, morroniside high-dose (50 mg/kg) group and morroniside (50 mg/kg) + glutathione peroxidase 4 (GPX4) inhibitor RSL3 (5 mg/kg) group. The mice in control group were given normal drinking water, and mice in the other groups were fed with 30% fructose water, while the mice in each treatment group were given corresponding drugs once a day for eight consecutive weeks. At the end of the experiment, serum, urine and kidney samples were collected from each group of mice, and body weight and kidney weight were recorded, the kidney index was calculated; The contents of creatinine (Cre), blood urea nitrogen (BUN) and uric acid (UA) in serum as well as the content of urinary protein in urine were detected, respectively. Meanwhile, the levels of reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), total-superoxide dismutase (T-SOD), lipid hydroperoxide (LPO), total iron, and ferrous ion (Fe^{2+}) in kidney of mice in each group were detected. Histopathological changes in liver was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining, Masson staining and Prussian Blue staining. qRT-PCR was used to detect the mRNA expressions of *GPX4* and solute carrier family 7 member 11 (*SLC7A11*) in kidney tissue of mice in each group. Western blotting and immunohistochemistry were used to detect the protein expression levels of GPX4 and SLC7A11 in kidney tissue of mice in each group. **Results** Compared with control group, mice in model group showed significantly increased body weight, kidney weight and kidney index ($P < 0.01$), significantly increased contents of Cre, BUN, UA in serum and urinary protein ($P < 0.01$), significantly increased levels of ROS, MDA, LPO, total iron and Fe^{2+} in kidney tissues ($P < 0.01$), significantly decreased T-SOD activity ($P < 0.01$), and significantly reduced mRNA and protein expression levels of *GPX4* and *SLC7A11* in kidney tissues ($P < 0.01$). Meanwhile, the kidney of mice in model group showed kidney tubular dilatation, glomerular fibrosis and iron deposition. Compared with model group, morroniside significantly decreased body weight, kidney weight and kidney index ($P < 0.05, 0.01$), significantly decreased levels of Cre, BUN, UA in serum as well as the content of urinary protein in urine ($P < 0.05, 0.01$), significantly decreased the contents of ROS, MDA, LPO, total iron, and Fe^{2+} in kidney tissues ($P < 0.05, 0.01$), and significantly increased T-SOD activity in kidney tissues ($P < 0.01$). Meanwhile, morroniside was able to attenuate renal tubular dilatation, glomerular fibrosis and iron deposition, and significantly increased the mRNA and protein expression levels of *GPX4* and *SLC7A11* in kidney tissues ($P < 0.05, 0.01$). Intervention with GPX4 inhibitor (RSL3) could significantly reverse the effect of morroniside on inhibiting ferroptosis by activating GPX4/SLC7A11 signaling pathway to improve renal dysfunction and kidney injury in fructose-fed mice. **Conclusion** Morroniside can ameliorate kidney injury in fructose-diet mice by modulating GPX4-mediated ferroptosis.

Key words: morroniside; fructose diet; kidney injury; ferroptosis; GPX4/SLC7A11 signaling pathway

慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD) 以肾脏结构和功能出现不可逆性改变为典型特征, 是终末期肾脏疾病和心血管疾病的独立危险因素^[1]。调查显示, 全球 CKD 患者数量超过 8 亿, 且其发病率和死亡率仍在快速增加, 并逐渐年轻化, 预计 2040 年其将成为全球第 5 大致死病因^[2-3]。由于 CKD 是一种无症状的疾病, 且临床上 CKD 的治疗方法有限, 因此迫切需要探索有效的预防措施及治疗手段来预防 CKD 进展。铁死亡是一种铁依赖性的程序性细胞死亡方式, 与 CKD 进展密切相关^[4]。研究表明, 大多数 CKD 患者存在不同程度的铁代谢紊乱, 而抑制铁死亡对于改善 CKD 患者肾功能具有积极作用^[5]。提示, 靶向抑制铁死亡可作为防治 CKD 的潜在策略。

“药食同源”理论自古以来就是传统中医药防治肾脏疾病的有力策略^[6]。因此, 以食品来源的活性分子作为潜在治疗药物被认为是治疗 CKD 及并发症的新策略。莫诺昔是药食同源中药和补益肝肾

名贵中药山茱萸 *Corni Fructus* 中的环烯醚萜苷类成分, 具有改善肾功能^[7]、调节代谢^[8]、抗炎^[9]、抗氧化^[10]等作用, 提示其有望成为治疗 CKD 及相关并发症的潜在候选药物。目前, 已有少量研究揭示莫诺昔具有改善糖尿病肾病的作用^[7], 但其抑制铁死亡改善 CKD 的作用及机制至今仍未见报道。果糖作为日常生活中广泛应用的甜味剂, 直接影响着机体尿酸代谢稳态, 是诱发 CKD 及相关并发症的独立危险因素^[11-12]。本课题组前期研究证实, 长期高果糖饮食可加速肾脏脂质过氧化和肾小管损伤, 从而为 CKD 进展奠定基础^[13]。因此, 本研究运用果糖饮食诱导建立小鼠肾损伤模型, 并探讨莫诺昔恢复肾功能改善果糖饮食小鼠肾损伤的作用及机制, 旨在为开发莫诺昔及莫诺昔来源中药 (如山茱萸) 应用于防治 CKD 提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 48 只, 体质量 (20±

2) g, 购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司, 动物生产许可证号 SCXK (豫) 2020-0005。动物饲养于武汉华联科模型动物研究院实验动物中心, 动物实验经武汉华联科模型动物研究院实验动物伦理学委员会批准 (批准号 HLK20230815001)。

1.2 药品与试剂

果糖 (质量分数 $\geq 99\%$, 批号 F108331)、莫诺苷对照品 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 J2127694)、别嘌呤醇对照品 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 D2420008)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抑制剂 RSL3 (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 F2403193) 购自成上海阿拉丁科技有限公司; 肌酐 (creatinine, Cre) 试剂盒 (批号 20240515)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 试剂盒 (批号 20240318)、尿酸试剂盒 (批号 20240411)、尿蛋白试剂盒 (批号 20240424)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、试剂盒 (批号 20231212)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 20231228)、总超氧化物歧化酶 (total-superoxide dismutase, T-SOD) 试剂盒 (批号 20240222)、脂质过氧化物 (lipid hydroperoxide, LPO) 试剂盒 (批号 20240416) 购自南京建成生物工程研究所; 组织铁含量检测试剂盒 (批号 BC4355)、亚铁离子 (Fe^{2+}) 含量检测试剂盒 (批号 BC5415)、TriQuick Reagent 总 RNA 提取试剂 (批号 20240521)、RT-PCR 反转录试剂盒 (批号 20240124)、 $2 \times$ SYBR Green PCR Mastermix (批号 20240516) 均购自北京索莱宝科技有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色试剂盒 (批号 CR2311064)、Masson 染色试剂盒 (批号 CR2305010)、普鲁士蓝染色试剂盒 (批号 CR2402112)、 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液 (批号 CR2403015)、磷酸盐缓冲液 (TBST, 批号 GA2401053)、通用型组织固定液 (批号 GP2310310)、快速高分辨电泳缓冲液 (批号 GC2409021)、免冰浴快速转膜缓冲液 (批号 GC2308001)、无蛋白快速封闭液 (批号 CR2409012)、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (批号 CR2409049)、预染蛋白 Marker (批号 GC2305048)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 CR2309132)、IP 裂解液 (批号 CR2404116)、ECL 发光液 (批号 CR2310113) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 蛋白酶抑制剂混合物 (批号

331322)、磷酸酶抑制剂混合物 (批号 009324) 购自北京康为世纪生物科技有限公司; β -actin 兔单克隆抗体 (批号 AWA80001)、GPX4 兔单克隆抗体 (批号 AWA12702)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11) 兔单克隆抗体 (批号 AWA10085)、HRP 标记兔抗山羊 IgG 二抗 (批号 AWS0002) 购自长沙艾碧维生物科技有限公司; 异氟烷 (批号 2024070701) 购自深圳瑞沃德生命科技股份有限公司。

1.3 仪器

Centrifuge Allegra-X-30R 型高速冷冻离心机 (美国 Beckman Coulter 公司); SynergyH4 型多功能酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); MA104 型电子分析天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司); B-JY88-IIN 型超声波破碎仪 (上海铂温仪器有限公司); IX73&DP80 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); PowerPac 型通用电泳仪、Turbo 型蛋白快速转膜仪、CFX96 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); G:BOX-F3 型凝胶成像系统 (英国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

雄性 C57BL/6 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、别嘌呤醇 (25 mg/kg)^[14-15] 组及莫诺苷低、高剂量 (25 、 50 mg/kg)^[7] 组和莫诺苷 (50 mg/kg) + RSL3 (5 mg/kg) 组^[16], 每组 8 只。根据 Zhang 等^[13]造模方法复制果糖饮食诱导的小鼠肾损伤模型, 其中果糖饮食小鼠肾功能异常 (如血清 Cre、BUN 水平升高)、肾脏组织学特征改变, 即表明小鼠肾损伤模型复制成功。对照组小鼠正常饮水, 其余各组小鼠均给予 30% 果糖水饲养, 同时别嘌呤醇组和莫诺苷低、高剂量组小鼠 ig 给予相应药物, 莫诺苷 + RSL3 组小鼠 ip RSL3 0.5 h 后 ig 给予莫诺苷, 1 次/d, 连续给药 8 周。

2.2 肾脏指数的测定

末次给药后禁食 12 h, 称定并记录各组小鼠体质量, 用 3% 异氟烷将各组小鼠麻醉后处死, 取出小鼠肾脏并称定肾脏质量, 计算肾脏指数。

肾脏指数 = 肾脏质量 / 小鼠体质量

2.3 血清 Cre、BUN、尿酸含量的检测

末次给药后禁食 12 h, 摘眼球收集各组小鼠血液, 4°C 、 $3\,000 \text{ r/min}$ 离心 10 min (离心半径 8 cm), 取上层血清。根据试剂盒说明书测定各组小鼠血清中 Cre、BUN、尿酸含量。

2.4 尿蛋白含量的检测

末次给药后禁食 12 h, 运用代谢笼收集各组小鼠尿液, 根据试剂盒说明书测定各组小鼠尿液中尿蛋白含量。

2.5 肾脏 T-SOD、ROS、MDA、LPO、总铁和亚铁离子含量的检测

取部分小鼠肾组织, 加入适量生理盐水置于超声破碎仪中进行破碎, 制备 10% 肾脏组织匀浆。按照试剂盒说明书测定肾组织匀浆中 T-SOD 活力及 ROS、MDA、LPO、总铁和亚铁离子的含量。按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书测定肾脏组织匀浆中的蛋白浓度。运用肾脏组织匀浆的蛋白浓度将肾脏组织匀浆中的 T-SOD 的活性及 MDA、LPO、总铁和亚铁离子的含量进行归一化。

2.6 肾脏病理学染色

取部分小鼠肾组织, 置于通用型组织固定液中固定, 随后经过脱水、石蜡包埋后制成 5 μm 的切片, 然后分别用 HE 染色试剂盒、Masson 染色试剂盒、普鲁士蓝染色试剂盒进行染色, 并在显微镜下观察各组小鼠肾脏病理学变化。

2.7 qRT-PCR 检测肾组织中 GPX4、SLC7A11 mRNA 的表达水平

运用 TriQuick Reagent RNA 提取试剂提取小鼠肾脏组织中的 RNA, 并运用 RT-PCR 反转录试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA 后运用 qRT-PCR 法检测 GPX4、SLC7A11 mRNA 的表达水平。qRT-PCR 扩增条件: 95 ℃、2 min, 95 ℃、10 s, 62 ℃、30 s, 72 ℃、15 s, 40 个循环。以 GAPDH 作为内参, 采用 2^{-ΔΔCt} 法计算相关基因 mRNA 的相对表达量。各引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。

2.8 Western blotting 检测肾脏组织中 GPX4、SLC7A11 蛋白的表达水平

运用 IP 裂解液提取各组小鼠肾脏组织中的总

蛋白并按照 BCA 蛋白含量检测试剂盒测定蛋白浓度。将肾脏组织蛋白提取液与 5× 蛋白上样缓冲液按 4:1 的体积比混匀后, 95 ℃ 变性 5 min, 制备小鼠肾脏蛋白样品。随后, 取各组小鼠肾脏蛋白样品 80 μg, 经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 运用无蛋白快速封闭液封闭 15 min。分别加入 GPX4、SLC7A11、β-actin 一抗 (稀释比例均为 1:1 000), 4 ℃ 孵育过夜, TBST 清洗 3 次, 10 min/次, 然后加入 HRP 标记兔抗山羊 IgG 二抗 (稀释比例为 1:8 000), 室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, 加入 ECL 发光液并运用凝胶成像分析系统成像, 使用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算目标蛋白条带的灰度值。

2.9 免疫组织化学法检测肾脏组织中 GPX4、SLC7A11 蛋白表达

取小鼠肾组织石蜡切片, 然后按照兔/鼠通用型 Streptavidin-HRP 免疫组化染色试剂盒说明书进行操作, 显微镜下观察小鼠肾组织中 GPX4、SLC7A11 蛋白的表达水平。

2.10 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对实验结果进行分析, 实验结果计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多组之间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 莫诺苷对果糖饮食小鼠体质量、肾脏质量及肾脏指数的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠体质量、肾脏质量及肾脏指数均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 别嘌呤醇组和莫诺苷低、高剂量组小鼠体质量、肾脏质量及肾脏指数均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 莫诺苷对果糖饮食小鼠肾功能的影响

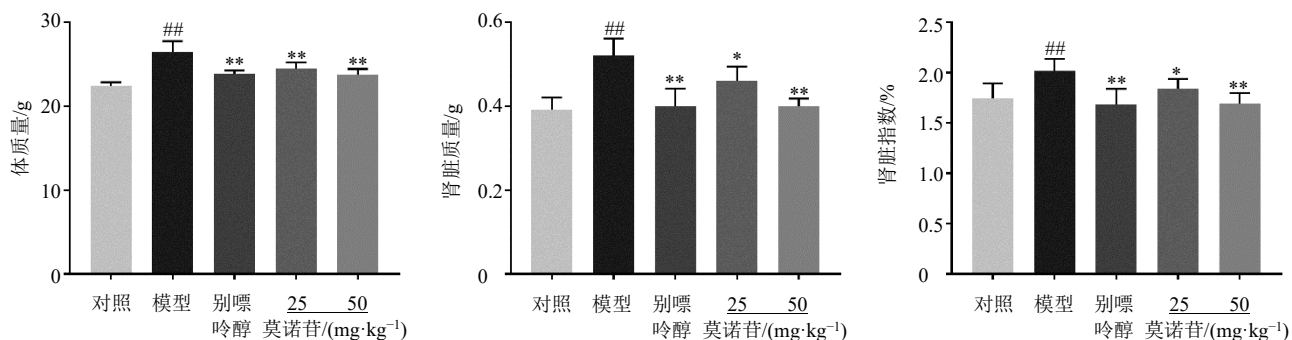
如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 Cre、BUN、尿酸含量和尿液中尿蛋白的含量均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 别嘌呤醇组和莫诺苷低、高剂量组小鼠血清中 Cre、BUN、尿酸含量和尿液中尿蛋白的含量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 提示莫诺苷具有改善果糖饮食小鼠肾功能障碍的作用。

3.3 莫诺苷对果糖饮食小鼠肾脏病理学变化的影响

如图 3 所示, 对照组小鼠肾形态结构正常, 肾小管细胞排列整齐, 无扩张和明显的炎性浸润; 与

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')	长度/bp
GAPDH	F: GGAGAAACCTGCCAAGTATG	180
	R: TGGGAGTTGCTGTTGAAGTC	
GPX4	F: CCACTGTGGAATGGATGAAAGT	152
	R: CACGGCAGGTCCTTCTCTATCA	
SLC7A11	F: TGGGGTCCCTGCATATTATCTCT	139
	R: GGCCAAGCTTTTGATGCATTAAG	



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下图同。

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 莫诺昔对果糖饮食小鼠体质量、肾脏质量及肾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effect of morroniside on body weight, kidney weight and kidney index in fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

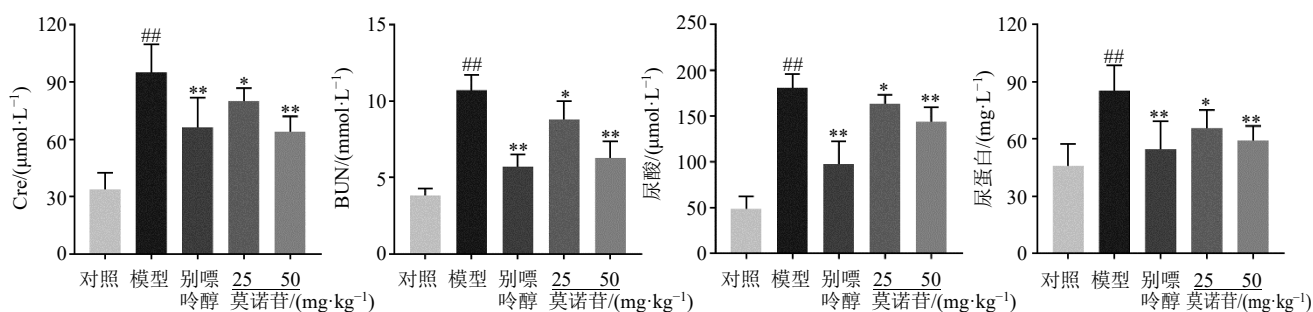
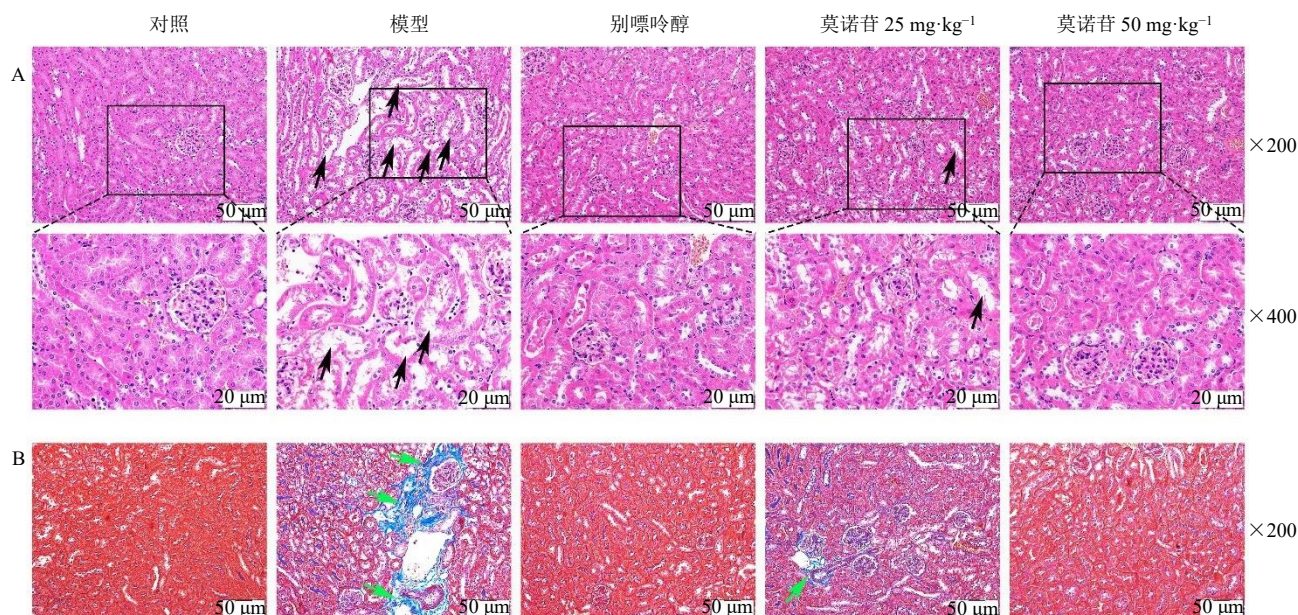


图 2 莫诺昔对果糖饮食小鼠肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of morroniside on renal function in fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-各组小鼠肾脏 HE 染色, 黑色箭头指示肾小管扩张; B-各组小鼠肾脏 Masson 染色, 绿色箭头指示胶原纤维沉积。

A-HE staining of kidney of mice in each group, black arrow indicates tubular dilation; B-Masson staining of kidney of mice in each group, green arrow indicates collagen fiber deposition.

图 3 莫诺昔对果糖饮食小鼠肾脏病理学变化的影响

Fig. 3 Effect of morroniside on kidney pathological changes in fructose-fed mice

对照组比较,模型组小鼠肾脏肾小管明显扩张,并伴有大量胶原纤维沉积;与模型组比较,别嘌呤醇组和莫诺苷低、高剂量组小鼠肾脏小管扩张明显减轻,并未见明显的胶原纤维沉积,提示莫诺苷具有改善果糖饮食小鼠肾脏组织学变化的作用。

3.4 莫诺苷对果糖饮食小鼠肾脏氧化应激的影响

如图 4 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾脏组织中 ROS、MDA、LPO 的含量显著升高 ($P < 0.01$), T-SOD 活力显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,别嘌呤醇组和莫诺苷低、高剂量组小鼠肾脏组织中 ROS、MDA、LPO 的含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), T-SOD 活力显著升高 ($P < 0.01$),提示莫诺苷具有改善果糖饮食小鼠肾脏氧化应激的作用。

3.5 莫诺苷对果糖饮食小鼠肾脏铁超载的影响

如图 5 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾脏组织中大量细胞内伴有铁沉积,且肾脏组织中总铁和 Fe^{2+} 含量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,别嘌呤醇组和莫诺苷低、高剂量组小鼠肾脏组织铁沉积明显减少,且肾脏组织中总铁和 Fe^{2+} 含量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。提示莫诺苷具有改善果糖饮食小鼠肾脏铁超载的作用。

3.6 莫诺苷对果糖饮食小鼠肾脏 *GPX4*、*SLC7A11* mRNA 和蛋白表达的影响

研究证实,SLC7A11-GPX4 依赖性谷胱甘肽系统是调控细胞铁死亡的核心分子途径^[17]。因此,进一步探讨了莫诺苷对果糖饮食小鼠肾脏 *GPX4*、*SLC7A11* mRNA 和蛋白表达的影响。如图 6 所示,

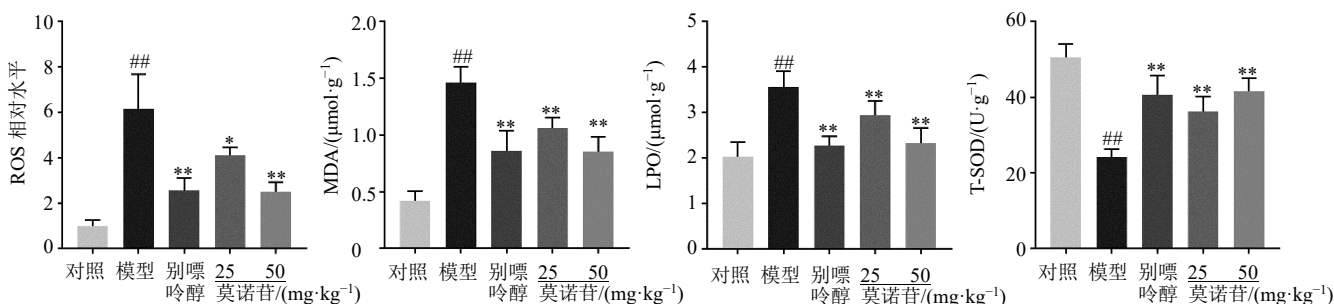
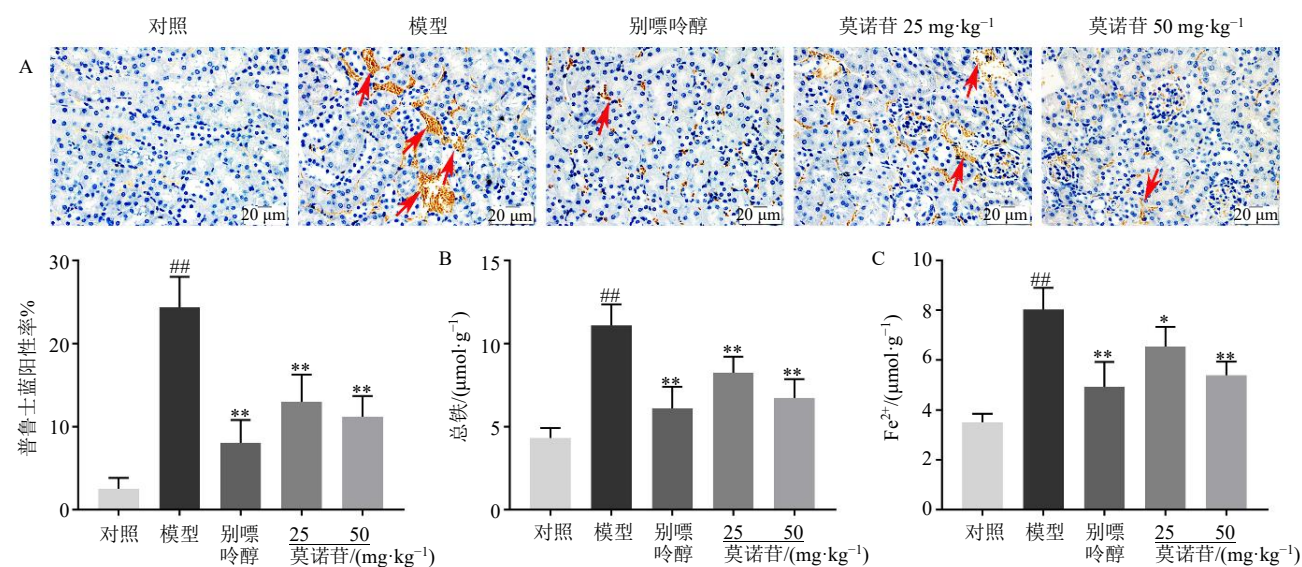


图 4 莫诺苷对果糖饮食小鼠肾脏氧化应激的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of morroniside on oxidative stress in kidney of fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

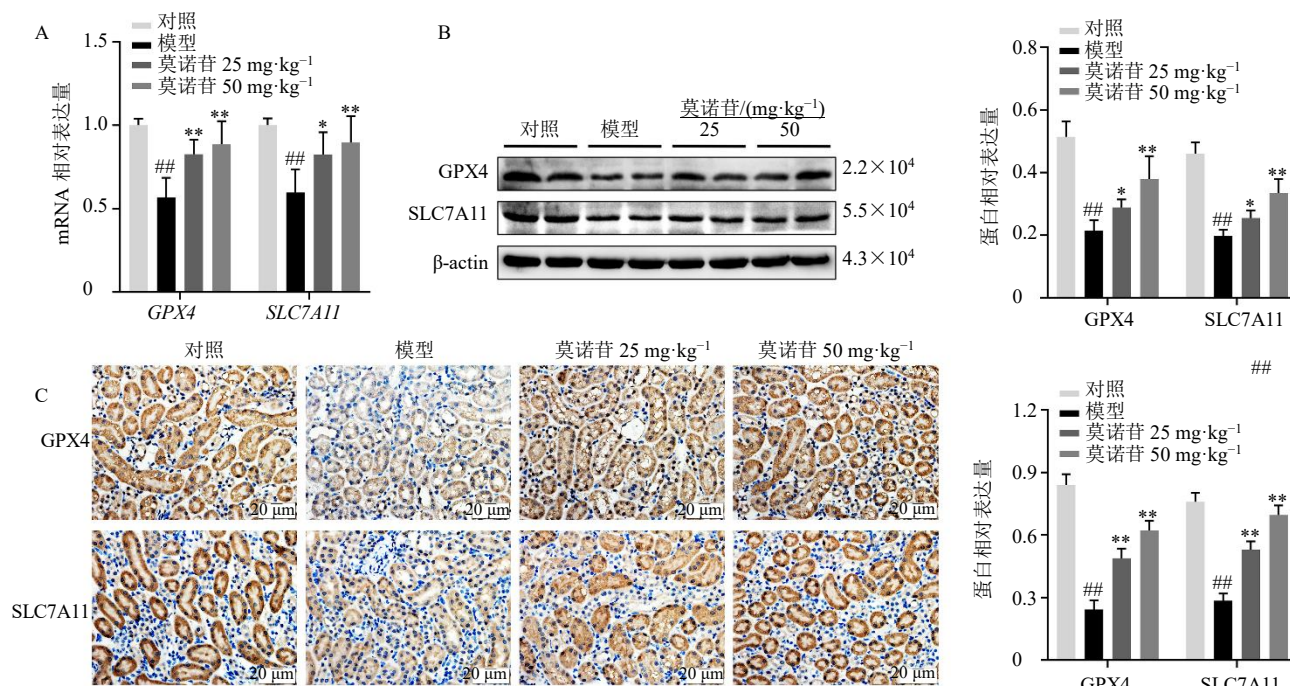


A-各组小鼠肾脏普鲁士蓝染色 ($\times 400$), 红色箭头指示铁沉积; B、C-各组小鼠肾脏组织总铁和 Fe^{2+} 含量。

A-prussian blue staining of kidney of mice in each group ($\times 400$), red arrows indicate iron deposition; B, C-contents of total iron and Fe^{2+} in kidney of mice in each group.

图 5 莫诺苷对果糖饮食小鼠肾脏铁超载的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of morroniside on kidney iron overload in fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-各组小鼠肾脏 *GPX4*、*SLC7A11* mRNA 表达; B-Western blotting 检测各组小鼠肾脏 *GPX4*、*SLC7A11* 蛋白表达; C-免疫组化法检测各组小鼠肾脏 *GPX4*、*SLC7A11* 蛋白表达 ($\times 400$)。

A-expressions of *GPX4* and *SLC7A11* mRNA in kidney of mice in each group; B-expressions of *GPX4* and *SLC7A11* protein in kidney of mice in each group detected by Western blotting; C-expressions of *GPX4* and *SLC7A11* protein in kidney of mice in each group detected by immunohistochemistry ($\times 400$).

图 6 莫诺昔对果糖饮食小鼠肾脏 *GPX4*、*SLC7A11* mRNA 和蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of morroniside on mRNA and protein expressions of *GPX4* and *SLC7A11* in the kidney of fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

与对照组比较,模型组小鼠肾脏 *GPX4*、*SLC7A11* mRNA 和蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,莫诺昔低、高剂量组小鼠肾脏组织中 *GPX4*、*SLC7A11* mRNA 和蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。免疫组织化学染色结果同样显示,与对照组比较,模型组小鼠肾脏组织中 *GPX4*、*SLC7A11* 蛋白的表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,莫诺昔低、高剂量组小鼠肾脏组织中 *GPX4*、*SLC7A11* 蛋白的表达水平显著升高 ($P < 0.01$)。提示莫诺昔能够通过激活 *GPX4*/*SLC7A11* 信号通路从而抑制果糖饮食小鼠肾脏铁死亡。

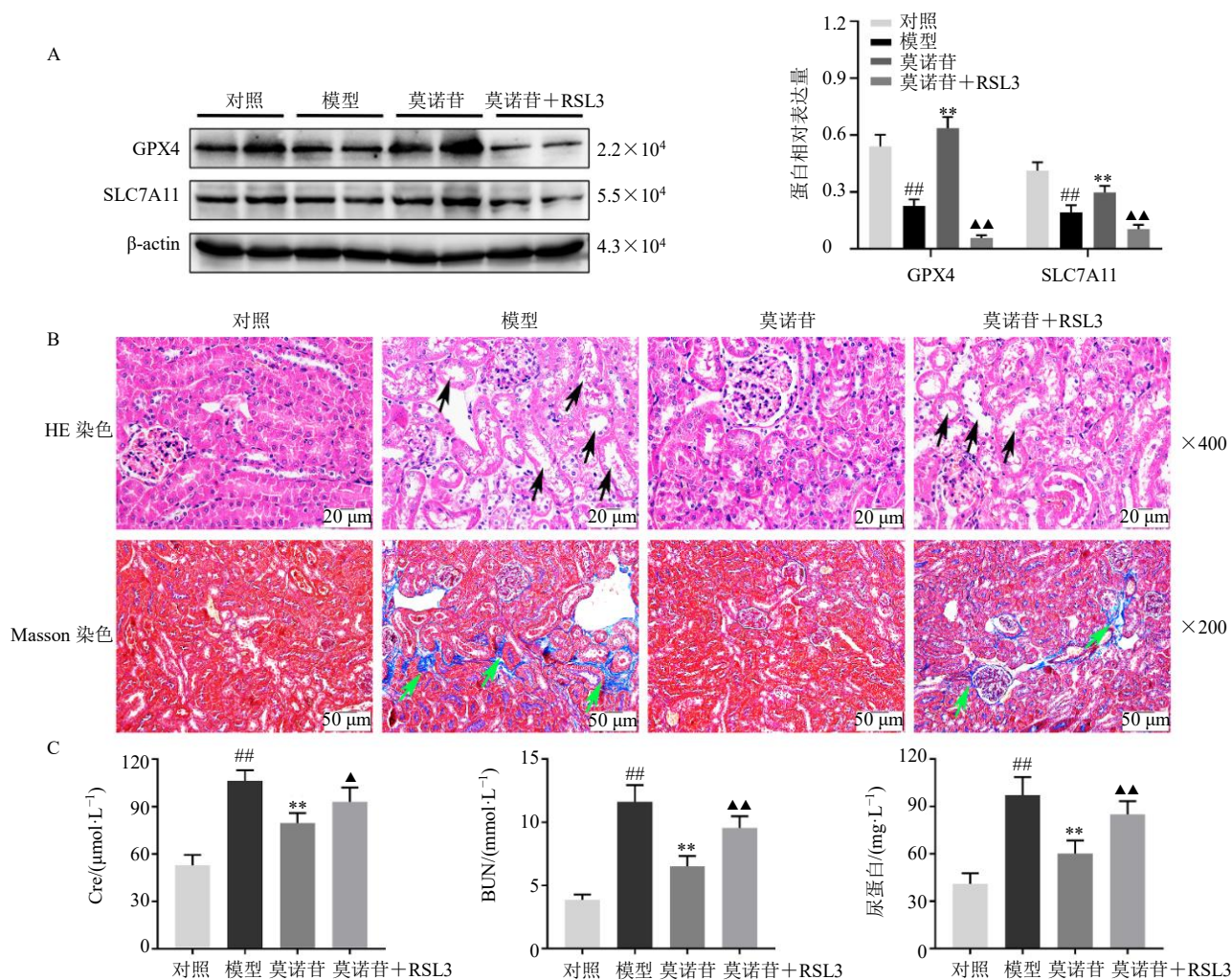
3.7 GPX4 抑制剂对莫诺昔改善果糖饮食小鼠肾脏损伤的影响

为了进一步明确调控铁死亡在莫诺昔改善果糖饮食小鼠肾损伤中的作用,在给予莫诺昔高剂量治疗的同时运用 *GPX4* 抑制剂即铁死亡诱导剂 (RSL3) 干预,进一步确证莫诺昔改善果糖饮食小鼠肾损伤的作用机制。如图 7 所示,与模型组比较,莫诺昔高剂量组小鼠肾脏 *GPX4*、*SLC7A11* 蛋白表

达水平显著升高 ($P < 0.01$);与莫诺昔高剂量组比较,莫诺昔高剂量+RSL3 组小鼠肾脏 *GPX4*、*SLC7A11* 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$)。同时,病理学染色和肾功能指标检测结果显示,与模型组比较,莫诺昔高剂量组小鼠肾脏未见明显的肾脏小管扩张和胶原纤维沉积,肾功能指标 (Cre、BUN、尿蛋白) 水平显著降低 ($P < 0.01$);与莫诺昔高剂量组比较,莫诺昔高剂量+RSL3 组小鼠肾脏小管细胞明显扩张,并伴有大量胶原纤维沉积,且 Cre、BUN、尿蛋白水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。提示 *GPX4* 抑制剂诱导铁死亡能够逆转莫诺昔改善果糖饮食小鼠肾损伤的作用。

4 讨论

作为一种隐藏在人们身边的“甜蜜杀手”,长期高果糖饮食可诱导肾脏脂质过氧化和肾小管损伤,是促进 CKD 发生发展的独立危险因素^[11-12]。研究显示,全球每年超过 1 100 万死亡病例归因于不合理的饮食习惯^[18],其中高糖饮食尤其是高果糖饮食,是引发代谢性疾病患病风险和死亡风险增加的



A-各组小鼠肾脏 GPX4、SLC7A11 蛋白表达; B-各组小鼠肾脏病理染色; C-各组小鼠血清中 Cre、BUN 和尿蛋白含量。与莫诺昔高剂量组比较: ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ 。

A-expressions of GPX4 and SLC7A11 protein in kidney of mice in each group; B-pathological staining of kidneys in each group of mice; C-levels of Cre, BUN and urinary protein in serum of mice in each group. ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs morroniside high-dose group.

图 7 GPX4 抑制剂对莫诺昔改善果糖饮食小鼠肾损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effect of GPX4 inhibitor intervention on morroniside ameliorates kidney injury in fructose-fed mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

重要原因^[19]。目前, 已有较多的研究在人群和啮齿动物模型中报道了高果糖饮食对肾脏的危害, 其主要通过促进尿酸生成并损害肾脏尿酸排泄, 导致高尿酸血症和肾脏尿酸盐结晶沉积, 进一步引起肾脏细胞氧化应激和炎症反应活化, 最终导致肾功能损伤、肾小球滤过屏障破坏和蛋白尿^[20-22], 甚至增加肾衰竭的风险^[11,23]。长期果糖饮食还被证实是青少年肾功能障碍及相关并发症发生的关键诱因^[24]。因此, 迫切需关注日常生活中果糖摄入对肾脏健康的潜在危害。

在果糖饮食驱动 CKD 进展过程中, 氧化应激活化被认为是诱导肾脏细胞损伤和细胞死亡的关键驱动因素, 也是肾损伤发生的关键致病事件^[25],

而抑制肾脏氧化应激在治疗果糖驱动的慢性肾损伤中显示出了积极作用^[26-27], 这与课题组前期研究结果一致^[13]。铁死亡是一种铁依赖性的由氧化应激反应和胱氨酸代谢密切相关的脂基活性氧积累驱动的新型细胞程序性死亡方式, 与 CKD 及相关并发症进展密切相关^[28-29]。最新的研究显示, 高果糖摄入可导致肾小球足细胞和肾小管上皮细胞铁死亡^[30-31]。此外, 高果糖摄入导致的血尿酸水平升高作为一种强效的细胞内促氧化剂, 可通过诱导细胞氧化应激导致肾小管细胞铁蓄积和铁死亡核心调控酶 GPX4 失活, 导致细胞内过氧化物的堆积, 引发铁死亡, 从而加速 CKD 进展^[32], 而铁死亡抑制在 CKD 治疗中的潜力已得到充分认可, 被认为

是极具潜力的 CKD 干预靶点^[33-34]。提示靶向抑制铁死亡减轻肾脏损伤可能是延缓 CKD 进展的前瞻性策略。山茱萸是我国传统名贵中药材和药食同源类中药，被誉为补益肝肾之要药^[35]，具有巨大的开发应用前景。莫诺昔是山茱萸中最主要的环烯醚萜苷类成分之一，且是《中国药典》2020 年版规定的山茱萸含量测定的主要指标性成分，是山茱萸发挥药效学作用的物质基础。尽管已有研究显示，莫诺昔具有改善糖尿病肾病小鼠肾损伤^[7]和抑制铁死亡的作用^[36-37]，但铁死亡在莫诺昔改善 CKD 中发挥的作用至今仍未见报道。因此，本研究重点关注了莫诺昔调控铁死亡改善果糖饮食诱导小鼠肾功能障碍和肾损伤的作用及潜在分子机制。结果显示，莫诺昔治疗后果糖饮食小鼠血清 Cre、BUN、尿酸及尿蛋白含量显著降低，肾小管扩张、肾小球纤维化等组织学变化明显减轻，表明莫诺昔具有改善果糖饮食小鼠肾损伤的作用。GPX4 是谷胱甘肽过氧化物酶家族中最重要的铁死亡调节因子之一，能够协同 SLC7A11 催化脂质过氧化物的还原，对维持细胞内脂质过氧化稳态至关重要^[4,38]。研究显示，肾损伤过程中，铁离子超载可以催化脂质过氧化物的生成，当 GPX4 活性不足时，脂质过氧化物就会大量积累，加速细胞内 ROS 生成，从而破坏细胞膜和线粒体完整性，导致肾脏细胞铁死亡^[39]。本研究果糖饮食小鼠肾脏伴随着大量铁沉积，且肾脏总铁和 Fe²⁺ 含量均显著升高，而莫诺昔治疗后能够显著降低果糖饮食小鼠肾脏铁超载。进一步研究发现，莫诺昔治疗能够升高果糖饮食小鼠肾脏 GPX4、SLC7A11 mRNA 和蛋白的表达水平，并降低肾脏 ROS、MDA 及脂质过氧化物含量，改善果糖诱导的小鼠肾脏铁死亡。GPX4 抑制剂即铁死亡诱导剂能够逆转莫诺昔抑制 GPX4 介导的铁死亡改善果糖饮食小鼠肾损伤的作用。以上结果说明，莫诺昔改善高果糖饮食小鼠肾损伤与促进肾脏 GPX4/SLC7A11 信号活化抑制铁死亡密切相关。

综上，莫诺昔具有改善高果糖饮食小鼠肾损伤的作用，其作用机制与调控 GPX4 依赖的铁死亡从而减轻肾脏氧化应激有关。莫诺昔作为天然活性化合物是一种潜在的营养治疗剂，未来非常有前景开发为治疗 CKD 药物，而膳食补充莫诺昔或富含莫诺昔的中药（如山茱萸）可作为预防 CKD（尤其是高果糖饮食驱动的 CKD 亚型）的有效策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Matsushita K, Ballew S H, Wang A Y, *et al.* Epidemiology and risk of cardiovascular disease in populations with chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2022, 18(11): 696-707.
- [2] Collaboration G C K D. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990 — 2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395(10225): 709-733.
- [3] Foreman K J, Marquez N, Dolgert A, *et al.* Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: Reference and alternative scenarios for 2016-40 for 195 countries and territories [J]. *Lancet*, 2018, 392(10159): 2052-2090.
- [4] Chu L K, Cao X, Wan L, *et al.* Autophagy of OTUD5 destabilizes GPX4 to confer ferroptosis-dependent kidney injury [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 8393.
- [5] Long Z Y, Luo Y F, Yu M, *et al.* Targeting ferroptosis: A new therapeutic opportunity for kidney diseases [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1435139.
- [6] Zhao Y, Song J Y, Feng R, *et al.* Renal health through medicine-food homology: A comprehensive review of botanical micronutrients and their mechanisms [J]. *Nutrients*, 2024, 16(20): 3530.
- [7] 吕兴, 许惠琴, 刘斌, 等. 莫诺昔对晚期糖基化终末产物加重链脲佐菌素诱导糖尿病肾病保护作用及其机制 [J]. *中草药*, 2014, 45(21): 3109-3116.
- [8] Zhang C, Tong Q, Liu K X, *et al.* Morroniside delays the progression of non-alcoholic steatohepatitis by promoting AMPK-mediated lipophagy [J]. *Phytomedicine*, 2024, 129: 155703.
- [9] Yu H, Yao S, Zhou C C, *et al.* Morroniside attenuates apoptosis and pyroptosis of chondrocytes and ameliorates osteoarthritic development by inhibiting NF-κB signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 266: 113447.
- [10] Gao X, Liu Y, Wang L, *et al.* Morroniside inhibits H₂O₂-induced podocyte apoptosis by down-regulating NOX4 expression controlled by autophagy *in vitro* [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 533809.
- [11] Nakagawa T, Johnson R J, Andres-Hernando A, *et al.* Fructose production and metabolism in the kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(5): 898-906.
- [12] Andres-Hernando A, Orlicky D J, Cicerchi C, *et al.* High fructose corn syrup accelerates kidney disease and mortality in obese mice with metabolic syndrome [J]. *Biomolecules*, 2023, 13(5): 780.
- [13] Zhang C, Song Y Y, Chen L, *et al.* Urolithin A attenuates hyperuricemic nephropathy in fructose-fed mice by impairing STING-NLRP3 axis-mediated inflammatory response via restoration of parkin-dependent mitophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 907209.

- [14] Wang P, Zhang X Q, Zheng X, *et al.* Folic acid protects against hyperuricemia in C57BL/6J mice via ameliorating gut-kidney axis dysfunction [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(50): 15787-15803.
- [15] Chen Y, Liu Q P, Meng X Y, *et al.* Catalpol ameliorates fructose-induced renal inflammation by inhibiting TLR4/MyD88 signaling and uric acid reabsorption [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 967: 176356.
- [16] Zhang L J, Chen F, Dong J, *et al.* HDAC3 aberration-incurred GPX4 suppression drives renal ferroptosis and AKI-CKD progression [J]. *Redox Biol*, 2023, 68: 102939.
- [17] Ye Y Z, Chen A, Li L, *et al.* Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification [J]. *Kidney Int*, 2022, 102(6): 1259-1275.
- [18] GBD 2017 Diet Collaborators. Health effects of dietary risks in 195 countries, 1990—2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2019, 393(10184): 1958-1972.
- [19] Srouf B, Fezeu L K, Kesse-Guyot E, *et al.* Ultraprocessed food consumption and risk of type 2 diabetes among participants of the NutriNet-santé prospective cohort [J]. *JAMA Intern Med*, 2020, 180(2): 283-291.
- [20] Olofsson C, Anderstam B, Bragfors-Helin A C, *et al.* Effects of acute fructose loading on levels of serum uric acid—a pilot study [J]. *Eur J Clin Invest*, 2019, 49(1): e13040.
- [21] Zawiasa A, Nowicki M. Acute effects of fructose consumption on uric acid and plasma lipids in patients with impaired renal function [J]. *Metabolism*, 2013, 62(10): 1462-1469.
- [22] Vallon V, Nakagawa T. Renal tubular handling of glucose and fructose in health and disease [J]. *Compr Physiol*, 2021, 12(1): 2995-3044.
- [23] Zhang P F, Sun H M, Cheng X Y, *et al.* Dietary intake of fructose increases purine de novo synthesis: A crucial mechanism for hyperuricemia [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 1045805.
- [24] Russo E, Leoncini G, Esposito P, *et al.* Fructose and uric acid: Major mediators of cardiovascular disease risk starting at pediatric age [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4479.
- [25] Hu G Z, Xu L S, Ito O. Impacts of high fructose diet and chronic exercise on nitric oxide synthase and oxidative stress in rat kidney [J]. *Nutrients*, 2023, 15(10): 2322.
- [26] Chen L, Yang J, Zhao S J, *et al.* *Atractylodis Rhizoma* water extract attenuates fructose-induced glomerular injury in rats through anti-oxidation to inhibit TRPC6/p-CaMK4 signaling [J]. *Phytomedicine*, 2021, 91: 153643.
- [27] Cheng X L, Qiu L W, Wang F. 18 α -Glycyrrhetic acid (GA) ameliorates fructose-induced nephropathy in mice by suppressing oxidative stress, dyslipidemia and inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 125: 109702.
- [28] Gao L, Zhang J S, Yang T T, *et al.* STING/ACSL4 axis-dependent ferroptosis and inflammation promote hypertension-associated chronic kidney disease [J]. *Mol Ther*, 2023, 31(10): 3084-3103.
- [29] Wang X J, Kim C S, Adams B C, *et al.* Human proximal tubular epithelial cell-derived small extracellular vesicles mediate synchronized tubular ferroptosis in hypoxic kidney injury [J]. *Redox Biol*, 2024, 70: 103042.
- [30] Wu W Y, Wang Z X, Li T S, *et al.* SSBP1 drives high fructose-induced glomerular podocyte ferroptosis via activating DNA-PK/p53 pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 52: 102303.
- [31] Guo H, Fang T, Cheng Y, *et al.* ChREBP- β /TXNIP aggravates fructose-induced renal injury through triggering ferroptosis of renal tubular epithelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 199: 154-165.
- [32] Li Y M, Zheng F X, Zhong S Q, *et al.* Protecting against ferroptosis in hyperuricemic nephropathy: The potential of ferrostatin-1 and its inhibitory effect on URAT1 [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 971: 176528.
- [33] Wang J Y, Wang Y Q, Liu Y, *et al.* Ferroptosis, a new target for treatment of renal injury and fibrosis in a 5/6 nephrectomy-induced CKD rat model [J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 127.
- [34] Guo R Z, Duan J Y, Pan S K, *et al.* The road from AKI to CKD: Molecular mechanisms and therapeutic targets of ferroptosis [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(7): 426.
- [35] 刘艳阳, 刘佩军, 郑艳华, 等. 《医学衷中参西录》山茱萸应用特色探析 [J]. *现代中医药*, 2016, 36(3): 66-68.
- [36] Du W B, Zeng W X, Wang Z W, *et al.* Morroniside repairs atrazine-induced skin damage by ameliorating lipid metabolism disorders and inhibiting ferroptosis [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 285: 117047.
- [37] Li M, Zhang J L, Jiang L Y, *et al.* Neuroprotective effects of morroniside from *Cornus officinalis* Sieb. Et Zucc against Parkinson's disease via inhibiting oxidative stress and ferroptosis [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 218.
- [38] Liu Y, Wan Y C, Jiang Y, *et al.* GPX4: The hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(3): 188890.
- [39] Guo Y Y, Liang N N, Zhang X Y, *et al.* Mitochondrial GPX4 acetylation is involved in cadmium-induced renal cell ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2024, 73: 103179.

[责任编辑 李亚楠]