

网络出版时间:2026-02-09 08:39:36 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260408.1018.015

KLF4调控糖尿病肾病铁死亡的作用机制

张焕臻¹,但章勇¹,施晓蕊¹,朱如梦¹,王怡²,朱华庆¹

(¹安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,分子生物学实验室,合肥 230032;

²安徽医科大学生命科学院微生物与生物工程系,合肥 230032)

摘要 **目的** 研究 Krüppel 样因子 4(KLF4)在 1 型糖尿病肾病(DN)中的作用及相关机制。**方法** 实验选取 16 只 SD 雄性大鼠,随机将其分为对照组与模型组,每组各 8 只。模型组大鼠予以单次腹腔注射 55 mg/kg 链脲佐菌素(STZ)制备 DN 模型,对照组于同一时间注射等体积枸橼酸钠缓冲液。模型构建成功后,测定血清中尿素氮(BUN)、血肌酐(SCR)水平,并对肾脏组织进行 HE 染色,以观察其病理学改变;免疫荧光染色检测肾脏组织内 KLF4 的表达情况;丙二醛(MDA)、Fe²⁺实验观察其脂质过氧化水平;构建高糖(HG)诱导的肾小管上皮细胞(HK-2)损伤模型,四氯四乙基苯并咪唑基羰花青碘化物(JC-1)检测 HK-2 细胞线粒体膜电位变化;MDA、Fe²⁺及脂质过氧化物实验检测 HK-2 细胞脂质过氧化水平;构建过表达 KLF4 HK-2 细胞,检测 JC-1、MDA、Fe²⁺及脂质过氧化物表达水平变化。Western blot 检测肾脏组织、HK-2 细胞及过表达 KLF4 HK-2 细胞内铁死亡相关蛋白:谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)、核因子 E2 相关因子 2(NRF2)、Kelch 样 ECH 相关蛋白-1(Keap1)表达水平。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠血清 BUN、SCR 水平升高,肾小球体积增大,肾间质纤维化,KLF4 表达水平下降,MDA、Fe²⁺及脂质过氧化物水平上升,NRF2、GPX4 表达水平降低,Keap1 表达水平升高。同时,HG 诱导的 HK-2 细胞也出现 KLF4 表达水平下降,MDA、Fe²⁺及脂质过氧化物水平上升,GPX4、NRF2 表达水平降低,Keap1 表达水平升高。而在过表达 KLF4 后,则可逆转 HG 诱导的上述变化。**结论** 在 1 型糖尿病大鼠肾脏组织中,KLF4 表达下降,铁死亡水平上升,过表达 KLF4 可缓解 HG 诱导的 HK-2 损伤。

关键词 糖尿病肾病;KLF4;铁死亡;Keap1;NRF2;GPX4

中图分类号 R 587

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)03-0509-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.017

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的严重微血管并发症之一,以持续性蛋白尿、肾小球滤过率降低和肾脏纤维化为特征性病理表现^[1]。在糖尿病病程中,长期高血糖状态可导致肾脏微血管结构损伤与肾单位功能进行性减退,约 20%~40% 的糖尿病患者最终可进展为终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)。研究^[2-3]显示,糖尿病常伴随氧化应激失衡、铁代谢异常及脂质过氧化增强等表现,而抑制铁死亡发生可显著减少足细胞及肾小管上皮细胞 HK-2 的死亡,缓解肾小球硬化和肾间质纤维化进程^[4]。而 Kelch 样 ECH 相关蛋

白 1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)轴是糖尿病氧化应激-铁死亡损伤的核心调控枢纽,若此通路调控异常会导致抗氧化防御机制减弱,并解除铁死亡抑制机制^[5],进而加速肾脏发生病变。

Krüppel 样因子 4(Krüppel-like factor 4, KLF4)隶属于 Krüppel 样转录因子家族,其分子结构中含有锌指结构域,广泛参与调控细胞分化、增殖、凋亡等生物学过程以及干细胞多能性维持和组织稳态调控,其在细胞命运调控中扮演核心角色^[6]。目前 KLF4 在 DN 中的作用及机制尚未见报道,故该实验以糖尿病大鼠为研究对象,探究 KLF4 在 DN 中的作用及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 16 只 SPF 级 SD 雄性大鼠由河南斯克贝斯生物科技股份有限公司提供,饲养于安徽医科大学实验动物中心 SPF 级环境中,温度(20±2)℃,

2025-12-04 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:82170484);安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202004b11020025);安徽省高校自然科学研究重点项目(编号:KJ2021A0247)

作者简介:张焕臻,女,硕士研究生;

朱华庆,男,教授,博士生导师,通信作者,E-mail: aydzhq@126.com;

王怡,女,博士,讲师,通信作者,E-mail: wangyi@ahmu.edu.cn

相对湿度40%~70%,采用12 h光照/12 h黑暗交替的光周期。所有实验动物的饲养与操作均遵循安徽省实验动物饲养与使用管理规范。[实验动物使用许可证编号:SYXK(皖)2020-001,生产许可证编号:SCXK(豫)2020-0005,伦理批号:LLSC20230983]。

1.2 实验细胞 HK-2细胞在含有10% FBS和1%青霉素和链霉素的低葡萄糖F12(LG),温度为37℃,湿度为95%,CO₂为5%的环境中生长。此外,对于基因过表达,根据制造商的方案,使用KLF4 OERNA预转染HK-2细胞。

1.3 主要化学品和试剂 JC-1检测试剂盒(货号:#CT0045)购自北京兰杰柯科技有限公司;尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)检测试剂盒(货号:#C013-2-1)、肌酐(serum creatinine, SCR)检测试剂盒(货号:#C011-2-1)购自南京建成生物工程研究所;F12细胞培养液购自上海逍鹏生物科技有限公司;青霉素-链霉素溶液(货号:#ST488S)、蛋白酶抑制剂(phenyl methane sulfonyl fluoride, PMSF)(货号:#P1005)、MDA检测试剂盒(货号:#S0131S)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(货号:#P0011)购自上海碧云天生物技术有限公司;OE-KLF4慢病毒液购自上海和元生物技术有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(货号:#086-150)购自南京维森特生物技术有限公司;Fe²⁺浓度检测试剂盒(货号:#E-BC-K773-M)购自武汉Elabscience公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(货号:#S0130)购自美国Sigma公司;Anti-Keap1(货号:#8047)、Anti-NRF2(货号:#12721)、Anti-GPX4(货号:#59735)抗体购自美国Cell Signaling Technology公司;山羊抗大鼠IGG-HRP(货号:#sc-2006)、山羊抗兔IGG-HRP(货号:#sc-2004)购自美国Santa Cruz公司。

1.4 方法

1.4.1 动物模型构建 16只SPF级SD雄性大鼠,体质量(230±20)g,适应性饲养1周后,随机分为对照组和模型组,每组8只。大鼠于8周龄时进行糖尿病模型构建,禁食不禁水14~16 h后,以55 mg/kg剂量进行STZ单次腹腔注射,注射3 h后恢复饮食;对照组大鼠同步腹腔注射等体积枸橼酸钠缓冲液,造模5 d后,对大鼠进行连续2次随机血糖检测,以血糖值≥16.7 mmol/L且伴多尿、多饮及体质量下降作为糖尿病模型成功的标准。

1.4.2 BUN和SCR测定 BUN检测:按试剂盒说明书配制检测体系,于640 nm波长测定样本吸光

度,参照试剂盒标准曲线计算尿素氮含量;SCR检测:按试剂盒说明书配制检测体系,最终依据试剂盒提供的计算公式推算肌酐浓度。

1.4.3 细胞模型构建 为了构建糖尿病体外细胞模型, HK-2细胞在含有30 mmol/L葡萄糖、10% FBS和1%青霉素和链霉素的高葡萄糖F12(HG)中培养24 h。使用KLF4 OERNA预转染HK-2细胞,构建过表达KLF4 HK-2细胞后,同样置于HG条件下处理24 h。

1.4.4 脂质过氧化检测 移除原有培养基,使用PBS缓冲液漂洗细胞。在培养皿中加入1 mL含5 μmol/L硼二吡咯亚甲基荧光探针(BODIPY 581/591 C11)染色液。将样本置于细胞培养箱中孵育30 min。完成染色程序后,用PBS冲洗,采用激光共聚焦显微镜(激发波长581 nm/发射波长591 nm)实施细胞内活性氧介导的脂质过氧化检测。

1.4.5 JC-1检测 弃去培养皿中原有培养基,用PBS缓冲液轻柔洗涤细胞,加入500 μL细胞培养液。培养皿中加入500 μL JC-1染色工作液,混匀后置于37℃细胞培养箱中孵育20 min。孵育期间,按JC-1染色缓冲液(5×)与蒸馏水1:4的体积比配制1×缓冲液,置于冰浴中备用。孵育结束后,用预冷的1×JC-1染色缓冲液洗涤细胞,加入多聚甲醛溶液室温固定5~10 min,随后用PBS缓冲液洗涤。加入DAPI溶液进行细胞核染色,37℃避光孵育10 min, PBS缓冲液洗涤后,加入1 mL细胞培养液。激光共聚焦显微镜下观察荧光信号。

1.4.6 Fe²⁺浓度检测 称取0.1 g液氮速冻肾脏组织样本,于冰浴条件下加入0.9 mL预冷组织裂解缓冲液,匀浆后转移至1.5 mL低温离心管,离心10 min。随后按试剂盒说明书配制检测体系,使用酶标仪在593 nm波长下检测,基于建立的标准曲线计算产物浓度。

1.4.7 MDA含量检测 称取等质量液氮速冻肾脏组织样本,每0.1 g肾脏组织加入1 mL RIPA裂解液(含1 mmol/L PMSF),匀浆后收集上清液,取8 μL用BCA法进行标准化定量。随后按试剂盒说明书配制检测体系,使用酶标仪于532 nm波长处测定吸光度值,通过标准曲线方程计算组织样本中MDA含量。

1.4.8 HE和免疫荧光染色 肾脏组织蜡块切片脱蜡后,按常规方法进行HE染色,使用共聚焦显微镜拍照并保存。对于KLF4的免疫荧光染色,肾脏

冰冻切片完成脱水预处理后,浸没于多聚甲醛溶液中室温固定 30 min。经 PBS 缓冲液洗涤后,滴加山羊血清封闭液,于 37 °C 恒温箱中孵育 20 min。随后移除封闭液,加入 KLF4 特异性一抗工作液,4 °C 孵育过夜。PBS 缓冲液洗涤切片,加入对应种属二抗,于 37 °C 避光环境下孵育 1 h。二抗孵育结束后,PBS 洗涤,滴加 DAPI 核染色液,37 °C 避光染色 10 min。结束后,用 PBST 洗涤,滴加抗荧光淬灭剂封片,使用激光共聚焦显微镜观察及拍照。

1.4.9 Western blot 检测蛋白表达 取等质量液氮速冻的肾脏组织样本,按每 0.1 g 组织加入 1 mL 含 1 mmol/L PMSF 的 RIPA 裂解液,使用冷冻研磨仪进行机械匀浆。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,调整蛋白浓度一致并均一化处理。配制 10% SDS-PAGE 凝胶,各泳道加入等体积的蛋白样本电泳,电泳结束后将蛋白转移至 PVDF 膜。快速封闭液室温封闭 30 min。4 °C 摇床与对应一抗(1:1 000)孵育过夜。次日,用 TBST 缓冲液洗膜,加入对应种属的二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,孵育完成后,TBST 缓冲液洗涤膜,配置显影液显影。使用 ChemiDoc™ Touch 成像系统采集图像。

1.5 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 模型组大鼠肾功能 SCR、BUN 水平的变化

与对照组相比,模型组 BUN、SCR(DN 模型构建成功后,继续饲养 16 周后取血清检测)水平均有增高($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 HE 染色结果 对照组肾小球结构正常,毛细

血管内皮细胞排列整齐,肾小管细胞形态正常,无空泡变性、坏死,无扩张或萎缩,肾间质无明显炎性细胞浸润;模型组出现肾小球体积增大,内皮细胞排列紊乱,肾小管出现空泡变性,肾小管扩张或萎缩,肾间质可见炎性细胞浸润。见图 2。

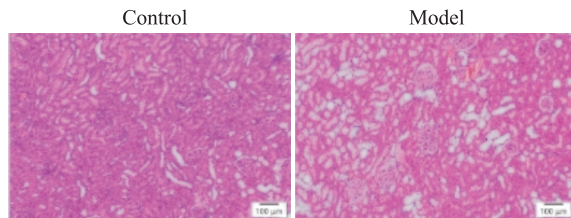


图 2 大鼠肾脏 HE 染色结果 ×100

Fig. 2 The results of HE staining of rat kidneys ×100

2.3 模型组大鼠肾脏组织 KLF4 表达情况

免疫荧光结果显示,与对照组相比,模型组 KLF4 绿色荧光强度显著弱于对照组。见图 3。

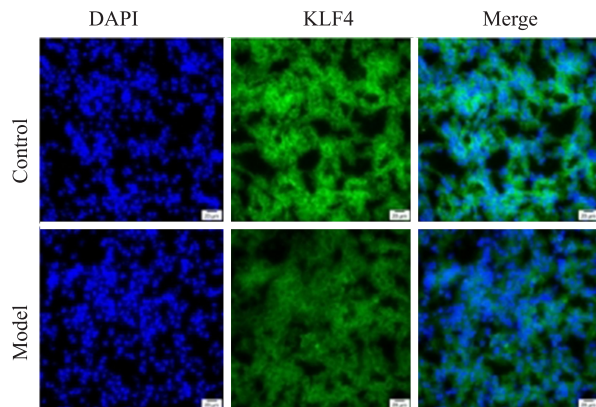


图 3 大鼠肾脏组织免疫荧光 KLF4 表达水平变化 ×400

Fig. 3 Changes in the expression level of KLF4 in rat kidney tissues detected by immunofluorescence ×400

2.4 模型组大鼠肾脏铁死亡相关 MDA 含量与 Fe^{2+} 浓度变化

与对照组相比,模型组 MDA 含量增加($P < 0.01$), Fe^{2+} 浓度上升($P < 0.001$)。见图 4。

2.5 模型组大鼠肾脏铁死亡相关蛋白 GPX4、NRF2、Keap1 表达水平变化

与对照组相比,模型组肾脏组织中 GPX4 表达水平下调($P < 0.05$),NRF2 表达水平下调($P < 0.01$),Keap1 表达水平上调($P < 0.05$)。见图 5。

2.6 HG 诱导的 HK-2 细胞线粒体膜电位变化

与正常组细胞相比,HG 组细胞出现明显粒体膜电位降低。见图 6。

2.7 HG 诱导的 HK-2 细胞铁死亡相关 MDA 含量、 Fe^{2+} 浓度、脂质过氧化物水平变化

与正常组相

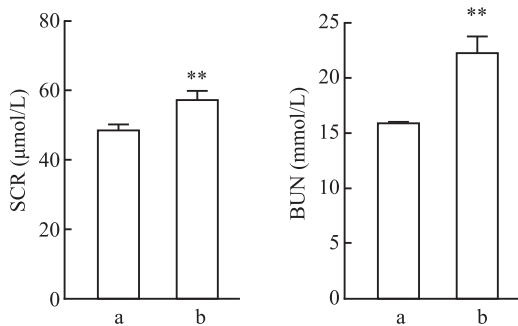


图 1 大鼠血清 BUN 及 SCR 水平变化

Fig. 1 Changes in serum BUN and SCR levels in rats

a: Control group; b: Model group; ** $P < 0.01$ vs Control group.

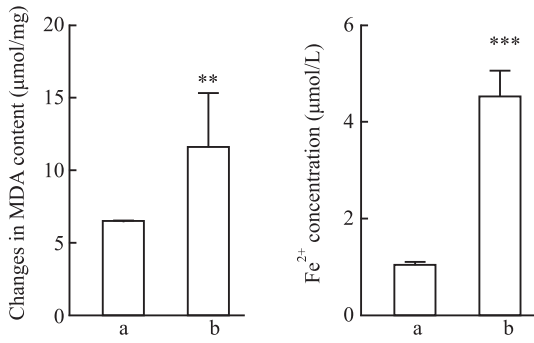


图4 大鼠肾脏铁死亡相关MDA与Fe²⁺变化

Fig. 4 Changes in MDA levels and Fe²⁺ concentration in rat kidneys

a: Control group; b: Model group; ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 vs Control group.

比, HG组HK-2细胞中MDA含量增加(*P* < 0.001), Fe²⁺浓度上升(*P* < 0.01), 脂质过氧化水平显著升高(绿色荧光强度增强)。见图7、8。

2.8 HG诱导的HK-2细胞KLF4及铁死亡相关GPX4、NRF2、Keap1蛋白表达水平变化 与正常组比较, HG组HK-2细胞中KLF4蛋白表达下调(*P* < 0.0001), GPX4蛋白表达下调(*P* < 0.05), NRF2蛋白表达下调(*P* < 0.01), Keap1蛋白表达上调(*P* < 0.05)。见图9。

2.9 过表达KLF4细胞株构建及过表达KLF4后HK-2细胞线粒体膜电位变化 过表达KLF4后, 可以逆转HG效应, 使线粒体膜电位上升。见图10、11。

2.10 过表达KLF4后HK-2细胞铁死亡相关MDA含量、Fe²⁺浓度、脂质过氧化物水平变化 过表达KLF4后, 逆转了HG效应, 表现为脂质过氧化水平降低, MDA含量减少(*P* < 0.01), Fe²⁺浓度下降(*P* < 0.0001)。见图12、13。

2.11 过表达KLF4后HK-2细胞铁死亡相关蛋白

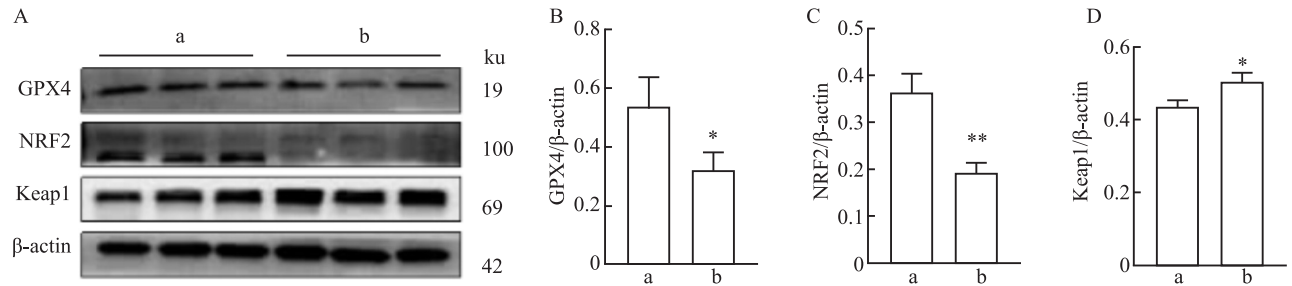


图5 大鼠肾脏组织GPX4、NRF2、Keap1蛋白表达水平变化

Fig. 5 Changes in the protein expression levels of GPX4, NRF2 and Keap1 in rat kidney tissues

A: Western blot results; B-D: Comparison of the relative expression levels of proteins in each group; a: Control group; b: Model group; **P* < 0.05, ***P* < 0.01 vs Control group.

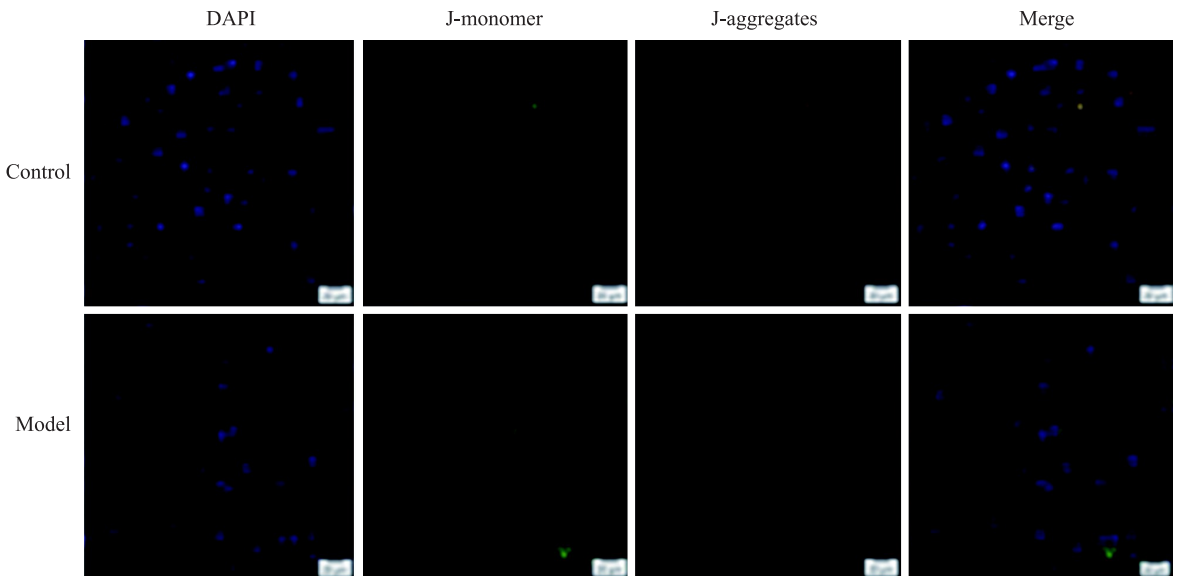


图6 HK-2细胞线粒体膜电位变化 ×400

Fig. 6 Changes in mitochondrial membrane potential of HK-2 cells ×400

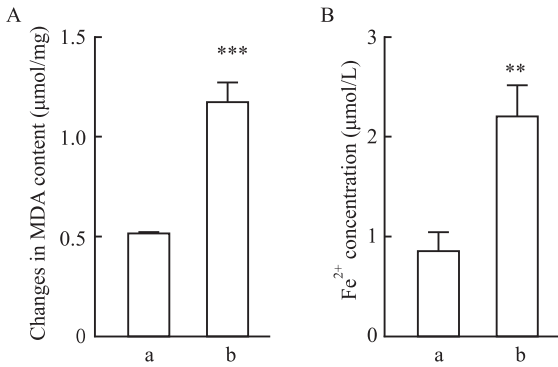


图7 HK-2细胞铁死亡相关MDA(A)与Fe²⁺(B)变化

Fig. 7 Changes in MDA levels (A) and Fe²⁺ concentration (B) in HK-2 cells

a: Control group; b: Model group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Control group.

GPX4、NRF2、Keap1 表达水平变化 过表达 *KLF4* 后,逆转了 HG 效应,GPX4 蛋白表达上调 ($P < 0.0001$),NRF2 蛋白表达上调 ($P < 0.0001$),Keap1 蛋白表达下调 ($P < 0.01$)。见图 14。

3 讨论

本研究通过体内外实验,系统揭示了 *KLF4* 在 DN 以及 HK-2 细胞铁死亡中的关键保护作用及其分子机制。HE 染色结果显示, DN 条件下肾脏呈现典型的病理损伤特征,包括肾小球体积增大、内皮细胞排列紊乱、肾小管空泡变性、扩张或萎缩以及肾间质炎性细胞浸润。免疫荧光染色进一步证实, DN

肾脏组织中 *KLF4* 蛋白表达显著下调。在功能层面, HG 诱导的 HK-2 出现了线粒体膜电位下降,而 *KLF4* 过表达有效逆转了这一现象,直接支持了 *KLF4* 对 HK-2 的保护作用。这些形态学和功能学改变为后续分子机制的探讨奠定了坚实的病理生理基础。

实验结果显示,糖尿病大鼠模型及 HG 处理的 HK-2 细胞中,伴随肾功能损伤(如血清 SCR、BUN 升高)和肾小管损伤标志物表达增加,均观察到脂质过氧化产物(如 MDA)显著积累和 Fe²⁺ 水平升高,提示铁死亡途径的激活。分子水平上,在 DN/HG 条件下, *KLF4* 表达降低的同时,观察到 Keap1 表达上调,而关键的 NRF2 及其下游效应分子 GPX4 的表达则下调。在 HK-2 细胞中特异性过表达 *KLF4*,能够有效逆转 HG 诱导的上述分子表型(即抑制 Keap1、恢复 NRF2 和 GPX4 表达)、减轻脂质过氧化(降低 MDA 水平)、改善线粒体形态与功能损伤,并最终抑制细胞铁死亡。这一系列结果表明, *KLF4* 功能丧失是 DN 进展中驱动 HK-2 铁死亡及肾损伤的关键因素。

本研究深入揭示了 *KLF4* 发挥肾保护作用的核心分子机制在于调控 Keap1-NRF2-GPX4 信号轴。在生理状态下, *KLF4* 可能通过直接或间接抑制 Keap1 的转录^[7],维持 NRF2^[8] 的稳定性并促进其核转位,从而激活包括 GPX4^[9] 在内的下游抗氧化基因

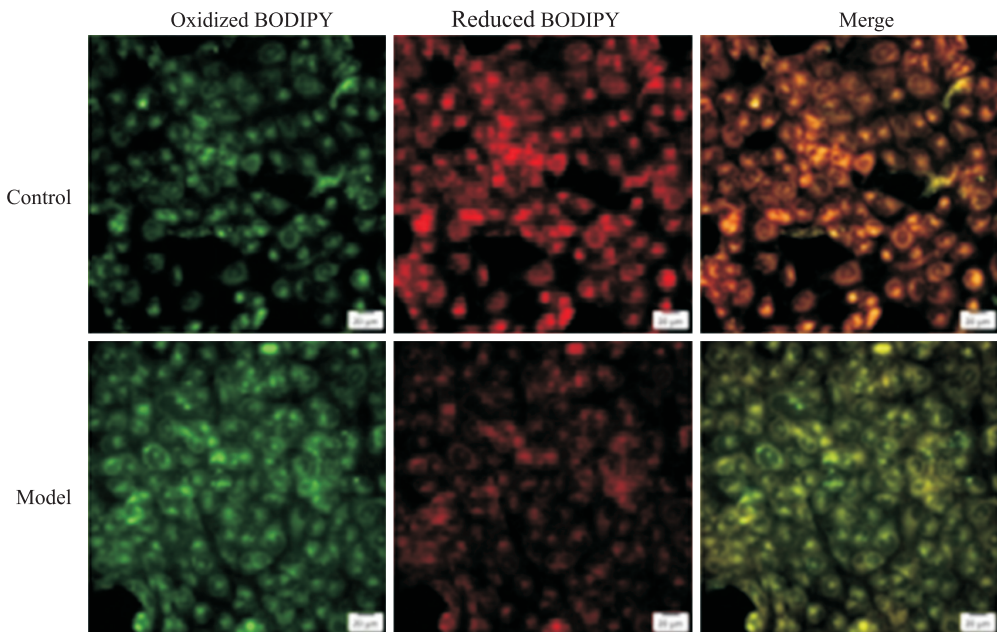


图8 HK-2细胞脂质过氧化物水平变化 ×400

Fig. 8 Changes in the lipid peroxide level of HK-2 cells ×400

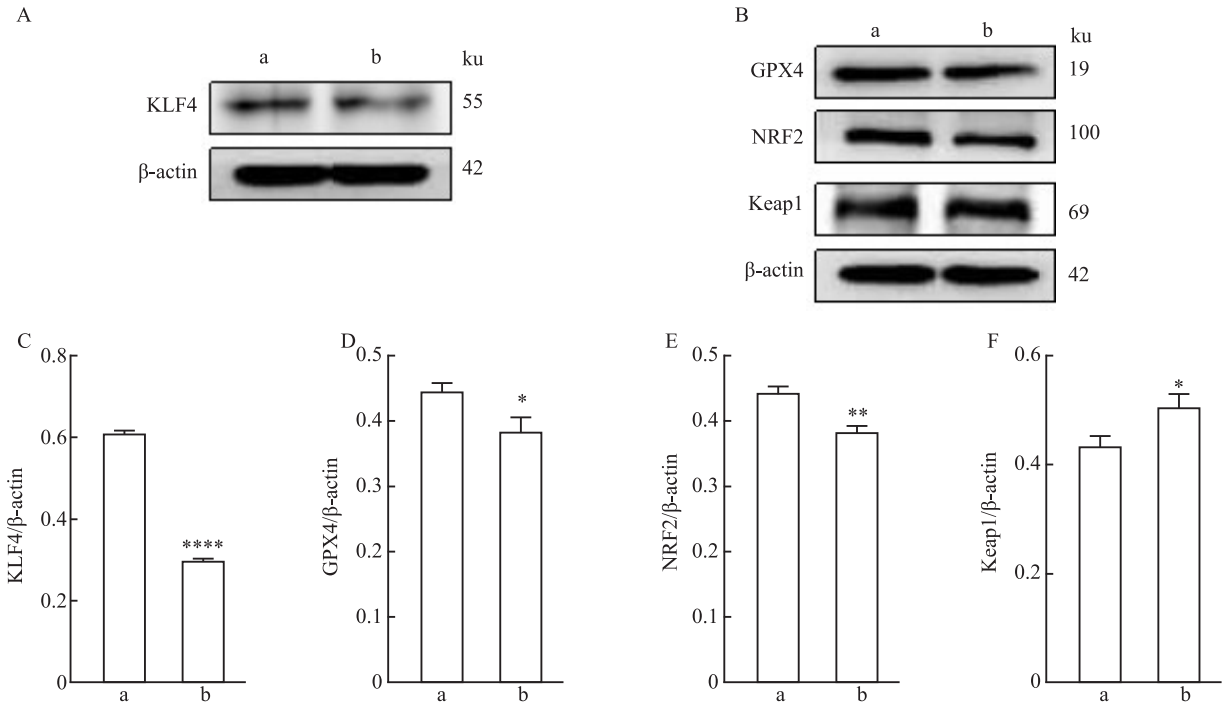


图9 HK-2细胞KLF4、GPX4、NRF2、Keap1蛋白表达水平变化

Fig. 9 Changes in the expression levels of KLF4, GPX4, NRF2 and Keap1 proteins in HK-2 cells

A, B: Western blot results; C-F: Comparison of the relative expression levels of proteins in each group; a: Normal group; b: HG group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ vs Normal group.

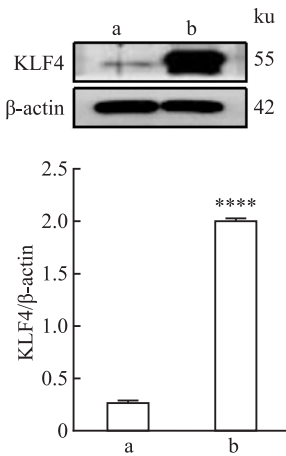


图10 Western blot验证HK-2过表达KLF4细胞株

Fig. 10 The construction of HK-2 cell line with over-expressed KLF4 verified by Western blot

a: Normal group; b: OE-KLF4 group; **** $P < 0.0001$ vs Normal group.

的表达。然而,在DN/HG的病理微环境下,KLF4的表达受到抑制,导致其对Keap1的负向调控作用减弱。Keap1表达失控进而促进NRF2的泛素化降解^[10],最终造成GPX4合成减少。GPX4作为清除脂质过氧化氢的关键酶,其表达下调削弱了细胞对脂质过氧化的防御能力,成为铁死亡^[11]发生的重要环节。本研究通过KLF4过表达实验验证了KLF4-

Keap1-NRF2-GPX4轴的存在及其在对抗HG诱导铁死亡中的核心地位。

结合已有研究,KLF4可能通过双重机制阻断铁死亡:①直接调控Keap1-NRF2-GPX4轴,增强抗氧化能力;②抑制铁代谢相关基因(如*TFR1*、*FTL*)的表达,减少游离铁池的生成。KLF4的缺失导致细胞内铁超载与脂质过氧化相互促进,形成“铁超载-脂质过氧化-铁死亡”的恶性正反馈环路^[12],加速HK-2的死亡。双重机制的失效共同解释了DN微环境中抗氧化防御系统崩溃和铁死亡易感性增加的深层原因。

综上所述,本研究阐明并验证了KLF4-Keap1-NRF2-GPX4信号轴在DN以及HK-2细胞铁死亡中的核心调控作用。KLF4通过维持该轴的正常功能,构成抵抗糖尿病肾脏氧化损伤和铁死亡的关键内源性保护机制。其功能下调是该病理过程的重要驱动因素。该研究可为理解DN肾损伤的分子机制^[13]提供了新视角,揭示了抗氧化防御在糖尿病微环境中失效的关键环节,靶向激活KLF4或其下游通路(如NRF2激活剂、GPX4稳定剂)有望成为开发新型抗氧化-抗铁死亡联合疗法以防治DN的理论基础。

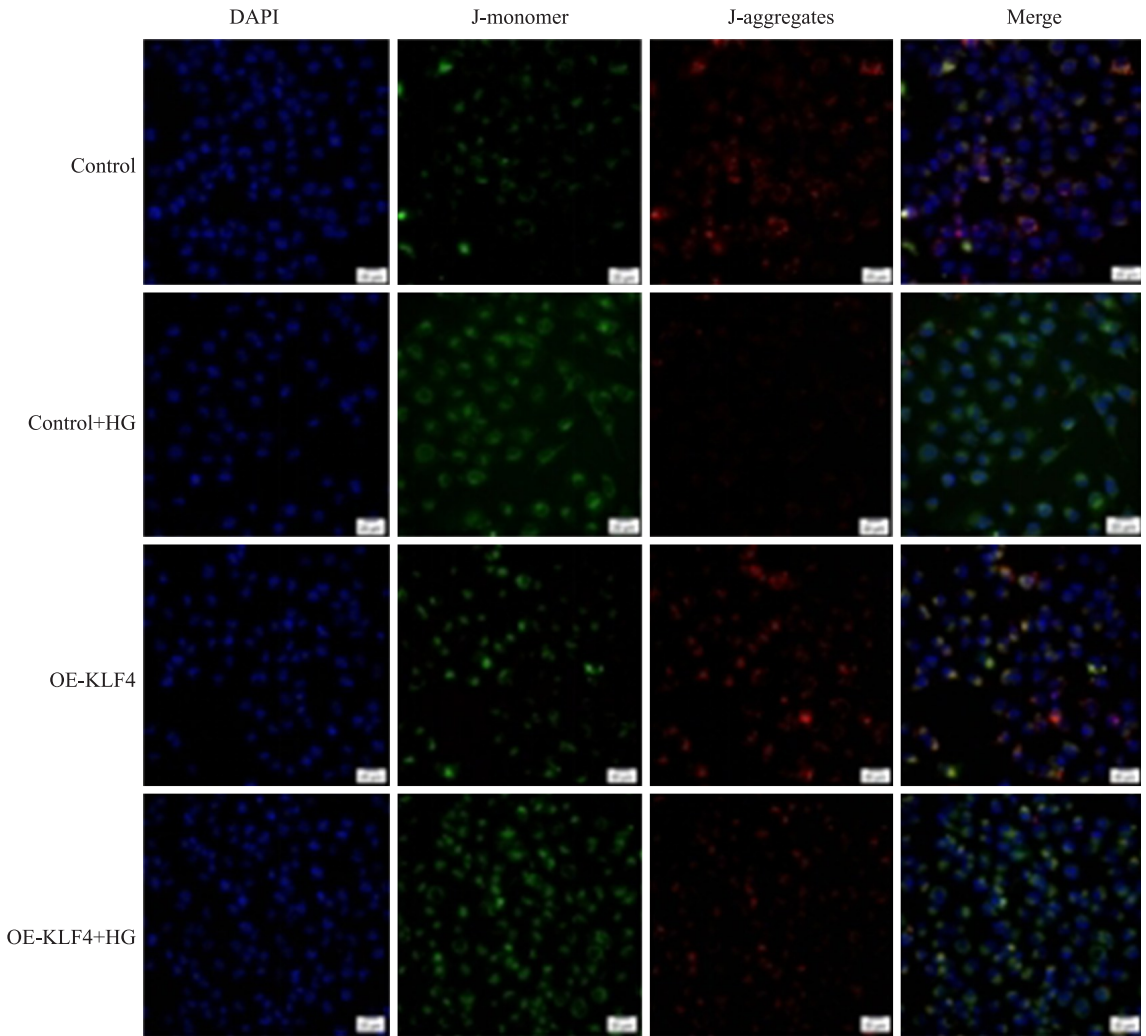


图 11 过表达 KLF4 HK-2 细胞线粒体膜电位变化 × 400

Fig. 11 Changes in mitochondrial membrane potential of KLF4-overexpressing HK-2 cells × 400

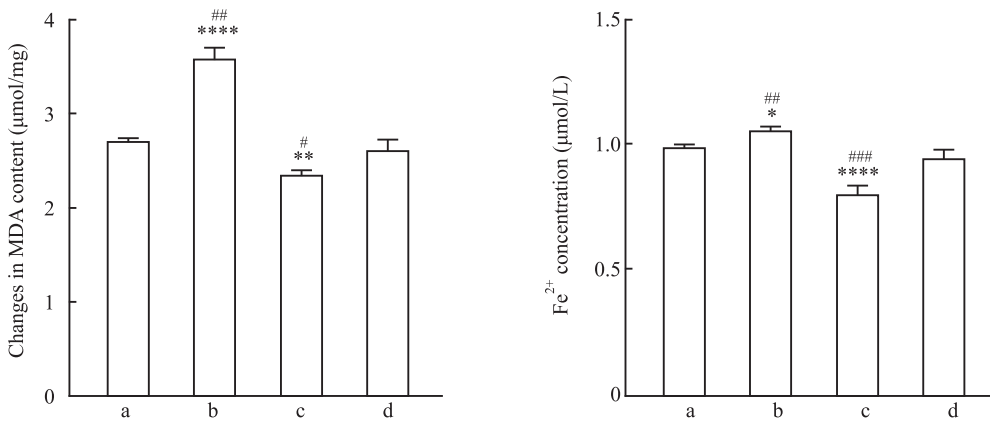


图 12 过表达 KLF4 HK-2 细胞 MDA 与 Fe²⁺ 变化

Fig. 12 Changes of MDA levels and Fe²⁺ concentration in HK-2 cells with over-expressed KLF4

a: Control group; b: Control+HG group; c: OE-KLF4 group; d: OE-KLF4+HG group; **P*<0.05, ***P*<0.01, *****P*<0.0001 vs Control group; #*P*<0.05, ##*P*<0.01, ###*P*<0.001 vs OE-KLF4+HG group.

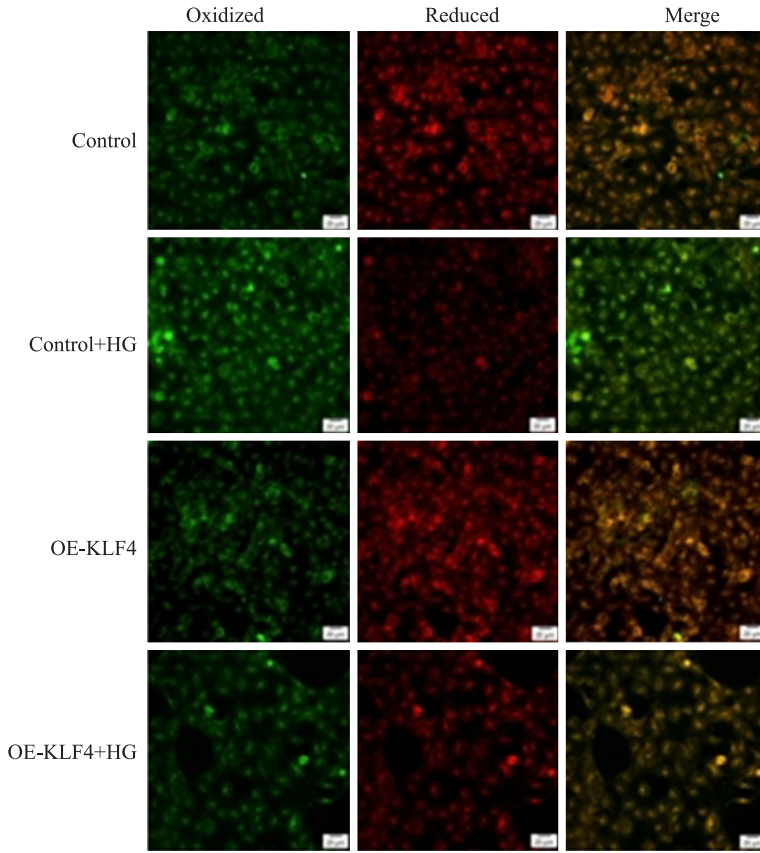


图 13 过表达 KLF4 HK-2 细胞脂质过氧化物水平变化 ×400

Fig. 13 Changes in lipid peroxide levels of HK-2 cells with over-expressed KLF4 ×400

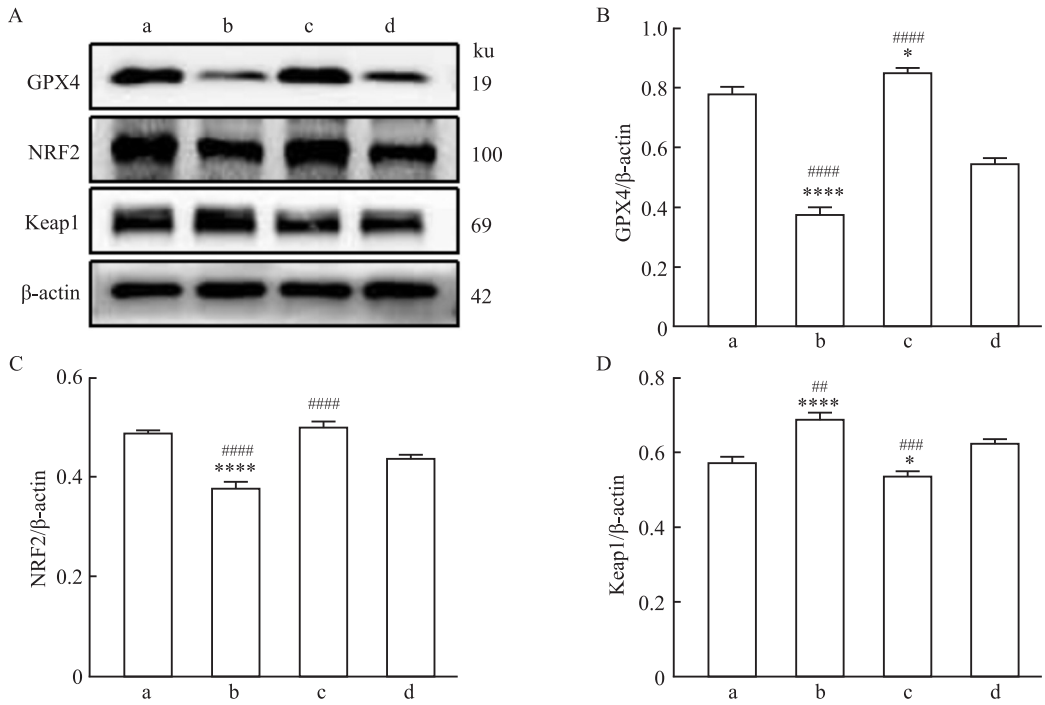


图 14 过表达 KLF4 HK-2 细胞 GPX4、NRF2、Keap1 蛋白表达水平变化

Fig. 14 Changes in the protein expression levels of GPX4, NRF2 and Keap1 in HK-2 cells with over-expressed KLF4

A: Western blot results; B: GPX4; C: NRF2; D: Keap1; a: Control group; b: Control+HG group; c: OE-KLF4 group; d: OE-KLF4+HG group;

* $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ vs Control group; ## $P < 0.01$, #### $P < 0.001$, ##### $P < 0.0001$ vs OE-KLF4+HG group.

参考文献

- [1] Soleymanian T, Kokabeh Z, Ramaghi R, et al. Clinical outcomes and quality of life in hemodialysis diabetic patients versus non-diabetics [J]. J Nephropathol, 2017, 6 (2) : 81-9. doi: 10.15171/jnp.2017.14.
- [2] 莫梓沂, 刘畅, 薛世圆, 等. 糖尿病肾病发病机制及治疗的研究进展[J]. 局解手术学杂志, 2021, 30(12): 1093-8. doi: 10.11659/jjssx.05E021051.
- [2] Mo Z Y, Liu C, Xue S Y, et al. Research advances in the pathogenesis and treatment of diabetic nephropathy [J]. J Reg Anat Oper Surg, 2021, 30 (12) : 1093-8. doi: 10.11659/jjssx.05E021051.
- [3] 孟丽, 朱艳, 杨琰, 等. A-485通过抑制P300/CBP诱导的H3K18ac/H3K27ac减轻糖尿病肾小管细胞脂质沉积[J]. 临床与实验病理学杂志, 2024, 40(5): 509-14. doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2024.05.012.
- [3] Meng L, Zhu Y, Yang Y, et al. A-485 alleviates tubular lipid accumulation by inhibiting H3K18ac/H3K27ac induced by P300/CBP in diabetic mice [J]. Chin J Clin Exp Pathol, 2024, 40(5): 509-14. doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2024.05.012.
- [4] Feng Q, Yang Y, Ren K, et al. Broadening horizons: the multifaceted functions of ferroptosis in kidney diseases [J]. Int J Biol Sci, 2023, 19(12): 3726-43. doi:10.7150/ijbs.85674.
- [5] 孟繁昊, 王珑. 基于氧化应激-铁死亡针刺抗抑郁中枢机制研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2024, 33(12): 1740-5, 1752. doi: 10.3969/j.issn.1008-8849.2024.12.025.
- [5] Meng F H, Wang L. Research progress on anti-depression central mechanism of acupuncture based on oxidative stress-iron death [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2024, 33(12): 1740-5, 1752. doi:10.3969/j.issn.1008-8849.2024.12.025.
- [6] Frazzi R. KLF4 is an epigenetically modulated, context-dependent tumor suppressor [J]. Front Cell Dev Biol, 2024, 12: 1392391. doi:10.3389/fcell.2024.1392391.
- [7] Dan Z, Shi X, Shu C, et al. 4-amino-2-trifluoromethyl-phenyl retinate alleviates lipopolysaccharide-induced acute myocardial injury through activation of the KLF4/p62 axis [J]. Cell Signal, 2024, 114: 111001. doi:10.1016/j.cellsig.2023.111001.
- [8] Luo X, Wang Y, Zhu X, et al. MCL attenuates atherosclerosis by suppressing macrophage ferroptosis via targeting KEAP1/NRF2 interaction [J]. Redox Biol, 2024, 69: 102987. doi:10.1016/j.redox.2023.102987.
- [9] Zheng Q, Xing J, Li X, et al. PRDM16 suppresses ferroptosis to protect against sepsis-associated acute kidney injury by targeting the NRF2/GPX4 axis [J]. Redox Biol, 2024, 78: 103417. doi: 10.1016/j.redox.2024.103417.
- [10] Shao N, Cai K, Hong Y, et al. USP9X suppresses ferroptosis in diabetic kidney disease by deubiquitinating Nrf2 *in vitro* [J]. Ren Fail, 2025, 47(1): 2458761. doi:10.1080/0886022X.2025.2458761.
- [11] Liu Z, Huang T, Hong Y, et al. Adaptive antioxidant nanomedicines inhibit ferroptosis in renal tubular epithelial cells to alleviate diabetic kidney disease [J]. Adv Sci (Weinh), 2025, 12 (37): e05168. doi:10.1002/advs.202505168.
- [12] 刘家希, 刘睿, 吕杨, 等. 铁死亡和氧化应激在多发骨髓瘤中相互作用的研究进展[J]. 西南医科大学学报, 2025, 48(2): 116-23. doi: 10.3969/j.issn.2096-3351.2025.02.002.
- [12] Liu JX, Liu R, Lv Y, et al. Crosstalk between ferroptosis and oxidative stress in multiple myeloma [J]. J Southwest Med Univ, 2025, 48 (2): 116-23. doi: 10.3969/j.issn.2096-3351.2025.02.002.
- [13] Cai S, Zhu H, Chen L, et al. Berberine inhibits KLF4 promoter methylation and ferroptosis to ameliorate diabetic nephropathy in mice [J]. Chem Res Toxicol, 2024, 37 (10) : 1728-37. doi: 10.1021/acs.chemrestox.4c00263.

Mechanism of KLF4 in regulating ferroptosis in diabetic nephropathy

Zhang Huanzhen¹, Dan Zhangyong¹, Shi Xiaorui¹, Zhu Rumeng¹, Wang Yi², Zhu Huaqing¹

(¹ Department of Biochemistry and Molecular Biology, Laboratory of Molecular Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032; ² Department of Microbial Bioengineering, School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the role of Krüppel-like factor 4 (KLF4) in type 1 diabetic nephropathy (DN) and to elucidate its underlying mechanisms. **Methods** Sixteen male Sprague-Dawley (SD) rats were selected and randomly divided into control group and model group, with 8 rats in each group. Rats in model group were intraperitoneally injected with a single dose of 55 mg/kg streptozotocin (STZ) to establish a diabetic nephropathy (DN) model, while those in control group were injected with an equal volume of sodium citrate buffer at the same time. After successful model establishment, the serum levels of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCR) were determined. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed on renal tissues to observe pathological changes, and immunofluorescence staining was conducted to detect the expression of KLF4 in renal tissues. Lipid peroxidation levels were evaluated by measuring malondialdehyde (MDA), Fe²⁺, and lipid peroxidation products in rat kidneys. A high glucose (HG)-induced cell injury model was established in HK-2 cells, with mitochondrial membrane potential assessed using 5, 5', 6, 6'-tetrachloro-1, 1', 3, 3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) staining. Lipid peroxidation levels (MDA, Fe²⁺, and lipid peroxides) were measured in HK-2 cells. KLF4-overexpressing HK-2 cells were then constructed, followed by repeated JC-1, MDA, Fe²⁺, and lipid peroxidation assays. Western blot was performed to evaluate the expression of ferroptosis-related proteins including gluta-

屎肠球菌介导的铜绿假单胞菌重组 Ef-PA0057 疫苗的构建及其保护力观察

李文桂, 欧兴坤, 何爱琳

(重庆医科大学附属第一医院传染病寄生虫病研究所, 重庆市传染病与寄生虫病学重点实验室, 重庆 400016)

摘要 **目的** 构建屎肠球菌(Ef)介导的铜绿假单胞菌(Pa)重组 Ef-PA0057 疫苗, 研究其诱导的肺荷菌量保护力及体液免疫应答。**方法** 将 PA01 株 ATCC9027 的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 克隆 PA0057 基因, 将克隆基因插入表达质粒 pGEX-1 λ T 得到 pGEX-PA0057; 将重组质粒电穿孔 Ef TX0016 株, 构建 rEf-PA0057 疫苗; 双酶切和 PCR 鉴定的抽提质粒经异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导后通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和 Western blot 分析鉴定表达产物; 用 5×10^8 克隆形成单位(CFU)的 rEf-PA0057 疫苗灌胃小鼠, 每周 3 次, 连续 3 周; 在初次接种后 4 周, 取 5×10^7 CFU 的 PA01 株进行滴鼻攻击, 在攻击后 2 周杀鼠, 分离肺脏, 培养肺细菌并行菌落计数; 分别于初次免疫后第 0、4、6 周采静脉血, 分离血清, ELISA 测定 IgG 及其亚类和 IgE。**结果** PCR 克隆出 900 bp 的 PA0057 基因; 双酶切证实 PA0057 基因插入 pGEX-1 λ T 中; PCR 显示, rEf-PA0057 疫苗构建成功; 经 SDS-PAGE 证实, 重组菌表达 58 ku 的 PA0057-GST 融合蛋白, 目标蛋白的含量是菌体总蛋白的 18%; Western blot 结果提示, 融合蛋白可与 Pa 感染的鼠阳性血清发生结合反应; rEf-PA0057 疫苗组、空载体组和 Ef 对照组肺组织的菌落数分别为 $(0.297 \pm 0.011) \times 10^8$ CFU、 $(7.576 \pm 0.206) \times 10^8$ CFU 和 $(7.551 \pm 0.185) \times 10^8$ CFU, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 疫苗组的血清抗体 IgG、IgG1、IgG2b、IgG3 和 IgE 在初次免疫后 4 周均升高, 在攻击后 2 周达较高水平 ($P < 0.01$); 同一时间点比较, 疫苗组的血清抗体与空载体组或 Ef 对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。**结论** 成功构建了 rEf-PA0057 疫苗, 该疫苗接种后产生的体液免疫反应可对抗 PA01 株的滴鼻攻击。

关键词 屎肠球菌; 铜绿假单胞菌; PA0057; 疫苗; 体液免疫

中图分类号 R 759; R 392.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)03-0518-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.03.018

2025-12-21 接收

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号:30671835、30200239)

作者简介: 李文桂, 男, 博士, 研究员, 通信作者, E-mail: cqliwengui@

163.com

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*, Pa) 是一种院内感染的常见致病菌, 用抗生素治疗易产生耐药性, 需要探索其他治疗方法。既往研究^[1]表明, 脂多糖、多糖、藻酸盐、鞭毛或菌毛均可作为疫苗使

thione peroxidase 4 (GPX4), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2), and Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1), in renal tissues, HK-2 cells, and *KLF4*-overexpressing HK-2 cells. **Results** Compared with the control group, DN rats exhibited elevated serum BUN and SCR levels, glomerular hypertrophy, renal interstitial fibrosis, and decreased *KLF4* expression. Additionally, MDA, Fe^{2+} , and lipid peroxidation levels increased, indicating enhanced ferroptosis in renal tissues, accompanied by reduced GPX4 and NRF2 expression and elevated Keap1 levels. Similarly, HG-treated HK-2 cells showed decreased *KLF4* expression, increased MDA, Fe^{2+} and lipid peroxidation, elevated ferroptosis, and dysregulated GPX4/NRF2/Keap1 expression. However, *KLF4* overexpression reversed these alterations induced by high glucose treatment. **Conclusion** In the renal tissues of type 1 diabetic rats, the expression of *KLF4* decreases the level of ferroptosis increases, and *KLF4* overexpression could alleviate HG-induced HK-2 cell injury.

Key words diabetic nephropathy; *KLF4*; ferroptosis; Keap1; NRF2; GPX4

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82170484); Key Research and Development Program of Anhui Province (No. 202004bll020025); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (No. KJ2021A0247)

Corresponding authors Zhu Huaqing, E-mail: aydzhq@126.com; Wang Yi, E-mail: wangyi@ahmu.edu.cn