

刘义琴,朱婷婷,毛海霞,等. 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型肾纤维化过程中铁死亡相关因子的变化 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(7): 85-91.

Liu YQ, Zhu TT, Mao HX, et al. Changes of ferroptosis-related factors in a rat model of adenine-induced chronic kidney disease [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(7): 85-91.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.07.011

腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型肾纤维化过程中铁死亡相关因子的变化

刘义琴^{1,2,3}, 朱婷婷^{1,2,3}, 毛海霞^{1,2,3}, 康婷^{1,2,3}, 张丽玲^{1,2,3}, 吴蔚桦^{1,2,3}, 欧三桃^{1,2,3*}

(1.西南医科大学附属医院肾病内科, 四川 泸州 646000; 2.四川省肾脏病临床医学研究中心, 四川 泸州 646000; 3.代谢性血管疾病四川省重点实验室, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 观察腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型肾铁死亡相关因子的变化并探讨铁死亡参与慢性肾病进展的机制。**方法** 20 只大鼠随机分为对照组(Con)和模型组(CKD),CKD 组予以 2.5%腺嘌呤灌胃诱导,所有大鼠于 6 周末处死。留取大鼠血样检测血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr);HE 染色观察肾病理改变;Masson 染色观察肾小管间质纤维化情况;检测肾组织铁含量、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽(GSH)含量;免疫组化染色观察过氧化物酶 4(GPX4)以及 4-羟基壬烯醛(4-HNE)蛋白的表达;Western blot 法检测铁死亡相关蛋白胱氨酸转运蛋白系统 X^{c-}亚基 SLC7A11、过氧化物酶 4(GPX4)以及铁代谢相关蛋白转铁蛋白受体 1(TFR-1)、铁蛋白重链(FTH)、铁蛋白轻链(FTL)、膜铁转运蛋白(FPN)的蛋白表达情况。分析铁含量、MDA 含量、GSH 水平与肾间质纤维化的相关性。**结果** 与 Con 组相比,CKD 组大鼠血清 BUN、Scr 均明显增加($P<0.05$),HE 染色和 Masson 染色见明显肾小管扩张及间质纤维化,铁含量以及 MDA 含量明显升高($P<0.05$),GSH 含量明显降低($P<0.05$);免疫组化显示,与 Con 组相比,CKD 组 4-HNE 蛋白表达明显增加,GPX4 蛋白表达明显减少。Western blot 结果显示,与 Con 组相比,CKD 组的 SLC7A11、GPX4、TFR-1、FPN 蛋白表达明显减少,而 FTH、FTL 蛋白表达明显增加。相关性分析提示铁含量、MDA 含量与肾纤维化相对面积(%)呈正相关、GSH 含量与肾纤维化相对面积(%)呈负相关。**结论** 在腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型中存在铁死亡,并可能通过 GSH-GPX4 轴参与 CKD 肾纤维化进展。

【关键词】 慢性肾病;铁死亡;纤维化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 07-0085-07

Changes of ferroptosis-related factors in a rat model of adenine-induced chronic kidney disease

LIU Yiqin^{1,2,3}, ZHU Tingting^{1,2,3}, MAO Haixia^{1,2,3}, KANG Ting^{1,2,3}, ZHANG Liling^{1,2,3},
WU Weihua^{1,2,3}, OU Santao^{1,2,3*}

(1. Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Sichuan Clinical Research Center for Nephropathy, Luzhou 646000. 3. Sichuan Key Laboratory of Metabolic Vascular Diseases, Luzhou 646000)

【Abstract】 Objective To observe expression of ferroptosis-related factors in an adenine-induced chronic kidney disease model, and investigate the mechanism of ferroptosis in the pathological process of chronic kidney disease. **Methods** Twenty rats were randomly divided into a control group (Con) and model group (CKD). The CKD model was established

【基金项目】 泸州市人民政府-西南医科大学科技战略合作项目基金(2021LZXNYD-J11)。

【作者简介】 刘义琴(1995—),女,硕士研究生,研究方向:肾纤维化。E-mail: lyq2587@163.com

【通信作者】 欧三桃(1976—),女,教授,硕士研究生导师,研究方向:肾纤维化。E-mail: ousantao@163.com

by 2.5% adenine gavage. All rats were sacrificed after 6 weeks. Blood samples were collected to measure serum urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr). HE staining was performed to observe renal pathological changes. Masson staining was performed to observe interstitial fibrosis of renal tubules. Iron, malondialdehyde (MDA), and glutathione (GSH) concentrations were measured. Western blot was performed to detect the protein expression of iron ferroptosis-related proteins including systemic X^{cr} subunit SLC7A11, peroxidase 4 (GPX4), and iron metabolism-related proteins including transferrin receptor 1 (TFR-1), ferritin heavy chain (FTH), ferritin light chain (FTL), and membrane iron transporter protein (FPN). Correlations between iron, MDA and GSH levels and interstitial renal fibrosis were analyzed.

Results Compared with the Con group, serum urea nitrogen and serum creatinine were significantly increased in the CKD group ($P<0.05$). HE and Masson staining showed significant tubular dilatation and interstitial fibrosis. Iron and MDA concentrations were significantly increased ($P<0.05$), and the GSH concentration was significantly decreased ($P<0.05$). Immunohistochemistry showed that, 4-HNE protein expression was significantly increased and GPX4 protein expression was significantly decreased in the CKD group compared with the Con group. Western blot showed that SLC7A11, GPX4, TFR-1, and FPN protein expression was significantly decreased, while FTH and FTL expression was significantly increased compared with the Con group. Correlation analysis indicated that iron and MDA concentrations were positively correlated to the relative area (%) of renal fibrosis, and the GSH concentration was negatively correlated with them.

Conclusions Ferroptosis is present in the adenine-induced CKD rat model and may be involved in renal fibrosis progression in CKD via the GSH-GPX4 axis.

【Keywords】 chronic kidney disease; ferroptosis; fibrosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

慢性肾病(chronic kidney disease,CKD)是一个全球性的公共卫生问题,影响全球 8%~16%的人口^[1]。CKD 发病机制复杂,肾小管间质纤维化是 CKD 的主要病理表现,也被认为是通向终末期肾病(end stage renal disease,ESRD)的最终共同途径^[2]。铁死亡是一种区别于细胞凋亡的细胞死亡方式,其特征是依赖铁的脂质过氧化物积累至致死水平^[3],现在被认为是参与肾疾病的关键靶点之一^[4-5]。近来的研究表明铁死亡是肾纤维化发病机制中的一个重要病理生理改变,在多柔比星诱导的肾纤维化动物模型中,观察到肾非血红素铁水平和肾前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)的 mRNA 表达增加^[6]。在单侧输尿管梗阻和缺血再灌注损伤构建的肾纤维化小鼠模型中,也观察到 GPX4 的表达下调,脂质过氧化物 4-HNE 的表达上调^[7-8]。这表明铁死亡可能在肾纤维化中发挥重要作用。但目前,对慢性肾病中铁死亡的直接研究仍非常有限,在腺嘌呤诱导的 CKD 模型中是否也发生了铁死亡尚不清楚,因此本研究旨在探讨腺嘌呤诱导的 CKD 大鼠模型肾中是否存在铁死亡,及其是否参与肾纤维化进程及可能的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

5~6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 20 只,体重 190

~230 g,购自西南医科大学实验动物中心[SCXK(川)2018-0017],饲养于西南医科大学动物研究中心[SYXK(川)2018-0065]。该实验经西南医科大学实验动物伦理委员会审批(IACUC-SWMU20210350),并遵循实验动物的 3R 原则,所有大鼠均在相对湿度 70%,环境温度(24±2)℃,12 h/12 h 明暗交替条件下进行喂养。

1.2 主要试剂与仪器

腺嘌呤(V900471-100G, Sigma, 美国);组织铁测定试剂盒及丙二醛(MDA)测定试剂盒(A039-2-1, A003-1, 南京建成, 中国);GSH 和 GSSG 检测试剂盒(S0053, 碧云天, 中国);兔 SP 试剂盒(SP-9000, 中杉金桥, 中国);HE 染色(C0105 S, 碧云天, 中国);Masson 三色染色液(BA7049B, 贝索生物, 中国);兔单抗-xCT Antibody (SLC7A11)、兔单抗-GPX4 Antibody、兔单抗-Transferrin Receptor (CD71)、Antibody(TFR-1)、兔单抗-Ferritin Antibody (FTH)、兔单抗-Ferritin Light Chain Antibody (FTL) (T57046、T56959、T56618、T55648、T56955, Abmart, 中国);兔多抗-FPN Antibody (F13581, Affinity, 中国);兔单抗-4-HNE (ab46545, Abcam, 英国);兔单抗-GAPDH (10494-1-AP, proteintech, 中国)。光学显微镜(Nikon, 日本);自动酶标仪(BioTek 公司, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型的构建与分组

20 只大鼠被随机分为对照组(Con)($n=10$)和

模型组 (CKD) ($n = 10$)。所有大鼠自由进食和饮水,昼夜节律光照,适应性喂养 1 周后,CKD 组给予 2.5%腺嘌呤混悬液 250 mg/kg 灌胃,1~3 周每天灌胃 1 次,4~6 周隔天灌胃 1 次;Con 组给予等量生理盐水灌胃,灌胃期间所有大鼠予以普通饲料直至实验结束。

1.3.2 组织取材与血液留取

造模第 6 周末,2%戊巴比妥钠以 50 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠,下腔静脉取血,离心取上清以检测肾功能。取双肾,一部分置于 4%的多聚甲醛中,常规石蜡包埋后切片以备病理染色及免疫组化,另一部分置于-80℃冰箱中备用。

1.3.3 大鼠肾功能检测

使用自动生化分析仪检测血清尿素氮 (BUN) 和肌酐 (SCr)。

1.3.4 肾组织形态学

HE 染色:石蜡切片置于 60℃孵箱 1 h,常规脱蜡至水,苏木素染色液染色 5 min,自来水冲洗 10 min,伊红染色液染色 30 s,脱水透明后中性树胶封片。

Masson 染色:石蜡切片置于 60℃孵箱 1 h,常规脱蜡至水,铁苏木素 A 液与 B 液等比例混合制备 Weigert 染色液,滴于切片上染 10 min,流水稍洗。1%盐酸酒精分化 5 s,流水冲洗 10 min,丽春红酸性品红染液染 8 min,流水稍洗,磷钼酸溶液 5 min,苯胺蓝复染 5 min。1%冰醋酸处理 1 min,脱水透明后中性树胶封片。采用 Image J 软件对胶原纤维的蓝色阳性区域进行半定量分析。

1.3.5 检测大鼠肾组织铁含量、MDA 和 GSH 含量

取肾组织,用预冷的 PBS 研磨,制备 10%的组织匀浆,离心取上清液。BCA 法测定蛋白浓度后,TBA 法检测匀浆中 MDA 含量,比色法检测组织铁含量;并按照 GSH 与 GSSG 试剂盒说明书制备匀浆,检测 GSH 含量。

1.3.6 免疫组化染色检测 GPX4 及 4-HNE 蛋白表达

石蜡切片置于 60℃孵箱 1 h,常规脱蜡至水,PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次,抗原修复,阻断内源性过氧化物酶,室温孵育 10 min;PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次。滴加适量的封闭用正常山羊血清工作液,室温孵育 10 min 后倾去血清。滴加适量一抗,4℃孵育过夜,PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次。滴加适量生物素标记山羊抗兔 IgG 聚合物,室温孵育 10

min;PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次。滴加适量辣根酶标记链霉卵白素工作液,室温孵育 10 min;PBS 缓冲液冲洗 3 min×3 次。滴加适量新鲜配制的 DAB 显色液,室温孵育 1 min 苏木素复染,流水冲洗 10 min。脱水、透明、中性树胶封片。采用 Image-Pro Plus 软件,对阳性表达进行定量分析。

1.3.7 Western blot 检测肾组织 SLC7A11、GPX4、TFR-1、FTH、FTL、FPN 蛋白的表达

RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂 (PMSF) 按 1000:10 的体积配置裂解液,取适量组织加入裂解液提取蛋白,碧云天 BCA 法计算出蛋白的浓度,根据不同的分子量选择 SDS-PAGE 凝胶电泳进行分离后转移至 PVDF 膜上;5%脱脂牛奶封闭 1 h,含 0.05% Tween-20 的 TBST 洗涤 10 min×3 次;一抗 4℃过夜孵育;TBST 洗涤 10 min×3 次;二抗稀释液 (1:10000) 摇床上摇动,室温孵育 1 h;TBST 洗涤 10 min×3 次。ECL 化学发光液孵育膜数秒后于凝胶成像分析系统中曝光采集图像。使用 Image J 软件对蛋白条带进行分析。

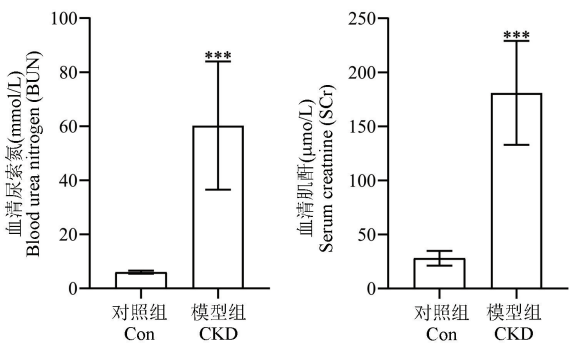
1.4 统计学方法

统计学分析使用 GraphPad Prism 9.0 软件,用平均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,两变量间相关性分析用 Pearson 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 两组大鼠肾功能情况

与 Con 组相比,CKD 组大鼠肾功能指标 (BUN、SCr) 均明显升高 ($P < 0.001$)。见图 1。



注:与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。
图 1 血尿素氮和肌酐水平
Note. Compared with the Con group, *** $P < 0.001$.
Figure 1 The level of blood urea nitrogen and serum creatinine

2.2 两组大鼠肾病理改变

HE 染色结果显示,Con 组肾小球、肾小管及肾间质结构及形态清晰,未见明显异常;CKD 组肾结构紊乱,肾小球数量明显减少、萎缩,囊腔扩张明显,肾小管可见明显扩张,管腔内可见棕黄色沉积物明显增多,管腔断裂,肾间质血管减少。Masson 染色结果显示:与 Con 组相比,CKD 组大鼠肾小管间质胶原纤维沉积明显增加($P<0.001$)。见图 2。

2.3 两组大鼠肾组织铁含量和氧化应激变化情况

与 Con 组相比,CKD 组铁含量、MDA 含量明显升高,GSH 含量明显降低,且差异具有统计学意义

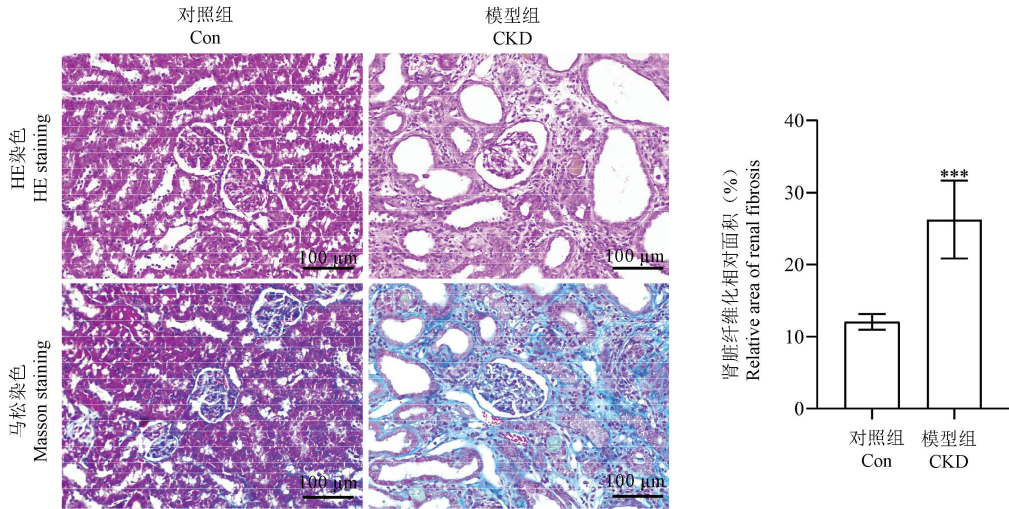
($P<0.001$)。见图 3。

2.4 两组大鼠肾组织 GPX4 和 4-HNE 免疫组化结果

免疫组化结果显示,与 Con 组相比,CKD 组 GPX4 蛋白表达明显减少($P<0.01$),而 4-HNE 表达明显增加($P<0.001$)。见图 4。

2.5 两组大鼠肾组织 SLC7A11 和 GPX4 Western blot 检测结果

Western blot 检测结果显示,与 Con 组相比,CKD 组大鼠肾组织 SLC7A11、GPX4 蛋白表达均明显减少($P<0.01$)。见图 5。

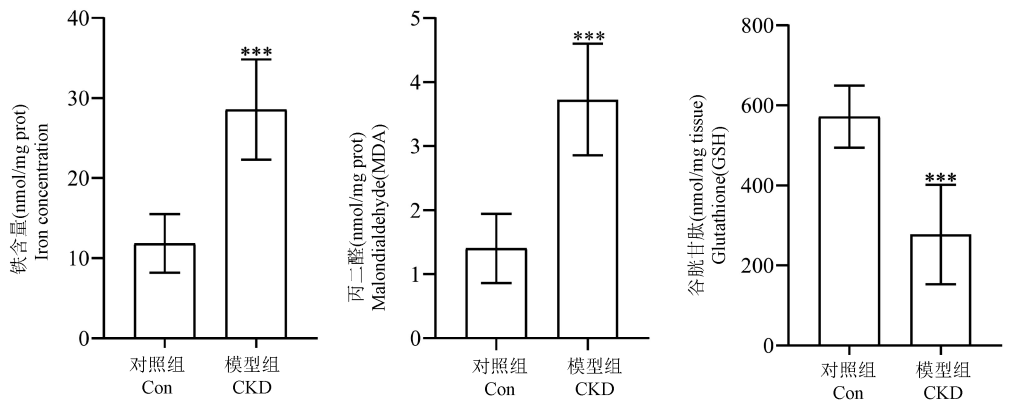


注:与对照组相比,*** $P<0.001$ 。

图 2 HE 和 Masson 染色结果

Note. Compared with the Con group, *** $P<0.001$.

Figure 2 The result of HE and Masson staining

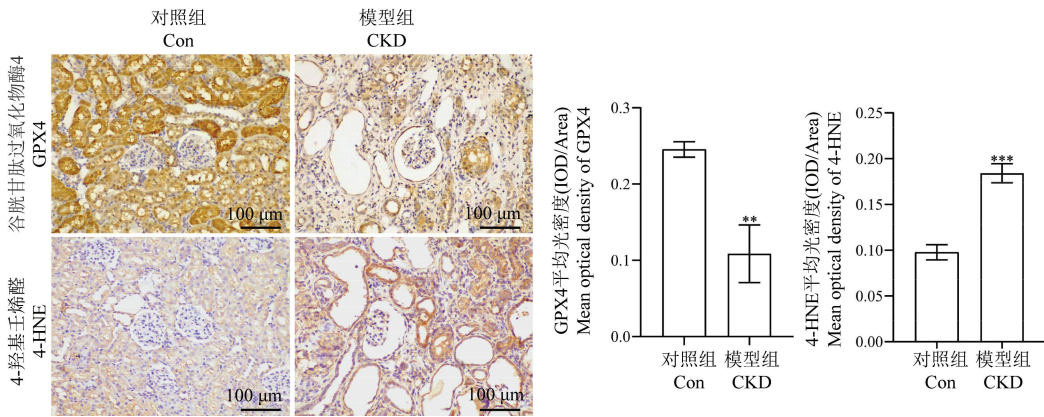


注:与对照组相比,*** $P<0.001$ 。

图 3 铁含量、MDA 和 GSH 含量

Note. Compared with the Con group, *** $P<0.001$.

Figure 3 The concentration of iron, MDA and GSH

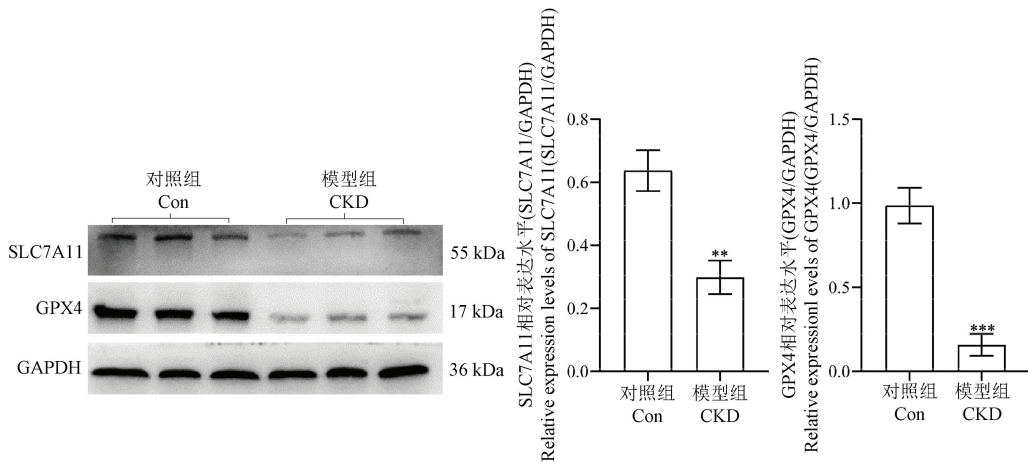


注:与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 4 GPX4 和 4-HNE 免疫组化结果

Note. Compared with the Con group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 4 Immunohistochemical results of GPX4 and 4-HNE



注:与对照组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 5 SLC7A11 和 GPX4 蛋白表达水平

Note. Compared with the Con group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 5 The protein expression level of SLC7A11 and GPX4

2.6 两组大鼠肾组织 TFR-1、FTH、FTL、FPN Western blot 检测结果

Western blot 检测结果显示,与 Con 组相比,CKD 组大鼠肾 TFR-1 和 FPN 蛋白表达明显减少($P<0.05$),FTH 表达明显升高($P<0.01$),FTL 的表达明显升高($P<0.05$)。见图 6。

2.7 相关性分析

相关性分析结果显示,铁含量、MDA 含量与肾纤维化相对面积(%)呈正相关、GSH 含量与肾纤维化相对面积(%)呈负相关($r=0.8357, P<0.05$; $r=0.8432, P<0.05$; $r=-0.9525, P<0.001$)。见图 7。

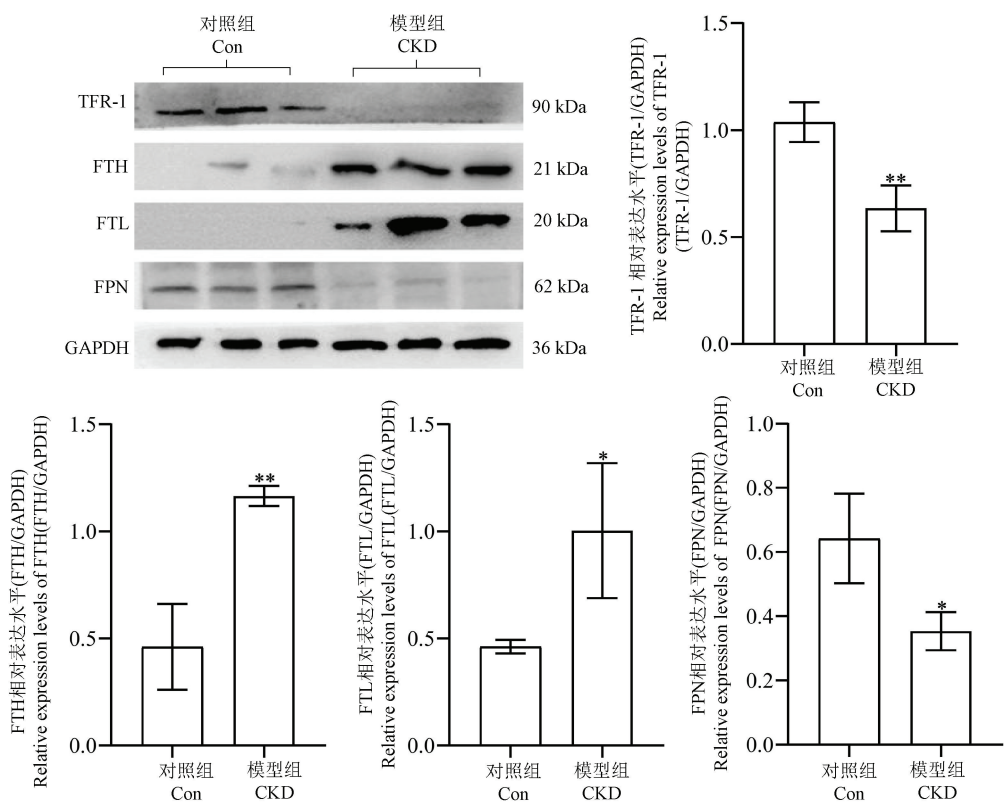
3 讨论

大多数 CKD 患者表现出不同程度的铁代谢和

脂质代谢紊乱,这为铁死亡提供了有利条件。然而,铁死亡在 CKD 中的作用仍知之甚少。本研究通过腺嘌呤灌胃建立 CKD 大鼠模型,观察 CKD 中是否存在铁死亡以及铁死亡参与 CKD 纤维化可能的机制。

现有研究已经证实,腺嘌呤灌胃诱导的 CKD 大鼠模型通过促进肾小管间质纤维化、肾小管萎缩和晶体形成,较好地模拟了人类 CKD 的进展,故而成为目前广泛采用的诱导 CKD 的造模方式^[9]。本研究中我们沿用前期模型构建方法^[10],结果显示,CKD 大鼠肾功能异常,肾结构紊乱,肾小管间质纤维沉积明显,证实成功建立了 CKD 模型。

近年来的研究发现铁死亡与不同实验动物模型中肾纤维化的发展有关,例如糖尿病肾病、高脂



注:与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。
图 6 铁代谢相关蛋白表达水平

Note. Compared with the Con group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 6 The expression level of iron metabolism-related protein

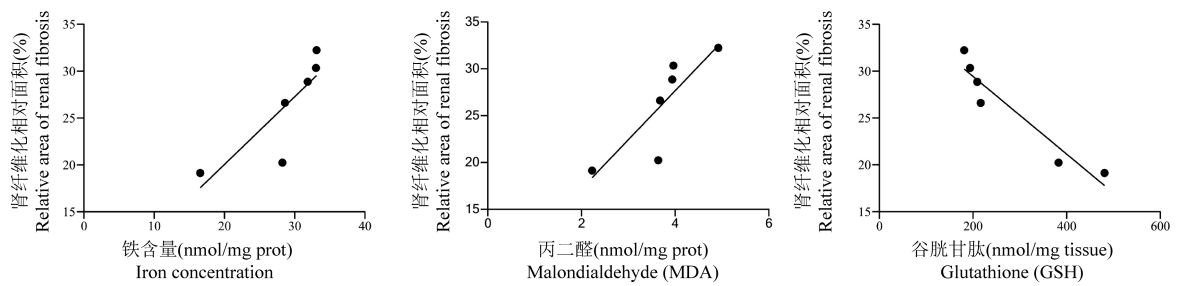


图 7 相关性分析
Figure 7 Correlation analysis

饮食引起的肾损伤、叶酸引起的肾损伤、单侧输尿管梗阻 (UO)、缺血/再灌注损伤 (IRI) 和 5/6 肾切除手术引起的慢性肾病^[11]。Zhang 等^[12] 在 5/6 肾切除手术诱导的 CKD 大鼠模型中发现,肾小管上皮细胞铁死亡会触发促纤维化介质 TGF- β 、CTGF 和 PDGF 等的分泌,这些介质随后以旁分泌方式调节间质成纤维细胞的增殖和分化。在本研究中,我们发现 CKD 组肾中的铁含量、MDA 含量明显增加,GSH 含量明显减少,且与肾间质纤维化之间存在显著相关性。进一步的免疫组化结果发现在 CKD 大鼠模型

中 GPX4 表达明显减少,而 4-HNE 的蛋白表达明显增加。4-HNE 是脂质过氧化的终产物之一,而 GPX4 作为一种调节铁死亡的关键基因,在 CKD 大鼠小管的表达明显减少,这表明铁死亡可能参与了腺嘌呤诱导的 CKD 肾纤维化进展。

氨基酸代谢在铁死亡中也起着重要作用。抑制系统 X^{c-} (system X^{c-}, xCT) 的活性会通过抑制胱氨酸的吸收来影响 GSH 的合成,导致谷胱甘肽过氧化物酶活性降低,细胞抗氧化能力下降,脂质 ROS 积累,最终发生氧化损伤和铁死亡^[13]。为了进一步

探讨 CKD 大鼠模型中铁死亡的发生机制,我们分析了肾组织中 GSH 含量和 GPX4 的蛋白表达情况,结果发现 CKD 组 GSH 含量降低,GPX4 蛋白表达降低。SLC7A11 是 xCT 中的转运催化亚基,也是铁死亡的重要标志物^[14]。SLC7A11 过表达可显著恢复 GSH 水平并减弱脂质过氧化,从而恢复细胞活力^[15]。我们进一步在 CKD 大鼠肾组织中检测到 SLC7A11 蛋白含量显著降低。综上,提示在 CKD 大鼠中由于 xCT 受到抑制,GSH 与 GPX4 表达下调,可能导致了组织抗氧化能力减弱,最终诱发铁死亡。

CKD 中的铁代谢极其复杂,在生理条件下铁调节蛋白表达水平正常的人,不会发生肾铁蓄积^[16]。然而,在 CKD 时,铁转运蛋白降低以及铁蛋白和转运铁到细胞中的蛋白上调^[16],管状铁沉积通过芬顿反应促进超氧自由基的产生,从而导致脂质过氧化,引起细胞损伤^[17-19]。我们通过检测与铁代谢相关的蛋白质来寻找铁沉积的原因。结果发现,CKD 组中 TFR-1 和 FPN 蛋白表达降低,FTH、FTL 表达明显升高,这与 Wang 等^[20]的研究一致。可能是由于 CKD 时,FPN 表达显著下调,胞内的铁无法排出,引起铁含量增加,肾处于升高的负反馈控制水平,TFR-1 蛋白下调,细胞应激增加铁储存蛋白 FTH、FTL 的表达,以通过增加铁储存来维持铁稳态。

综上所述,在腺嘌呤诱导的 CKD 模型中存在铁沉积和脂质过氧化的铁死亡特征性表现,且可能通过 GSH-GPX4 轴参与 CKD 肾纤维化的发生发展。后续的研究可从细胞水平进一步验证,并使用 ferrostatin-1 和 liproxstatin-1 等铁死亡抑制剂进行干预,以期为 CKD 肾纤维化防治提供新靶点,抑制肾铁死亡或许是治疗 CKD 有前景的策略。

参考文献:

- [1] Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic kidney disease diagnosis and management: a review [J]. JAMA, 2019, 322 (13): 1294-1304.
- [2] Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC 3rd, et al. Mouse models of diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(1): 27-45.
- [3] Dixon S, Lemberg K, Lamprecht M, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. Cell, 2012, 149 (5): 1060-1072.
- [4] Wang J, Liu Y, Wang Y, et al. The cross-link between ferroptosis and kidney diseases [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6654887.
- [5] Belavgeni A, Meyer C, Stumpf J, et al. Ferroptosis and

- necroptosis in the kidney [J]. Cell Chem Biol, 2020, 27(4): 448-462.
- [6] Fang X, Wang H, Han D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019, 116(7): 2672-2680.
- [7] Ikeda Y, Ozono I, Tajima S, et al. Iron chelation by deferoxamine prevents renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction [J]. PLoS One, 2014, 9 (2): e89355.
- [8] Zhou L, Xue X, Hou Q, et al. Targeting ferroptosis attenuates interstitial inflammation and kidney fibrosis [J]. Kidney Dis (Basel), 2022, 8(1): 57-71.
- [9] Diwan V, Brown L, Gobe GC. Adenine-induced chronic kidney disease in rats [J]. Nephrology (Carlton), 2018, 23(1): 5-11.
- [10] 毛海霞, 康婷, 吴蔚桦, 等. 腺嘌呤诱导慢性肾病大鼠模型中 HIF-1 α 、RhoA、SOX9 的表达及意义 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 70-77, 135.
- [11] Zhou J, Tan Y, Wang R, et al. Role of ferroptosis in fibrotic diseases [J]. J Inflamm Res, 2022, 15: 3689-3708.
- [12] Zhang B, Chen X, Ru F, et al. Liproxstatin-1 attenuates unilateral ureteral obstruction-induced renal fibrosis by inhibiting renal tubular epithelial cells ferroptosis [J]. Cell Death Dis, 2021, 12(9): 843.
- [13] Li J, Cao F, Yin HL, et al. Ferroptosis: past, present and future [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2): 88.
- [14] Wang Y, Yang L, Zhang X, et al. Epigenetic regulation of ferroptosis by H2B monoubiquitination and p53 [J]. EMBO Rep, 2019, 20(7): e47563.
- [15] Hong T, Lei G, Chen X, et al. PARP inhibition promotes ferroptosis via repressing SLC7A11 and synergizes with ferroptosis inducers in BRCA-proficient ovarian cancer [J]. Redox Biol, 2021, 42: 101928.
- [16] van Raaij S, van Swelm R, Bouman K, et al. Tubular iron deposition and iron handling proteins in human healthy kidney and chronic kidney disease [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 9353.
- [17] Ueda N, Baliga R, Shah SV. Role of 'catalytic' iron in an animal model of minimal change nephrotic syndrome [J]. Kidney Int, 1996, 49(2): 370-373.
- [18] Sheerin NS, Sacks SH, Fogazzi GB. *In vitro* erythrophagocytosis by renal tubular cells and tubular toxicity by haemoglobin and iron [J]. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14(6): 1391-1397.
- [19] Sponsel HT, Alfrey AC, Hammond WS, et al. Effect of iron on renal tubular epithelial cells [J]. Kidney Int, 1996, 50(2): 436-444.
- [20] Wang J, Wang Y, 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.