

# 灵芝多糖通过增加Nrf2、降低IL-1阻止糖尿病肾病的铁死亡

徐顺娟<sup>1,2</sup>, 万 磊<sup>3</sup>, 张杰涛<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>青岛大学附属医院全科医学科, 山东 青岛

<sup>2</sup>青岛市黄岛区灵山卫中心卫生院内科, 山东 青岛

<sup>3</sup>潍坊医学院附属医院内分泌科, 山东 潍坊

收稿日期: 2023年9月13日; 录用日期: 2023年10月8日; 发布日期: 2023年10月13日

## 摘要

目的: 铁死亡导致多种急性、慢性肾损伤, 包括糖尿病肾病(DN), 本研究评估灵芝多糖(GLPs)在抑制铁死亡, 保护糖尿病诱导肾小管损伤的作用和机制。方法: 调取GEO数据库数据, 采用GSEA和加权基因共表达网络分析研究DN和铁死亡的关系。免疫浸润分析DN发病与炎症细胞和炎症因子之间的关系。高糖刺激的近端小管上皮细胞损伤和STZ诱导的糖尿病小鼠模型分别用于体外和体内实验。检测Nrf2表达、细胞活力、谷胱甘肽浓度和脂质过氧化, Elisa检测细胞IL-1的水平。结果: GLPs缓解高糖刺激的近端小管上皮细胞损伤, 降低细胞MDA、ROS的水平, 增加细胞表达Nrf2。GLPs的肾小管的保护作用能被Nrf2的抑制剂阻断。体内实验结果显示, GLPs能够降低小鼠血BNU、Cr, 增加肾脏谷胱甘肽浓度。结论: GLPs能够通过增加Nrf2表达发挥抗氧化作用, 抑制铁死亡, 保护糖尿病所致的肾小管细胞死亡。

## 关键词

糖尿病肾病, 铁死亡, 灵芝多糖, 核红细胞2相关因子2, 活性氧

# *Ganoderma lucidum Polysaccharide Prevented Ferroptosis in Diabetes Nephropathy by Inhibiting IL-1 and Enhancing Nrf2*

Shunjuan Xu<sup>1,2</sup>, Lei Wan<sup>3</sup>, Jietao Zhang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of General Practice, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

\*通讯作者。

<sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Qingdao Huangdao District Lingshanwei Center Hospitals, Qingdao Shandong

<sup>3</sup>Department of Endocrine, Weifang Medical University Affiliated Hospital, Weifang Shandong

Received: Sep. 13<sup>th</sup>, 2023; accepted: Oct. 8<sup>th</sup>, 2023; published: Oct. 13<sup>th</sup>, 2023

## Abstract

**Objective:** Ferroptosis contributes to many kinds of acute and chronic renal injuries, including DN (diabetic nephropathy). This study evaluated the role and mechanism of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLPs) in inhibiting ferroptosis and protecting renal tubular injury induced by diabetes. **Methods:** Datasets from GEO cohort were collected, and relationship between DN and ferroptosis was analyzed by GSEA analysis. Immune infiltration analysis was performed to investigate the relationship between DN pathogenesis and cytokines. High glucose-stimulated proximal tubular epithelial cell injury and diabetes mouse models were used *in vitro* and *in vivo*, respectively. GLPS was used to treat cells or mouse models. The expression of Nrf2, cell viability, glutathione concentration and lipid peroxidation, and the level of cellular inflammatory factors were detected. **Results:** GLPS could alleviate the injury of proximal tubular epithelial cells stimulated by high glucose, reduce the level of intracellular MDA and ROS, and increase the expression of Nrf2 in cells. The protective effect of GLPs on renal tubules can be blocked by the inhibitor of Nrf2. *In vivo* experiment results showed that GLPs could reduce the blood BNU and Cr, and increase the kidney glutathione concentration in mice. **Conclusion:** GLPs can play an antioxidant role by increasing the expression of Nrf2, inhibit ferroptosis, and protect renal tubular cell death caused by diabetes.

## Keywords

Diabetes Nephropathy, Ferroptosis, *Ganoderma lucidum* Polysaccharide, Erythrocyte 2 Related Factor 2, Reactive Oxygen Species

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

糖尿病肾病(Diabetes nephropathy, DN)是慢性肾病患者死亡和发病的主要原因之一，占慢性肾病患者的20%~30%，特征是细胞外基质蛋白沉积、肾小管间质纤维化、肾小球硬化[1]。目前已对DN的发生机制的有了深入的了解，多种细胞死亡参与了DN的发生，包括凋亡、焦亡和坏死[2]。

铁死亡是近期发现的一种非典型细胞死亡。低胱氨酸/谷氨酸反转运蛋白系统Xc-(xCT)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)水平降低细胞内胱氨酸浓度，减少谷胱甘肽合成和增加细胞内脂质过氧化物的积累，进而诱发细胞铁死亡[3][4]，GPX4的诱导性缺失导致小鼠的急性肾功能衰竭和早期死亡[5]。研究表明，在急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)期间，铁死亡与肾小管细胞死亡有关[6]。铁抑制素-1(Fer-1)是一种抑制铁死亡的小分子化合物，其可缓解AKI模型中的肾小管损伤[7]。尽管有研究已经发现铁死亡在DN患者肾小管损伤中发挥作用[8][9]。然而，铁死亡在DN中的机制尚未阐明，如何有效阻止铁死亡，延缓DN的研究较少。

作为人类健康护理的宝贵财富，中医药长期以来一直被利用于有效治疗 DN。雷公藤及其制剂提取物已被证明对 DN 有效，可降低尿蛋白和降低血清肌酐[10] [11]。近来也发现多种中医药能够通过抑制铁死亡阻止 DN 进展，毛蕊异黄酮通过抑制铁死亡，在高糖诱导的肾小管损伤模型中的发挥保护作用[12]。灵芝多糖(*Ganoderma lucidum* polysaccharides, GLPs)是灵芝的基本生物活性成分之一，具有抗炎、抗氧化和抗凋亡的特性[13]，GLPs 可以抑制 MAPK 和 NF- $\kappa$ B 途径显著减弱 LPS 诱导的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 等炎症介质的释放[14]。本实验我们验证 GLPs 抑制铁死亡的作用，探讨 GLPs 保护 DN 的机制。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 基因的表达数据采集与处理

本研究检索 GEO 数库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中糖尿病肾病样本数据，选择出包含 DN 患者基因表达数据 GSE142153，其中有 23 例 DN 患者样本和 10 例正常样本的基因表达数据。采用 Strawberry Perl (v5.30.0) 对基因数据注释、调整，用 R 语言软件(Vesion4.2.2)中 Limma 包对数据校正后进行差异分析，以  $|log2FC| > 1$  和校正  $P < 0.05$  为统计学意义标准，使用 ggplot2 包用于建立 DEGs 的火山图，Pheatmap 包构建表达差异基因(DEGs)的热图，通过韦恩图获取两个数推集的共同差异基因。使用 clusterProfiler 软件包对差异表达的基因进行 GO (Gene Ontology)、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 和 GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) 富集分析。通过 FerrDb 数据库(<http://www.zhounan.org/ferrdb/>)筛选出经过验证的铁死亡相关基因(ferroptosis related gene, FRG)并进一步分析。使用 WGCNA 包对基因差表达数据进行 WGCNA (weighted gene co-expression network analysis) 富集分析。采用 glmnet 包进行 LASSO (the least absolute shrinkage and selection operator) 回归分析校正。采用 pROC 进行 ROC (receiver operating characteristic curve) 验证。采用 reshape2、ggpubr、GSEABase、GSVA 包进行免疫浸润分析。

### 2.2. 细胞培养

人近端管状上皮细胞 HK-2 购自 ATCC (Manassas, VA, 美国)，细胞培养在含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中，细胞培养在 37°C、5% 的 CO<sub>2</sub> 条件下。对于糖尿病细胞模型，HK-2 细胞培养在含有 25 mM D-葡萄糖(Sigma, 美国)的培养基中。然后，细胞分别用 10 和 40  $\mu$ M 的 GLPs (MedChemExpress, 上海) 处理。

### 2.3. MDA、GSH、BUN 和 Cr 水平的测定

使用南京建成生物技术有限公司的试剂盒检测 MDA、GSH、BUN 和 Cr，尿微量白蛋白试剂盒(Bethyl Laboratories, 美国)，检测方法参照试剂供应商的说明书。

### 2.4. 乳酸脱氢酶的测定(LDH)

LDH 测定试剂盒(K313; Biovision, 美国)用于测量培养基中 LDH 的活性，用于评估细胞损伤。检测方法参照试剂供应商的说明书。

### 2.5. 细胞中脂质 ROS 的检测

使用 C11-BODIPY 试剂盒测量脂质 ROS 水平(Thermo Fisher Scientific, 美国)。用 10 mM C11-BODIPY 培养处理的细胞 1 小时后，收获细胞并用含有 1% 牛血清白蛋白的 PBS 洗涤。脂质 ROS 水平为使用流式细胞仪(BD Biosciences, 美国)。

## 2.6. 细胞活性检测

使用 MTT 检测细胞活力(Beyotime, 上海)。共  $1 \times 10^3$  的 HK-2 细胞接种到 96 孔板的每个孔中。处理后, 向孔中加入 20  $\mu\text{L}$  MTT 并孵育 4 小时, 吸弃孔内培养基, 每孔加 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 振荡 10 分钟。用酶标仪(Bio-Rad Laboratories, 美国)测定 490 nm 波长的吸光度。

## 2.7. 蛋白质印迹

向细胞中添加 RIPA 裂解缓冲液(Bio-Rad Laboratories, 美国)。10%十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳上分离裂解液中的蛋白质, 半干转膜法 PVDF 膜上进行印迹(Millipore Corp, 美国)。用 5% BSA 封闭膜, 使用 ECL 系统显影(BioRad Laboratories, 美国)。抗体详细信息如下: 抗 GPX4 (Ab125066; Abcam, 美国); 抗 NCOA4 (Ab86707; Abcam, 美国); 抗 b-actin (proteinab, 武汉)。

## 2.8. 动物实验

24 只雄性 C57BL/6J 小鼠(6 周龄)购自上海 SLAC 实验动物有限公司, 动物实验经青岛大学动物伦理委员会批准。小鼠分笼饲养在清洁级(SPF)动物房内, SPF 级动物房内环境温度为( $25 \pm 2$ ) $^\circ\text{C}$ , 相对湿度 50%~70%, 每天予以 12 h 光照。采用多次小剂量剂量(50 mg/kg STZ, 连续注射 4 d, 联合高脂高糖饮食)诱导 C57BL/6J 小鼠糖尿病肾病模型。模型小鼠随机分为: 对照组(注射等体积柠檬酸缓冲液)、10 mg/kg 和 40 mg/kg 的 GLPS 治疗组。

## 2.9. 空腹血糖和 OGTT

在小鼠禁食 12 h 后, 鼠尾末端 2 mm 处剪断尾巴, 将第一滴血弃去, 第二滴血滴在血糖试纸上, 检测空腹血糖。OGTT: 对各组小鼠给予 20%葡萄糖溶液 2 g/kg 进行灌胃, 同样方法检测 0、30、60、120 min 血糖, 绘制血糖 - 时间曲线, 并计算曲线下面积(AUC)。

## 2.10. 肾功能及尿 ACR 测定

将采集的血液标本分离出血清后, 采用全自动生化分析仪检测血肌酐、尿素氮等指标。采用 ELISA 法测定尿微量白蛋白及尿白蛋白。采用尿肌酐试剂盒(除蛋白法)测定尿肌酐水平, 进而计算出尿 ACR (尿微量白蛋白/肌酐)。

## 2.11. 苏木精伊红(HE)染色

肾组织取自不同组的小鼠并在 4%多聚甲醛中浸泡 24 小时。然后冲洗, 用梯度乙醇脱水, 并切成切片。将苏木精添加到切片中 5 分钟, 伊红染色 1 分钟。

## 2.12. 统计分析

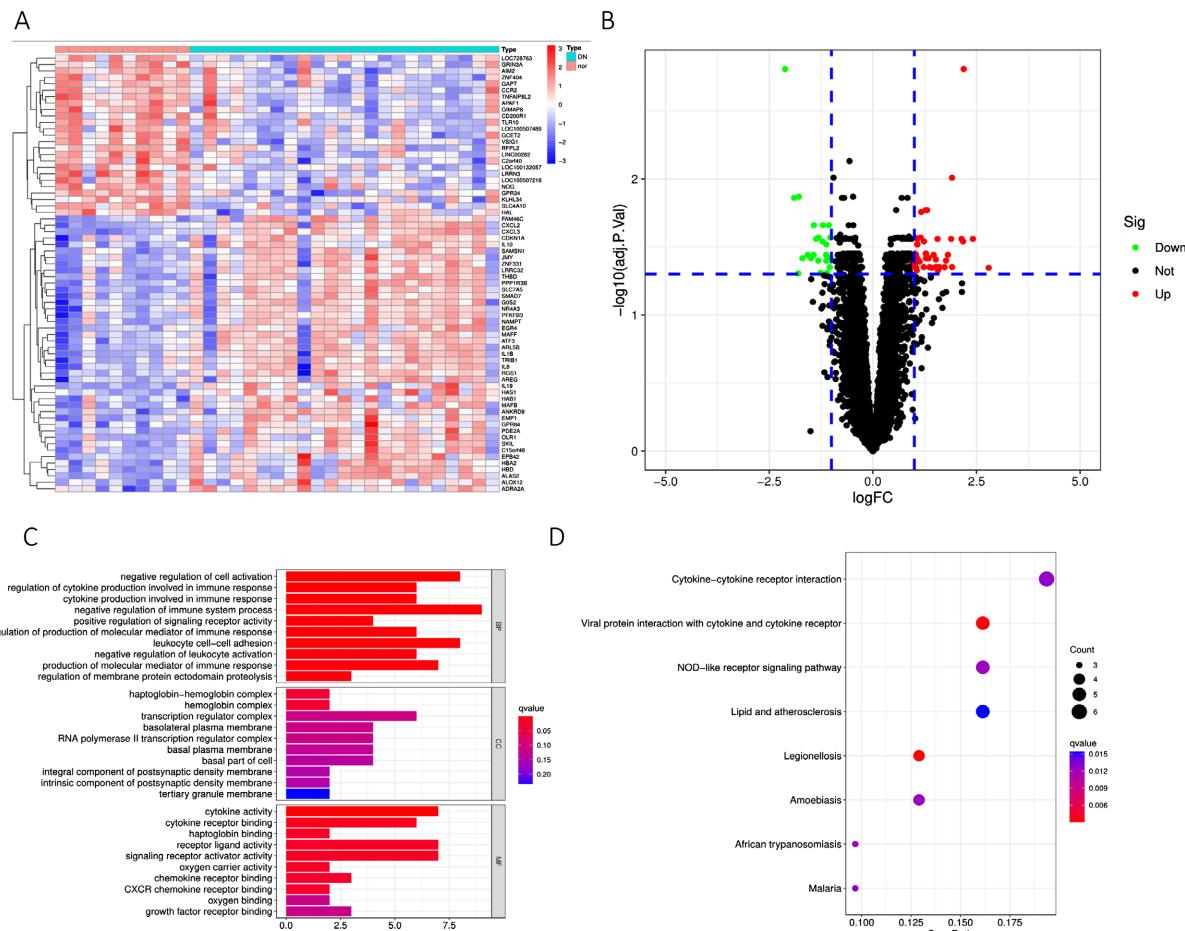
所有数据均显示为平均值  $\pm$  标准差( $SD \pm SEM$ ), 数据采用 one-way ANOVA 方差分析或 students-t 检验, 使用 GraphPad Prism 5.0 进行数据分析(GraphPad Software, 美国)。

## 3. 结果

### 3.1. GEO 数据库中差异表达基因功能富集分析

对 DN 患者与正常人外周血单个核细胞数据集(GSE142153)进行差异分析, 将差异分析结果生成火山图(图 1(A)), 并将筛选出前 100 个差异基因生成热图(图 1(B))。GO 结果显示, 差异基因富集在细胞因子介导的免疫应答、白细胞功能的调控(图 1(C))。KEGG 分析结果显示, 差异基因富集在细胞因子和受体

的相互作用、NOD 样受体信号通路(图 1(D))。



(A) DN 大鼠与正常大鼠肾脏差异基因热图, (B) DN 大鼠与正常大鼠肾脏差异基因的火山图, (C) GO 分析图, (D) KEGG 分析图。

**Figure 1.** Functional enrichment analysis of differentially expressed genes in GEO database  
**图 1.** GEO 数据库中差异表达基因功能富集分析

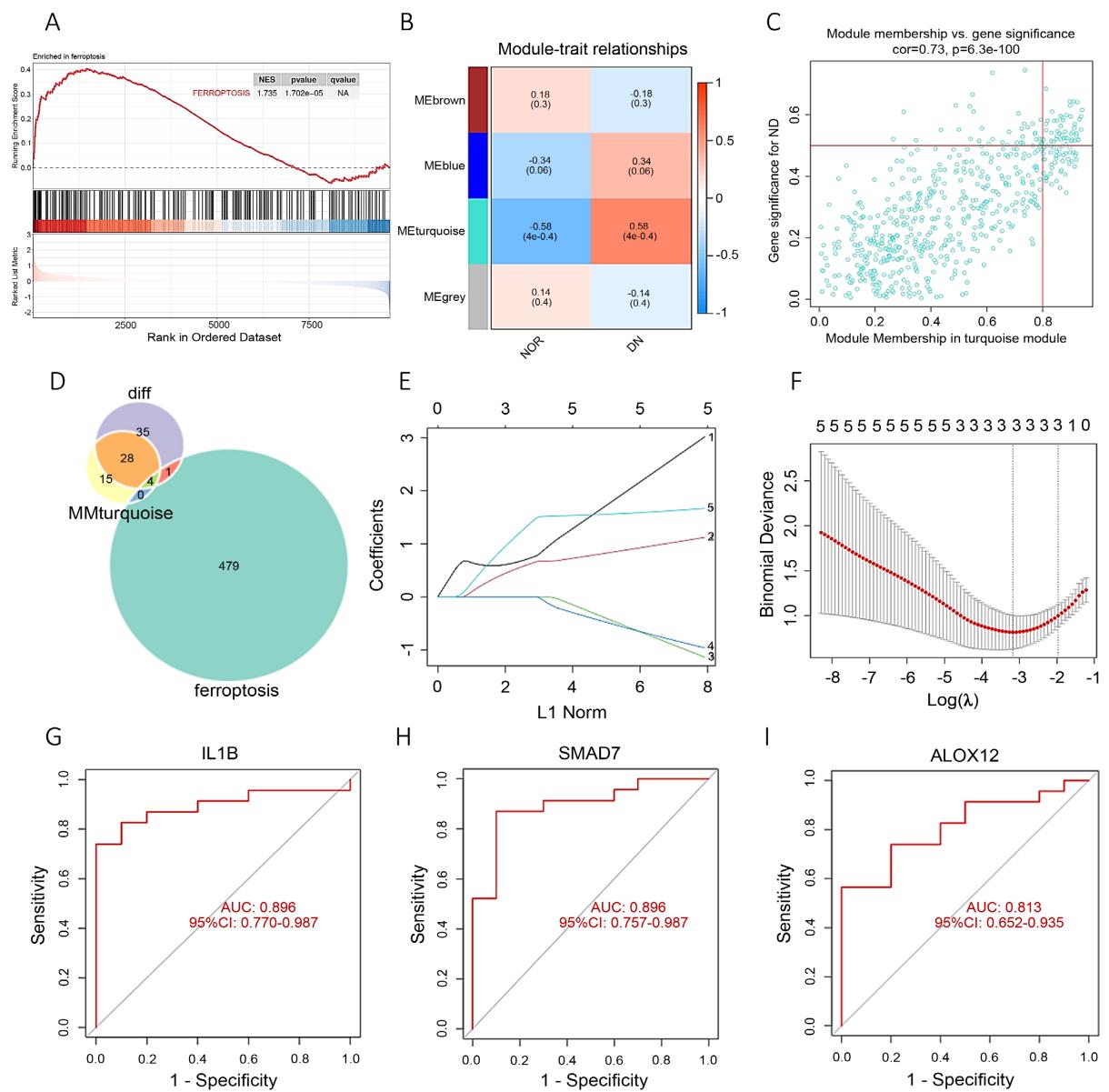
### 3.2. DN 患者与正常人差异表达基因与 FRG 的相关

GSE142153 差异分析的数据进行铁死亡基因集的 GSEA 富集分析, 结果显示 FRGs 在 DN 大鼠表达显著上调( $NES = 1.735, P < 0.001$ ) (图 2(A))。WGCNA 富集分析结果显示, 将所有基因分为 4 个模块, 其中 Meturquoise 模块与 DN 关系最密切, 呈正相关( $r = 0.58, P < 0.001$ ; 图 2(B)), 按照 $|GS| > 0.5 \& |MM| > 0.8$  条件进一步筛选出 Meturquoise 模块中与 DN 关系最密切的 47 个基因(图 2(C))。将差异基因、Meturquoise 模块与 DN 关系最密切基因、铁死亡基因集取交集, 筛出 5 个交集基因(图 2(D))。对筛选出 5 个交集基因进行 LASSO 回归分析, 筛选出 IL-1B、SAMD 7 和 ALOX12 (图 2(E), 图 2(F)), 将 IL-1B、SAMD 7 和 ALOX12 基因做 ROC 曲线分析, 结果显示 IL-1B、SAMD 7 和 ALOX12 是预测 DN 的良好指标(图 2(G)~(I))。

### 3.3. GLPs 抑制铁死亡发挥肾脏保护作用

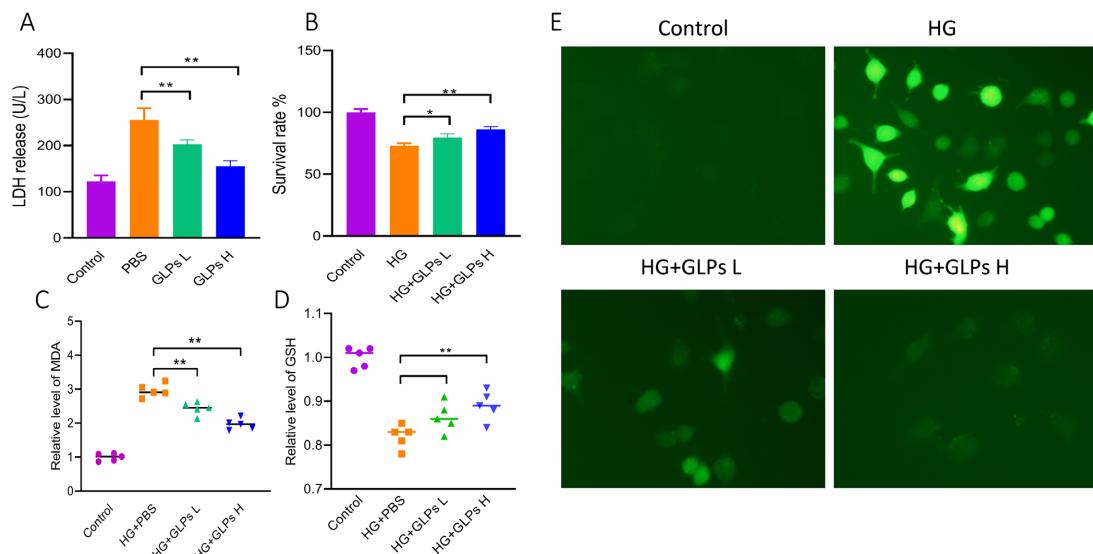
为探讨 GLPs 在高糖所致肾小管损伤中的作用, HK-2 细胞培养在含有 25 mM 葡萄糖培养基中。高

糖组培养基中 LDH 水平高明显高于对照组(图 3(A)), 表明高糖治疗诱导了 HK-2 细胞的损伤; 加入 10 和 40  $\mu\text{M}$  GLPs 处理细胞, LDH 水平降低(图 3(A))。细胞活力实验证了实高糖导致肾小管损伤, 而 GLPs 则缓解了损伤(图 3(B))。为检测高糖致肾小管损伤中铁死亡的作用, 我们测定了 MDA、GSH 和脂质 ROS 水平, 结果显示高糖组细胞中 MDA 显著升高(图 3(C)), GSH 水平显著降低(图 3(D)); 荧光探针法显示, 高糖组细胞中 L-ROS 水平升高(图 3(E))。铁死亡抑制剂 Fer-1 能恢复高糖导致肾小管细胞 MDA、GSH 的变化(图 3(C)、图 3(D)), 表明铁死亡在高糖诱导的肾小管上皮损伤中发挥重要作用。GLPs 能显著恢复高糖导致肾小管细胞 MDA, GSH 的变化(图 3(C)、图 3(D)), 降低高糖组细胞中 L-ROS 的荧光信号(图 3(E))。表明 GLPs 可能通过阻止细胞铁死亡保护肾小管上皮细胞免受高糖的损伤。



(A) GSEA 分析结果, (B) WGCNA 富集分析结果, (C) DN 关系最密切的 47 个基因, (D) 韦恩图, (E)~(F) LASSO 回归分析结果, (G)~(I) ROC 曲线分析分析结果。

**Figure 2.** Relationship between differentially expressed genes and FRG in DN patients  
**图 2.** DN 患者差异表达基因与 FRG 的关系

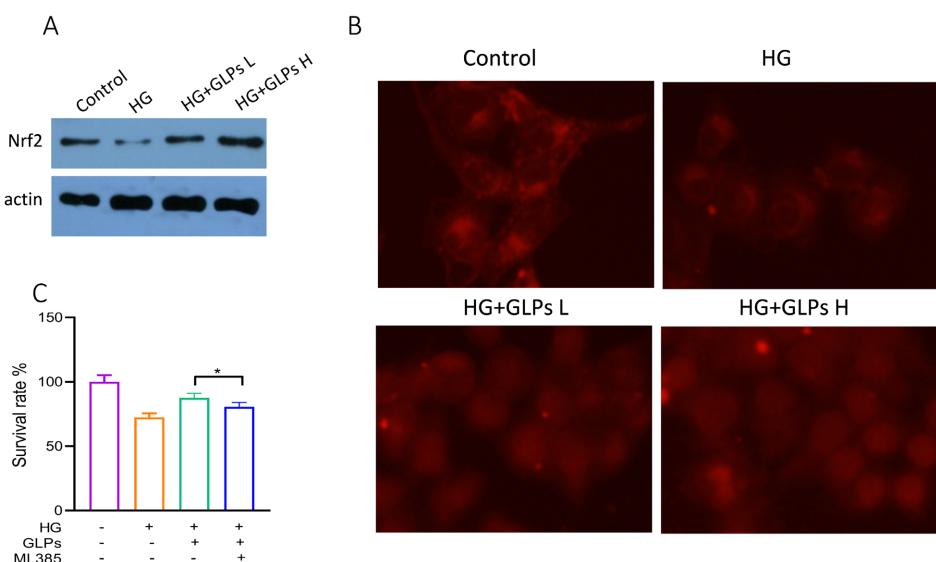


(A) HK-2 细胞中的 LDH 水平, (B) HK-2 细胞中的活力, (C) HK-2 细胞中的 LDH 水平, (D) HK-2 细胞中的 GSH 水平, (E) 细胞中 L-ROS 水平。

**Figure 3.** GLPs inhibited ferroptosis and exerts a renal protective effect  
**图 3.** GLPs 抑制铁死亡发挥肾脏保护作用

### 3.4. GLPS 激活 Nrf2 抑制铁死亡

Nrf2 蛋白在机体抗氧化应激损伤，维持细胞氧化还原内稳态发挥重要作用。本实验中，我们检测了高糖诱导的肾上皮细胞中 Nrf2 蛋白水平的下降(图 4(A)), 细胞核中 Nrf2 也升高(图 4(B)), 表明受高糖诱导的肾上皮细胞可能通过增加细胞 Nrf2 的水平和激活对抗损伤。采用 GLPs 治疗处理高糖损伤的肾上皮细胞，结果显示细胞中 Nrf2 蛋白水平的明显增加(图 4(A)), 细胞核中 Nrf2 明显升高(图 4(B))。而 Nrf2 抑制剂(ML385; medchemexpress, 上海)抑制了 GLPs 对受高糖诱导的肾上皮细胞的保护作用(图 4(C))。

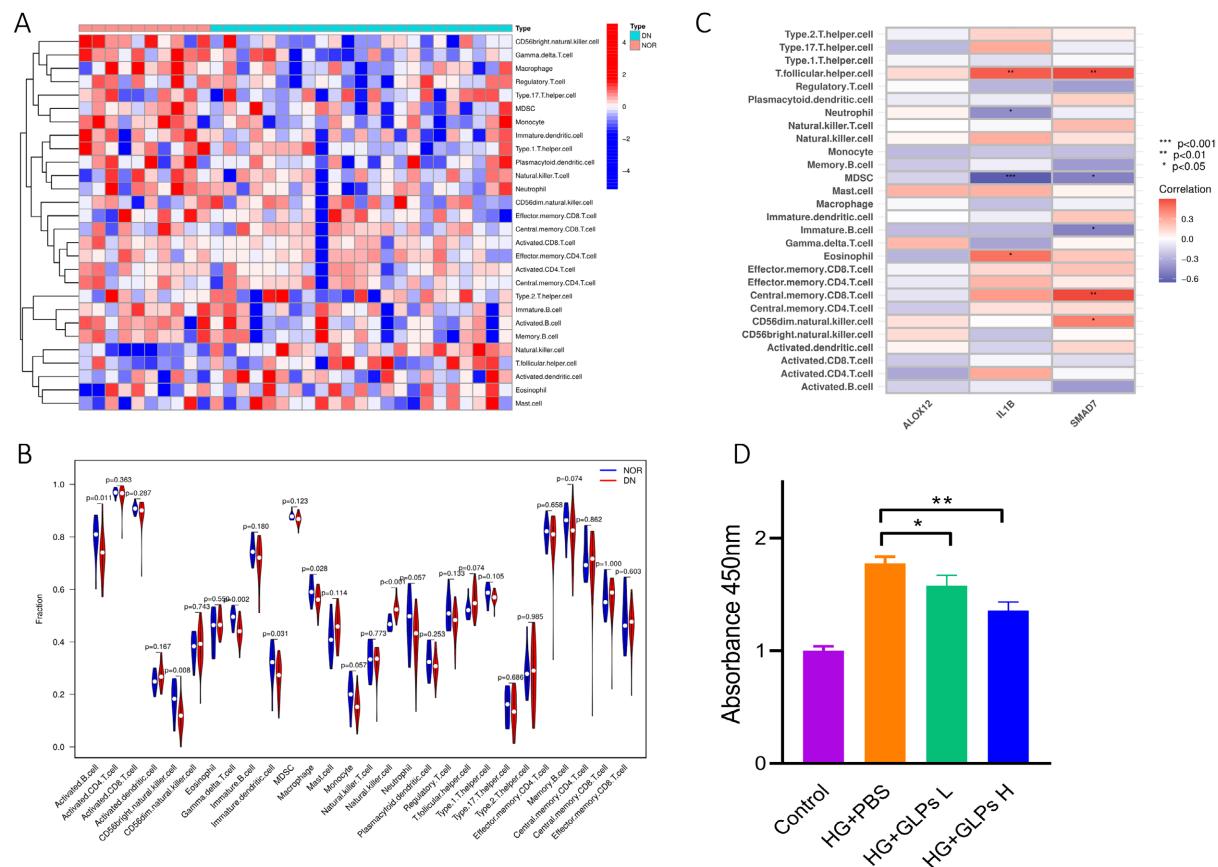


(A) Western blot 检测 HK-2 细胞中 Nrf2 的表达, (B) 免疫荧光 HK-2 细胞核中的 Nrf2 水平, (C) MTT 检测细胞活力。

**Figure 4.** GLPs inhibited ferroptosis via activating Nrf2  
**图 4.** GLPs 激活 Nrf2 抑制铁死亡

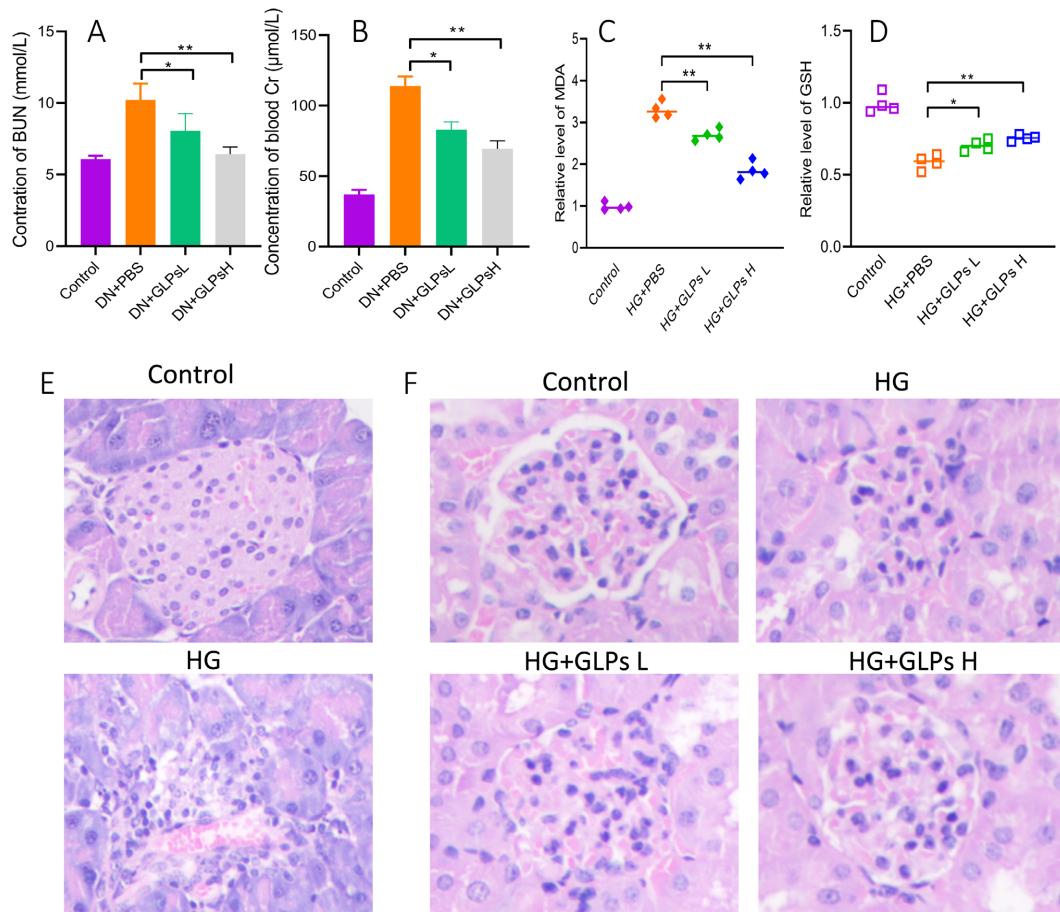
### 3.5. GLPs 抑制肾小管上皮细胞释放细胞因子

铁死亡是一种炎症性细胞死亡形式，胞内氧化还原失衡导致炎症介质的释放。通过对 GSE142153 数据进行单样本基因集富集分析(ssGSEA)，结果发现 DN 与多种炎性细胞激活相关，例如自然杀伤细胞、激活的 B 细胞、树突状细胞、巨噬细胞(图 5(A)、图 5(B))。将筛选的核心基因 IL-1B、SAMD 7 和 ALOX12DN 与免疫细胞进行相关性分析，结果显示 IL-1 $\beta$  和 SMAD7 与免疫激活密切相关(图 5(C))。本实验中，我们采用 Ellisa 监测了细胞培养液中 IL-1 的水平，高糖诱导的肾上皮细胞中 IL-1 的水平明显升高，GLPs 治疗后，细胞中 IL-1 的水平下降(图 5(D))。



### 3.6. GLPs 减轻糖尿病小鼠肾脏损伤

糖尿病小鼠血 BUN、Cr 水平明显高于正常组(图 6(A)、图 6(B))，为验证 GLPs 在体内的治疗作用，用 10mg/kg 和 40 mg/kg 的 GLPs 对 STZ 诱导的糖尿病小鼠进行了治疗。GLPs 治疗的糖尿病肾病小鼠血 BUN 和 Cr 水平降低(图 6(A)、图 6(B))。与对照组小鼠相比，糖尿病肾病小鼠表现出较高的 LDH、MDA 水平，降低的 GSH 水平，GLPs 降低了 MDA 水平，并增加了 GSH 水平(图 6(C)、图 6(D))。实验结束后，HE 染色检测肾脏和胰岛的形态学变化。结果显示在糖尿病肾病小鼠中发现胰岛破坏，体积变小，内有较多炎性细胞浸润(图 6(E))。肾小管上皮细胞肿胀，肾小球体积变小，血管袢减少，肾小球内过多蛋白沉积，GLPS 则改善了肾小管扩张(图 6(F))。此外，GLPS 治疗明显降低了糖尿病小鼠肾脏中胶原沉积(图 6(F))。



(A) 小鼠 BUN 的水平, (B) 小鼠肌酐水平, (C) 肾脏中 MDA 水平, (D) 肾脏中 GSH 水平, (E) 小鼠胰腺 HE 染色结果, (F) 小鼠肾脏 HE 染色结果。

**Figure 6.** GLPs alleviated kidney damage in diabetes mice

**图 6.** GLPs 减轻糖尿病小鼠肾脏损伤

#### 4. 讨论

DN 的严重微血管病变引起肾组织抗氧化能力的降低和 ROS 积累, 导致 RTEC 损伤和组织破坏[15][16]。DN 患者的肾活检显示 GPX4 和 SLC7A11 降低[9], db/db 小鼠和链脲佐菌素处理小鼠的肾脏中总铁和 FTH 显著升高[17]。我们调取 GEO 数据库中的资料, 将 DN 肾小管中的基因表达与铁死亡的相关基因做 GSEA 富集分析, 结果显示 DN 肾小管中的基因表达与密切相关铁死亡。对 DN 肾小管中的差异基因做 GO 和 KEGG 分析, 结果显示差异基因富集在氧化应激和脂质代谢通路[18]。

本实验中, 我们采用高糖处理肾小管上皮 HK-2 细胞, 细胞活力下降, 细胞中 MDA 显著升高, GSH 水平显著降低, 细胞中 L-ROS 水平也升高。铁死亡阻滞剂 Fer-1 能恢复高糖导致肾小管细胞 MDA, GSH 的变化, 降低高糖组细胞中 L-ROS 的。表明铁死亡在高糖诱导的肾小管上皮损伤中发挥重要作用。

有证据表明植物提取物已被证明对治疗 DN 有效, 从蘑菇、真菌和植物中获得的多糖具有很强的清除自由基能力, 可以防止生物体内的氧化损伤[19], 平菇是一种具有药理潜力的食用菌, 其提取物中的杂多糖、 $\beta$ -葡聚糖、 $\alpha$ -葡聚糖和低聚糖的混合物能对抗  $H_2O_2$  诱导的氧化损伤[20]。GLPS 是灵芝的基本生物活性成分之一, 具有抗炎、抗氧化和抗凋亡的特性[21][22]。实验中, 我们发现 GLPS 能显著降低高糖导

致肾小管细胞 MDA 水平, 增加 GSH 的含量, 降低高糖组细胞中 L-ROS 的荧光信号, 实验结果表明 GLPS 能缓解 DN 的氧化应激, 减轻细胞损伤。

核因子红细胞 2 相关因子 2 (Nrf2) 在保护细胞免受 ferroptosis 中发挥核心作用[23] [24]。因此我们检测 GLPS 处理高糖导致肾小管细胞中 Nrf2 的表达, 细胞中 Nrf2 和细胞核中 Nrf2 均明显升高。应用 Nrf2 的抑制剂能阻断 GLPs 对细胞的保护作用。本实验中, 我们采用 STZ 药物制备糖尿病肾病小鼠模型, 经 GLPs 治疗后, 小鼠血液中 BUN 和 Cr 水平降低, 肾小管上皮细胞中 LDH 和 MDA 水平下降, GSH 水平升高。小鼠肾小管上皮细胞肿胀减轻, 胶原沉积减少。表明 GLPS 可能通过阻止细胞铁死亡保护肾小管上皮细胞免受高糖的损伤。

研究发现, 铁死亡细胞通过释放炎症相关的细胞因子从而激发细胞免疫, 激活的免疫细胞通过识别不同模式的细胞死亡机制激发炎症反应, 促进细胞死亡[25] [26]。通过比对糖肾肾小管上皮的单细胞基因测序分析, 结果显示 DN 肾小管上皮的单细胞与免疫细胞的激活相关, 其中 IL-1 可能起着重要作用。我们检测到 DN 肾小管细胞培养液中 IL-1 的水平升高, 而 GLPS 则降低了细胞培养液中 IL-1 的水平。

总之, 我们的研究发现 GLPS 能减轻高糖对肾脏造成的损伤, 降低 LDH 和 MDA 水平下降的水平, 增加细胞中 Nrf2 的表达对抗细胞氧化应激。同时, GLPs 还能抑制受损肾小管上皮细胞释放细胞因子, 缓解级联细胞免疫造成的细胞损伤。本实验为采用 GLPs 治疗 DN 提供了可靠的实验依据和机制。

## 基金项目

潍坊市自然科学基金, 2021GX064。

## 参考文献

- [1] Zhang, L., Long, J., Jiang, W., Shi, Y., He, X., Zhou, Z., Li, Y., et al. (2016) Trends in Chronic Kidney Disease in China. *The New England Journal of Medicine*, **375**, 905-906. <https://doi.org/10.1056/NEJMcl602469>
- [2] Al Mamun, A., Ara Mimi, A., Wu, Y., Zaeem, M., Abdul Aziz, M., Aktar Suchi, S., Alyafeai, E., Munir, F. and Xiao, J. (2021) Pyroptosis in Diabetic Nephropathy. *Clinica Chimica Acta*, **523**, 131-143. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.09.003>
- [3] Bayir, H., Anthonymuthu, T.S., Tyurina, Y.Y., Patel, S.J., Amoscato, A.A., Lamade, A.M., et al. (2020) Achieving Life through Death: Redox Biology of Lipid Peroxidation in Ferroptosis. *Cell Chemical Biology*, **27**, 387-408. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.03.014>
- [4] Yang, W.S. and Stockwell, B.R. (2016) Ferroptosis: Death by Lipid Peroxidation. *Trends in Cell Biology*, **26**, 165-176. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.10.014>
- [5] Friedmann Angel, J.P., Schneider, M., Proneth, B., Tyurina, Y.Y., Tyurin, V.A., Hammond, V.J., et al. (2014) Inactivation of the Ferroptosis Regulator Gpx4 Triggers Acute Renal Failure in Mice. *Nature Cell Biology*, **16**, 1180-1191. <https://doi.org/10.1038/ncb3064>
- [6] Zhou, Y., Zhang, J., Guan, Q., Tao, X., Wang, J. and Li, W. (2022) The Role of Ferroptosis in the Development of Acute and Chronic Kidney Diseases. *Journal of Cellular Physiology*, **237**, 4412-4427. <https://doi.org/10.1002/jcp.30901>
- [7] Martin-Sanchez, D., Ruiz-Andres, O., Poveda, J., Carrasco, S., Cannata-Ortiz, P., Sanchez-Nino, M.D., et al. (2017) Ferroptosis, but Not Necroptosis, Is Important in Nephrotoxic Folic Acid-Induced AKI. *Journal of the American Society of Nephrology*, **28**, 218-229. <https://doi.org/10.1681/ASN.2015121376>
- [8] Wang, W.J., Jiang, X., Gao, C.C. and Chen, Z.W. (2021) Salusinbeta Participates in High Glucoseinduced HK2 Cell Ferroptosis in a Nrf2 Dependent Manner. *Molecular Medicine Reports*, **24**, Article No. 674. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12313>
- [9] Li, S., Zheng, L., Zhang, J., Liu, X. and Wu, Z. (2021) Inhibition of Ferroptosis by Up-Regulating Nrf2 Delayed the Progression of Diabetic Nephropathy. *Free Radical Biology and Medicine*, **162**, 435-449. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.323>
- [10] Liu, X.J., Hu, X.K., Yang, H., Gui, L.M., Cai, Z.X., Qi, M.S. and Dai, C.M. (2022) A Review of Traditional Chinese Medicine on Treatment of Diabetic Nephropathy and the Involved Mechanisms. *The American Journal of Chinese Medicine*, **50**, 1739-1779. <https://doi.org/10.1142/S0192415X22500744>

- [11] Huang, W.J., Liu, W.J., Xiao, Y.H., Zheng, H.J., Xiao, Y., Jia, Q., et al. (2020) Tripterygium and Its Extracts for Diabetic Nephropathy: Efficacy and Pharmacological Mechanisms. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **121**, Article ID: 109599. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109599>
- [12] Huang, D., Shen, P., Wang, C., Gao, J., Ye, C. and Wu, F. (2022) Calycosin Plays a Protective Role in Diabetic Kidney Disease through the Regulation of Ferroptosis. *Pharmaceutical Biology*, **60**, 990-996. <https://doi.org/10.1080/13880209.2022.2067572>
- [13] Li, Y., Liang, W., Han, Y., Zhao, W., Wang, S. and Qin, C. (2022) Triterpenoids and Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* Improve the Histomorphology and Function of Testes in Middle-Aged Male Mice by Alleviating Oxidative Stress and Cellular Apoptosis. *Nutrients*, **14**, Article No. 4733. <https://doi.org/10.3390/nu14224733>
- [14] Xu, J., Xiao, C., Xu, H., Yang, S., Chen, Z., Wang, H., et al. (2021) Anti-Inflammatory Effects of *Ganoderma lucidum* Sterols via Attenuation of the p38 MAPK and NF-kappaB Pathways in LPS-Induced RAW 264.7 Macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, **150**, Article ID: 112073. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112073>
- [15] Akhtar, M., Taha, N.M., Nauman, A., Mujeeb, I.B. and Al-Nabat, A. (2020) Diabetic Kidney Disease: Past and Present. *Advances in Anatomic Pathology*, **27**, 87-97. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000257>
- [16] Gorin, Y. and Block, K. (2013) Nox4 and Diabetic Nephropathy: With a Friend Like This, Who Needs Enemies? *Free Radical Biology and Medicine*, **61**, 130-142. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.014>
- [17] Kim, S., Kang, S.W., Joo, J., Han, S.H., Shin, H., Nam, B.Y., et al. (2021) Correction: Characterization of Ferroptosis in Kidney Tubular Cell Death under Diabetic Conditions. *Cell Death & Disease*, **12**, Article No. 382. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03667-y>
- [18] Wang, Y., Bi, R., Quan, F., Cao, Q., Lin, Y., Yue, C., et al. (2020) Ferroptosis Involves in Renal Tubular Cell Death in Diabetic Nephropathy. *European Journal of Pharmacology*, **888**, Article ID: 173574. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173574>
- [19] Guo, M.F., Dai, Y.J., Gao, J.R. and Chen, P.J. (2020) Uncovering the Mechanism of *Astragalus membranaceus* in the Treatment of Diabetic Nephropathy Based on Network Pharmacology. *Journal of Diabetes Research*, **2020**, Article ID: 5947304. <https://doi.org/10.1155/2020/5947304>
- [20] Barbosa, J.R., Oliveira, L.C., Almada-Vilhena, A.O., et al. (2020) Obtaining Extracts Rich in Antioxidant Polysaccharides from the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus* Using Binary System with Hot Water and Supercritical CO<sub>2</sub>. *Food Chemistry*, **330**, Article ID: 127173. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127173>
- [21] Lu, J., He, R., Sun, P., Zhang, F., Linhardt, R.J. and Zhang, A. (2020) Molecular Mechanisms of Bioactive Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* (Lingzhi), a Review. *International Journal of Biological Macromolecules*, **150**, 765-774. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.035>
- [22] Li, Y., Tang, J., Gao, H., Xu, Y., Han, Y., Shang, H., Lu, Y. and Qin, C. (2021) *Ganoderma lucidum* Triterpenoids and Polysaccharides Attenuate Atherosclerotic Plaque in High-Fat Diet Rabbits. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, **31**, 1929-1938. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2021.03.023>
- [23] Wang, Y., Yan, S., Liu, X., Deng, F., Wang, P., Yang, L., et al. (2022) PRMT4 Promotes Ferroptosis to Aggravate Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy via Inhibition of the Nrf2/GPX4 Pathway. *Cell Death & Differentiation*, **29**, 1982-1995. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00990-5>
- [24] Dodson, M., Castro-Portuguez, R. and Zhang, D.D. (2019) NRF2 Plays a Critical Role in Mitigating Lipid Peroxidation and Ferroptosis. *Redox Biology*, **23**, Article ID: 101107. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101107>
- [25] Martin-Sanchez, D., Poveda, J., Fontecha-Barriuso, M., Ruiz-Andres, O., Sanchez-Nino, M.D., Ruiz-Ortega, M., Ortiz, A. and Sanz, A.B. (2018) Targeting of Regulated Necrosis in Kidney Disease. *Nefrologia (Engl Ed)*, **38**, 125-135. <https://doi.org/10.1016/j.nefro.2017.04.004>
- [26] Hu, X., Zhang, H., Zhang, Q., Yao, X., Ni, W. and Zhou, K. (2022) Emerging Role of STING Signalling in CNS Injury: Inflammation, Autophagy, Necroptosis, Ferroptosis and Pyroptosis. *Journal of Neuroinflammation*, **19**, Article No. 242. <https://doi.org/10.1186/s12974-022-02602-y>