

综述

铁死亡调控在肝脏疾病治疗中的研究进展

陈晨¹, 程卓安¹, 王存^{1,2}, 夏强^{1,2,3}

1. 上海交通大学医学院附属仁济医院肝脏外科, 上海 200120; 2. 上海市肿瘤研究所癌基因及相关基因国家重点实验室, 上海 200120; 3. 上海市器官移植研究所, 上海器官移植与免疫工程技术研究中心, 上海 200120

[摘要] 铁死亡是由于脂质活性氧自由基累积造成的细胞死亡, 以铁依赖的脂质双分子层氧化性损伤为特征。铁积累和脂质过氧化是铁死亡过程中的关键标志。铁稳态、氧化还原稳态、脂质合成等过程失调可影响铁死亡。目前已报道铁死亡的主要调控轴包括胱氨酸/谷氨酸转运体 (System X_c⁻) - 谷胱甘肽 (glutathione, GSH) - 谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 轴、辅酶 Q10 (coenzyme Q10, CoQ10) - 铁死亡抑制蛋白 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) - 泛醇轴、GTP 环化水解酶 1 (GTP cyclohydrolase 1, GCH1) - 四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin, BH4) - 二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) - 磷脂轴、二氢乳清酸脱氢酶 (dehydrogenase, DHODH) - 泛醇轴等。铁死亡被视为重要的细胞死亡形式, 在肝细胞癌、肝缺血再灌注损伤、脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化和肝脏代谢病等多种疾病中发挥重要的作用, 清晰阐释铁死亡的分子机制可为上述肝脏疾病的治疗提供潜在靶点。因此, 该综述主要概括和探讨铁死亡的分子特征、相关生物学过程、调控途径, 以及调控铁死亡在肝脏疾病治疗中的研究现状。

[关键词] 铁死亡; 肝脏疾病; 脂质过氧化

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.03.013 **[中图分类号]** R575.5 **[文献标志码]** A

Research progress in ferroptosis regulation in the treatment of liver diseases

CHEN Chen¹, CHENG Zhuoan¹, WANG Cun^{1,2}, XIA Qiang^{1,2,3}

1. Department of Liver Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200120, China; 2. State Key Laboratory of Oncogenes and Related Gens, Shanghai Cancer Institute, Shanghai 200120, China; 3. Shanghai Institute of Transplantation, Shanghai Engineering Research Center of Transplantation and Immunology, Shanghai 200120, China

[Abstract] Ferroptosis is a form of cell death that results from accumulation of lipid reactive oxygen species, marked by iron-dependent oxidative damage of phospholipids. Accumulation of iron and lipid hydroperoxides are hallmarks of ferroptosis. Diverse biological contexts, including iron handling, redox homeostasis, imbalance of lipid synthesis, participate in ferroptosis. Mechanistically, pathways of ferroptosis regulation involving System X_c⁻-glutathione (GSH)-glutathione peroxidase 4 (GPX4) axis, coenzyme Q10 (CoQ10)-ferroptosis suppressor protein 1 (FSP1)-ubiquinol axis, GTP cyclohydrolase 1 (GCH1)-tetrahydrobiopterin (BH4)-dihydrofolate reductase (DHFR) axis, dehydrogenase (DHODH)-ubiquinol axis have been discovered. Ferroptosis has been implicated in multiple liver diseases, such as hepatocellular carcinoma, liver ischemia-reperfusion injury, steatohepatitis, liver fibrosis, cirrhosis and liver metabolic diseases. Elucidating its mechanism offers various tractable nodes for therapeutic intervention. Here, we summarize insights into the molecular characteristics, biological processes, regulatory pathways of ferroptosis and its recent advances in the treatment of liver diseases.

[Key words] ferroptosis; liver disease; lipid peroxidation

细胞是生命的基本单位, 细胞的增殖、分化、死亡对正常发育、内环境稳态、预防异常增殖性疾病至关重要。细胞的命运受到环境和基因共同影响。近年

来研究者们发现, 广泛的脂质过氧化通过特有的方式——铁死亡 (ferroptosis) 可促进细胞死亡。随着研究深入, 铁死亡有望为疾病治疗提供新思路、新方案。

[基金项目] 国家自然科学基金 (92059205)。

[作者简介] 陈晨 (1996—), 女, 住院医师, 博士; 电子信箱: 18217597089@163.com。

[通信作者] 夏强, 电子信箱: xiaqiang@shsmu.edu.cn。

[Funding Information] National Natural Science Foundation of China (92059205)。

[Corresponding Author] XIA Qiang, E-mail: xiaqiang@shsmu.edu.cn。



1 铁死亡的发现及分子特征

2003年,有研究者^[1]通过高通量化合物筛选发现NSC146109(后更名为erastin)对RAS突变的肿瘤细胞有选择性致死作用。随后,在2008年,有研究者^[2]进一步通过高通量小分子筛选,鉴定出了另外2种RAS突变选择性致死化合物:铁死亡诱导剂RAS合成致死分子3(RAS-selective lethal small molecule 3, RSL3)和RSL5。后续研究显示,这种细胞死亡不同于细胞凋亡、坏死、焦亡和其他特征明确的调节性细胞死亡类型。RSL3引起的细胞死亡与细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平增高密切相关,使用铁螯合剂或抑制铁摄取基因可一定程度阻断该类细胞死亡。因此,2012年,人们正式使用“铁死亡”来代指这种铁依赖性、非凋亡形式的调节性细胞死亡^[3]。

目前主要存在两类途径介导铁死亡发生,即外源性途径(转运体依赖性途径)和内源性途径(酶调节性途径)。外源性途径通过抑制胱氨酸/谷氨酸转运体(System X_c⁻)等细胞膜转运体或激活铁转运体血清转铁蛋白和乳铁蛋白而启动。内源性途径主要通过阻断细胞内的抗氧化酶实现。铁死亡与其他形式的细胞死亡相比具有其独特的特征。使用透射电子显微镜可以观察到铁死亡细胞通常表现出线粒体异常,如膜密度增加、外膜破裂、嵴减少或消失^[3];而并未出现染色质凝集等细胞凋亡的特征,无胞质和细胞器肿胀、质膜破裂等细胞坏死的特征,亦无自噬的双膜囊泡特征^[3-4]。

生化角度上,铁死亡主要表现为铁积累和脂质过氧化。此外,细胞还呈现出ROS积累、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)激活、胱氨酸/谷氨酸转运体抑制、谷胱甘肽(glutathione, GSH)耗竭、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化增加、花生四烯酸介质(如11-HETE和15-HETE)释放等。由于铁死亡过程中损伤相关分子模式(damage-related molecular patterns, DAMP)启动,该细胞死亡模式还具有促炎的免疫特征。

2 铁死亡相关生物学过程

铁积累和脂质过氧化是铁死亡中膜发生氧化损伤

的关键信号。许多通路正是通过影响铁稳态、氧化还原稳态和脂质合成等细胞代谢过程从而改变细胞对铁死亡的敏感性。

2.1 铁死亡中的铁过载

铁元素由于有配体结合和电子转移的特性,对生物体至关重要。细胞铁是影响铁死亡的重要元素之一。生理条件下细胞内铁主要靠铁反应元件结合蛋白(iron regulatory protein, IRP)调节,它们在细胞铁水平较低时被激活,改变铁的摄取、利用、储存和排出^[5]。铁稳态也受到小分子激素赫普西汀等调节,它竞争性与细胞表面的铁转运蛋白结合,随后被溶酶体降解,进而使铁无法转出^[6]。抑制溶酶体对铁蛋白的降解可通过减少不稳定铁进而阻断铁死亡。减少胞内铁在其他方面的利用会增加细胞对铁死亡的敏感性。如缺乏铁硫簇(iron-sulfur cluster, ISC)通过增加铁载量促进细胞铁死亡。在肺癌细胞中通过敲除铁硫簇合成酶半胱氨酸脱硫酶(cysteine desulfurase, NFS1)会促进erastin诱导的铁死亡^[7]。抑制ISC合成可通过激活IRP2增加细胞对铁死亡的敏感性^[8]。过表达铁硫簇组装酶(iron-sulfur cluster assembly enzyme, ISCU)可以减轻双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)诱导的铁死亡^[9]。此外,铁储存蛋白的合成和降解会影响细胞内铁含量进而影响铁死亡。最后,阻断铁的释放途径可增加细胞对铁死亡的敏感性。过表达铁输出蛋白溶质载体家族40成员1(solute carrier family 40 member 1, SLC40A1)可抑制西拉美辛和拉帕替尼诱导的铁死亡^[10]。Prominin 2(PROM2)可通过形成含铁蛋白的多泡体,进而刺激外泌体依赖的铁输出,最终抑制细胞铁死亡^[11]。

2.2 铁死亡中的氧化还原稳态失衡

细胞内氧化还原(redox)失衡可促进细胞发生铁死亡。氧化还原反应产生的ROS和活性氮(reactive nitrogen species, RNS)参与调节细胞存活。细胞内ROS主要来源于线粒体代谢和细胞膜上的NADPH氧化酶(NADPH oxidase, NOX)家族,其家族成员NOX1、CYBB/NOX2和NOX4介导ROS产生,促进脂质过氧化进而导致铁死亡^[12-15]。

NADPH是主要的电子供体,是一种重要的还原

剂。下游的电子受体以硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 系统和 GSH 系统为主。TRX 通过硫氧还蛋白还原酶 (thioredoxin reductase, TRXR) 使用 NADPH 提供的还原当量还原二硫化物。过氧还蛋白接受电子并清除过氧化氢。谷胱甘肽还原酶 (glutathione-disulfide reductase, GSR) 使用 NADPH 提供的电子把氧化态型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) 还原为 GSH。GSH 是主要的内源性抗氧化剂, 可以清除 ROS, 并使谷氧还蛋白和谷胱甘肽过氧化物酶具有还原能力^[16]。GSH 的合成依赖于半胱氨酸、含硫氨基酸前体、谷氨酸半胱氨酸连接酶 (glutamate-cysteine ligase, GCL) 的活性。System X_c⁻可使细胞外的胱氨酸和细胞内的谷氨酸发生交换, 维持 GSH 的产生。此外, 膜电子转运蛋白细胞色素 P450 还原酶 (cytochrome P450 oxidoreductase, POR) 使用 NADPH 作为电子供体, 使得下游的电子受体接受电子后被还原, 去除多聚不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 的氢或还原 Fe³⁺ 诱发脂质过氧化导致铁死亡^[17]。转录因子核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) 对调控抗氧化基因也发挥一定作用^[18]。

2.3 铁死亡中的脂质过氧化和氨基酸代谢失衡

过量积聚的脂质发生过氧化是铁死亡的重要标志之一, 脂肪酸代谢失衡是影响铁死亡的一个重要因素。铁死亡过程中过氧化的底物是具有多不饱和羟基尾的磷脂。由于含有双烯氢原子, PUFA 容易发生脂质过氧化, 即在铁依赖性酶和不稳定铁作用下使用氧分子发生过氧化反应, 产生脂质过氧化物 (PL-PUFA-OOH)^[19]。PL-PUFA-OOH 的积累最终会破坏细胞器和细胞膜结构, 因此 PUFA-PLs 含量越高的膜越容易发生过氧化。花生四烯酸 (C20:4) 或其延伸产物肾上腺酸 (C22:4) 的磷脂酰乙醇胺 (phosphatidyl ethanolamine, PEs) 是氧化驱动铁死亡的关键磷脂^[20]。研究者^[21]筛选发现了两种与脂代谢相关的膜重塑酶, 即乙酰辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long chain family member 4, ACSL4) 和磷脂酰胆碱酰基转移酶 3 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 对 PUFA-PLs 的产生发挥重要作用。ACSL4 可以连接长链 PUFAs 和辅酶 A, 其产物可被重新酯化为磷脂, 增加了脂质和膜中的长链 PUFAs 掺入量^[22]。在多种

肿瘤中 ACSL4 的表达量都与细胞对铁死亡诱导剂的敏感性相关。LPCAT3 是 LPLAT 异构体的主要存在形式, 对 PUFA 具有特异性, 可调节磷脂和缩醛磷脂中 PUFA 的含量^[23]。

抑制脂质过氧化系统可抑制铁死亡: 如谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 可参与阻断磷脂过氧化到相应的磷脂醇从而抑制铁死亡, 自由基捕获抗氧化剂 (radical-trapping antioxidants, RTA) 和铁死亡抑制蛋白 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) 等参与终止自由基驱动的脂质过氧化发展阶段从而抑制铁死亡^[24-25]。脂氧酶 (lipoxygenases, LOXs) 可以直接氧化膜中的 PUFAs 和含 PUFA 的脂质^[26], 但其在铁死亡中的具体作用还不清楚。GTP 环化水解酶 1 (GTP cyclohydrolase 1, GCH1) 调控的四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin, BH4) 合成可以选择性抑制多不饱和脂肪酸尾部消耗磷脂, 造成脂质重塑从而抑制铁死亡^[27]。

此外, 氨基酸代谢与铁死亡也密切相关。半胱氨酸在谷氨酸-半胱氨酸连接酶 (glutamate-cysteine ligase, GCL) 和谷胱甘肽合成酶 (glutathione synthase, GSS) 催化下合成 GSH^[3], 影响 GSH 的合成途径可显著影响铁死亡。研究者在氨基酸饥饿条件下发现谷氨酰胺分解促进铁死亡^[28]。谷氨酸通过转氨酶 (glutamic-oxaloacetic transaminase 1, GOT1) 介导转氨产生的 α -酮戊二酸可在线粒体中产生 ROS 诱导铁死亡。在线粒体中, α -酮戊二酸介导柠檬酸盐产生, 后者可在胞质中通过 ATP 柠檬酸裂解酶产生乙酰辅酶 A^[29]。在胱氨酸剥夺时, α -酮戊二酸刺激二氢硫酰胺脱氢酶在线粒体产生 ROS, 增加铁含量, 从而诱导铁死亡^[30]。

3 铁死亡的调控

3.1 System X_c⁻-GSH-GPX4 轴

System X_c⁻是由 xCT [溶质运载蛋白 7 家族成员 11 (solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)] 和 4F2 重链 (SLC3A2) 两个亚基组成的异源二聚体, 可向细胞内转入胱氨酸, 同时释放 1 个谷氨酸到胞外。SLC7A11 的表达和活性受到多种因素调节, 包括肿瘤蛋白 P53 (tumor protein P53, TP53)、核转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-like-

2, NFE2L2)/NRF2、乳腺癌易感基因1 (breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1) 相关蛋白1、黏蛋白1 (mucin1, MUC1)、Beclin1 (BECN1) 等, 进而影响GSH的水平。抑制SLC7A11通路是诱导铁死亡的重要机制之一。GSH是由谷氨酸 (glutamic acid, Glu)、半胱氨酸 (cysteine, Cys)、甘氨酸 (glycine, Gly) 组成的三肽, 其中的半胱氨酸巯基是其作为抗氧化剂的主要功能基团。组成GSH的半胱氨酸, 可通过转硫途径从甲硫氨酸中获得, 也可通过System X_c⁻从细胞外的胱氨酸中获得。GPX4是一种硒蛋白, 是抗氧化的关键酶, 可以直接把磷脂过氧化物还原为磷脂过氧化氢^[31-32]。一旦膜发生氧化损伤, 细胞会启动至少2种机制进行修复: 第一种是激活特异性的酶 [如GPX4、凋亡诱导因子线粒体相关2 (apoptosis inducing factor mitochondrial 2, AIFM2) 等] 来限制脂质过氧化, 第二种是使用囊泡转运、胞吞胞吐修复损伤的膜。硒元素可通过转录因子AP-2 gamma和特异性蛋白1上调GPX4的表达^[33]。目前, 人们公认System X_c⁻-GSH-GPX4轴是铁死亡过程中主要的负向调控轴。

3.2 CoQ10/FSP1-泛醇轴

辅酶Q10 (coenzyme Q10, CoQ10) 也称泛醌 (ubiquinone), 是来源于甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway) 的亲脂性代谢产物。CoQ10通常在线粒体电子传递链中行使功能。线粒体外的CoQ10由成纤维细胞特异蛋白1 (fibroblast-specific protein 1, FSP1) 再生。FSP1旧称为AIFM2。2019年研究者报道了FSP1的抗铁死亡功能是基于它的氧化还原酶活性, 可使用NAD(P)H/H⁺把线粒体外的CoQ10还原为泛醇 (ubiquinol)。泛醇可作为强自由基捕获抗氧化剂直接还原脂自由基, 或间接通过 α -生育酚 (维生素E的常见形式) 阻断脂质过氧化反应^[24-25]。FSP1可被过氧化物酶体增殖物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR α) 激活, 而PPAR α 受鼠双微体基因2 (murine double minute 2, MDM2)/MDMX复合体控制^[34]。

3.3 GCH1-BH4-DHFR-磷脂轴

2020年研究者发现表达GCH1的细胞合成BH₄, 能够选择性抑制含2个多不饱和脂肪酰基尾的磷脂消耗, 从而抑制铁死亡。BH₄有抗氧化功能, 其氧化形

式为二氢生物蝶呤 (dihydrobiopterin, BH₂)。BH₂可在二氢叶酸还原酶 (dihydrofolate reductase, DHFR) 催化下以NADPH作为供氢载体再生为BH₄。当GPX4受抑制时, BH₄的生物合成是重要的代偿通路^[27,35]。

3.4 DHODH-泛醇轴

二氢乳清酸脱氢酶 (dehydrogenase, DHODH) 是嘧啶从头合成的限速酶之一, 位于线粒体内膜上, 催化二氢乳清酸氧化为乳清酸。在这一过程中, 电子被传递给线粒体内膜上的CoQ, 使其还原为抗氧化剂泛醇, 从而在GPX4低表达细胞中抑制铁死亡^[36]。DHODH将嘧啶合成与线粒体呼吸链偶联, 为治疗GPX4低表达的肿瘤提供潜在治疗策略。

3.5 其他调控

如图1所示, 铁死亡过程涉及多种转录因子激活或抑制。如上皮间质化相关因子SNAIL1、TWIST1上调可增加细胞对铁死亡的敏感性, 这提示诱导铁死亡对间质型肿瘤细胞具有潜在应用价值^[37]。TP53通过抑制SLC7A11或二肽基肽酶4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP-4) 促进铁死亡^[15,38]。在氧化压力下, 核转录因子NRF2从Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1) 上解离, 定位到核上, 激活下游抗氧化反应元件的靶基因, 如FTH1、FTL、SLC40A1、ABCB6、HMOX1等铁相关基因, 从而促进GSH合成, 限制ROS产生。活化转录因子4 (activating transcription factor 4, ATF4) 是代谢和氧化稳态的调节因子, 激活ATF4可促进表达SLC7A11从而影响铁死亡^[39]。肿瘤抑制因子神经纤维蛋白2基因 (neurofibromin 2, NF2) 通过抑制促癌转录共激活因子Yes相关蛋白 (Yes associated protein, YAP) 的活性从而抑制铁死亡^[40]。YAP/transcription activator with PDZ binding motif (TAZ) 以TEA转录因子 (TEA domain transcription factor, TEAD) 依赖的方式影响SLC7A11表达从而抑制铁死亡, 使得肝细胞癌对索拉非尼耐药^[41]。低氧诱导因子2 α (hypoxia-inducible factor-2 α , HIF-2 α) 上调脂质和铁调节基因, 使得细胞对铁死亡敏感性增加, 且HIF-2 α 通过不可逆的半胱氨酸氧化从而增加ROS^[42]。

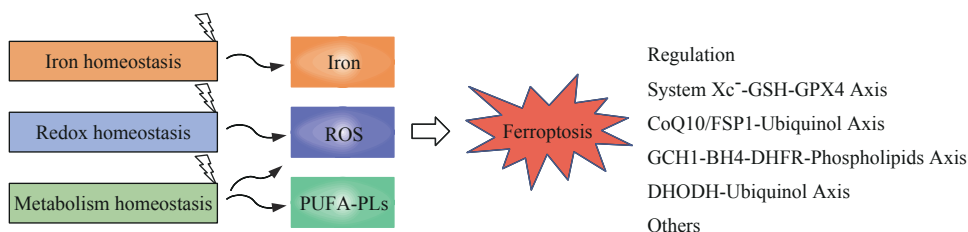


图1 铁死亡概览

Fig 1 An overview of ferroptosis

4 铁死亡的诱导剂和抑制剂

4.1 诱导剂

自从首个铁死亡诱导剂 erastin 报道以来^[1,3], 越来越多的研究聚焦利用铁死亡清除肿瘤细胞 (尤其是耐药状态的肿瘤细胞)。理论上, 靶向抑制性调控轴

的关键酶和相应通路的抑制剂即可作为潜在的铁死亡诱导剂; 反之, 铁死亡正向调控轴的抑制剂即为铁死亡抑制剂。现已存在的铁死亡诱导剂只占铁死亡调节网络的一小部分。常见的铁死亡诱导剂和抑制剂如表1所示。

表1 常见的铁死亡诱导剂和抑制剂

Tab 1 Common inducers and inhibitors of ferroptosis

Inducer	Target	Inhibitor	Target
RSL3, ML162, ML210, FIN56, FINO ₂	GPX4	Iron chelator	Iron toxicity
Erastin, erastin analogs, IKE, Sorafenib, Sulfasalazine, PE, glutamate, IFN- γ	System X _c ⁻	Ferrostatin-1, liprostatin-1, deuterated PUFAs, MUFAs	Lipid peroxidation
FIN56	CoQ10	Vitamin E, α -tocopherol, RTA	Lipid propagation
BSO	Glutamate-cysteine ligase	Thiazolidinediones	ACSL4
Statins	HMG-CoA	Baicalein, Zileuton	Lipoxygenases
Brequinar	DHODH		
iFSP1	FSP1		
Artemisinins	Ferritinophagy		
Methotrexate	Dihydrofolate reductase		

Note: HMG-CoA—3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; MUFAs—monounsaturated fatty acids.

大多数经典的铁死亡诱导剂是通过拮抗 System X_c⁻-GPX4 轴发挥作用。GPX4 抑制剂作为铁死亡诱导剂是通过促进脂质 ROS 累积诱导铁死亡。耐药肿瘤细胞对 GPX4 抑制剂诱导的铁死亡敏感性显著增高^[43]。在肿瘤细胞系中, 肾癌细胞和弥漫大 B 细胞淋巴瘤对 GPX4 抑制剂诱导的铁死亡最敏感^[44]。经典的 GPX4 抑制剂是 RSL3, 在 2008 年被首次报道^[2]。RSL3 和 (S)-enantiomer (ML162) 都存在高活性的氯乙酰胺基团, 不仅使 GPX4 的活性位点硒代胱氨酸共价失活, 而且也使其其他硒蛋白失活, 一定程度限制了它们的体内应用。ML210 在特异性上做了改善, RSL3、ML162、ML210 均通过抑制 GPX4 诱导铁死亡; 2018 年, 研究者^[45]在检验 56 种非凋亡的致死化合物时发现, ferroptosis inducing 56 (FIN56) 通过乙酰辅酶 A 羧化酶降解 GPX4 诱导铁死

亡, 同时还能结合并激活角鲨烯合成酶 (一种参与胆固醇合成的酶), 导致最终消耗内源性 CoQ10; FINO₂ 还促进铁氧化, 间接抑制 GPX4。以上药物具有高度亲电性, 使得 GPX4 的活性位点硒代半胱氨酸被共价烷基化, 但由于选择性差、药代动力学的劣势, 限制了其体内应用。

Erastin 发挥作用是通过抑制 System X_c⁻, 造成半胱氨酸饥饿, GSH 耗竭和 GPX4 失活。但是 erastin 水溶性差且在代谢上不稳定, 不适于体内应用, 因此研究者开发了其类似物哌嗪-erastin 和咪唑酮 erastin (imidazole ketone erastin, IKE), 在动物模型中取得较好效果。2013 年研究者^[46]报道, 使用多激酶抑制剂索拉非尼可使肝细胞癌发生铁依赖性细胞死亡。索拉非尼会抑制 System X_c⁻ 的功能, 诱发内质网应激和铁死亡。2020 年研究者^[47]报道了抗炎药物柳氮磺吡

啉(sulfasalazine, SAS)可诱导铁死亡,其作用方式与erastin类似,但是效力要弱很多。磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)、谷氨酸盐、干扰素 γ (interferon- γ , IFN- γ)等通过抑制或下调System X_c^- 诱导铁死亡。丁硫氨酸硫酸亚胺(buthionine sulfoximine, BSO)通过抑制谷氨酸-半胱氨酸连接酶,直接抑制GSH合成,从而诱导铁死亡。

但并不是所有的细胞的生存和增殖都依赖System X_c^- 。在一些肿瘤细胞中,胱氨酸可通过转硫途径由甲硫氨酸旁路合成。因此在这种情况下,单纯抑制System X_c^- 不足以诱导铁死亡。

他汀类药物(氟伐他汀、洛伐他汀酸、辛伐他汀等)通过减少甲羟戊酸途径中异戊烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP)产生,减少硒蛋白和CoQ10生物合成,从而促进间质型细胞发生铁死亡^[48]。Brequinar是一种喹啉羧酸衍生物,最初开发用作抗癌药物,它可抑制DHODH诱导铁死亡^[36]。FSP1为铁死亡抑制基因,FSP1 inhibitor(iFSP1)抑制FSP1,与RSL3协同诱导铁死亡^[25]。甲氨蝶呤抑制DHFR,协同抑制GPX4从而诱导铁死亡^[35]。青蒿素类如蒿甲醚、青蒿琥酯、双氢青蒿素会影响许多通路进而影响铁死亡。2015年有研究^[49]报道了青蒿琥酯在Kirsten鼠类肉瘤(Kirsten rat sarcoma, KRAS)转换的胰腺导管腺癌细胞中诱导铁死亡;2019年有报道^[9]发现,双氢青蒿素通过促进铁蛋白吞噬、增加游离铁促进铁死亡,且证实在治疗急性髓系白血病中可发挥作用。纳米材料也为铁死亡诱导剂的研究提供了新的可能。

4.2 抑制剂

铁死亡的抑制剂主要从阻断铁依赖性脂质过氧化出发,如RTA、铁螯合剂等广泛性抑制剂。通过高通量筛选,2012年研究者^[3]报道了化合物Ferrostatin-1是铁死亡的有效抑制剂,可抑制erastin和RSL3诱导的铁死亡。2014年人们发现Liprostatin-1可抑制GPX4^{-/-}细胞中ROS的产生^[50]。它没有蛋白靶标,通过抑制脂质过氧化水平防止铁死亡。维生素E、 α -生育酚可阻断脂质过氧化的发展阶段。氧化多不饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸可阻断脂质过氧化。靶向性抑制ACSL4和膜电子转运蛋白POR也可抑制铁死亡。ACSL4和LPCAT3参与把PUFA并入细胞膜的过程。

ACSL4可使细胞膜富含长链多不饱和 ω 6脂肪酸,抑制ACSL4可抑制铁死亡^[22]。脂氧合酶抑制剂(如黄芩素)可阻断脂氧合酶诱导的脂质过氧化抑制铁死亡^[47]。

5 铁死亡在肝脏疾病治疗中的研究

多种器官损伤和退行性疾病与铁死亡相关。铁死亡调控在治疗耐药性肿瘤、缺血性器官损伤、广泛脂质过氧化相关的退行性疾病方面具有巨大潜力。

5.1 铁死亡将成为肝脏肿瘤治疗新靶点

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种多基因参与、多因素介导、病理机制复杂的恶性肿瘤,铁死亡治疗肝细胞癌是一个新的研究方向。生物信息学分析^[51]发现使用铁死亡相关基因构建的模型可有效区分肝细胞癌患者和健康对照,且高风险组预后更差。高铁饮食会增加HCC患病风险。Erastin诱导铁死亡可抑制HCC增殖和进展^[51]。HCC治疗药物索拉非尼可抑制SLC7A11促进肝癌细胞铁死亡。IFN- γ 通过酪氨酸蛋白激酶/信号转导子和转录激活子(Janus kinase/signal transducer and activator of transcription, JAK/STAT)信号通路抑制System X_c^- ,使HCC对铁死亡敏感^[52]。

5.2 阻断铁死亡可减轻缺血再灌注损伤

临床样本分析^[53]显示:在肝切除术中,门静脉阻断的患者与未阻断的患者相比,其肝组织中GPX4的降低和铁载量的增加更显著。铁蛋白水平是铁载量的反映。在肝移植中,儿童活体肝移植供体的高血清铁蛋白是肝移植后肝损伤的独立危险因素;同时,动物模型验证了铁螯合剂可减轻缺血再灌注损伤,高铁饮食则会加重^[54],这提示铁过载是临床中缺血再灌注损伤的危险因素,铁死亡是其中重要的程序性细胞死亡方式。另有研究^[55]表明,再灌注30 min时铁死亡相关蛋白变化最为显著。阻断铁死亡可以减轻缺血再灌注损伤^[55-56]。调节脂质合成的ACSL4可调节铁死亡相关的再灌注损伤^[55]。体外实验^[53]发现肝巨噬细胞参与缺血再灌注损伤的铁死亡过程,巨噬细胞共培养通过下调GPX4和铁蛋白重链1进而导致铁死亡。

5.3 肝炎、肝纤维化、肝硬化中的铁死亡性损伤

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 可表现为脂肪变性、脂肪肝炎、纤维化,甚至可进展到肝硬化和肝细胞癌。在乙醇灌胃的小鼠模型中,脂素1过表达加剧铁积累,同时GSH和GAPDH减少,促进铁死亡性肝损伤^[57]。非酒精性脂肪肝病 (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是包括从单纯的肝脂肪变性到非酒精性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 的一系列疾病,由脂肪酸过载造成的肝细胞损伤引起。在NASH患者中观察到磷脂酰胆碱和氧化磷脂酰乙醇胺比例降低^[58],脂质过氧化的次级产物丙二醛、4-羟基酮可作为氧化应激的标志物^[59]。但铁死亡在NAFLD中的具体作用不明确。此外,铁死亡还会影响免疫细胞的数量和功能。发生铁死亡的细胞也可被免疫细胞识别,诱发一系列炎症反应^[60]。

肝硬化患者血清转铁蛋白水平降低,铁和脂质过氧化水平较对照组明显升高。在动物模型中,使用铁死亡抑制剂可在 *Trf* 敲除小鼠中逆转用高铁饮食或四氯化碳诱导的肝纤维化损伤^[61]。Erastin、索拉非尼、BSO可以诱导肝星状细胞发生铁死亡,减缓肝纤维化的进展^[62]。

5.4 调控铁死亡治疗代谢性肝病

铁死亡与肝脏遗传代谢性疾病关系的系统性研究较少,目前研究者报道血色病 (haemochromatosis) 和尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease, NPD) 与铁死亡有关。

铁死亡在血色病等铁过载性肝脏疾病中发挥作用。血色病是一种遗传性疾病,由基因突变造成铁吸收障碍,表现为各个器官的实质细胞出现铁累积。研究者^[63]发现在血色病小鼠模型中单纯敲除 *Slc7a11*^{-/-} 并不足以导致铁死亡,但铁过载会诱导 *Slc7a11*^{-/-} 细胞发生铁死亡。还有研究^[64]发现,在血色病中,铁过

载伴随成纤维细胞生长因子21 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 水平上调,反过来保护肝细胞免受线粒体损伤、肝纤维化。这可能为治疗铁过载性肝病提供有效治疗策略。

NPD由于遗传性的神经鞘磷脂酶缺乏造成溶酶体功能异常,导致鞘磷脂在包括肝脏在内的多个器官系统中积累。NPD C型 (NPD type C, NPC) 患者的成纤维细胞中ROS和脂质过氧化水平较正常对照明显升高^[65],患者血清中氧化应激相关标志物上升^[66],CoQ10减少^[67]。抑制铁死亡相关损伤也许会为NPD的治疗提供新思路。

6 总结与展望

铁死亡是重要的细胞死亡形式,近几年相关研究得到迅速发展。但铁死亡在分子机制探索和临床转化方面还存在很多未解决的问题。例如,目前尚不能明确区分凋亡、坏死、自噬等其他细胞死亡形式和铁死亡的分子转换机制。针对该领域的深入研究,有望为人们理解相关疾病发病机制提供新的视野,并为临床利用铁死亡调控治疗相关疾病提供潜在思路。

利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

作者贡献/Authors' Contributions

陈晨、程卓安参与了论文的写作,王存、夏强参与了修改。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

The manuscript was drafted by CHEN Chen and CHENG Zhuoan, and revised by WANG Cun and XIA Qiang. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

• Received: 2022-07-12

• Accepted: 2022-12-16

• Published online: 2023-03-28

参·考·文·献

- [1] DOLMA S, LESSNICK S L, HAHN W C, et al. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells[J]. Cancer Cell, 2003, 3(3): 285-296.
- [2] YANG W S, STOCKWELL B R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells[J]. Chem Biol,

2008, 15(3): 234-245.

- [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): 1060-1072.
- [4] XIE Y, HOU W, SONG X, et al. Ferroptosis: process and function[J]. Cell Death Differ, 2016, 23(3): 369-379.
- [5] HENTZE M W, MUCKENTHALER M U, GALY B, et al. Two to

- tango: regulation of mammalian iron metabolism[J]. *Cell*, 2010, 142(1): 24-38.
- [6] NEMETH E, TUTTLE M S, POWELSON J, et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization[J]. *Science*, 2004, 306(5704): 2090-2093.
 - [7] ALVAREZ S W, SVIDERSKIY V O, TERZI E M, et al. NFS1 undergoes positive selection in lung tumours and protects cells from ferroptosis[J]. *Nature*, 2017, 551(7682): 639-643.
 - [8] TERZI E M, SVIDERSKIY V O, ALVAREZ S W, et al. Iron-sulfur cluster deficiency can be sensed by IRP2 and regulates iron homeostasis and sensitivity to ferroptosis independent of IRP1 and FBXL5[J]. *Sci Adv*, 2021, 7(22): eabg4302.
 - [9] DU J, WANG T, LI Y, et al. DHA inhibits proliferation and induces ferroptosis of leukemia cells through autophagy dependent degradation of ferritin[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 131: 356-369.
 - [10] MA S, HENSON E S, CHEN Y, et al. Ferroptosis is induced following siramesine and lapatinib treatment of breast cancer cells[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(7): e2307.
 - [11] BROWN C W, AMANTE J J, CHHOY P, et al. Prominin2 drives ferroptosis resistance by stimulating iron export[J]. *Dev Cell*, 2019, 51(5): 575-586. e4.
 - [12] YANG W H, HUANG Z Q, WU J L, et al. A TAZ-ANGPTL4-NOX2 axis regulates ferroptotic cell death and chemoresistance in epithelial ovarian cancer[J]. *Mol Cancer Res*, 2020, 18(1): 79-90.
 - [13] CHEN X, XU S, ZHAO C, et al. Role of TLR4/NADPH oxidase 4 pathway in promoting cell death through autophagy and ferroptosis during heart failure[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(1): 37-43.
 - [14] YANG W H, DING C C, SUN T, et al. The hippo pathway effector TAZ regulates ferroptosis in renal cell carcinoma[J]. *Cell Rep*, 2019, 28(10): 2501-2508. e4.
 - [15] XIE Y, ZHU S, SONG X, et al. The tumor suppressor p53 limits ferroptosis by blocking DPP4 activity[J]. *Cell Rep*, 2017, 20(7): 1692-1704.
 - [16] MURI J, KOPF M. Redox regulation of immunometabolism[J]. *Nat Rev Immunol*, 2021, 21(6): 363-381.
 - [17] ZOU Y L, LI H X, GRAHAM E T, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis[J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(3): 302-309.
 - [18] SUZUKI T, MOTOHASHI H, YAMAMOTO M. Toward clinical application of the Keap1-Nrf2 pathway[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2013, 34(6): 340-346.
 - [19] CONRAD M, PRATT D A. The chemical basis of ferroptosis[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(12): 1137-1147.
 - [20] KAGAN V E, MAO G W, QU F, et al. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 81-90.
 - [21] DIXON S J, WINTER G E, MUSAVI L S, et al. Human haploid cell genetics reveals roles for lipid metabolism genes in nonapoptotic cell death[J]. *ACS Chem Biol*, 2015, 10(7): 1604-1609.
 - [22] DOLL S, PRONETH B, TYURINA Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91-98.
 - [23] LAGROST L, MASSON D. The expanding role of lysophosphatidylcholine acyltransferase-3 (LPCAT3), a phospholipid remodeling enzyme, in health and disease[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2022, 33(3): 193-198.
 - [24] BERSUKER K, HENDRICKS J M, LI Z P, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 688-692.
 - [25] DOLL S, FREITAS F P, SHAH R, et al. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor[J]. *Nature*, 2019, 575(7784): 693-698.
 - [26] KUHN H, BANTHIYA S, VAN LEYEN K. Mammalian lipoxygenases and their biological relevance[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851(4): 308-330.
 - [27] KRAFT V A N, BEZJIAN C T, PFEIFFER S, et al. GTP cyclohydrolase 1/tetrahydrobiopterin counteract ferroptosis through lipid remodeling[J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6(1): 41-53.
 - [28] GAO M, MONIAN P, QUADRI N, et al. Glutaminolysis and transferrin regulate ferroptosis[J]. *Mol Cell*, 2015, 59(2): 298-308.
 - [29] LEE H, ZANDKARIMI F, ZHANG Y L, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis[J]. *Nat Cell Biol*, 2020, 22(2): 225-234.
 - [30] SHIN D, LEE J, YOU J H, et al. Dihydrolipoamide dehydrogenase regulates cystine deprivation-induced ferroptosis in head and neck cancer[J]. *Redox Biol*, 2020, 30: 101418.
 - [31] URSINI F, MAIORINO M, VALENTE M, et al. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1982, 710(2): 197-211.
 - [32] URSINI F, MAIORINO M, GREGOLIN C. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase[J]. *Int J Tissue React*, 1986, 8(2): 99-103.
 - [33] ALIM I, CAULFIELD JT, CHEN Y, et al. Selenium drives a transcriptional adaptive program to block ferroptosis and treat stroke[J]. *Cell*, 2019, 177(5): 1262-1279. e25.
 - [34] VENKATESH D, O'BRIEN N A, ZANDKARIMI F, et al. MDM2 and MDMX promote ferroptosis by PPAR α -mediated lipid remodeling[J]. *Genes Dev*, 2020, 34(7/8): 526-543.
 - [35] SOULA M, WEBER R A, ZILKA O, et al. Metabolic determinants of cancer cell sensitivity to canonical ferroptosis inducers[J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(12): 1351-1360.
 - [36] MAO C, LIU X G, ZHANG Y L, et al. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer[J]. *Nature*, 2021, 593(7860): 586-590.
 - [37] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Broadening horizons: the role of ferroptosis in cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2021, 18(5): 280-296.
 - [38] JIANG L, KON N, LI T Y, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression[J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57-62.
 - [39] CHEN D, FAN Z, RAUH M, et al. ATF4 promotes angiogenesis and neuronal cell death and confers ferroptosis in a xCT-dependent manner[J]. *Oncogene*, 2017, 36(40): 5593-5608.
 - [40] WU J, MINIKES A M, GAO M H, et al. Intercellular interaction dictates cancer cell ferroptosis via NF2-YAP signalling[J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 402-406.
 - [41] GAO R Z, KALATHUR R K R, COTO-LLERENA M, et al. YAP/TAZ and ATF4 drive resistance to Sorafenib in hepatocellular carcinoma by preventing ferroptosis[J]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13(12): e14351.
 - [42] SINGHAL R, MITTA S R, DAS N K, et al. HIF-2 α activation potentiates oxidative cell death in colorectal cancers by increasing cellular iron[J]. *J Clin Invest*, 2021, 131(12): e143691.
 - [43] HANGAUER M J, VISWANATHAN V S, RYAN M J, et al. Drug-tolerant persister cancer cells are vulnerable to GPX4 inhibition[J]. *Nature*, 2017, 551(7679): 247-250.
 - [44] YANG W S, SRIRAMARATNAM R, WELSCH M E, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4[J]. *Cell*, 2014, 156(1/2): 317-331.
 - [45] GASCHLER M M, ANDIA A A, LIU H R, et al. FINO₂ initiates ferroptosis through GPX4 inactivation and iron oxidation[J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(5): 507-515.
 - [46] LOUANDRE C, EZZOUKHRY Z, GODIN C, et al. Iron-dependent cell death of hepatocellular carcinoma cells exposed to sorafenib[J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(7): 1732-1742.
 - [47] HADIAN K, STOCKWELL B R. SnapShot: ferroptosis[J]. *Cell*, 2020, 181(5): 1188-1188. e1.
 - [48] VISWANATHAN V S, RYAN M J, DHRUV H D, et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway[J]. *Nature*, 2017, 547(7664): 453-457.
 - [49] ELING N, REUTER L, HAZIN J, et al. Identification of artesunate as a specific activator of ferroptosis in pancreatic cancer cells[J]. *Oncoscience*, 2015, 2(5): 517-532.

- [50] ANGELI J P F, SCHNEIDER M, PRONETH B, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice[J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16(12): 1180-1191.
- [51] TANG B F, ZHU J Y, LI J, et al. The ferroptosis and iron-metabolism signature robustly predicts clinical diagnosis, prognosis and immune microenvironment for hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Commun Signal*, 2020, 18(1): 174.
- [52] KONG R, WANG N, HAN W, et al. IFN γ -mediated repression of system xc⁻ drives vulnerability to induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2021, 110(2): 301-314.
- [53] WU S, YANG J, SUN G L, et al. Macrophage extracellular traps aggravate iron overload-related liver ischaemia/reperfusion injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(18): 3783-3796.
- [54] YAMADA N, KARASAWA T, WAKIYA T, et al. Iron overload as a risk factor for hepatic ischemia-reperfusion injury in liver transplantation: potential role of ferroptosis[J]. *Am J Transplant*, 2020, 20(6): 1606-1618.
- [55] LI Y, FENG D C, WANG Z Y, et al. Ischemia-induced ACSL4 activation contributes to ferroptosis-mediated tissue injury in intestinal ischemia/reperfusion[J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26(11): 2284-2299.
- [56] FANG X X, WANG H, HAN D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(7): 2672-2680.
- [57] ZHOU Z, YE T J, BONAVIDA G, et al. Adipose-specific lipin-1 overexpression renders hepatic ferroptosis and exacerbates alcoholic steatohepatitis in mice[J]. *Hepatol Commun*, 2019, 3(5): 656-669.
- [58] LI Z Y, AGELLON L B, ALLEN T M, et al. The ratio of phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine influences membrane integrity and steatohepatitis[J]. *Cell Metab*, 2006, 3(5): 321-331.
- [59] NELSON J E, WILSON L, BRUNT E M, et al. Relationship between the pattern of hepatic iron deposition and histological severity in nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2011, 53(2): 448-457.
- [60] CHEN X, KANG R, KROEMER G, et al. Ferroptosis in infection, inflammation, and immunity[J]. *J Exp Med*, 2021, 218(6): e20210518.
- [61] YU Y, JIANG L, WANG H, et al. Hepatic transferrin plays a role in systemic iron homeostasis and liver ferroptosis[J]. *Blood*, 2020, 136(6): 726-739.
- [62] ZHANG Z L, YAO Z, WANG L, et al. Activation of ferritinophagy is required for the RNA-binding protein ELAVL1/HuR to regulate ferroptosis in hepatic stellate cells[J]. *Autophagy*, 2018, 14(12): 2083-2103.
- [63] WANG H, AN P, XIE E J, et al. Characterization of ferroptosis in murine models of hemochromatosis[J]. *Hepatology*, 2017, 66(2): 449-465.
- [64] WU A M, FENG B, YU J, et al. Fibroblast growth factor 21 attenuates iron overload-induced liver injury and fibrosis by inhibiting ferroptosis[J]. *Redox Biol*, 2021, 46: 102131.
- [65] ZAMPIERI S, MELLON S H, BUTTERS T D, et al. Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(9b): 3786-3796.
- [66] VÁZQUEZ M C, BALBOA E, ALVAREZ A R, et al. Oxidative stress: a pathogenic mechanism for Niemann-Pick type C disease[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 205713.
- [67] FU R, YANJANIN NM, BIANCONI S, et al. Oxidative stress in Niemann-Pick disease, type C[J]. *Mol Genet Metab*, 2010, 101(2/3): 214-218.

[本文编辑] 张慧俊

