

铁死亡：一种新的细胞死亡方式*

关鹏¹⁾ 石振华¹⁾ 李亚青¹⁾ 王娜^{1,2)**}

(¹⁾河北师范大学生命科学院分子铁代谢研究室, 石家庄 050024; (²⁾河北医科大学基础课部, 石家庄 050091)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00499

死亡不仅是所有细胞的最终命运, 而且它与细胞分裂、增殖一样, 在整个机体的生长、发育中具有不可替代的作用. 目前认为, 除了坏死外, 细胞死亡形式分为程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD), 包括凋亡(apoptosis)和自噬(autophagy), 及非程序性细胞死亡(non-programmed cell death, NPCD), 包括副凋亡(paraptosis)、细胞有丝分裂灾难(mitotic catastrophe)和胀亡(oncosis)等. 2012年, Dixon等^[1]新提出了一种叫做铁死亡(ferroptosis)的铁依赖性的细胞死亡形式, 该死亡方式受细胞内信号通路的严密调节(图1).

氧运送等过程中起着重要的作用. 按每公斤体重含元素铁计算: 正常男性成人约 50 mg, 女性成人约 35 mg, 小儿 30~60 mg, 足月新生儿 60~70 mg^[2]. 研究发现, 铁参与了 ferroptosis 的发生^[1]. 现就 ferroptosis 的特点与作用调节机制综述如下.

1 Ferroptosis 的提出

Ferroptosis 是研究小分子 erastin 杀死含有致癌基因 RAS 突变的肿瘤细胞的作用机制时被发现的. RAS 是最常见的癌基因, 它所编码的 RAS 蛋白是一种小 G 蛋白, 其活性依赖与 GTP 的结合, 突变的 RAS 蛋白丧失了水解 GTP 的活性, 从而激活 RAS 通路下游相关基因, 导致细胞癌变^[3]. RAS 突变的肿瘤细胞能够通过上调转铁蛋白受体 1 和下调转铁蛋白的作用增加细胞内的铁含量. 用这个小分子处理表达有 RAS 的细胞, 导致细胞通过一个“氧化性的、非凋亡的”机制死亡^[4].

作为一种抗肿瘤药物, erastin 能够与线粒体外膜的电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channels, VDACs)结合, 通过关闭 VDAC2/3 间接诱导 ROS 的产生. Ferroptosis 的发生需要铁依赖的活性氧的产生, 却不需要 caspase、ATP 耗竭、产生线粒体活性氧(reactive oxygen species, ROS)、调节线粒体外膜通透性的 Bax/Bak 以及细胞内增高的钙离子浓度^[5]. 铁离子螯合剂能抑制 erastin 诱导的癌细胞死亡, 表明铁离子在诱导细胞

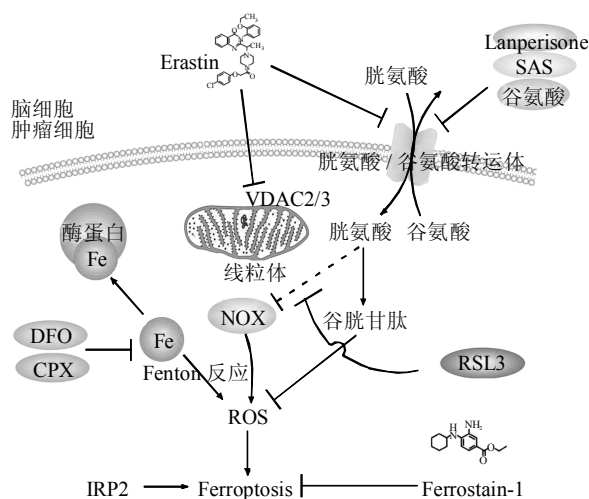


Fig. 1 Cartoon depicting the mechanism and regulation of ferroptosis

图1 Ferroptosis 的发生机制及调节

铁是人体内含量最高的微量元素, 广泛分布在人体的各器官组织, 在 DNA 的合成、电子传递、

* 国家自然科学基金资助项目(31200863, 31271146).

** 通讯联系人.

Tel: 0311-80787579, E-mail: iiiif@163.com

收稿日期: 2012-10-16, 接受日期: 2013-01-09

死亡过程中发挥了重要作用. 2012年, Dixon等^[1]在大量研究的基础上认识到这种细胞死亡方式是一种不同于凋亡、坏死和自噬的新方式, 并将这种铁依赖的死亡方式命名为“ferroptosis”.

2 Ferroptosis 的特点

对 ferroptosis 的研究仅处于开始阶段, 目前发现这一过程与凋亡、坏死和自噬在形态学、生物化学和遗传学等方面均有差异. 凋亡典型的特征包括细胞皱缩、核浓缩、染色质边集、DNA降解、膜起泡、核和胞浆断裂成凋亡小体, 后被邻近的细胞吞噬和降解^[6]. 坏死的形态学特征是细胞和细胞器肿胀、膜破裂、核染色体溶解而不是固缩, 线粒体受损, 随后细胞溶解. 坏死的发生不需要能量, 在能量存在时诱发凋亡的刺激会因为细胞内 ATP 水平的严重下降、能量缺乏而导致坏死的发生^[7]. 自噬典型的特征为细胞内出现大量泡状结构, 即双层膜结构的自吞噬泡, 吞噬泡内为胞质及细胞器. 高尔基器、核糖体、内质网等均先于核的改变而被降解, 但细胞骨架成分却大部分保存^[8]. Ferroptosis 典型的特征为线粒体变小, 但双层膜的密度增加, 同时表现为细胞质以及脂质活性氧自由基增多.

3 Ferroptosis 的发生

Ferroptosis 的发生与已知的谷氨酸的毒性发生有类似的机制, 并且这两个过程都是铁和 ROS 依赖的. 兴奋性毒性是神经元死亡的一种形式, 谷氨酸等兴奋性氨基酸导致 NMDA 钙通道打开, 引起随后的细胞质内钙增加和死亡^[9]. 钙螯合剂 BAPTA-AM、Fura-2 或 EGTA 均对 erastin 引起的细胞死亡没有影响作用, 表明钙内流在 ferroptosis 的发生过程中不起作用. 谷氨酸除通过激活谷氨酸受体产生兴奋性神经毒性外, 还可通过抑制细胞膜上胱氨酸 / 谷氨酸反向转运体的功能产生细胞毒性作用, 该作用以细胞内谷胱甘肽耗竭和活性氧成分升高为主要特征, 被称为谷氨酸的氧化毒性^[10]. 细胞内谷胱甘肽的减少可抑制 H₂O₂ 对磷酸戊糖途径的促进作用, 使 NADPH 合成减少, 增加活性氧成分对细胞的毒性作用^[11]. Orrenius 等^[12]认为谷氨酸的氧化毒性可能与未知的某些死亡类型部分同时发生. 我们推测这种死亡类型就是 ferroptosis, 并且 ferroptosis 是细胞发生谷氨酸氧化毒性的结果.

Dixon 等^[1]用 erastin 孵育 N-RAS 基因突变的人纤维肉瘤细胞系 HT-1080 细胞, 研究发现, 细胞

的 ROS 和死亡率增加, 同时加入去铁胺 (deferoxamine, DFO) 共孵育降低了细胞 ROS 聚集和细胞死亡, 而加入柠檬酸铁胺、柠檬酸铁或氯化铁共孵育均能增加 ROS 的产生以及细胞的死亡率. 胱氨酸 / 谷氨酸转运体是由二硫键连接的异二聚体复合物, 包含 SLC7A11 和 SLC3A2L 两个亚单位. 通过分析 60 个人癌细胞系, Huang 等^[13]发现 SLC7A11 的表达与 SLC3A2L 的表达呈正相关, 同时与 SLC7A5 的表达正相关. SLC7A5 是一个与 SLC7A11 类似的亚单元, 也能够与激活胱氨酸 / 谷氨酸转运体 SLC3A2L 结合, 组成负责较大中性氨基酸运输的氨基酸转运体^[14]. Dixon 等^[1]发现抑制氨基酸转运体的亚单元 SLC7A11 能够加速 erastin 引起的细胞死亡, 而 SLC7A11 过表达能够抑制 erastin 引起的细胞死亡. SLC7A11 调节的胱氨酸摄取是生物体合成谷胱甘肽的限速步骤^[15]. Erastin 可以与 SLC7A5 结合, 这一结合可能抑制了 SLC7A11, 进而影响胱氨酸 / 谷氨酸转运体负责的胱氨酸转运. Yagoda 等^[16]发现, erastin 会引起线粒体功能障碍, 并且 erastin 的作用位点 VDAC 位于线粒体上, 因此线粒体的电子传递链可能是诱导 ferroptosis 发生 ROS 的重要来源. 然而 Dixon 等^[1]的研究证明, 在 erastin 处理的细胞中, 线粒体的电子传递链不是致命的 ROS 的来源. 他们发现用 erastin 处理 HT-1080 细胞并不能增加线粒体 ROS 的产生, 用鱼藤酮阻断线粒体电子传递链引起线粒体 ROS 以对 DFO 不敏感的形式增加. 另外, 尽管 KRAS 突变的人骨肉瘤细胞系 143B 细胞由于缺失线粒体 DNA 基因不能产生电子传递链依赖的 ROS, 该细胞对 erastin 和 RLS3 的敏感程度与野生型的 143B 细胞相当. RAS 表达的细胞能够通过 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidases, NOX) 产生大量的 ROS, Dixon 等在排除了电子传递链之后, 继而研究了 NOX 是否是致命 ROS 的来源. 研究发现, NOX 的各种抑制剂均能抑制 erastin 诱导 ferroptosis 的发生. 综上所述, Ferroptosis 的作用机制可能与谷氨酸的氧化毒性类似, erastin、柳氮磺胺吡啶 (sulfasalazine, SAS) 等药物通过胱氨酸 / 谷氨酸转运体抑制胱氨酸的吸收, 从而破坏了细胞内氧化还原平衡的调节并且最终形成依赖于铁离子的氧化性死亡^[1].

抑制胱氨酸 / 谷氨酸反向转运体不仅会影响胱氨酸依赖的谷胱甘肽合成, 还会抑制胱氨酸的跨膜穿梭, 这两种作用都会损坏细胞的抗氧化系统, 增

加 ROS 的积累. Erastin 抑制该转运体一定会导致 RAS 突变肿瘤细胞以 ferroptosis 的方式死亡, 然而抑制该转运体对 ferroptosis 来说却不是必需的. RSL3 是筛选致死 RAS 突变细胞药物时与 erastin 一同发现的复合物^[16], 该药物并不抑制胱氨酸的摄取, 却可以引起铁和 ROS 依赖的 ferroptosis. RSL3 可能调节着位于胱氨酸 / 谷氨酸转运体下游或与之平行的作用位点的活性. Lanperisone 原本在临床上用作肌肉松弛剂^[17], Shaw 等^[18]发现该药物还具有致死 RAS 细胞的作用, 同样可以通过抑制胱氨酸摄取或其他信号发生 ferroptosis.

4 Ferrotosis 的调节

Ferrotosis 是铁依赖的细胞死亡, 铁螯合剂 DFO、CPX 等均会降低这一死亡形式的发生. 铁是许多重要酶的辅基, 因此铁螯合剂可能通过影响某些重要的含铁酶的活性抑制了 ferroptosis 的发生. 另外, 诸多研究表明铁与氧化应激关系密切. 铁离子如果不能以适当方式与蛋白质或其他配体结合, 其可以通过 H₂O₂ 依赖的 Fenton 反应催化形成具有代谢毒性的 ROS, 攻击生物大分子, 从而引起细胞的死亡. 然而, 铁在细胞发生 ferroptosis 时的作用不仅限于此, 因为 fenton 反应也可以引起其他形式的死亡——凋亡^[19]或坏死^[20], 详细的机制有待进一步研究. Dixon 等^[1]发现 DFO 能够在 HT-1080 人纤维肉瘤细胞系、BJeLR 人包皮成纤维细胞系、Calu-1 人肺癌细胞系和小鼠胚胎成纤维细胞抑制 erastin 引起的 ferroptosis, CPX 能够在培养的海马器官型脑片抑制谷氨酸引起的细胞死亡. Yu 等^[21]应用谷氨酸转运体抑制剂苏 - 羟天冬氨酸 (threo-hydroxyaspartate, THA) 诱导的脊髓体外器官型培养谷氨酸兴奋性毒性模型, 发现转铁蛋白受体和二价金属离子转运体蛋白表达升高, 铁蛋白表达降低, 组织内总铁含量增加, 氧化应激水平升高, 运动神经元数目减少. 给予铁螯合剂 DFO 可以有效阻止谷氨酸导致的氧化应激, 保护运动神经元.

筛选线粒体 shRNA 库发现, 铁调节蛋白 2 (iron regulator protein 2, IRP2) 可以促进 erastin 引起的 ferroptosis. 铁调节蛋白 (iron regulator protein, IRP) 是位于细胞质中的反式作用因子, 能在细胞内铁浓度发生改变时, 通过与铁蛋白、转铁蛋白受体等铁转运相关蛋白的 mRNA 上顺式作用元件——铁反应元件 (iron response element, IRE) 结合来调控细胞内这些蛋白质的翻译. 在铁缺乏的

状态下, IRP2 蛋白开始合成并保持稳定^[22]; 在高铁细胞中, IRP2 发生降解^[23]. IRP2 可以通过降低转铁蛋白受体的表达降低铁摄取, 通过引起铁蛋白的表达捕捉自由的二价铁增加铁储存^[24-25]. Dixon 等用 IRP2 特异的 shRNA 转染 HT-1080 细胞, 3 天后发现铁蛋白重链和铁蛋白轻链的 mRNA 均有显著的增高, 而用 shRNA 干扰 IRP2 的拮抗剂 FBXL5 则会显著增加转铁蛋白受体的 mRNA, 用 shRNA 干扰转铁蛋白受体的表达会降低 erastin 引起的细胞死亡. 上述研究表明细胞内的不稳定铁池 (labile iron pool, LIP) 影响着细胞对 erastin 的敏感性.

Ferrostatin-1 (Fer-1) 是合成的一个分子质量为 262u 的小分子物质, 能够特异地抑制 RAS 致死的细胞死亡方式 ferroptosis, 但对其他的氧化致死物质或凋亡信号引起的细胞死亡没有抑制作用. 研究发现, Fer-1 能够抑制 erastin 引起的肿瘤细胞的死亡, 并且能够抑制谷氨酸在培养的海马器官型脑片引起细胞毒性. 由此, 我们进一步确认 erastin 引起的癌细胞死亡和谷氨酸引起的海马神经细胞的死亡机制相同, 即 ferroptosis, 这一死亡方式可以被铁螯合剂和 Fer-1 所抑制. Fer-1 对 ferroptosis 的抑制作用主要是通过抗氧化作用清除 ROS 实现的, 但在这一过程中 Fer-1 既不抑制 MEK/ERK 信号途径也不影响蛋白质的合成. 研究发现, 破坏 Fer-1 结构上任何一个芳香胺均能影响 Fer-1 的抗氧化性和对 ferroptosis 的抑制作用, 表明这两个芳香胺结构对 Fer-1 来说至关重要.

5 展 望

Ferrotosis 涉及一系列复杂的生化反应, 涉及不同基因的表达、调控和信号传导系统. Erastin、RSL3、Lanperisone、SAS、谷氨酸等都能诱导肿瘤细胞或脑细胞发生 ferroptosis, 这种细胞死亡方式与 RAS 肿瘤细胞的死亡和神经退行性疾病的发生有密切关系, 因此进一步深入研究 ferroptosis 通路的生化机制, 探讨其在不同疾病模型中的作用, 对相关疾病治疗靶点的确证以及治疗药物的研究具有重要意义.

化疗是肿瘤综合治疗手段之一, 多数化疗药物是通过引起肿瘤细胞凋亡起作用的. 然而, 随着化疗时间的延长部分细胞会产生凋亡耐受, 从而导致肿瘤耐药的形成. Ferroptosis 的发现为我们提供了想象的空间, 能否诱导细胞发生该类型的死亡定向

清除 RAS 突变肿瘤细胞呢? SAS 是由国家食品药品监督管理局批准的国药准字药品, 有柳氮磺吡啶片、柳氮磺吡啶胶囊和柳氮磺吡啶栓等产品, 临床上用作治疗溃疡性结肠炎和风湿性关节炎. 由于 SAS 同时也是 ferroptosis 的诱导物, 因此对使用 SAS 药物的 RAS 突变肿瘤患者的调查或许可以解开我们的疑问. 如果有效, 将 ferroptosis 作为 RAS 突变肿瘤的新靶点, 有可能为克服其耐药提供一种新的治疗途径.

铁在脑损伤和神经退行疾病发生时参与细胞死亡的现象很早之前就被人们注意到了. 帕金森病和阿尔茨海默症患者的脑内均发现了铁的沉积, 铁螯合剂对 6-OHDA、MPP⁺ 或 A β 引起的神经毒性模型可以起到保护作用. 明确 ferroptosis 是否存在于各种神经退行性疾病中, 可以通过药物调控神经细胞的 ferroptosis, 从而控制这类神经系统疾病的发生与发展.

参 考 文 献

- [1] Dixon S J, Lemberg K M, Lamprecht M R, *et al.* Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 2012, **149**(5): 1060–1072
- [2] 张美瑜, 廖清奎. 铁在人体内的分布与作用. *国际输血及血液学杂志*, 1988, **11**(2): 109–111
Zhang M Y, Liao Q K. *International Journal of Blood Transfusion and Hematology*, 1988, **11**(2): 109–111
- [3] Fernandez-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*, 2011, **2**(3): 344–358
- [4] Yagoda N, von Rechenberg M, Zaganjor E, *et al.* RAS-RAF-MEK-dependent oxidative cell death involving voltage-dependent anion channels. *Nature*, 2007, **447**(7146): 864–868
- [5] Reed J C, Pellecchia M. Ironing out cell death mechanisms. *Cell*, 2012, **149**(5): 963–965
- [6] Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardio Res*, 2000, **45**(3): 528–537
- [7] Rami A, Kogel D. Apoptosis meets autophagy-like cell death in the ischemic penumbra: Two sides of the same coin?. *Autophagy*, 2008, **4**(4): 422–426
- [8] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, *et al.* Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, **451**(7182): 1069–1075
- [9] Manev H, Favaron M, Guidotti A, *et al.* Delayed increase of Ca²⁺ influx elicited by glutamate: role in neuronal death. *Mol Pharm*, 1989, **36**(1): 106–112
- [10] Sato H, Tamba M, Okuno S, *et al.* Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain. *J Neurosci*, 2002, **22**(18): 8028–8033
- [11] Ben-Yoseph O, Boxer P A, Ross B D. Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *J Neurochem*, 1996, **66**(6): 2329–2337
- [12] Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**(7): 552–565
- [13] Huang Y, Dai Z, Barbacioru C, *et al.* Cystine-glutamate transporter SLC7A11 in cancer chemosensitivity and chemoresistance. *Cancer Research*, 2005, **65**(16): 7446–7454
- [14] Kanai Y, Endou H. Functional properties of multispecific amino acid transporters and their implications to transporter-mediated toxicity. *J Toxic Sci*, 2003, **28**(1): 1–17
- [15] Verrey F, Closs E I, Wagner C A, *et al.* CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflugers Archiv: Europe J Physiol*, 2004, **447**(5): 532–542
- [16] 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. *Cancer Cell*, 2003, **3**(3): 285–296
- [17] Sakitama K, Ozawa Y, Aoto N, *et al.* Effects of a new centrally acting muscle relaxant, NK433 (lanperisone hydrochloride) on spinal reflexes. *Euro J Pharm*, 1997, **337**(2–3): 175–187
- [18] Shaw A T, Winslow M M, Magendanz M, *et al.* Selective killing of K-ras mutant cancer cells by small molecule inducers of oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(21): 8773–8778
- [19] Nakagawa H, Hasumi K, Woo J T, *et al.* Generation of hydrogen peroxide primarily contributes to the induction of Fe(II)-dependent apoptosis in Jurkat cells by (-)-epigallocatechin gallate. *Carcinogenesis*, 2004, **25**(9): 1567–1574
- [20] Yuan W, Guo J, Li X, *et al.* Hydrogen peroxide induces the activation of the phospholipase C-gamma1 survival pathway in PC12 cells: protective role in apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2009, **41**(8): 625–630
- [21] Yu J, Guo Y, Sun M, *et al.* Iron is a potential key mediator of glutamate excitotoxicity in spinal cord motor neurons. *Brain Research*, 2009, **1257**: 102–107
- [22] Henderson B R, Kuhn L C. Differential modulation of the RNA-binding proteins IRP-1 and IRP-2 in response to iron. IRP-2 inactivation requires translation of another protein. *J Biol Chem*, 1995, **270**(35): 20509–20515
- [23] Guo B, Phillips J D, Yu Y, *et al.* Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome. *J Biol Chem*, 1995, **270**(37): 21645–21651
- [24] Schneider B D, Leibold E A. Regulation of mammalian iron homeostasis. *Curr Opin Clin Nutri Metab Care*, 2000, **3**(4): 267–273
- [25] Meyron-Holtz E G, Ghosh M C, Iwai K, *et al.* Genetic ablations of iron regulatory proteins 1 and 2 reveal why iron regulatory protein 2 dominates iron homeostasis. *EMBO J*, 2004, **23**(2): 386–395