



Nrf2 调控的铁死亡途径在非酒精性脂肪性肝病防治中的作用机制*

负志强¹⁾ 姚婷婷¹⁾ 李 涛²⁾ 衣雪洁^{1,3)**}

(¹⁾ 沈阳体育学院运动人体科学学院, 沈阳 110115; (²⁾ 沈阳体育学院实验室管理中心, 沈阳 110115;

(³⁾ 沈阳体育学院运动与健康研究中心, 沈阳 110115)

摘要 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是发病率很高的慢性肝病类型, 与肥胖、糖尿病、高脂血症等代谢综合征密切相关, 是当前重要的公共健康问题之一。其具体的发病机制尚不清楚。目前有研究认为铁死亡参与了 NAFLD 的发生与发展, 铁死亡是一种新型程序性细胞死亡。核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2) 是调控铁死亡过程中的重要核因子, 对铁死亡过程中抗氧化、铁代谢以及脂质过氧化途径起到调控作用, 并且已被报道可能通过抑制铁死亡改善 NAFLD。本文通过对铁死亡与 NAFLD 的关系研究进行梳理, 探究 Nrf2 调控铁死亡改善 NAFLD 的可能机制。最后, 对存在的问题进行分析并提出未来研究展望。

关键词 Nrf2, 铁死亡, 非酒精性脂肪性肝病

中图分类号 R392.1, R723.14

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0210

随着肥胖的流行, 非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 患病率逐年增加, 目前被认为是全球最普遍的慢性肝病之一^[1-2]。NAFLD 是一种进展性肝病, 最初的特点是单纯的脂肪变性, 进而发展成非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH)、肝纤维化甚至肝细胞癌^[3]。全球约 25% 的成年人患有 NAFLD, 中国 NAFLD 的总体患病率约为 30%^[4]。由于高发病率和潜在的严重危害, NAFLD 已成为重要的公共健康问题之一。但是 NAFLD 的发病机制较为复杂, 目前尚未完全阐明。“二次打击学说”是 NAFLD 发病的经典机制, 目前将胰岛素抵抗引起的肝脏脂肪变性认为是“第一次打击”; 而活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 堆积导致的炎症、内质网应激和氧化应激被认为是“第二次打击”, 氧化应激在其中起着关键作用^[5-7]。巧合的是, 铁死亡的重要特征之一也是脂质过氧化物堆积以及抗氧化酶谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 减少。为此一些学者开始探究铁死亡与 NAFLD 的关系及其作用的机制, 发现

引起铁死亡的多种机制, 也参与了 NAFLD 的发生发展^[3, 8-9]。其中, 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2) 在铁死亡参与 NAFLD 的发展中扮演重要的角色^[9-11], 本文对 Nrf2、铁死亡和 NAFLD 的关系进行梳理, 总结 Nrf2 通过铁死亡调控 NAFLD 的可能机制, 并提出目前研究可能存在的问题, 为防治 NAFLD 提供了新的视野。

1 非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 与铁死亡

2012 年 Dixon 等^[12]首次提出铁死亡是一种新型程序性死亡, 它是指由于铁依赖性的脂质过氧化物堆积而导致的非凋亡形式的细胞死亡。其形态学特征区别于凋亡、坏死和自噬, 主要表现为线粒体

* 国家自然科学基金 (12072202) 和辽宁省教育厅 (LJC2019ST03) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 17742780139, E-mail: yixuejie8387@163.com

收稿日期: 2022-05-07, 接受日期: 2022-10-31

体积减小、膜密度增加、线粒体嵴减少或消失。已有研究表明, 过度的铁死亡与神经退行性疾病^[13]、缺血/再灌注诱导的器官损伤^[14]、心肌梗塞^[15]和NAFLD^[16]有因果关系, 抑制铁死亡可能对这些疾病起到改善效果。另外, 抑制铁死亡有助于抑制多种癌症的发展^[17]。

肝脏是铁储存、脂质代谢的重要器官, 肝细胞中铁代谢异常和脂质过氧化物的过度积累都会引起铁死亡^[18]。2019年日本 Minoru Tanaka 研究小组^[19]首次发现, NASH模型小鼠肝细胞中铁死亡先于其他的细胞死亡。特异性抑制脂质过氧化反应可抑制铁死亡的发生, 减缓肝脏损伤。之后的学者进一步发现, GPX4、铁代谢、脂质过氧化以及一些其他途径参与了肝脏铁死亡的调控, 改善肝脏过度铁死亡可能成为防治NAFLD的重要方法之一。

1.1 NAFLD与铁死亡的GPX4途径

脂质过氧化物堆积以及GPX4减少是铁死亡的主要特征之一^[20-21]。在正常状态下, GPX4可通过其辅因子谷胱甘肽 (glutathione, GSH), 将有毒的脂质氢过氧化物 (L-OOH) 转化为无毒的脂质醇 (L-OH), 从而清除脂质过氧化物^[22]。因此, 抑制GPX4会导致脂质过氧化物积累, 这也是铁死亡的标志之一^[23]。但在NAFLD的不同发展阶段GPX4的变化不尽相同。

近几年的研究显示, 肝脏单纯性脂肪变性不仅有GPX4的表达下降, 同时伴随着铁死亡的发生, 在这时增加GPX4的表达不仅可以负向调节铁死亡, 对NAFLD的发展也可以起到有效的抑制作用^[9]。高脂饮食 (HFD) 的NAFLD模型或棕榈酸/油酸 (PA/OA) 诱导的肝细胞变性模型中均显示GPX4表达降低, 且发生铁死亡^[3]。肝细胞中沉默GPX4后脂质变性加剧, 通过激活胸腺肽 β 4 (thymosin β 4, T β 4) 来增加GPX4表达可抑制铁死亡, 改善NAFLD^[8]。

NAFLD得不到有效的控制, 可进展为危害性更大的NASH, 但是NAFLD如何发展为NASH尚不清楚。不同于NAFLD, 在NASH阶段, GPX4表达量显著升高。对C57BL/6小鼠进行3周蛋氨酸/胆碱缺乏饮食 (MCD) 饮食干预后, 发现小鼠肝脏GPX4表达显著增加, 并伴随着铁死亡, ROS、肝Fe (II) 和总铁增加, 脂质过氧化物合成酶酰基辅酶A合成酶长链家族成员4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 和脂氧合酶 (lipoxygenase, ALOX) 显著增加, 同

时发生NASH^[24]。另一篇使用C57BL/6小鼠通过MCD干预10 d制备小鼠NASH模型, 同样出现了GPX4表达量显著升高和铁死亡加剧的现象^[25]。这提示, GPX4在NASH中升高, 这与单纯性脂肪肝中GPX4下降刚好相反。可以推测, 随着NAFLD病程的加剧, 会出现严重的炎症及脂质过氧化反应, 机体为了保护细胞免受危害会做出应激反应, 这可能是NASH中GPX4表达上升的原因, 但上升的GPX4并不能完全清除过多的脂质过氧化物, 从而发生铁死亡。

然而, 造模时间的不同可能对GPX4在NASH中的功能产生影响。一项研究发现, 对C57BL/6小鼠进行MCD饮食干预4、8、12周, NASH严重程度随着时间的增加而增加, 同时伴有GPX4的持续上升, 不同的是GSH升高和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 持续下降, 提示铁死亡可能受到抑制。这之前研究中铁死亡促进NASH进展相悖。作者认为, 防治NASH的进展中, 铁死亡可能作为一种修复或抵抗调节剂来减轻NASH中的肝损伤。离体实验显示, 对人正常肝细胞 (LO2) 给予高游离脂肪酸 (HFFA) 72 h建造的NASH模型, 在过表达GPX4时, LO2细胞脂质积累增加, 在使用RSL3后脂质积累减轻, 这之前研究结果相反^[26]。推测, 早期NASH中, 增加GPX4表达可抑制铁死亡改善NASH。但这篇文章对C57BL/6小鼠MCD饮食干预4、8、12周显著高于其他研究报道的3周和10 d, 并且离体实验中通过HFFA对LO2细胞进行72 h NASH造模, 也显著高于24 h PA处理的LO2细胞^[8]。长时间的NASH造模可能导致肝炎达到不可逆的程度, 造成脂质堆积持续性增加。并且文章只对离体实验中GPX4表达进行干预, 无法验证在体实验中长时间NASH造模后, 增加GPX4表达是否也发挥脂质沉积的作用。这一结果需要后续研究验证不同造模时间对GPX4与脂质积累的影响。且在NASH模型中, 过表达烯醇化酶3 (ENO3) 会引起GPX4表达增加, 同时脂质积累加重。有学者已证明, ENO3可加速胆固醇酯合成引起肝脏胆固醇酯积累^[27]。提示ENO3可能通过GPX4调控了肝脏的胆固醇合成与积累, 但相关研究尚浅, 还需要进一步的验证。

上述研究结果虽然不尽一致, 但大多结果表明, GPX4下降与铁死亡和NAFLD有关, 升高GPX4能抑制铁死亡, 改善NAFLD。但在不同程度的NASH状态下, 肝细胞GPX4表达增加与铁死

亡和NASH病程的关系结果并不一致,铁死亡在NASH发展中的作用机制还有待进一步的研究。

1.2 NAFLD与铁死亡的铁代谢途径

铁稳态失衡不仅是许多疾病(动脉粥样硬化、心肌病、肾缺血再灌注和神经退行性疾病)的诱发因素之一^[28],也是NAFLD的病因之一^[29]。肝脏是机体铁储存的主要器官,对于维持机体铁稳态十分重要。膳食铁在肠细胞中被血红素加氧酶(hemoxygenase, HO-1)降解,分解为Fe(II)、胆绿素和胆红素。Fe(II)通过细胞膜铁转运蛋白(ferroportin, FPN)转运入血液,通过血液循环维持机体铁稳态。在肝细胞中,血液中的铁通过与肝细胞膜上的转铁蛋白受体1(transferrin receptor 1, TFR1)结合,内吞进入细胞。Fe(III)在酸性环境中从转铁蛋白中释放出来,通过前列腺六跨膜上皮抗原3(six-transmembrane epithelial antigen of the prostate 3, STEAP3)还原为不稳定的高反应性Fe(II),一部分通过二价金属转运蛋白1(divalent metal transporter 1, DMT1)和瞬时受体电位阳离子通道黏脂蛋白1/2(transient receptor potential mucolipin 1/2, TRPML1/2)转运到溶酶体膜中,进入细胞内不稳定铁池(labile iron pool, LIP),另一部分Fe(II)可被铁蛋白吸收。另外,肝细胞还可以通过分泌铁调素负反馈调节FPN阻止铁流出细胞进入血液循环中,以维持机体整体铁稳态。

当机体铁稳态受到破坏时,过量的Fe(II)会

导致铁过载的发生,这不仅是铁死亡的诱发因素之一,也是NAFLD的发病原因之一^[29]。研究人员为证明过量的铁离子在NAFLD中的作用,通过HFD建立NAFLD小鼠模型,发现在小鼠肝脏中总铁浓度无显著变化,但Fe(II)浓度升高^[9]。值得注意的是,由LIP释放的Fe(II)是铁过载和芬顿反应发生的原因之一。在发生NAFLD条件下,过量的铁会产生具有氧化还原活性的非转铁蛋白结合铁(nontransferrin-binding iron, NTBI),其摄取由金属转运蛋白(metal transporter Zip14, SLC39A14)介导。通常情况下,铁储存在肝脏铁蛋白中,而铁过载时核受体共激活因子4(nuclear receptor coactivator, NCOA4)与铁蛋白结合,将其输送至溶酶体,导致LIP中铁积累加剧,最终释放大量的Fe(II)^[30]。Fe(II)与过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)反应生成Fe(III)与羟基自由基(HO•),发生芬顿反应^[31-32]。芬顿反应产生的HO•攻击膜上的多不饱和脂肪酸导致脂质过氧化物的生成增加,进而引发铁死亡。这提示NAFLD中Fe(II)的增多可能是铁死亡的重要原因^[9](图1)。同样Li等^[24]发现,NASH小鼠肝脏同样出现铁过载,通过铁螯合剂DFO缓解了这一现象,并且抑制铁死亡,改善了NASH。以上结果表明,铁过载引发的脂质过氧化物增加以及铁死亡的发生可能是导致小鼠发生NAFLD的重要原因,降低铁过载可能对NAFLD的治疗起到重要作用。

相反,有研究显示未出现铁过载情况下,也会

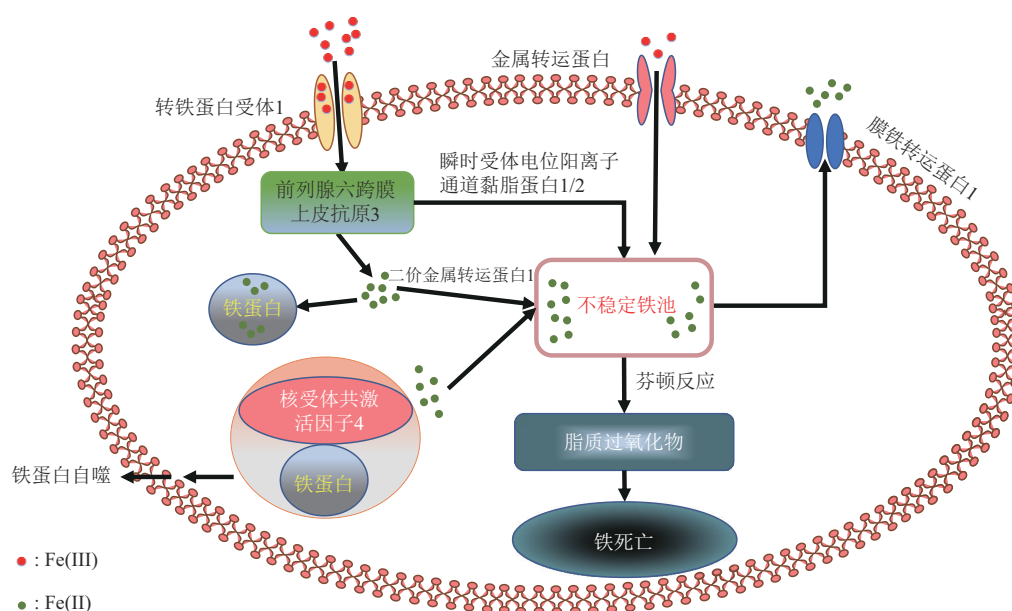


Fig.1 Iron metabolism in hepatocytes

图1 肝细胞中的铁代谢

发生铁死亡与肝损伤。多聚胞嘧啶RNA结合蛋白1 (polyr (C) binding protein 1, PCBP1) 是一种多功能蛋白质, 可作为胞质铁伴侣, 与铁结合并转移至哺乳动物细胞中的受体蛋白^[33]。LIP中95%是由PCBP1与Fe-GSH复合物组成, 而Fe-GSH是由GSH通过其游离巯基直接配位Fe (II) 形成^[34]。有研究报道, 在PCBP1敲除小鼠中肝细胞铁水平降低, 而LIP中的具有高反应性的铁含量增加, 其中未与PCBP1结合的Fe (II) 导致ROS产生, 在不出现铁过载的情况下导致脂质过氧化物增加, 加剧脂质变性。辅酶Q10可逆转PCBP1敲除引起的ROS增加以及肝脂肪变性^[35]。因此, 在肝脏中PCBP1可能通过调控LIP, 从而抑制铁死亡改善NAFLD。

综上所述, 铁过载是NAFLD发生的重要原因, 也是引发铁死亡的关键因素。因此降低铁过载抑制铁死亡对于NAFLD的发展可能起到缓解作用。另外, PCBP1可能成为降低铁过载的可行靶标。

1.3 NAFLD与铁死亡的脂质过氧化途径

NAFLD的发病机制中, 脂质过氧化物积累引起的氧化应激被认为是一个重要的因素^[36], 而脂质过氧化物积累也是铁死亡发生的原因之一^[3]。因此, 脂质过氧化可能是引发铁死亡, 导致NAFLD发展的关键因素。

脂质过氧化物的生成是由包括花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 在内的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs), 通过ACSL4的催化下生成多不饱和脂肪酸-辅酶A (polyunsaturated fatty acid, PUFA-CoA), 随后在溶磷脂酰胆碱酰基转移酶3 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 催化下形成多不饱和脂肪酸-磷脂酰乙醇胺 (poly-unsaturated fatty acid-phosphatidyl ethanolamine, PUFA-PE), 最终通过酶促或非酶促 (芬顿反应) 生成脂质过氧化物^[37]。近来报道, HFD诱导的NAFLD小鼠中发现脂质过氧化产物MDA以及Fe (II) 含量显著增加, 同时引发铁死亡^[9]。在NASH小鼠中, 脂质过氧化底物AA的上升是最明显的过程之一。并在小鼠肝脏中发现铁过载、MDA增加以及脂质堆积的现象, 使用铁死亡抑制剂后脂质堆积与铁过载得到改善, 脂质过氧化产物MDA下降, NASH程度下降^[24]。上文讨论过, 在铁过载时, 过多的Fe (II) 可能引发芬顿反

应, 参与脂质过氧化反应。因此, 参与脂质过氧化物生成的AA与Fe (II) 在脂质过氧化反应中可能存在协同关系, 共同增加铁死亡的发生, 加速NAFLD的进展。

ACSL4是PUFA生成脂质过氧化物的关键酶, 可将PUFA氧化为5-羟基二十碳四烯酸 (5-hydroxyeicosatetraenoic acid, 5-HETE)。Wei等^[38]将大鼠暴露于砷, 建立NASH以及铁死亡模型, 结果显示ACSL4和MDA表达明显升高。抑制ACSL4表达后, 由砷诱导的大鼠NASH中5-HETE含量下降, 抑制铁死亡, 缓解NASH。该研究指出, 线粒体融合蛋白2 (mitofusin 2, Mfn2) 在砷暴露诱导的肝铁死亡上游发挥作用, 同时Mfn2可与肌醇需要酶1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α) 结合促进5-HETE产生, 引发脂质代谢紊乱, 导致铁死亡发生、加剧NASH。因此Mfn2/IRE1 α 可能通过ACSL4正向调控铁死亡, 加剧砷诱导的NASH。

综上所述, 通过抑制脂质过氧化反应和铁死亡, 可能是治疗NAFLD的可行方法。

1.4 NAFLD与铁死亡的其他诱发途径

线粒体氧化应激可能通过正向调控铁死亡参与NAFLD的进展。线粒体氧化应激会导致其功能障碍, 其特征是三羧酸循环流量以及线粒体ROS增加, 增强的线粒体ROS可加速肝脂肪变性, 补充辅酶Q10可以逆转线粒体ROS增加和肝脂肪变性^[35]。膳食铁过载的情况下, 黄鲶鱼肝脏中氧化应激增加, 脂质过氧化物堆积, 并出现了铁死亡。通过MitoTEMPO (线粒体超氧化物清除剂) 处理显著降低黄鲶鱼肝细胞线粒体以及细胞质中的MDA以及ROS, 并增加Nrf2、GPX4和GSH等铁死亡中抗氧化酶的活性。之后通过溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 消融肝细胞中的线粒体, 在铁过载的条件下消融线粒体, 细胞ROS并未增加, 铁死亡受到抑制^[39]。这说明, 铁过载诱导的肝脏铁死亡是通过氧化应激导致的, 且线粒体氧化应激占主要地位。二氢乳清酸脱氢酶 (dihydroorate Dehydrogenase, DHODH) 是一种线粒体内膜酶, 可降低线粒体氧化应激^[40]。据报道, 在GPX4过表达或敲低的癌细胞中, 抑制DHODH都可增强铁死亡诱导剂对其的作用^[41]。在线粒体中, DHODH与GPX4平行发挥抗氧化作用, 独立于胞质中的GPX4^[40], 这可能在NAFLD中的铁死亡发挥作用。综上所述, 线粒体氧化应激对于肝脏

中的铁死亡发生十分重要,通过消除线粒体中的ROS来抑制铁死亡可能是防治NAFLD的新手段。

近几年的研究显示,Nrf2通过调控下游铁死亡相关因子改善NAFLD中发挥重要的作用。

2 Nrf2在铁死亡调控NAFLD中的作用

转录因子Nrf2是一种碱性亮氨酸拉链蛋白,是许多抗氧化蛋白的关键转录因子。正常状态下,Nrf2与Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor, KEAP1)结合,通过泛素-蛋白酶体途径不断降解,当处于亲电和氧化应激状态时,KEAP1上的半胱氨酸残基被修饰,引起KEAP1的结构发生改变,破坏了KEAP1与Nrf2的结合,抑制了Nrf2降解,Nrf2进入到细胞核中与小肌肉腱膜纤维肉瘤(small musculoaponeurotic fibrosarcoma, MAF)蛋白二聚化,促进下游细胞保护基因的转录^[42]。

Nrf2的下游因子已被报道在NAFLD和铁死亡中起到关键作用^[43],最新研究显示,激活Nrf2可以抑制NAFLD小鼠的铁死亡^[3, 9]。因此,本文重点讨论Nrf2、铁死亡与NAFLD之间的联系,探讨激活Nrf2抑制铁死亡影响NAFLD的发生与发展(图2)。

2.1 Nrf2与抗氧化

Nrf2是抗氧化系统中的重要转录因子,可靶向一系列氧化还原相关基因,对铁死亡起到调控作用。

GPX4已被确立为Nrf2重要的抗氧化转录调节靶标^[44],在多种细胞中沉默Nrf2均可降低GPX4的表达^[45-46]。除了直接调控GPX4转录外,Nrf2还可以通过调控GSH的转录来调节GPX4的活性。由上文可知,GPX4依靠GSH发挥抗氧化功能,因此GSH是GPX4的限速底物。由于参与GSH的从头合成的胱氨酸/谷氨酸逆向转运体(system X C-,又名SLC7A11)、 γ 谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -glutamyl cysteine synthetase, γ -GCS)和谷氨酸-半胱氨酸连接酶(glutamate-cysteine ligase, GCL)均受到Nrf2调控。因此,Nrf2是GSH从头合成的重要的调控因子^[47-48]。可通过调控GSH合成间接影响GPX4的抗氧化功能。在结肠炎继发的肝损伤小鼠和四氯化碳诱导的急性肝损伤小鼠中,均可以通过激活Nrf2-GPX4轴抑制肝脏铁死亡^[49-50]。且在6周的MCD饮食后,与野生型小鼠相比,Nrf2敲除小鼠肝脏的脂肪变性、炎症和纤维化更为严

重。同时Nrf2敲除小鼠肝脏中GSH水平明显下调、脂质过氧化物过度堆积^[51]。这表明,Nrf2可能直接或间接影响GPX4,从而抑制铁死亡改善NASH。除此之外,Nrf2还可以通过调控铁死亡抑制蛋白1(ferroptosis suppressor protein1, FSP1)的转录来调节抗氧化功能。FSP1是一种新发现的内源性铁死亡抑制剂,它执行氧化还原酶的作用通过减少辅酶Q10增加铁死亡抗性^[52]。在铁死亡中,FSP1与GPX4平行发挥抗氧化功能^[53]。有研究表明,在KEAP1 KO的肺癌细胞中,GPX4表达下降,而FSP1表达增加,并表现出了铁死亡抗性。通过染色质免疫沉淀发现FSP1的启动子中含有两个Nrf2的抗氧化反应原件(ARE)位点,在KEAP1 KO细胞中的Nrf2缺失消除了KEAP1 KO诱导的FSP1启动子-荧光素酶活性和FSP1表达,并使KEAP1 KO细胞对铁死亡诱导剂诱导的铁死亡重新敏感。这表明FSP1是Nrf2转录靶标,并且在GPX4降低的情况下,Nrf2可以通过上调FSP1的转录发挥抗氧化功能,从而产生铁死亡抗性^[54]。另外,HFD诱导的NAFLD小鼠Nrf2与FSP1表达降低,ROS、MDA和铁离子水平升高^[3]。Nrf2通过相互独立的GPX4和FSP1两种途径,协调发挥抗氧化、抗铁死亡的作用。这些可能为治疗NAFLD提供了一种启示。

除上述因子外Nrf2还可通过影响HO-1^[55]或Sestrin2(Sesn2)^[56]发挥抗氧化功能。由上文可知,HO-1可产生胆绿素/胆红素和一氧化碳等代谢产物,这些代谢物可清除脂质过氧化物使细胞免受氧化应激的攻击^[57]。目前多项实验证明通过增加NRF2/HO-1途径可以减缓NAFLD的发展^[58-60]。一项研究发现,DA通过与NRF2竞争KEAP1,激活NRF2下游HO-1以及GSH可以抗铁死亡,改善HFD诱导的NAFLD^[3]。提示,Nrf2可通过激活HO-1发挥抗氧化作用,抑制铁死亡改善NAFLD。Sesn2是一种保守的抗氧化蛋白,响应于基因毒性、代谢和氧化应激等各种刺激,起到恢复机体平衡的作用^[56]。研究表明,Nrf2可通过与Sesn2启动子中的ARE抗氧化反应原件结合刺激其转录^[61-63]。Park等^[64]对原代肝细胞施加erastin(铁死亡诱导剂)诱导其发生铁死亡,发现Sesn2 mRNA表达增加。为探讨在铁死亡中Sesn2升高是否由于转录调节,作者敲除Nrf2后发现铁死亡诱导剂引起的Sesn2升高消失。在删除Sesn2启动子上的ARE反应原件后,Sesn2表达下降。在铁过载诱导的肝损

伤模型中过表达 *Sesn2* 后, *Sesn2* 通过降低铁离子水平以及清除脂质过氧化物, 抑制了铁死亡缓解肝损伤。利拉鲁肽 (liraglutide, LG) 可通过激活 *Sesn2*、Nrf2/HO-1 改善肥胖诱导的 NAFLD^[65]。这些结果表明, Nrf2 可能通过下游 HO-1、*Sesn2* 发挥抗氧化功能, 抑制铁死亡改善 NAFLD。

总而言之, Nrf2 的抗氧化功能对于抑制铁死亡起到关键作用, 它不仅可通过直接或间接调控 GPX4 活性, 还可以在 GPX4 失活时刺激 FSP1 转录或直接刺激 HO-1 和 *Sesn2* 转录发挥抗氧化作用。因此, 靶向 Nrf2 可通过其抗氧化功能成为未来防治 NAFLD 的可行方法。

2.2 Nrf2与铁代谢

肝脏是铁储存的重要器官, Nrf2 通过调控铁储存及转运控制铁代谢。铁积累增加导致铁代谢受损是铁死亡发生的原因之一。研究发现, 在 NASH 模型中 Nrf2 敲除小鼠体内铁积累比正常小鼠更加明显^[51]。

肝脏中铁主要储存在铁蛋白中, 铁蛋白重链 (ferritin heavy chain, FTH1) 和铁蛋白轻链 (ferritin light chain, FTL) 是铁蛋白组成的一部分^[66], FTH1 含有一个亚铁氧化物酶活性位点, 可以将 Fe (II) 氧化为 Fe (III) 储存在铁蛋白中, FTL 可以控制铁蛋白的稳定^[67]。FTH1 和 FTL 都是已知的 Nrf2 的转录靶点^[68-69]。Nrf2 可以通过促进铁蛋白 (FTL 和 FTH1) 的表达来调节铁的储存, 以减少铁积累, 从而减轻铁死亡^[69]。在肝癌细胞中激活 Nrf2 核易位可抑制肝癌细胞的铁死亡, 沉默 FTH1 可增加肝癌细胞铁死亡^[70]。在铁过载诱导的小鼠肝损伤模型中成纤维细胞生长因子 21 (fibroblast growth factor 21, FGF21) 可激活 Nrf2 及其下游靶基因 GPX4、HO-1、FTH1 和 FTL 增加, 通过增加抗氧化以及铁代谢功能抑制铁死亡, 改善铁过载诱导的肝损伤^[71]。银杏内酯 B (ginkgolide B, GB) 可激活 Nrf2 通过抗氧化以及铁代谢抑制铁死亡, 改善 HFD 诱导的 NAFLD, 但是在激活 Nrf2 后 FTH1 表达下调^[9]。究其原因, 一方面可能是由激活 Nrf2 的物质 (FGF21、GB) 所决定, 另一方面可能是由于铁蛋白自噬导致。上文了解铁蛋白自噬是维持机体铁稳态的重要机制^[72]。NCOA4 作为自噬货物受体可以选择性地与 FTH1 相互作用, 将其输送到溶酶体进行降解, 最终导致 FTH1 结合的铁释放, 引起细胞内游离铁增加^[73-74]。研究报道, 铁蛋白在低铁条件下通过自噬

降解, 释放铁离子^[75], 因此 HFD 可能导致铁蛋白自噬, FTH1 降低, 当铁过载条件下, 铁蛋白不发生自噬^[75], FTH1 为了降低铁过载, 恢复机体铁稳态从而导致其表达增加。总之, Nrf2 可转录 FTH1 和 FTL 调控铁存储, 改善肝脏中铁积累, 抑制铁死亡, 最终对 NAFLD 起到防治作用。

Nrf2 不仅可以调控铁储存, 还可以通过调控铁输出来调控铁代谢。FPN1 可将铁从细胞运输到血液循环中, 以维持机体铁稳态^[76]。FPN1 的转录已被证明受 Nrf2 调控, Nrf2 可通过调节 FPN1 的表达来影响细胞铁流量和细胞铁含量^[77-78]。有研究表明, Nrf2/FPN1 通路通过介导铁稳态和铁死亡发挥改善疾病的作用^[79]。并且女性 NAFLD 患者中 FPN1 增加^[80]。因此, 肝脏中 Nrf2/FPN1 通路可能也会通过增加铁输出, 抑制铁死亡达到改善 NAFLD 的作用。

总而言之, 激活 Nrf2 有望通过控制铁储存和铁输出降低铁过载引起的铁死亡, 最终改善 NAFLD。但目前研究多集中于 Nrf2 影响铁储存改善 NAFLD, 而通过铁输出降低铁死亡改善 NAFLD 尚未见报道, 需要后续研究证明。

2.3 Nrf2与脂质过氧化

抑制 Nrf2 可以调控铁死亡过程中的脂质过氧化影响 NAFLD。PUFA 既可由环境和饮食产生, 还可通过 (acetyl CoA carboxylase, ACC) 产生, 且 ACC 受 Nrf2 调控^[81]。ACC 是一种参与脂肪酸合成的酶, 可催化乙酰辅酶 A (acetyl-CoA) 转化为丙二酰辅酶 A (malonyl-CoA), 而丙二酰辅酶 A 是 PUFA 合成所必需的。研究表明, 腺苷酸激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 可介导 ACC 的磷酸化和失活负调节脂质过氧化反应。据报道, 在 AMPK 基因缺失的细胞中施加 ACC 抑制剂可消除 AMPK 失活引起的铁死亡^[82]。另外, Nrf2 敲除小鼠的肝脏中 AMPK 水平下降^[83]。与之一致的, 在 Keap1 敲除小鼠的肝脏中 AMPK 水平升高^[84]。这说明肝脏 AMPK 可能受到 Nrf2 调控, 且 Nrf2 可能通过 AMPK 间接参与脂质过氧化反应, 调控铁死亡。

Nrf2 通过调控过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR γ) 参与铁死亡过程。PPAR γ 对脂质代谢至关重要^[85-86], 且 PPAR γ 由 Nrf2 转录^[87]。铁死亡中除 ACSL4 外, 环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX2) 同样可催化 AA 生成脂质过氧化物。在神经元细胞

中铁死亡诱导剂可降低PPAR γ 表达,升高COX2的表达,激活PPAR γ 后可通过抑制COX2的表达,减弱脂质过氧化物生成,抑制铁死亡^[88]。在原代神经元细胞中PPAR γ 激活剂增加Nrf2与PPAR γ 的表达,抑制铁死亡诱导剂诱导的铁死亡^[89]。且在HFD诱导的NAFLD小鼠中,Nrf2敲除小鼠与正常小鼠相比,脂质堆积减少,PPAR γ 水平降低^[90]。这说明,受Nrf2所调控的PPAR γ 可能通过参与脂质过氧化反应调控铁死亡,影响NAFLD的进展。

综上所述,Nrf2有望通过直接影响PPAR γ 或通过节间影响AMPK,调控脂质过氧化反应,抑制铁死亡。

2.4 Nrf2其他机制

上文可知,线粒体功能紊乱参与NAFLD与铁

死亡中。在线粒体功能紊乱的疾病中,Nrf2也受到抑制^[91]。据报道,Nrf2敲除小鼠的线粒体ROS明显高于WT小鼠^[92]。而且,线粒体是细胞ROS的主要来源,同时线粒体也是产生腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)的主要细胞器。然而,当线粒体障碍能量代谢受损时,会激活受Nrf2调控的AMPK,它通过限制ACC参与脂质过氧化反应,调控铁死亡。且AMPK失活会激活铁死亡^[82]。萝卜硫素(glucoraphanin)^[93]或一氧化碳释放分子A1(Carbon monoxide releasing molecule-A1, CORM-A1)^[94]可激活Nrf2通过影响线粒体功能障碍改善NAFLD。这提示在NAFLD中激活Nrf2可能通过调节线粒体功能障碍抑制铁死亡改善NAFLD。

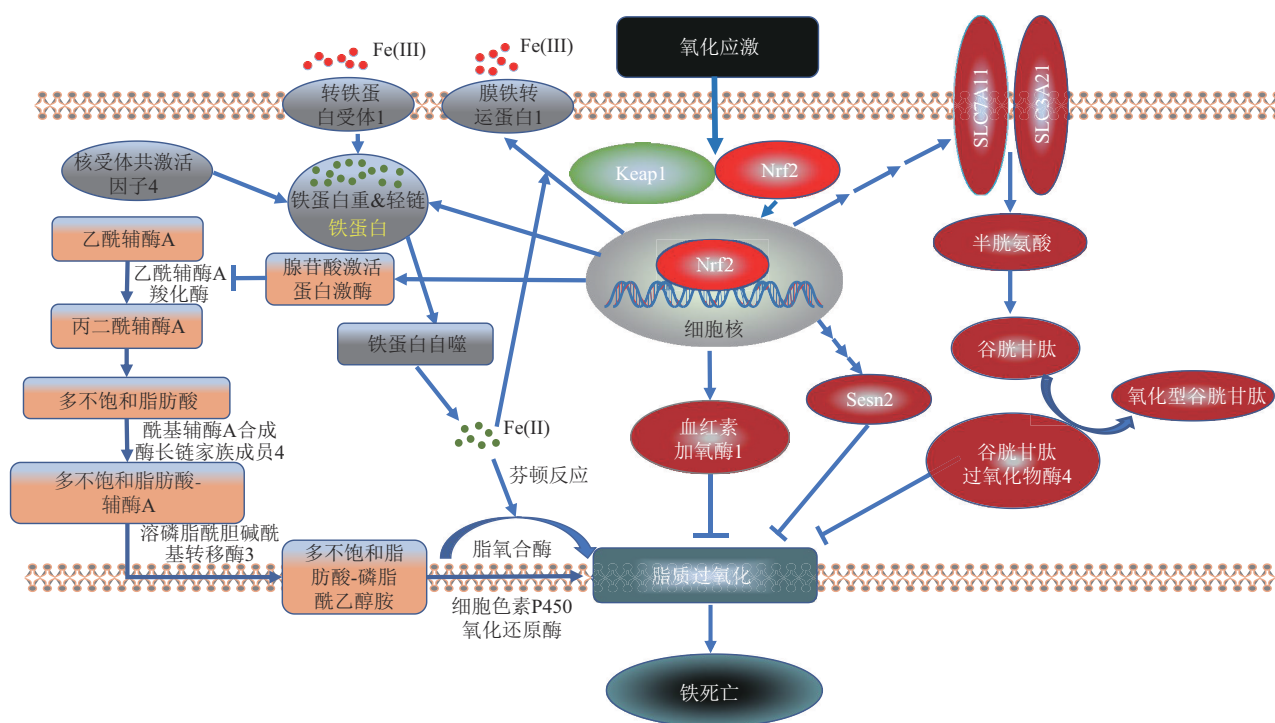


Fig. 2 The mechanism of ferroptosis regulated by Nrf2 in NAFLD

图2 非酒精性脂肪肝中Nrf2调控铁死亡的机制

红色部分表示Nrf2调控的抗氧化途径;灰色部分表示Nrf2调控的铁代谢机制;橙色部分表示脂质过氧化途径。

3 结论与展望

NAFLD因其高发病率和潜在的危害受到广泛关注,并与铁死亡高度相关^[19]。本文讨论了铁死亡在NAFLD中的机制,铁死亡通过GPX4途径、铁代谢途径、脂质代谢途径以及一些其他途径参与

到NAFLD的进程中。此外,多项研究表明Nrf2、铁死亡和NAFLD存在一定联系,Nrf2通过抑制铁死亡可改善NAFLD^[10-11]。

针对目前铁死亡改善NAFLD的研究,本文提出以下几点思考。在NAFLD的进展中,GPX4的表达在NAFLD与NASH中出现相反的结果,本文

猜测这可能是机体对于升高炎症或脂质过氧化反应做出的应激反应。而FSP1与GPX4均通过抗氧化功能,达到抵抗铁死亡的目的。但FSP1在NAFLD中的研究尚浅。GPX4与FSP1可能均受到Nrf2的调控。探讨在NAFLD中靶向Nrf2、GPX4与FSP1分别有什么影响,以及是否可同时激活这两种抗氧化途径,以在NAFLD中共同发挥抑制铁死亡的功能,具有重要的意义。

由于肝脏在铁储存中的重要性,铁过载又是NAFLD与铁死亡发生的重要原因,了解何种途径降低铁过载,抑制铁死亡,可能会对NAFLD的防治具有极大的帮助。但由于肝脏铁代谢的复杂性,目前研究尚不全面,仍需进一步的探索。例如,肝脏线粒体中铁代谢是否参与NAFLD的铁死亡,铁过载与脂质过氧化的复杂关系,Nrf2调控的FTH1在铁过载以及HFD小鼠中的表达,受Nrf2调控的FPN1作为人体内唯一的铁输出蛋白,在NAFLD中也起到调控铁代谢功能,但是FPN1如何通过调节铁死亡从而调控NAFLD,对于上述问题的研究均未见报道。

另外,目前研究较少将铁死亡中脂质过氧化途径的一些重要酶与NAFLD建立关联,如将游离不饱和脂肪酸转移到磷脂中的LPCAT3及合成脂质过氧化物的关键酶等。因此,需要后续研究证明这些参与脂质过氧化反应的因子是否可影响NAFLD的进程。

总体而言,通过Nrf2抑制铁死亡改善NAFLD是可行的。望后续发现更多与Nrf2相关的途径,为改善NAFLD提供帮助。

参 考 文 献

- [1] Younossi Z, Anstee Q M, Marietti M, *et al.* Global burden of NAFLD and NASH: trends, predictions, risk factors and prevention. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, **15**(1): 11-20
- [2] Yki-Järvinen H. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2014, **2**(11): 901-910
- [3] Gao G, Xie Z, Li E W, *et al.* Dehydroabietic acid improves nonalcoholic fatty liver disease through activating the Keap1/Nrf2-ARE signaling pathway to reduce ferroptosis. *J Nat Med*, 2021, **75**(3): 540-552
- [4] Wu Y, Zheng Q, Zou B, *et al.* The epidemiology of NAFLD in Mainland China with analysis by adjusted gross regional domestic product: a meta-analysis. *Hepatol Int*, 2020, **14**(2): 259-269
- [5] Day C P, James O F. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party?. *Hepatology*, 1998, **27**(6): 1463-1466
- [6] Wang Y L, Wu J, Li R X, *et al.* A double-edged sword: the Kelch-like ECH-associated protein 1-nuclear factor erythroid-derived 2-related factor 2-antioxidant response element pathway targeted pharmacological modulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Opin Pharmacol*, 2021, **60**: 281-290
- [7] Cusi K. Role of insulin resistance and lipotoxicity in non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Liver Dis*, 2009, **13**(4): 545-563
- [8] Zhu Z, Zhang Y, Huang X, *et al.* Thymosin beta 4 alleviates non-alcoholic fatty liver by inhibiting ferroptosis *via* up-regulation of GPX4. *Eur J Pharmacol*, 2021, **908**: 174351
- [9] Yang Y, Chen J, Gao Q, *et al.* Study on the attenuated effect of Ginkgolide B on ferroptosis in high fat diet induced nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicology*, 2020, **445**: 152599
- [10] Yuan J, Yu Z, Gao J, *et al.* Inhibition of GCN2 alleviates hepatic steatosis and oxidative stress in obese mice: involvement of NRF2 regulation. *Redox Biol*, 2022, **49**: 102224
- [11] Yang Y, Cai F, Zhou N, *et al.* Dimethyl fumarate prevents ferroptosis to attenuate acute kidney injury by acting on NRF2. *Clin Transl Med*, 2021, **11**(4): e382
- [12] 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
- [13] Jakaria M, Belaidi A A, Bush A I, *et al.* Ferroptosis as a mechanism of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 2021, **159**(5): 804-825
- [14] Yan H F, Tuo Q Z, Yin Q Z, *et al.* The pathological role of ferroptosis in ischemia/reperfusion-related injury. *Zool Res*, 2020, **41**(3): 220-230
- [15] Wang N, Ma H, Li J, *et al.* HSF1 functions as a key defender against palmitic acid-induced ferroptosis in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, **150**: 65-76
- [16] Zhang H, Zhang E, Hu H. Role of ferroptosis in non-alcoholic fatty liver disease and its implications for therapeutic strategies. *Biomedicines*, 2021, **9**(11): 1660
- [17] Hassannia B, Vandenabeele P, Vanden Berghe T. Targeting ferroptosis to iron out cancer. *Cancer Cell*, 2019, **35**(6): 830-849
- [18] Chen J, Li X, Ge C, *et al.* The multifaceted role of ferroptosis in liver disease. *Cell Death Differ*, 2022, **29**(3): 467-480
- [19] Tsurusaki S, Tsuchiya Y, Koumura T, *et al.* Hepatic ferroptosis plays an important role as the trigger for initiating inflammation in nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Death Dis*, 2019, **10**(6): 449
- [20] Yang W S, Sriramaratnam R, Welsch M E, *et al.* Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*, 2014, **156**(1-2): 317-331
- [21] Friedmann Angeli J P, Schneider M, Proneth B, *et al.* Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nat Cell Biol*, 2014, **16**(12): 1180-1191
- [22] 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. *Biochim Biophys Acta*, 1982, **710**(2): 197-211

- [23] Ursini F, Maiorino M. Lipid peroxidation and ferroptosis: the role of GSH and GPx4. *Free Radic Biol Med*, 2020, **152**: 175-185
- [24] Li X, Wang T X, Huang X, *et al*. Targeting ferroptosis alleviates methionine-choline deficient (MCD) -diet induced NASH by suppressing liver lipotoxicity. *Liver Int*, 2020, **40**(6): 1378-1394
- [25] Qi J, Kim J W, Zhou Z, *et al*. Ferroptosis affects the progression of nonalcoholic steatohepatitis *via* the modulation of lipid peroxidation-mediated cell death in mice. *Am J Pathol*, 2020, **190**(1): 68-81
- [26] Lu D, Xia Q, Yang Z, *et al*. ENO3 promoted the progression of NASH by negatively regulating ferroptosis *via* elevation of GPX4 expression and lipid accumulation. *Ann Transl Med*, 2021, **9**(8): 661
- [27] Wu J, Zhou D, Deng C, *et al*. Characterization of porcine ENO3: genomic and cDNA structure, polymorphism and expression. *Genet Sel Evol*, 2008, **40**(5): 563-579
- [28] Le Y, Zhang Z, Wang C, *et al*. Ferroptotic cell death: new regulatory mechanisms for metabolic diseases. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2021, **21**(5): 785-800
- [29] Salomao M A. Pathology of hepatic iron overload. *Clin Liver Dis (Hoboken)*, 2021, **17**(4): 232-237
- [30] Chen X, Yu C, Kang R, *et al*. Iron metabolism in ferroptosis. *Front Cell Dev Biol*, 2020, **8**: 590226
- [31] Koppenol W H. The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep*, 2001, **6**(4): 229-234
- [32] Lai C S, Piette L H. Spin-trapping studies of hydroxyl radical production involved in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys*, 1978, **190**(1): 27-38
- [33] Philpott C C, Jadhav S. The ins and outs of iron: escorting iron through the mammalian cytosol. *Free Radic Biol Med*, 2019, **133**: 112-117
- [34] Hider R C, Kong X L. Glutathione: a key component of the cytoplasmic labile iron pool. *Biomaterials*, 2011, **24**(6): 1179-1187
- [35] Jadhav S, Protchenko O, Li F, *et al*. Mitochondrial dysfunction in mouse livers depleted of iron chaperone PCBP1. *Free Radic Biol Med*, 2021, **175**: 18-27
- [36] Ota T. Molecular mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD)/nonalcoholic steatohepatitis (NASH). *Adv Exp Med Biol*, 2021, **1261**: 223-229
- [37] Kagan V E, Mao G, Qu F, *et al*. Oxidized arachidonic and adrenic PEs navigate cells to ferroptosis. *Nat Chem Biol*, 2017, **13**(1): 81-90
- [38] Wei S, Qiu T, Wang N, *et al*. Ferroptosis mediated by the interaction between Mfn2 and IREa promotes arsenic-induced nonalcoholic steatohepatitis. *Environ Res*, 2020, **188**: 109824
- [39] Chen G H, Song C C, Pantopoulos K, *et al*. Mitochondrial oxidative stress mediated Fe-induced ferroptosis *via* the NRF2-ARE pathway. *Free Radic Biol Med*, 2022, **180**: 95-107
- [40] Mao C, Liu X, Zhang Y, *et al*. DHODH-mediated ferroptosis defence is a targetable vulnerability in cancer. *Nature*, 2021, **593**(7860): 586-590
- [41] Wu J, Wang Y, Jiang R, *et al*. Ferroptosis in liver disease: new insights into disease mechanisms. *Cell Death Discov*, 2021, **7**(1): 276
- [42] Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells*, 2011, **16**(2): 123-140
- [43] Lu J, Zhao Y, Liu M, *et al*. Toward improved human health: Nrf2 plays a critical role in regulating ferroptosis. *Food Funct*, 2021, **12**(20): 9583-9606
- [44] Osburn W O, Wakabayashi N, Misra V, *et al*. Nrf2 regulates an adaptive response protecting against oxidative damage following diquat-mediated formation of superoxide anion. *Arch Biochem Biophys*, 2006, **454**(1): 7-15
- [45] Lu H, Xiao H, Dai M, *et al*. Britanin relieves ferroptosis-mediated myocardial ischaemia/reperfusion damage by upregulating GPX4 through activation of AMPK/GSK3beta/Nrf2 signalling. *Pharm Biol*, 2022, **60**(1): 38-45
- [46] Yang W, Wang Y, Zhang C, *et al*. Maresin1 protect against ferroptosis-induced liver injury through ROS inhibition and Nrf2/HO-1/GPX4 activation. *Front Pharmacol*, 2022, **13**: 865689
- [47] Fan Z, Wirth A K, Chen D, *et al*. Nrf2-Keap1 pathway promotes cell proliferation and diminishes ferroptosis. *Oncogenesis*, 2017, **6**(8): e371
- [48] Lian G, Gnanaprakasam J R, Wang T, *et al*. Glutathione *de novo* synthesis but not recycling process coordinates with glutamine catabolism to control redox homeostasis and directs murine T cell differentiation. *Elife*, 2018, **7**: e36158
- [49] Chen Y, Zhu S, Chen Z, *et al*. Gingerenone A alleviates ferroptosis in secondary liver injury in colitis mice *via* activating Nrf2-Gpx4 signaling pathway. *J Agric Food Chem*, 2022, **70**(39): 12525-12534
- [50] Zhao T, Yu Z, Zhou L, *et al*. Regulating Nrf2-GPx4 axis by bicyclol can prevent ferroptosis in carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Cell Death Discov*, 2022, **8**(1): 380
- [51] Sugimoto H, Okada K, Shoda J, *et al*. Deletion of nuclear factor-E2-related factor-2 leads to rapid onset and progression of nutritional steatohepatitis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010, **298**(2): G283-G294
- [52] Doll S, Freitas F P, Shah R, *et al*. FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor. *Nature*, 2019, **575**(7784): 693-698
- [53] Bersuker K, Hendricks J M, Li Z, *et al*. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis. *Nature*, 2019, **575**(7784): 688-692
- [54] Koppula P, Lei G, Zhang Y, *et al*. A targetable CoQ-FSP1 axis drives ferroptosis- and radiation-resistance in KEAP1 inactive lung cancers. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 2206
- [55] Ryter S W, Alam J, Choi A M. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*, 2006, **86**(2): 583-650
- [56] Budanov A V, Sablina A A, Feinstein E, *et al*. Regeneration of peroxiredoxins by p53-regulated sestrins, homologs of bacterial AhpD. *Science*, 2004, **304**(5670): 596-600

- [57] Sugimoto R, Tanaka Y, Noda K, *et al.* Preservation solution supplemented with biliverdin prevents lung cold ischaemia/reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2012, **42**(6): 1035-1041
- [58] Xu Q, Fan Y, Loo J J, *et al.* Aoin protects mice from diet-induced non-alcoholic steatohepatitis *via* activation of Nrf2/HO-1 signaling. *Food Funct*, 2021, **12**(2): 696-705
- [59] Qiu M, Xiao F, Wang T, *et al.* Protective effect of Hedansanqi Tiaozhi Tang against non-alcoholic fatty liver disease *in vitro* and *in vivo* through activating Nrf2/HO-1 antioxidant signaling pathway. *Phytomedicine*, 2020, **67**: 153140
- [60] Qiao Y, Li X, Zhang X, *et al.* Hepatocellular iNOS protects liver from NASH through Nrf2-dependent activation of HO-1. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, **514**(2): 372-378
- [61] Shin B Y, Jin S H, Cho I J, *et al.* Nrf2-ARE pathway regulates induction of Sestrin-2 expression. *Free Radic Biol Med*, 2012, **53**(4): 834-841
- [62] Kim M G, Yang J H, Kim K M, *et al.* Regulation of Toll-like receptor-mediated Sestrin2 induction by AP-1, Nrf2, and the ubiquitin-proteasome system in macrophages. *Toxicol Sci*, 2015, **144**(2): 425-435
- [63] Bae S H, Sung S H, Oh S Y, *et al.* Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage. *Cell Metab*, 2013, **17**(1): 73-84
- [64] Park S J, Cho S S, Kim K M, *et al.* Protective effect of sestrin2 against iron overload and ferroptosis-induced liver injury. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, **379**: 114665
- [65] Han X, Ding C, Zhang G, *et al.* Liraglutide ameliorates obesity-related nonalcoholic fatty liver disease by regulating Sestrin2-mediated Nrf2/HO-1 pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, **525**(4): 895-901
- [66] Xie Y, Hou W, Song X, *et al.* Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ*, 2016, **23**(3): 369-379
- [67] Theil E C. Ferritin: the protein nanocage and iron biomineral in health and in disease. *Inorg Chem*, 2013, **52**(21): 12223-12233
- [68] Cairo G, Tacchini L, Pogliaghi G, *et al.* Induction of ferritin synthesis by oxidative stress. Transcriptional and post-transcriptional regulation by expansion of the "free" iron pool. *J Biol Chem*, 1995, **270**(2): 700-703
- [69] Chang C F, Cho S, Wang J. (-)-Epicatechin protects hemorrhagic brain *via* synergistic Nrf2 pathways. *Ann Clin Transl Neurol*, 2014, **1**(4): 258-271
- [70] Sun X, Ou Z, Chen R, *et al.* Activation of the p62-Keap1-NRF2 pathway protects against ferroptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*, 2016, **63**(1): 173-184
- [71] Wu A, Feng B, Yu J, *et al.* Fibroblast growth factor 21 attenuates iron overload-induced liver injury and fibrosis by inhibiting ferroptosis. *Redox Biol*, 2021, **46**: 102131
- [72] Bellelli R, Federico G, Matte A, *et al.* NCOA4 deficiency impairs systemic iron homeostasis. *Cell Rep*, 2016, **14**(3): 411-421
- [73] Mancias J D, Wang X, Gygi S P, *et al.* Quantitative proteomics identifies NCOA4 as the cargo receptor mediating ferritinophagy. *Nature*, 2014, **509**(7498): 105-109
- [74] Kerins M J, Ooi A. The roles of NRF2 in modulating cellular iron homeostasis. *Antioxid Redox Signal*, 2018, **29**(17): 1756-1773
- [75] Asano T, Komatsu M, Yamaguchi-Iwai Y, *et al.* Distinct mechanisms of ferritin delivery to lysosomes in iron-depleted and iron-replete cells. *Mol Cell Biol*, 2011, **31**(10): 2040-2052
- [76] Donovan A, Lima C A, Pinkus J L, *et al.* The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*, 2005, **1**(3): 191-200
- [77] Marro S, Chiabrando D, Messana E, *et al.* Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. *Haematologica*, 2010, **95**(8): 1261-1268
- [78] Yang S, Deng Q, Sun L, *et al.* Salmonella effector SpvB interferes with intracellular iron homeostasis *via* regulation of transcription factor NRF2. *FASEB J*, 2019, **33**(12): 13450-13464
- [79] Tian H, Xiong Y, Zhang Y, *et al.* Activation of NRF2/FPN1 pathway attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats by regulating iron homeostasis and ferroptosis. *Cell Stress Chaperones*, 2022, **27**(2): 149-164
- [80] Auguet T, Aragonès G, Berlanga A, *et al.* Hepcidin in morbidly obese women with non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One*, 2017, **12**(10): e0187065
- [81] Sun X, Li X, Jia H, *et al.* Nuclear factor E2-related factor 2 mediates oxidative stress-induced lipid accumulation in adipocytes by increasing adipogenesis and decreasing lipolysis. *Antioxid Redox Signal*, 2020, **32**(3): 173-192
- [82] Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, *et al.* Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nat Cell Biol*, 2020, **22**(2): 225-234
- [83] Meakin P J, Chowdhry S, Sharma R S, *et al.* Susceptibility of Nrf2-null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes but not with insulin resistance. *Mol Cell Biol*, 2014, **34**(17): 3305-3320
- [84] Xu J, Donepudi A C, Moscovitz J E, *et al.* Keap1-knockdown decreases fasting-induced fatty liver *via* altered lipid metabolism and decreased fatty acid mobilization from adipose tissue. *PLoS One*, 2013, **8**(11): e79841
- [85] Cai W, Yang T, Liu H, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ): a master gatekeeper in CNS injury and repair. *Prog Neurobiol*, 2018, **163-164**: 27-58
- [86] Han L, Bai L, Qu C, *et al.* PPAR γ -mediated ferroptosis in dendritic cells limits antitumor immunity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, **576**: 33-39
- [87] Annie-Mathew A S, Prem-Santhosh S, Jayasuriya R, *et al.* The pivotal role of Nrf2 activators in adipocyte biology. *Pharmacol Res*, 2021, **173**: 105853
- [88] Liang H, Tang T, Huang H, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ameliorates neuronal ferroptosis after traumatic brain injury in mice by inhibiting cyclooxygenase-2. *Exp Neurol*,

- 2022,**354**: 114100
- [89] Duan C, Jiao D, Wang H, *et al.* Activation of the PPARgamma prevents ferroptosis-induced neuronal loss in response to intracerebral hemorrhage through synergistic actions with the Nrf2. *Front Pharmacol*, 2022, **13**: 869300
- [90] Li L, Fu J, Liu D, *et al.* Hepatocyte-specific Nrf2 deficiency mitigates high-fat diet-induced hepatic steatosis: involvement of reduced PPARgamma expression. *Redox Biol*, 2020, **30**: 101412
- [91] Matigian N, Abrahamsen G, Sutharsan R, *et al.* Disease-specific, neurosphere-derived cells as models for brain disorders. *Dis Model Mech*, 2010, **3**(11-12): 785-798
- [92] Kovac S, Angelova P R, Holmstrom K M, *et al.* Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase. *Biochim Biophys Acta*, 2015, **1850**(4): 794-801
- [93] Xu L, Nagata N, Ota T. Impact of glucoraphanin-mediated activation of Nrf2 on non-alcoholic fatty liver disease with a focus on mitochondrial dysfunction. *Int J Mol Sci*, 2019, **20**(23): 5920
- [94] Upadhyay K K, Jadeja R N, Vyas H S, *et al.* Carbon monoxide releasing molecule-A1 improves nonalcoholic steatohepatitis via Nrf2 activation mediated improvement in oxidative stress and mitochondrial function. *Redox Biol*, 2020, **28**: 101314

Role of Nrf2-regulated Ferroptosis Pathway in The Prevention and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease*

YUN Zhi-Qiang¹⁾, YAO Ting-Ting¹⁾, LI Tao²⁾, YI Xue-Jie^{1,3)**}

¹⁾College of Kinesiology, Shenyang Sport University, Shenyang 110115, China;

²⁾Laboratory Management Center of Shenyang Sport University, Shenyang 110115, China;

³⁾Sports and Health Research Center of Shenyang Sport University, Shenyang 110115, China)

Abstract Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a chronic liver disease with high incidence. NAFLD is closely related to obesity, diabetes, hyperlipidemia and other metabolic syndromes, and it is one of the important public health problems at present. Its specific pathogenesis is still unclear. At present, some studies believe that ferroptosis is involved in the occurrence and development of NAFLD, and ferroptosis is a new type of programmed cell death. Nrf2 is an important nuclear factor in the regulation of ferroptosis. First of all, Nrf2 can directly or indirectly regulate the downstream antioxidant GPX4 to participate in ferroptosis and the development of NAFLD, and can stimulate FSP1 transcription or directly stimulate HO-1 and Sesn2 transcription to play an antioxidant role when GPX4 is inactivated. Secondly, iron overload is closely related to ferroptosis and NAFLD. Nrf2 may reduce ferroptosis caused by iron overload by controlling iron storage and iron output, and finally improve NAFLD. However, the current research focuses on Nrf2 regulating iron storage affecting NAFLD, while Nrf2 regulating iron output and affecting ferroptosis and NAFLD have not been reported. In addition, Nrf2 is expected to regulate lipid peroxidation and inhibit ferroptosis by directly affecting PPAR γ or indirectly affecting AMPK. Finally, the study shows that activating Nrf2 may inhibit ferroptosis by regulating mitochondrial dysfunction. All in all, Nrf2 can participate in the occurrence and development of ferroptosis and NAFLD through many ways. It is hoped that more ways related to Nrf2 will be found in the future to help improve NAFLD.

Key words Nrf2, ferroptosis, non-alcoholic fatty liver disease

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0210

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (12072202) and Liaoning Provincial Department of Education (LJC2019ST03).

** Corresponding author.

Tel: 86-17742780139, E-mail: yixuejie8387@163.com

Received: May 7, 2022 Accepted: October 31, 2022