

· 中青年学者论坛 ·



**王培** 海军军医大学(第二军医大学)药学系副院长,教授、博士生导师。主要从事心血管代谢疾病的药理学研究。国家自然科学基金优秀青年科学基金获得者、科技部“863”青年科学家、上海市优秀学科带头人、上海市曙光学者、上海市青年科技启明星,曾获中国药理学会施维雅青年药物化学奖、上海市青年五四奖章。兼任中国药理学会第十二届理事会理事、中国药理学会心血管药理专业委员会副主任委员、中国药理学会分子药理专业委员会委员、上海市药理学会秘书长/常务理事。承担国家自然科学基金青年科学基金、科技部“863”项目等课题14项。作为通信作者或第一作者在 *Eur Heart J*、*J Pineal Res*、*APSB*、*Theranostics*、*Redox Biol* 等期刊上发表论文60余篇。申请国家发明专利16项,获得授权7项。荣立个人三等功1次。

DOI:10.16781/j.CN31-2187/R.20220745

## 非凋亡程序性细胞死亡在代谢相关脂肪性肝病中的作用

陈奕婷, 王培\*

海军军医大学(第二军医大学)药学系,上海 200433

**【摘要】** 既往认为程序性细胞死亡就是指凋亡,因此代谢相关脂肪性肝病中肝细胞死亡的最重要原因也被默认为凋亡。随着越来越多非凋亡程序性细胞死亡(铁死亡、坏死性凋亡、焦亡等)的发现,它们与炎症、活性氧、免疫信号活化高度相关的特征日益受到重视。大量证据表明,相较于“免疫沉默”的凋亡,非凋亡程序性细胞死亡似乎在代谢相关脂肪性肝病的肝细胞死亡中起到更为关键的作用,焦亡的特点是在肝脏组织中诱导大量炎症分子释放,坏死性凋亡的特点是导致肝细胞彻底坏死,铁死亡的特点则是出现较为剧烈的脂质氧化应激。本文旨在阐述非凋亡程序性细胞死亡与代谢相关脂肪性肝病的联系,并对它们在代谢相关脂肪性肝病中的可能作用机制进行探讨。

**【关键词】** 程序性细胞死亡; 代谢相关脂肪性肝病; 细胞焦亡; 坏死性凋亡; 铁死亡; 细胞凋亡; 炎症

**【中图分类号】** R 575.5; R 589.2 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2097-1338(2023)06-0657-09

### Roles of non-apoptotic programmed cell death in metabolic-associated fatty liver disease

CHEN Yi-ting, WANG Pei\*

School of Pharmacy, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**【Abstract】** Traditionally, programmed cell death (PCD) refers to apoptosis. As such, apoptosis is considered to be the most important cause of hepatocyte death in metabolic-associated fatty liver disease (MAFLD). However, with the discovery of more and more non-apoptotic PCD (including ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis), their characteristics which are highly related to inflammation, reactive oxygen species, and immune signal activation have been increasingly valued. A large amount of evidence shows that compared with “immune silence” apoptosis, the non-apoptotic PCD seems to play more critical roles in causing hepatocyte death in MAFLD. The characteristic of pyroptosis is to induce the release of a large number of inflammatory molecules in liver tissue, the characteristic of necroptosis is to lead to complete necrosis of liver cells, and the characteristic of ferroptosis is to have more intense lipid oxidative stress. The purpose of this article is to elaborate the relationship between non-apoptotic PCD and MAFLD, and discuss their possible interaction mechanisms in MAFLD.

**【Key words】** programmed cell death; metabolic-associated fatty liver disease; pyroptosis; necroptosis; ferroptosis; apoptosis; inflammation

[Acad J Naval Med Univ, 2023, 44(6): 657-665]

[收稿日期] 2022-09-21

[接受日期] 2022-12-15

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(82073915)。Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (82073915).

[作者简介] 陈奕婷, 硕士生. E-mail: chenyingting24678@outlook.com

\*通信作者( Corresponding author). Tel: 021-81871203, E-mail: pwang@smmu.edu.cn

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指所有除酒精外的不明因素所导致的临床肝脏病理综合征, 以肝细胞内脂肪的异位沉积为首要特征。NAFLD 包括非酒精性脂肪肝 (non-alcoholic fatty liver, NAFL)、非酒精性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis, NASH) 及其相关肝硬化与肝细胞癌。随着对病因研究的深入及诊断的合理化, 2020年初, 众多国际专家小组倡议以“代谢相关脂肪性肝病 (metabolic-associated fatty liver disease, MAFLD)”取代原有命名, 并提出新的定义及更规范的诊断标准, 明确代谢紊乱为 MAFLD 的主要病因<sup>[1]</sup>。

程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD) 作为机体调节内环境稳定的方式之一, 会响应代谢紊乱产生的刺激而启动自杀程序, 过度的响应则会打破细胞增殖与死亡之间的平衡, 对肝脏产生损伤, 破坏肝脏原有的内环境稳定, 引发

免疫细胞募集、星状细胞激活等一系列后果<sup>[2]</sup>, 这可能是 MAFLD 进展的驱动因素。凋亡先前被认为是 PCD 的同义词, 也已有研究揭示凋亡在 MAFLD 中发挥作用<sup>[3]</sup>, 被认为是 MAFLD 中肝脏一系列病变的最重要原因。随着对 PCD 认识的加深, 2018年细胞死亡命名委员会 (Nomenclature Committee on Cell Death, NCDD) 描述了含凋亡在内共计 11 种调节性细胞死亡方式, 焦亡、坏死性凋亡、铁死亡等一系列非凋亡 PCD 的辨认与发现对先前结论提出了质疑和挑战。这是因为凋亡并不伴随剧烈的炎症反应产生, 而焦亡、坏死性凋亡、铁死亡这 3 种 PCD 恰恰与炎症和氧化应激高度相关 (表 1), 提示其对 MAFLD 可能有比凋亡更强的促进作用。因此, 这些非凋亡 PCD 是否参与、如何参与 MAFLD 的疾病发展受到了广泛关注。本文将着重讨论焦亡、坏死性凋亡、铁死亡这 3 种非凋亡 PCD 在 MAFLD 发展的作用, 并对其可能的机制进行探讨。

表 1 4 种 PCD 特征比较

Tab 1 Hallmarks comparison of 4 types of PCD

PCD type	Morphological characteristic	Regulatory factor	Biochemical process
Apoptosis	Cell shrinkage, chromatin condensation, and plasma membrane rupture	caspase 3, caspase 6, caspase 7, Bcl-2, and TP53	Bcl-2 family, caspase activation, $\Delta\Psi_m$ depletion, and phosphatidylserine exposure
Necroptosis	Cell swelling, plasma membrane rupture, chromatin condensation, and cellular content release	cIAP, RIPK3, RIPK1, and MLKL	Necrosome assembly, RIPK1 ubiquitination and phosphorylation, RIPK3, and MLKL phosphorylation
Pyroptosis	Cell swelling, plasma membrane rupture, membrane pore formation, cellular content release, and chromatin condensation	caspase 1, caspase 4, caspase 5, caspase 11, NLRP3, and GSDMD	Inflammasome assembly, caspase activation, GSDMD cleavage and activation, and IL-1 $\beta$ and IL-18 release
Ferroptosis	Mitochondria shrinkage, mitochondrial cristae decrease or disappear, mitochondrial membrane density increase, and mitochondrial membrane rupture	ACSL4, LPCAT3, SLC7A11, GSH-Px4, and AIFM1	Iron depletion, $\Delta\Psi_m$ depletion, and lipid peroxidation

PCD: Programmed cell death; caspase: Cysteine aspartic acid specific protease; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; TP53: Tumor protein 53;  $\Delta\Psi_m$ : Mitochondrial transmembrane potential; cIAP: Cellular inhibitor of apoptosis protein; RIPK: Receptor-interacting protein kinase; MLKL: Mixed lineage kinase domain-like protein; NLRP3: NOD-like receptor thermal protein domain-associated protein 3; GSDMD: Gasdermin D; IL: Interleukin; ACSL4: Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4; LPCAT3: Lysophosphatidylcholine acyltransferase 3; SLC7A11: Solute carrier family 7 member 11; GSH-Px4: Glutathione peroxidase 4; AIFM1: Apoptosis-inducing factor mitochondria-associated 1.

## 1 焦 亡

1.1 焦亡的基本通路 焦亡是一类以炎症为特征的 PCD, 分为经典途径与非经典途径, 前者依赖 caspase 1 介导的炎症小体组装, 后者则由 caspase 4/5/11 启动下游反应。在经典焦亡途径中, 模式识别受

体识别到损伤相关分子模式 (damage-associated molecular pattern, DAMP) 信号后, 与凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein, ASC) 结合形成炎症小体, 招募并活化 caspase 1。成熟的 caspase 1 切割消皮素 D (gasdermin D) 形成具有细胞穿孔活性的氨基端片段并寡聚于膜上,

使细胞膜破裂并释放内容物,引起炎症反应<sup>[4]</sup>。同时,caspase 1会切割IL-1 $\beta$ 与IL-18的前体使其活化,通过正向刺激促炎因子进一步扩大炎症反应。因为焦亡的这一特征通路,单纯性MAFLD向NASH转化的重要原因由原来普遍认为的凋亡转变成caspase 1介导的焦亡<sup>[5]</sup>。目前,已有研究证实从MAFLD发展到NASH的过程中焦亡明显增加,且其作用并不局限于激活肝星状细胞,最终结果是促进了大面积的肝脏细胞损伤,诱导肝纤维化<sup>[6]</sup>。总体而言,在MAFLD的进程中,焦亡比凋亡诱导了更强的肝实质细胞损伤。

**1.2 焦亡与MAFLD的联系** 在早期,NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain-associated protein 3, NLRP3)炎症小体被认为是焦亡的关键特征。有学者在NASH患者样本中发现NLRP3的激活<sup>[7]</sup>,推测NLRP3可能是MAFLD中的重要激活分子。NLRP3本身可以被各类细胞信号激活,如细胞外ATP信号、活性氧、胆固醇晶体等<sup>[8]</sup>。在MAFLD中,主要的激活物可能是饱和脂肪酸或胆固醇晶体。Csak等<sup>[7]</sup>在使用蛋氨酸及胆碱缺乏(methionine and choline deficient, MCD)饲料诱导的NASH模型小鼠中检测到NLRP3、ASC、caspase 1表达显著上升;分离小鼠肝细胞并使用棕榈酸(饱和脂肪酸)处理,发现经棕榈酸处理后的肝细胞内NLRP3表达相较于亚油酸(不饱和脂肪酸)处理的细胞明显增加,且后续使用脂多糖刺激后肝细胞IL-1 $\beta$ 表达显著上升,提示可能是饱和脂肪酸作为内源性信号诱导NLRP3活化,组装炎症小体。Mridha等<sup>[9]</sup>使用胆固醇晶体处理MCD饮食诱导的NASH模型小鼠离体肝实质与非实质细胞,发现胆固醇晶体可以激活肝巨噬细胞而非肝脏实质细胞释放IL-1 $\beta$ ,推断胆固醇晶体可能也是激活NLRP3的途径之一。此外,不乏证据表明NLRP3介导的焦亡途径在代谢综合征、肥胖、2型糖尿病等一系列MAFLD常见合并症中起着重要的调控作用<sup>[10-11]</sup>,促进MAFLD继续恶化。因此,与MAFLD高度相关的脂质可能激活NLRP3,而NLRP3介导焦亡的发生又可促进MAFLD向炎症转化。

近年研究发现,消皮素D是细胞焦亡的真正直接执行者。caspase 4/11可以对消皮素D蛋白的第275位氨基酸位置进行切割,导致其断裂成2

段(氨基端片段和羧基端片段)。消皮素D氨基端片段可以在细胞膜、线粒体膜等膜样结构上聚集,形成一个大型多聚复合物,并对细胞膜打孔,使细胞内容物泄露,从而导致细胞死亡<sup>[12-13]</sup>。在这一过程中,焦亡的细胞会释放出活化的IL-1 $\beta$ ,并强烈诱导后续炎症反应。近年来,结构生物学为消皮素D氨基端片段在细胞膜上的聚集及诱导膜结构的变化提供了更多证据<sup>[14]</sup>。Xu等<sup>[15]</sup>发现,在MAFLD的进展中,消皮素D是驱动肝实质细胞死亡和肝脏功能损伤的关键执行者。Gaul等<sup>[5]</sup>则发现,肝细胞发生焦亡后释放的IL-1 $\beta$ 、IL-18可激活邻近的肝星状细胞,从而促进MAFLD病程快速向肝纤维化进展。包括肝细胞、肝星状细胞在内的肝脏实质细胞发生焦亡后,可释放出IL-33,促进肝脏肿瘤的发生、发展<sup>[16]</sup>。有趣的是,消皮素D在细胞上打孔诱导细胞焦亡的同时,caspase 7会在细胞膜上“打补丁”修补缺损的细胞膜<sup>[17]</sup>,这一作用完全不同于其在凋亡中作为承上启下的信号放大分子的角色,提示凋亡与焦亡可能存在截然不同的调控机制。

## 2 坏死性凋亡

**2.1 坏死性凋亡的基本通路** 坏死性凋亡是一类以坏死样细胞死亡形态与自噬激活为特征的PCD。Fas/肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor, TNFR)家族可以介导细胞凋亡的经典途径,而Degterev等<sup>[18]</sup>发现,在缺乏细胞内凋亡信号的情况下,一种非凋亡的死亡形式将被激活,根据其形态学特征和受调控的特点命名为坏死性凋亡。坏死性凋亡可通过线粒体依赖的内源性途径激活,也可以通过外在死亡受体依赖的途径激活,如TNF- $\alpha$ 信号可以与受体TNFR1结合,诱导膜结合的信号复合体I产生,同时招募接头蛋白TNFR1相关死亡域蛋白与受体相互作用蛋白激酶(receptor-interacting protein kinase, RIPK)1,包括其E3泛素连接酶——TNFR相关因子2及泛素酶凋亡抑制蛋白家族成员——细胞凋亡抑制蛋白(cellular inhibitor of apoptosis protein, cIAP)<sup>[2]</sup>。而RIPK1的K63泛素链<sup>[19]</sup>可促进TGF- $\beta$ 激活激酶1的激活与招募,并通过NF- $\kappa$ B诱导激酶/NF- $\kappa$ B抑制物激酶激活NF- $\kappa$ B促炎通路<sup>[20]</sup>及MAPK,从而促进细胞的存活。

若 cIAP1/2 活性被抑制,则 RIPK1 去泛素化,从复合体 I 中解离并与 Fas 相关死亡结构域蛋白结合,两者与 caspase 8 共同构成复合体 II b,激活 caspase 8 并诱发细胞凋亡。caspase 8 扮演着“开关”的角色,决定着细胞死亡是走向凋亡还是坏死性凋亡,当其活性受到抑制时,RIPK1 会招募 RIPK3,构成坏死小体<sup>[21]</sup>,这一组装过程将导致 RIPK3 的自动磷酸化,同时,RIPK1 自身也在 RIPK3 依赖的条件下发生磷酸化修饰,两者的修饰将吸引混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL),MLKL 在 RIPK3 的磷酸化下发生构象变化<sup>[22]</sup>,与质膜中的磷酸磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol-phosphate, PIP)结合形成大孔,导致细胞死亡。研究发现,TNF 在炎性环境下可以激活一种不依赖 caspase 3/8 的死亡通路而对肝脏造成损伤<sup>[23-24]</sup>,证实坏死性凋亡通过释放促炎因子参与 MAFLD 的发展过程,导致肝脏的炎症及纤维化,其形态学改变与凋亡相比更激烈,造成的肝损伤也更严重。

**2.2 坏死性凋亡与 MAFLD 的联系** RIPK3 参与功能性坏死小体的构成,是调控坏死性凋亡的关键因子,且可独立于 MLKL 诱导炎症小体的组装及 IL-1 $\beta$  的释放<sup>[25]</sup>。Afonso 等<sup>[26]</sup>通过脂质组学研究为 RIPK3 调控脂肪肝提供了证据,研究结果显示 RIPK3 基因缺乏小鼠的肝脏脂质谱发生了改变,富含双键的甘油二酯、甘油三酯含量下降。Gautheron 等<sup>[27]</sup>发现 RIPK3 的激活与肝脏纤维化加重有关,具体机制为 RIPK3 通过激活 JNK 来促进促炎介质(如单核细胞趋化蛋白 1)的释放,从而募集巨噬细胞至受损肝脏加剧肝脏炎症与纤维化。Wu 等<sup>[28]</sup>发现 RIPK3 缺乏可下调活性氧、抑制 caspase 1 对过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)的切割,介导了肿瘤相关巨噬细胞的脂质代谢重编程。Afonso 等<sup>[29]</sup>利用胆碱缺乏型氨基酸饲料喂养的 NASH 小鼠模型进行研究,结果显示 RIPK3 缺乏通过上调 NASH 小鼠体内的 PPAR $\gamma$  影响脂质组,减少肝脏中炎症细胞的浸润,并通过 PPAR $\gamma$  辅助活化因子 1 $\alpha$ /PPAR $\gamma$  轴调节线粒体的适应性,激活活性氧清除酶;反之,RIPK3 会在坏死性凋亡刺激下增加有氧呼吸,导致活性氧增加,在前反馈通路中激活 RIPK1,持续性地诱导肝

细胞坏死性凋亡。总的来说,RIPK3 缺乏将调节肝脏应激代谢稳态、改善线粒体生物功能、促进代谢重编程、激活抗氧化防御机制。有趣的是,控制着凋亡的 caspase 8 在 MCD 喂养诱导的 NASH 模型小鼠中的主要功能是抑制 RIPK3 依赖的坏死性凋亡过度激活<sup>[27]</sup>,通过激活凋亡途径来保护肝脏免受更激烈的死亡方式。这提示细胞凋亡在脂肪肝向 NASH、肝纤维化发展的过程中,可能成为肝脏的相对保护性机制。

近年研究发现,MLKL 是执行坏死性凋亡的最终分子与核心。Sun 等<sup>[22]</sup>首次报道了 RIPK3 的功能底物 MLKL,它是由氨基端螺旋结构与羧基端激酶样结构组成的假激酶,其 T357、S358 的双重磷酸化可能是坏死小体激活的标志。MLKL 包含 1 个连接假激酶结构域的四螺旋束结构域(4-helix bundle domain, 4-HBD),Murphy 等<sup>[30]</sup>通过质谱确定了 MLKL 激活环内的 S345、S347、T349 是 RIPK3 的磷酸化修饰位点,而这种修饰会使得 MLKL 的氨基端结构暴露<sup>[31]</sup>,暴露出 4-HBD 及中央支撑区<sup>[32]</sup>,形成同源低聚物并能与质膜内小叶的 PIP 结合<sup>[33]</sup>。MLKL 在质膜上构成开放的 K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> 通道破坏膜电位平衡;同时 4-HBD 所带的正电荷会与 PIP 膜上所带的负电荷相互作用,在膜上形成孔,导致膜破裂,引起细胞死亡并释放内容物,从而引起广泛炎症反应<sup>[34]</sup>,创造炎性环境。已有研究将 MLKL 与肝脏的指标建立联系,Guo 等<sup>[35]</sup>关注到 MLKL 水平与肝纤维化部分指标呈正相关,而 MLKL 特异性敲除将通过减少肝细胞坏死及肝星状细胞活化来缓解纤维化,提示 MLKL 缺乏对肝脏具有保护作用。此外,近年来,自噬在 NAFLD 中对肝脏的保护作用得到广泛关注<sup>[36]</sup>,Wu 等<sup>[37-38]</sup>发现 MLKL 可能通过抑制自噬、诱导坏死性凋亡对肝脏造成损伤。因此,坏死性凋亡除了通过释放炎症因子、诱发炎症反应等促进 MAFLD 向 NASH 转化外,其他方面的作用如 MLKL 抑制自噬、RIPK3 自身独立促进炎症因子释放等在 MAFLD 中又扮演什么角色,仍然值得进一步研究与思考。总而言之,不同于细胞凋亡的快速免疫沉默清除机制<sup>[39]</sup>,坏死性凋亡伴随着炎症反应的发生<sup>[40]</sup>,两者在 MAFLD 中起着不同的作用。

### 3 铁死亡

**3.1 铁死亡的基本通路** 铁死亡是一种依赖铁、由脂质过氧化驱动、受调控的细胞死亡方式。Stockswell 团队首次发现致癌的 RAS 选择性致死小分子 erastin 可以触发一种依赖铁的非凋亡细胞死亡形式,并将其命名为铁死亡<sup>[41]</sup>。脂质过氧化所需要的酶、芬顿反应的发生等都依赖铁的催化或参与。脂质过氧化可被细胞的各类信号激活,包括营养物质、代谢活动、压力应激等。反应启动后,细胞内的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, PUFA) 在酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4) 的帮助下快速与辅酶 A 连接,再被溶血卵磷脂酰基转移酶 3 (lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3) 酯化,进一步生成磷脂氢过氧化物 (phospholipid hydroperoxide, PLOOH),与  $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$  发生芬顿反应,随后自由基从 PUFA 双烯丙基中捕获电子,结合氧分子生成自由基  $\text{PLO}\cdot$  或  $\text{PLOO}\cdot$ ,驱动链反应<sup>[42]</sup>。这一 PUFA 激活并掺入膜脂的过程可造成特定膜脂的过氧化,并最终导致质膜透化破裂引起细胞死亡<sup>[43]</sup>。细胞对于铁死亡有诸多抑制手段,目前研究最多的调控通路是胱氨酸/谷氨酸反向转运体 ( $\text{x}_c^-$  系统)/谷胱甘肽/谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GSH-Px4) 轴<sup>[44]</sup>,胱氨酸通过  $\text{x}_c^-$  系统进入细胞内,被硫氧还蛋白还原酶 1 (thioredoxin reductase 1, TXNRD1) 还原成半胱氨酸并合成谷胱甘肽,谷胱甘肽提供 2 个电子给 GSH-Px4,将 PLOOH 还原成醇 (PLOH),从而中断脂质过氧化。此外,独立于 GSH-Px4 的新通路——铁死亡抑制蛋白 1 (ferroptosis suppressor protein 1, FSP1) /泛醌 (ubiquinone, 即辅酶 Q) /还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 也被报道<sup>[45]</sup>。FSP1 是一种 NADPH 依赖性的泛醌氧化还原酶,可还原非线粒体隔室中的一类亲脂性自由基捕获抗氧化剂泛醌为泛醇,减少脂质自由基从而中断链反应; $\alpha$ -生育酚也可起到类似作用<sup>[46]</sup>。2020 年,基于成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR)

及其相关蛋白 9 (CRISPR-associated protein 9, Cas9) 基因编辑技术筛选的新通路鸟苷三磷酸环水解酶 1 (guanosine triphosphate cyclohydrolase 1, GCH1) /四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin, BH4) 轴被报道<sup>[47]</sup>,表达 GCH1 的细胞合成 BH4 引起脂质重塑,选择性地防止具有 2 个多不饱和脂肪酰基尾部的磷脂的耗竭,从而抑制铁死亡。BH4 调控可能具有双重机制,其本身作为自由基捕获剂 (radical-trapping agent, RTA) 的同时,还可参与辅酶 Q10 的合成过程。目前仍未有直接证据证明铁死亡参与了 MAFLD 的进展,现有研究试图通过“代谢”这一关键词来搭建两者之间的桥梁,包括共享的脂质如脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX) 家族成员 12/15<sup>[48-49]</sup>及铁的代谢稳定等。

**3.2 铁死亡与 MAFLD 的联系** 铁在细胞死亡过程中扮演了诸多角色,是产生活性氧的各类酶、脂质过氧化所需酶如花生四烯酸脂氧合酶 (arachidonate lipoxygenase, ALOX)、细胞色素 P450 氧化还原酶 (cytochrome P450 oxidoreductase, POR) 等的催化剂和启动芬顿反应的反应物<sup>[50]</sup>。最近的研究表明铁代谢稳定与肝脏稳态息息相关。Gao 等<sup>[51]</sup>发现 NASH 以肝细胞缺铁及肝星状细胞铁超载为特征,而铁的积累会导致活性氧过度生成从而促进肝星状细胞纤维化激活。Yu 等<sup>[52]</sup>则发现减少肝转铁蛋白表达可显著减少肝脏铁蓄积,防止高铁饮食诱导的肝纤维化。Protchenko 等<sup>[53]</sup>研究发现,抑制小鼠细胞质中铁离子分子伴侣多聚胞嘧啶结合蛋白 1 后,小鼠肝铁酶水平降低,铁调节系统被破坏并自发发展为炎症和脂肪性肝病;转录组分析表明,小鼠体内存在脂质生物合成和氧化应激反应途径的激活,提示铁与肝脏脂肪变性存在联系。基因组学也为铁与 MAFLD 之间的联系提供了证据。Corradini 等<sup>[54]</sup>通过基因测序发现,MAFLD 患者体内存在与铁代谢相关的基因变体 (其中铜蓝蛋白突变最多),这些变体与高铁蛋白水平、肝脏铁沉积和更严重的肝脏疾病相关。总而言之,铁分布紊乱对肝脏炎症、纤维化起到了推进作用,且铁沉积本身就与许多肝脏疾病 (如血色素沉着症) 相关。有趣的是,铁在不同肝脏细胞中分布差异导致的有利或不利结果也许能为治疗 MAFLD 启发新的思路。

Li 等<sup>[55]</sup>提取鞣花酸破坏囊泡相关膜蛋白 2 (vesicle-associated membrane protein 2, VAMP2)

相关蛋白复合物的形成,诱导肝星状细胞铁死亡,发挥抗纤维化作用。此外,肝癌靶向药索拉非尼在肝纤维化中的治疗效果引起广泛关注,索拉非尼诱导肝星状细胞铁死亡的机制引起了研究者的兴趣。Li等<sup>[56]</sup>认为索拉非尼诱导的癌细胞(AGS、HCT116)铁死亡可能与降低 $x_c^-$ 系统组成部分溶质载体家族7成员11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)蛋白水平有关。而索拉非尼的耐药则成了阻碍其作为肝纤维化用药的重要原因之一,破解耐药机制迫在眉睫。Lu等<sup>[57]</sup>通过蛋白质组学和生物学信息分析推断,ETS原癌基因1依赖性转录增加的miRNA-23a-3p可以靶向ACSL4的3'非翻译区抑制铁死亡,从而导致索拉非尼耐药。Gao等<sup>[58]</sup>则通过转录组分析推断,Yes相关蛋白(Yes-associated protein, YAP)和转录共激活因子PDZ结合基序(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif, TAZ)诱导SLC7A11蛋白表达,抵消了索拉非尼对铁死亡的诱导作用。

本课题组前期在肝细胞上的研究发现,铁死亡的负向调控分子GSH-Px4可能在MAFLD肝脏中存在异常剪切过程,有一个特殊的剪切产物(比正常剪切产物多1个外显子)被诱导,通过与经典GSH-Px4转录产物形成多聚物使具有抗铁死亡作用的GSH-Px4失活,从而促进MAFLD中的铁死亡发生<sup>[59]</sup>;另外,铁死亡抑制剂似乎还能抑制另外一种非凋亡PCD——广泛凋亡(pyroptosis, apoptosis, necroptosis; PANoptosis)<sup>[60]</sup>,而铁离子的螯合剂却无法影响PANoptosis,提示铁死亡信号通路存在异质性,并且非凋亡PCD之间具有复杂联系。总而言之,由于铁死亡的复杂性,“靶向”和“长效”可能成为未来几年开发调节铁死亡来治疗MAFLD的重要趋势和未来方向。

#### 4 小结和展望

由于凋亡的免疫沉默性,焦亡、坏死性凋亡、铁死亡等非凋亡PCD似乎比凋亡在肝脏稳态方面的有着更重要的调节作用,可能是肝脏炎症的真正推手<sup>[61]</sup>。因此,靶向干预这些死亡方式已迅速成为MAFLD研究的热点,也被认为是具有潜力的治疗方向之一。同时,细胞死亡发生的位置、发生的先后顺序、相互之间的平衡都有待进一步研究与利用。如肝实质细胞发生铁死亡会对肝脏造成损伤,而诱导肝星状细胞发生铁死亡反而可以

对肝脏起到保护作用,减缓其进一步纤维化;促进MAFLD向NASH转化的第一个推手,理论上有可能是涉及炎症小体组装、炎症因子释放的焦亡,实际观察却发现肝脏细胞发生焦亡前已有铁死亡的痕迹,因此也存在铁死亡首先产生活性氧来启动这一转化的可能性;共享部分机制的细胞凋亡与坏死性凋亡,通过caspase 8控制细胞走向温和与激烈2种截然不同的死亡方式,激活caspase 7来修复其余细胞死亡方式造成的损伤也可能是MAFLD治疗的切入点之一。

此外,现阶段研究的主流观点仍停留在将不同类型的PCD视为个体,认为它们在特定的环境下各自发挥作用,分别探索不同途径之中潜在的药物靶点;实际上PCD之间还存在部分共享的机制,如调控炎症、免疫细胞等,它们也可以在多种与MAFLD相关的病理背景下共存,如肥胖、代谢综合征。因此,深入解析它们之间的机制联系,可能会为MAFLD的治疗开启新的篇章。

过往10年间,医学界对MAFLD的认知不断深化,将NAFLD明确为MAFLD,排他性诊断上升为确诊性诊断,以往MAFLD中起主要作用的PCD也从凋亡转向焦亡、坏死性凋亡、铁死亡等非凋亡的死亡方式。这几类非凋亡PCD如何参与MAFLD仍未知,例如,在焦亡中,炎症小体的组装受到了哪类信号的激活?在坏死性凋亡中,RIPK1、RIPK3独立于坏死性凋亡的促炎作用是否促进了MAFLD的进展?在铁死亡中,对于免疫细胞的调控是否部分参与焦亡、坏死性凋亡的促炎机制?等等。非凋亡PCD在MAFLD中的作用尚存诸多谜题,阐明两者之间相互联系的机制可能会为MAFLD的药物研发提供全新的思路与方向。

#### [参考文献]

- [1] ESLAM M, NEWSOME P N, SARIN S K, ANSTEE Q M, TARGHER G, ROMERO-GOMEZ M, et al. A new definition for metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: an international expert consensus statement[J]. *J Hepatol*, 2020, 73: 202-209.
- [2] SCHWABE R F, LUEDDE T. Apoptosis and necroptosis in the liver: a matter of life and death[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2018, 15: 738-752.
- [3] NASIRI-ANSARI N, NIKOLOPOULOU C, PAPOUTSI K, KYROU I, MANTZOROS C S, KYRIAKOPOULOS G, et al. Empagliflozin attenuates non-alcoholic fatty liver

- disease (NAFLD) in high fat diet fed *ApoE*<sup>-/-</sup> mice by activating autophagy and reducing ER stress and apoptosis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 818. DOI: 10.3390/ijms22020818.
- [4] YU P, ZHANG X, LIU N, TANG L, PENG C, CHEN X. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 128. DOI: 10.1038/s41392-021-00507-5.
- [5] GAUL S, LESZCZYNSKA A, ALEGRE F, KAUFMANN B, JOHNSON C D, ADAMS L A, et al. Hepatocyte pyroptosis and release of inflammasome particles induce stellate cell activation and liver fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2021, 74: 156-167.
- [6] KAUFMANN B, KUI L, RECA A, LESZCZYNSKA A, KIM A D, BOOSHEHRI L M, et al. Cell-specific deletion of NLRP3 inflammasome identifies myeloid cells as key drivers of liver inflammation and fibrosis in murine steatohepatitis[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 14: 751-767.
- [7] CSAK T, GANZ M, PESPIA J, KODYS K, DOLGANIUC A, SZABO G. Fatty acid and endotoxin activate inflammasomes in mouse hepatocytes that release danger signals to stimulate immune cells[J]. *Hepatology*, 2011, 54: 133-144.
- [8] YU L L, HONG W, LU S, LI Y R, GUAN Y Y, WENG X G, et al. The NLRP3 inflammasome in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis: therapeutic targets and treatment[J/OL]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 780496. DOI: 10.3389/fphar.2022.780496.
- [9] MRIDHA A R, WREE A, ROBERTSON A A B, YEH M M, JOHNSON C D, VAN ROOYEN D M, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice[J]. *J Hepatol*, 2017, 66: 1037-1046.
- [10] PALMA G, SORICE G P, GENCHI V A, GIORDANO F, CACCIOPPOLI C, D'ORIA R, et al. Adipose tissue inflammation and pulmonary dysfunction in obesity[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 7349. DOI: 10.3390/ijms23137349.
- [11] LAMKANFI M, KANNEGANTI T D. The inflammasome: a remote control for metabolic syndrome[J]. *Cell Res*, 2012, 22: 1095-1098.
- [12] SHI J J, ZHAO Y, WANG K, SHI X Y, WANG Y, HUANG H W, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death[J]. *Nature*, 2015, 526: 660-665.
- [13] KAYAGAKI N, STOWE I B, LEE B L, O'ROURKE K, ANDERSON K, WARMING S, et al. Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling[J]. *Nature*, 2015, 526: 666-671.
- [14] XIA S Y, ZHANG Z B, MAGUPALLI V G, PABLO J L, DONG Y, VORA S M, et al. Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1[J]. *Nature*, 2021, 593: 607-611.
- [15] XU B, JIANG M Z, CHU Y, WANG W J, CHEN D, LI X W, et al. Gasdermin D plays a key role as a pyroptosis executor of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice[J]. *J Hepatol*, 2018, 68: 773-782.
- [16] YAMAGISHI R, KAMACHI F, NAKAMURA M, YAMAZAKI S, KAMIYA T, TAKASUGI M, et al. Gasdermin D-mediated release of IL-33 from senescent hepatic stellate cells promotes obesity-associated hepatocellular carcinoma[J/OL]. *Sci Immunol*, 2022, 7: eabl7209. DOI: 10.1126/sciimmunol.abl7209.
- [17] NOZAKI K, MALTEZ V I, RAYAMAJHI M, TUBBS A L, MITCHELL J E, LACEY C A, et al. Caspase-7 activates ASM to repair gasdermin and perforin pores[J]. *Nature*, 2022, 606: 960-967.
- [18] DEGTEREV A, HUANG Z H, BOYCE M, LI Y Q, JAGTAP P, MIZUSHIMA N, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1: 112-119.
- [19] YUAN J Y, AMIN P, OFENGEIM D. Necroptosis and RIPK1-mediated neuroinflammation in CNS diseases[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2019, 20: 19-33.
- [20] PARK S, HATANPAA K J, XIE Y, MICKEY B E, MADDEN C J, RAISANEN J M, et al. The receptor interacting protein 1 inhibits p53 induction through NF-κB activation and confers a worse prognosis in glioblastoma[J]. *Cancer Res*, 2009, 69: 2809-2816.
- [21] LI J X, MCQUADE T, SIEMER A B, NAPETSCHNIG J, MORIWAKI K, HSIAO Y S, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis[J]. *Cell*, 2012, 150: 339-350.
- [22] SUN L M, WANG H Y, WANG Z G, HE S D, CHEN S, LIAO D H, et al. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of RIP3 kinase[J]. *Cell*, 2012, 148: 213-227.
- [23] LIEDTKE C, BANGEN J M, FREIMUTH J, BERAZA N, LAMBERTZ D, CUBERO F J, et al. Loss of caspase-8 protects mice against inflammation-related hepatocarcinogenesis but induces non-apoptotic liver injury[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141: 2176-2187.
- [24] KÜNSTLE G, HENTZE H, GERMAN P G, TIEGS G, MEERGANS T, WENDEL A. Concanavalin A hepatotoxicity in mice: tumor necrosis factor-mediated organ failure independent of caspase-3-like protease activation[J]. *Hepatology*, 1999, 30: 1241-1251.
- [25] LAWLOR K E, KHAN N, MILDENHALL A, GERLIC M, CROKER B A, D'CRUZ A A, et al. RIPK3 promotes cell death and NLRP3 inflammasome activation in the

- absence of MLKL[J/OL]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6282. DOI: 10.1038/ncomms7282.
- [26] AFONSO M B, RODRIGUES P M, MATEUS-PINHEIRO M, SIMÃO A L, GASPAR M M, MAJDI A, et al. RIPK3 acts as a lipid metabolism regulator contributing to inflammation and carcinogenesis in non-alcoholic fatty liver disease[J]. *Gut*, 2021, 70: 2359-2372.
- [27] GAUTHERON J, VUCUR M, REISINGER F, CARDENAS D V, RODERBURG C, KOPPE C, et al. A positive feedback loop between RIP3 and JNK controls non-alcoholic steatohepatitis[J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6: 1062-1074.
- [28] WU L, ZHANG X, ZHENG L, ZHAO H K, YAN G F, ZHANG Q, et al. RIPK3 orchestrates fatty acid metabolism in tumor-associated macrophages and hepatocarcinogenesis[J]. *Cancer Immunol Res*, 2020, 8: 710-721.
- [29] AFONSO M B, ISLAM T, MAGUSTO J, AMORIM R, LENOIR V, F SIMÕES R, et al. RIPK3 dampens mitochondrial bioenergetics and lipid droplet dynamics in metabolic liver disease[J/OL]. *Hepatology*, 2022. DOI: 10.1002/hep.32756.
- [30] MURPHY J M, CZABOTAR P E, HILDEBRAND J M, LUCET I S, ZHANG J G, ALVAREZ-DIAZ S, et al. The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism[J]. *Immunity*, 2013, 39: 443-453.
- [31] ZHUANG C L, CHEN F E. Small-molecule inhibitors of necroptosis: current status and perspectives[J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 1490-1510.
- [32] CHEN X, LI W J, REN J M, HUANG D L, HE W T, SONG Y L, et al. Translocation of mixed lineage kinase domain-like protein to plasma membrane leads to necrotic cell death[J]. *Cell Res*, 2014, 24: 105-121.
- [33] GALLUZZI L, KEPP O, CHAN F K M, KROEMER G. Necroptosis: mechanisms and relevance to disease[J]. *Annu Rev Pathol*, 2017, 12: 103-130.
- [34] WU J F, HUANG Z, REN J M, ZHANG Z R, HE P, LI Y X, et al. MLKL knockout mice demonstrate the indispensable role of MLKL in necroptosis[J]. *Cell Res*, 2013, 23: 994-1006.
- [35] GUO R, JIA X H, DING Z B, WANG G, JIANG M M, LI B, et al. Loss of MLKL ameliorates liver fibrosis by inhibiting hepatocyte necroptosis and hepatic stellate cell activation[J]. *Theranostics*, 2022, 12: 5220-5236.
- [36] UENO T, KOMATSU M. Autophagy in the liver: functions in health and disease[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14: 170-184.
- [37] WU X Q, NAGY L E. MLKL contributes to Western diet-induced liver injury through inhibiting autophagy[J]. *Autophagy*, 2020, 16: 1351-1352.
- [38] WU X Q, POULSEN K L, SANZ-GARCIA C, HUANG E, MCMULLEN M R, ROYCHOWDHURY S, et al. MLKL-dependent signaling regulates autophagic flux in a murine model of non-alcohol-associated fatty liver and steatohepatitis[J]. *J Hepatol*, 2020, 73: 616-627.
- [39] RAVICHANDRAN K S. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways[J]. *Immunity*, 2011, 35: 445-455.
- [40] PASPARAKIS M, VANDENABEELE P. Necroptosis and its role in inflammation[J]. *Nature*, 2015, 517: 311-320.
- [41] DIXON S J, LEMBERG K M, LAMPRECHT M R, SKOUTA R, ZAITSEV E M, GLEASON C E, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death[J]. *Cell*, 2012, 149: 1060-1072.
- [42] CHEN X, LI J B, KANG R, KLIONSKY D J, TANG D L. Ferroptosis: machinery and regulation[J]. *Autophagy*, 2021, 17: 2054-2081.
- [43] YAN B, AI Y W, SUN Q, MA Y, CAO Y, WANG J W, et al. Membrane damage during ferroptosis is caused by oxidation of phospholipids catalyzed by the oxidoreductases POR and CYB5R1[J/OL]. *Mol Cell*, 2021, 81: 355-369.e10. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.11.024.
- [44] JIANG X J, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 266-282.
- [45] BERSUKER K, HENDRICKS J M, LI Z P, MAGTANONG L, FORD B, TANG P H, et al. The CoQ oxidoreductase FSP1 acts parallel to GPX4 to inhibit ferroptosis[J]. *Nature*, 2019, 575: 688-692.
- [46] STOCKWELL B R. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications[J]. *Cell*, 2022, 185: 2401-2421.
- [47] KRAFT V A N, BEZJIAN C T, PFEIFFER S, RINGELSTETTER L, MÜLLER C, ZANDKARIMI F, et al. GTP cyclohydrolase 1/tetrahydrobiopterin counteract ferroptosis through lipid remodeling[J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6: 41-53.
- [48] ZHANG X J, JI Y X, CHENG X, CHENG Y J, YANG H L, WANG J Y, et al. A small molecule targeting ALOX12-ACC1 ameliorates nonalcoholic steatohepatitis in mice and macaques[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2021, 13: eabg8116. DOI: 10.1126/scitranslmed.abg8116.
- [49] HEINRICH L, BOOIJINK R, KHURANA A, WEISKIRCHEN R, BANSAL R. Lipoygenases in chronic liver diseases: current insights and future perspectives[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43: 188-205.
- [50] LEI G, ZHUANG L, GAN B Y. Targeting ferroptosis as a vulnerability in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2022, 22: 381-396.



- [51] GAO H, JIN Z M, BANDYOPADHYAY G, WANG G W, ZHANG D H, ROCHA K C E, et al. Aberrant iron distribution via hepatocyte-stellate cell axis drives liver lipogenesis and fibrosis[J/OL]. *Cell Metab*, 2022, 34: 1201-1213.e5. DOI: 10.1016/j.cmet.2022.07.006.
- [52] YU Y Y, JIANG L, WANG H, SHEN Z, CHENG Q, ZHANG P, et al. Hepatic transferrin plays a role in systemic iron homeostasis and liver ferroptosis[J]. *Blood*, 2020, 136: 726-739.
- [53] PROTCHENKO O, BARATZ E, JADHAV S, LI F M, SHAKOURY-ELIZEH M, GAVRILOVA O, et al. Iron chaperone poly rC binding protein 1 protects mouse liver from lipid peroxidation and steatosis[J]. *Hepatology*, 2021, 73: 1176-1193.
- [54] CORRADINI E, BUZZETTI E, DONGIOVANNI P, SCARLINI S, CALEFFI A, PELUSI S, et al. Ceruloplasmin gene variants are associated with hyperferritinemia and increased liver iron in patients with NAFLD[J]. *J Hepatol*, 2021, 75: 506-513.
- [55] LI L H, WANG K P, JIA R J, XIE J, MA L M, HAO Z Q, et al. Ferroportin-dependent ferroptosis induced by ellagic acid retards liver fibrosis by impairing the SNARE complexes formation[J/OL]. *Redox Biol*, 2022, 56: 102435. DOI: 10.1016/j.redox.2022.102435.
- [56] LI H, YU Y, LIU Y, LUO Z H, LAW B Y K, ZHENG Y, et al. Ursolic acid enhances the antitumor effects of sorafenib associated with Mcl-1-related apoptosis and SLC7A11-dependent ferroptosis in human cancer[J/OL]. *Pharmacol Res*, 2022, 182: 106306. DOI: 10.1016/j.phrs.2022.106306.
- [57] LU Y J, CHAN Y T, TAN H Y, ZHANG C, GUO W, XU Y, et al. Epigenetic regulation of ferroptosis via ETS1/miR-23a-3p/ACSL4 axis mediates sorafenib resistance in human hepatocellular carcinoma[J/OL]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41: 3. DOI: 10.1186/s13046-021-02208-x.
- [58] GAO R Z, KALATHUR R K R, COTO-LLERENA M, ERCAN C E, BUECHEL D, SHUANG S, et al. YAP/TAZ and ATF4 drive resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma by preventing ferroptosis[J/OL]. *EMBO Mol Med*, 2021, 13: e14351. DOI: 10.15252/emmm.202114351.
- [59] TONG J, LI D J, MENG H B, SUN D Y, LAN X T, NI M, et al. Targeting a novel inducible GPX4 alternative isoform to alleviate ferroptosis and treat metabolic-associated fatty liver disease[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12: 3650-3666.
- [60] TONG J, LAN X T, ZHANG Z, LIU Y, SUN D Y, WANG X J, et al. Ferroptosis inhibitor liproxstatin-1 alleviates metabolic dysfunction-associated fatty liver disease in mice: potential involvement of PANoptosis[J/OL]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44: 1014-1028. DOI: 10.1038/s41401-022-01010-5.
- [61] GAUTHERON J, GORES G J, RODRIGUES C M P. Lytic cell death in metabolic liver disease[J]. *J Hepatol*, 2020, 73: 394-408.

[本文编辑] 孙岩