

靶向 Nrf2-铁死亡通路抑制脑出血后继发性脑损伤研究进展

侯建辉(综述),李强*(审校)

(赤峰学院附属医院神经内科,内蒙古赤峰 024005)

[摘要] 脑出血后继发性脑损伤(secondary brain injury after ICH, SBI-ICH)导致神经元的不可逆损伤。近年研究表明,铁死亡可以介导脑出血后神经元死亡的病理过程,而抑制铁死亡能够有效地减少 SBI-ICH。而激活核因子-红系 2 相关因子 2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)对控制铁死亡途径的许多关键成分抑制铁死亡。现总结了铁死亡参与 SBI-ICH 的发病机制,并总结了药物通过激活 Nrf2 抑制铁死亡在治疗 SBI-ICH 方面的应用研究进展,为靶向干预铁死亡治疗和防治 SBI-ICH 提供参考依据,为药物研发提供新思路。

[关键词] 脑出血后继发性脑损伤;脑出血;铁死亡 doi:10.3969/j.issn.1007-3205.2024.09.009

[中图分类号] R741.05 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-3205(2024)09-1037-04

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)是出血性脑卒中的亚型,占出血性卒中的 80%, 占有类型卒中的 10%~15%^[1]。ICH 后可导致脑出血后的继发性损伤(secondary brain injury after ICH, SBI-ICH),从而介导 ICH 不良预后,尚缺乏有效治疗手段。研究^[2]表明,铁依赖性脂质过氧化驱动的细胞死亡,即铁死亡(Ferroptosis)参与了 SBI-ICH 的病理过程。研究^[3]显示,在动物模型中,抑制铁死亡可以有效地减弱神经元损伤的发生,从而减轻 SBI-ICH。而激活转录因子 NF-E2 相关因子 2(nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2)调控铁死亡途径的许多关键成分,进而抑制铁死亡发生。现综述了铁死亡参与 SBI-ICH 的发病机制,并总结了通过激活 Nrf2 抑制铁死亡的药物在治疗 SBI-ICH 方面的应用研究进展。

1 铁死亡

铁死亡是在 2012 年提出的一种铁依赖的、脂质过氧化驱动的新型的细胞程序性死亡方式^[2]。铁死亡的关键特征包括细胞内铁稳态失衡、抗氧化防御

体系的丧失和膜脂质过氧化 3 个过程^[4-5]。铁死亡的诱导需要 2 个关键信号,即游离铁的积累和溶质载体家族 7 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)/谷胱甘肽(glutathione, GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗氧化系统的抑制^[6]。GPX4 主要利用细胞膜上的氨基酸转运体(System Xc⁻)转运进入细胞内的 GSH 将脂质过氧化物还原为相应的醇或水,对抗细胞的氧化应激完成脂质过氧化的修复。System Xc⁻由 SLC7A11 和溶质载体家族 3 成员 2(solute carrier family 3 member 2, SLC3A2)组成, SLC7A11 又叫 xCT 是催化亚基,其主要负责转运活性,而 SLC3A2 作为伴侣蛋白。铁死亡过程中的过氧化底物多不饱和脂肪酸磷脂(polyunsaturated fatty acid-containing phospholipids, PL-PUFAs)的形成是诱发铁死亡的关键驱动因素,酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4(acyl coenzyme A synthetase long-chain family member 4, ACSL4)和溶血卵磷脂酰基转移酶 3(lysophosphatidylcholine acyltransferase 3, LPCAT3)促进 PUFA 与磷脂结合,形成 PL-PUFAs。一旦 PL-PUFAs 被整合到膜环境中,依赖铁的酶和动态铁(labile iron)利用分子氧(O₂)对 PL-PUFAs 进行过氧化反应,生成过氧化 PL-PUFAs(PL-PUFA-OOH)。能驱动铁死亡铁依赖的酶包括脂氧合酶(lipoxygenases, ALOX)和细胞色素 P450 氧化还原酶(cytochrome P450 oxidoreductase, POR)^[7]。以上过程导致脂质过氧化物的积累,脂质过氧化或其二级产物,如 4-羟基

[收稿日期]2023-07-10

[基金项目]内蒙古自然科学基金项目(2022MS08046);内蒙古人类遗传病研究自治区高等学校重点实验室开放课题(YC202305, YC202304)

[作者简介]侯建辉(1985-),女,内蒙古赤峰人,赤峰学院附属医院主管护师,医学学士,从事神经内科疾病护理研究。

* 通信作者。E-mail:liqiang1980_1981@126.com

壬烯醛(4-Hydroxynonenal, 4-HNE)和丙二醛(malonaldehyde, MDA)直接或间接诱导细胞膜上的孔隙形成,进而启动铁死亡,最终引发细胞死亡。

2 Nrf2 调控铁死亡

Nrf2 通路是机体中重要抗氧化反应通路。在生理条件下, Nrf2 主要定位于细胞质内,与 Nrf2 上游调控因子 Kelch 样环氧丙烷相关蛋白 1(kelch-like ECH-associated protein 1, KEAP1)结合,经泛素蛋白酶途径降解,使 Nrf2 维持在基础水平^[8]。当受到过多的氧化刺激时, Nrf2 从 KEAP1 中解放出来,转运到细胞核,与抗氧化和细胞保护蛋白抗氧化反应元件(anti-oxidant response element, ARE)序列结合,启动 ARE 控制的抗氧化酶基因的转录。Nrf2 调控铁死亡代谢途径的关键酶,包括调节 GSH 合成的酶,如 SLC7A11 和 GPX4;铁代谢基因,如转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, TfR1)、膜铁转运蛋白(ferroportin, FPN)、血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)和铁蛋白;抗氧化防御系统基因表达,如铁死亡抑制蛋白 1(Ferroptosis suppressor protein 1, FSP1)。因此, Nrf2 是脂质过氧化和铁死亡的关键调节因子,上调 Nrf2 能够抑制铁死亡。推断与脂质过氧化增加和铁死亡相关的疾病可能是 Nrf2 信号异常的结果^[9-11]。

3 铁死亡参与脑出血后神经损伤发病机制

2017 年的研究^[12]首次显示脑出血后神经元存在铁死亡通路的激活。后续研究^[13-14]证实了铁死亡在脑出血后神经元损伤中的作用,主要通过诱导神经毒素释放和氧化应激反应来参与脑出血发病机制。ICH 后,血液中血红蛋白释放的铁会产生大量的活性氧,导致神经细胞氧化应激和继发性脑损伤。临床前和临床研究的证据表明, ICH 后血肿释放的毒素可能会导致脑出血后的脑损伤。具体机制为,在机体发生 ICH 后,溶解的红细胞释放血红蛋白,血红蛋白可被血肿周围区域活化的小胶质细胞和巨噬细胞所吞噬,释放亚铁(Fe^{2+}),随后转运出小胶质细胞和巨噬细胞的 Fe^{2+} ,通过转铁蛋白-转铁蛋白受体系统进入神经元,而这些在神经元中积累的过量 Fe^{2+} ,通过芬顿反应生成羟基自由基,攻击 DNA、蛋白质和脂膜,从而诱导活性氧的产生和脂质过氧化的发生。因此,降低血红蛋白/铁诱导的毒性可能是 ICH 的潜在治疗方法。在器官型海马切片培养模型中,铁死亡特异性抑制剂铁抑素 1

(Ferrostatin-1, Fer-1)可防止神经元死亡,并减少血红蛋白诱导的铁沉积, ICH 后服用 Fer-1 的小鼠表现出明显的脑保护和神经功能改善^[12]。ICH 后铁死亡导致神经元死亡,服用 Fer-1 能够减轻出血性脑损伤,而另有研究^[12]显示环氧合酶 2(Cyclooxygenase-2, COX-2)可能是铁死亡的生物标志物。研究^[15]表明,在 ICH 细胞模型和 ICH 人脑组织中,铁死亡相关基因表达是上调的。ICH 急性期存在铁死亡,即使远离血肿中心的神经元也存在铁死亡^[15]。Fer-1 在体外和体内降低了脂质活性氧的产生,并减弱了前列腺素内过氧化物合酶 2(prostaglandin endoperoxide synthase 2, PTGS2)基因及其编码产物 COX-2 表达水平的增加。膜铁转运蛋白 1(ferroportin 1, FPN1)是一种铁外排转运体,是迄今为止唯一确定的哺乳动物铁输出转运蛋白, FPN1 在老年 ICH 患者和小鼠模型的出血脑组织中显著上调,而 FPN1 基因敲除后可显著恶化 ICH 后的症状,而过表达 FPN1 的病毒预处理的老龄小鼠显示出这些症状的显著改善,表明上调 FPN1 能够抑制脑出血后铁死亡的发生^[16]。氧化低密度脂蛋白受体 1(oxidized low-density lipoprotein receptor 1, OLR1),也称为凝集素样氧化低密度脂蛋白受体 1,是 C 型凝集素家族的膜蛋白受体,其在 ICH 血肿中表达增高^[17],在大鼠脑出血模型中, OLR1 敲低后减轻了脑出血大鼠的神经损伤,减少了大鼠脑组织中的血肿体积、神经元的丢失及炎症反应和氧化应激。 OLR1 的沉默通过上调 GPX4、FTH1 和下调 COX-2 抑制铁死亡。脑出血后鞘氨醇激酶 1(sphingosine kinase 1, Sphk1)表达上调^[18]。 Sphk1 是一种调节铁死亡途径中鞘氨醇代谢的关键酶。在体内和体外 ICH 模型中,抑制 Sphk1 能够减弱 ICH 诱导的 Sphk1 上调和铁死亡,进而减轻继发性脑损伤和神经细胞死亡,这项研究^[18]也进一步证实了铁死亡与 ICH 密切相关,而 Sphk1 在这一致死过程中起着关键作用,这为脑出血的预防和治疗提供了一种独特而有效的治疗方法和方向。因此,可以判定铁死亡是 ICH 后神经元损伤的重要发病机制,并且可能是通过铁死亡相关基因表达的改变来进行参与的。

4 激活 Nrf2 抑制铁死亡从而减弱脑出血后继发性脑损伤

上调 Nrf2 能够抑制铁死亡。近年来通过激活 Nrf2 抑制脑出血后继发性脑损伤取得了一定进展。醉茄素 A(Withaferin A, WFA)是一种天然化合物,

对许多神经系统疾病具有神经保护作用。在尾状核注射自体尾动脉血建立的小鼠 ICH 模型中, WFA 显著降低丙二醛的水平, 并增加了抗氧化应激标志物超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性。WFA 激活 Nrf2/HO-1 信号通路, 促进了 Nrf2 从细胞质向细胞核的易位, 并增加了 HO-1 的表达^[19]。在血红素诱导的 SH-SY5Y 细胞中, WFA 可抑制 SH-SY5Y 细胞损伤, 同时降低丙二醛的水平, 并增加超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性^[19]。WFA 激活了 Nrf2 进而促进 HO-1 表达, 沉默 Nrf2 完全逆转了 HO-1 的表达、氧化应激和 WFA 的保护作用, 这表明 WFA 通过激活 Nrf2 抑制脑出血损伤。WFA 联合 Fer-1 可减少血红素诱导的 SH-SY5Y 神经元细胞损伤, 表明 WFA 通过激活 Nrf2 进而抑制铁死亡^[19]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 是核激素受体家族中的一种配体激活受体, 与 Nrf2 协同作用, 促进相关基因的表达并抑制铁死亡。血红素诱导的原代大鼠海马神经元中, PPAR γ 激动剂吡格列酮 (pioglitazone, PDZ) 激活 PPAR γ 、Nrf2 和 GPX4, 进而抑制神经元铁死亡发生, 而在纹状体自体血注射的 ICH 大鼠中, PDZ 通过抑制铁死亡促进大鼠神经功能的恢复, 而 Nrf2 抑制剂 ML385 逆转 PDZ 对大鼠的神经保护

作用^[20]。表明 PDZ 通过激活 Nrf2 进而抑制铁死亡, 抑制 ICH 后神经损伤, 从而改善神经功能。藏红花素 (Crocin) 是从番红花中分离得到的主要化合物, 对脑出血等多种疾病具有潜在治疗作用。研究^[21]表明, 藏红花素通过激活 Nrf2 减轻脑出血后神经元铁死亡。在小鼠尾壳核自体血注射脑出血模型中, 藏红花素能够减轻脑出血引起的脑水肿和神经功能缺损, 增加脑组织 SOD 和 GSH-PX 活性, 而 MDA 含量和 Fe²⁺ 浓度, 增加 GPX4、FTH1 和 SLC7A11 的表达, 表明其具有抑制神经元细胞的铁死亡作用^[21]。进一步研究^[21]显示藏红花素激活 Nrf2, 表明藏红花素通过激活 Nrf2 进而抑制铁死亡, 减轻脑出血后继发性脑损伤。(一)-表儿茶素没食子酸酯 [(一)-Epicatechin, EC] 降低脑出血小鼠的病变体积, 并降低血肿周围区域的细胞死亡和神经元变性, 从而改善了神经功能缺损^[22]。这与其激活 Nrf2 有关。同时 EC 还减少了 HO-1 表达和抑制脑铁沉积, 进而抑制铁依赖性细胞死亡和铁死亡相关基因表达。表明 EC 通过激活 Nrf2 进而抑制铁死亡, 从而发挥对脑出血损伤的抑制作用^[22]。因此, 药物通过激活 Nrf2 抑制铁死亡, 能够在 ICH 体内外模型中减轻脑出血后继发性脑损伤, 进而改善神经缺损症状, 达到治疗脑出血后继发性脑损伤的作用。见表 1。

表 1 通过激活 Nrf2 抑制铁死亡减轻脑出血后继发性脑损伤的化合物作用机制总结

化合物	实验模型	药理作用	作用机制	参考文献
醉茄素 A	小鼠尾壳核自体血注射	↓ 脑组织损伤; ↑ 神经功能; ↓ 铁沉积; ↓ 丙二醛; ↑ 超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶 4; ↑ 转录因子 NFE2 相关因子 2/血红素加氧酶 1	转录因子 NFE2 相关因子 2/谷胱甘肽过氧化物酶 4	[19]
醉茄素 A	血红素处理 SH-SY5Y 细胞	↓ 细胞损伤; ↓ 丙二醛; ↑ 超氧化物歧化酶; ↑ 谷胱甘肽过氧化物酶 4; ↑ 转录因子 NFE2 相关因子 2	转录因子 NFE2 相关因子 2/谷胱甘肽过氧化物酶 4	[19]
吡格列酮	大鼠尾壳核自体血注射	↑ 血肿清除; ↓ 脑水肿; ↑ 恢复神经功能; ↑ 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 、转录因子 NFE2 相关因子 2 和谷胱甘肽过氧化物酶 4	转录因子 NFE2 相关因子 2/谷胱甘肽过氧化物酶 4	[20]
吡格列酮	血红素处理大鼠原代海马神经元	↑ 神经元存活; ↓ 丙二醛; ↓ 4-羟基壬烯醛; ↑ 谷胱甘肽; ↑ 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 、转录因子 NFE2 相关因子 2 和谷胱甘肽过氧化物酶 4	转录因子 NFE2 相关因子 2/谷胱甘肽过氧化物酶 4	[20]
藏花素	小鼠尾壳核自体血注射	↓ 脑水肿和神经功能障碍; ↑ 超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶; ↓ 丙二醛; ↓ 二价铁; ↑ 谷胱甘肽过氧化物酶 4; ↑ 铁蛋白重链; ↑ 溶质载体家族 7 成员 11; ↑ 转录因子 NFE2 相关因子 2	转录因子 NFE2 相关因子 2/溶质载体家族 7 成员 11/谷胱甘肽过氧化物酶 4	[21]
(一)-表儿茶素没食子酸酯	胶原酶诱导的小鼠脑出血模型	↓ 脑损伤量; ↑ 神经功能; ↓ 丙二醛; ↓ 氧化损伤; ↑ 超氧化物歧化酶; ↓ 出血半球血红素加氧酶 1; ↓ 二价铁; 脂运载蛋白 2	转录因子 NFE2 相关因子 2	[22]

5 总结与展望

综上所述,铁死亡参与 ICH 后神经元损伤的发病机制。但其具体致病机制的研究还处于初级阶段,对铁死亡的各个通路在 ICH 中的病理机制的揭示尚不透彻,这也是未来的研究方向。另外,在针对激活 Nrf2 抑制铁死亡治疗 ICH 方面的探索,目前尚处于起步阶段,而且大多数研究只是通过细胞模型或动物模型进行简单探讨抑制铁死亡的效应观察,还缺乏足够的、有深度的机制探讨。再次,应该进行更多的临床试验来检验铁死亡抑制剂的效果,这是很有希望的防治策略,值得进一步开发和验证。总之,未来继续深入研究铁死亡在 ICH 中的作用机制和激活 Nrf2 抗铁死亡治疗的药物值得热切期待,这也是 SBI-ICH 防治的巨大空间。

[参考文献]

- [1] Donkor ES. Stroke in the 21(st) century: a snapshot of the burden, epidemiology, and quality of life [J]. *Stroke Res Treat*, 2018, 2018: 3238165.
- [2] Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401-2421.
- [3] Yu Y, Yan Y, Niu F, et al. Ferroptosis: a cell death connecting oxidative stress, inflammation and cardiovascular diseases [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 193.
- [4] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-1072.
- [5] Wang Y, Wu X, Ren Z, et al. Overcoming cancer chemotherapy resistance by the induction of ferroptosis [J]. *Drug Resist Updat*, 2023, 66: 100916.
- [6] Chen X, Kang R, Kroemer G, et al. Ferroptosis in infection, inflammation, and immunity [J]. *J Exp Med*, 2021, 218(6): e20210518.
- [7] Zou Y, Li H, Graham ET, et al. Cytochrome P450 oxidoreductase contributes to phospholipid peroxidation in ferroptosis [J]. *Nat Chem Biol*, 2020, 16(3): 302-309.
- [8] Cuadrado A, Rojo AI, Wells G, et al. Therapeutic targeting of the NRF2 and KEAP1 partnership in chronic diseases [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18(4): 295-317.
- [9] Kajarabille N, Latunde-Dada GO. Programmed cell-death by ferroptosis: antioxidants as mitigators [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19): 4968.
- [10] Dodson M, Castro-Portuguez R, Zhang DD. NRF2 plays a critical role in mitigating lipid peroxidation and ferroptosis [J]. *Redox Biol*, 2019, 23: 101107.
- [11] Qu Z, Sun J, Zhang W, et al. Transcription factor NRF2 as a promising therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 159: 87-102.
- [12] Li Q, Han X, Lan X, et al. Inhibition of neuronal ferroptosis protects hemorrhagic brain [J]. *JCI Insight*, 2017, 2(7): e90777.
- [13] Zille M, Karuppagounder SS, Chen Y, et al. Neuronal death after hemorrhagic stroke in vitro and in vivo shares features of ferroptosis and necroptosis [J]. *Stroke*, 2017, 48(4): 1033-1043.
- [14] 陈越, 伍国锋, 任思颖. 脑出血后神经细胞铁死亡的研究进展 [J]. *中华神经医学杂志*, 2022, 21(1): 87-91.
- [15] Chen B, Chen Z, Liu M, et al. Inhibition of neuronal ferroptosis in the acute phase of intracerebral hemorrhage shows long-term cerebroprotective effects [J]. *Brain Res Bull*, 2019, 153: 122-132.
- [16] Bao WD, Zhou XT, Zhou LT, et al. Targeting miR-124/ Ferroportin signaling ameliorated neuronal cell death through inhibiting apoptosis and ferroptosis in aged intracerebral hemorrhage murine model [J]. *Aging Cell*, 2020, 19(11): e13235.
- [17] Inoue T, Ishida T, Inoue T, et al. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 levels as a biomarker of acute intracerebral hemorrhage [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2019, 28(2): 490-494.
- [18] Diao X, Cui Q, Tian N, et al. Hemorrhage-induced sphingosine kinase 1 contributes to ferroptosis-mediated secondary brain injury in intracerebral hemorrhage [J]. *Mol Neurobiol*, 2022, 59(3): 1381-1397.
- [19] Zhou ZX, Cui Q, Zhang YM, et al. Withaferin A inhibits ferroptosis and protects against intracerebral hemorrhage [J]. *Neural Regen Res*, 2023, 18(6): 1308-1315.
- [20] Duan C, Jiao D, Wang H, et al. Activation of the PPAR γ prevents ferroptosis-induced neuronal loss in response to intracerebral hemorrhage through synergistic actions with the Nrf2 [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 869300.
- [21] Wang F, Li WL, Shen LJ, et al. Crocin alleviates intracerebral hemorrhage-induced neuronal ferroptosis by facilitating Nrf2 Nuclear translocation [J]. *Neurotox Res*, 2022, 40(2): 596-604.
- [22] Chang CF, Cho S, Wang J. (–)- Epicatechin protects hemorrhagic brain via synergistic Nrf2 pathways [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2014, 1(4): 258-271.

(本文编辑:何祯)