

刘玉倩,杨雯茜,王海涛. GSH/GPx4 介导的铁死亡通路在有氧运动预防自然衰老小鼠模型肝过氧化损伤中的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(12): 1581-1587.

Liu YQ, Yang WQ, Wang HT. Role of the ferroptosis pathway mediated by GSH/GPx4 in preventing hepatocyte peroxidative injury following aerobic exercise in an elderly mouse model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(12): 1581-1587.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.008

GSH/GPx4 介导的铁死亡通路在有氧运动预防自然衰老小鼠模型肝过氧化损伤中的作用

刘玉倩^{1,2}, 杨雯茜^{2,3}, 王海涛^{1,2*}

(1. 岭南师范学院运动与健康研究所, 广东 湛江 524048; 2. 岭南师范学院体育科学学院, 广东 湛江 524048; 3. 华南师范大学体育科学学院, 广州 510631)

【摘要】 目的 阐明谷胱甘肽 (glutathione, GSH)/谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPx4) 介导的铁死亡 (ferroptosis) 通路在有氧运动预防小鼠增龄性肝细胞过氧化损伤中的作用机制, 为运动改善肝衰老和糖脂代谢紊乱提供新的作用靶点。**方法** 52 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 20 只, 随机分为老年对照组 (EC 组) 和老年运动组 (EE 组), 每组 10 只。16 周递增负荷中等强度运动 (1 ~ 2 周 14 m/min, 3 ~ 4 周 15 m/min, 5 ~ 10 周 16 m/min, 11 ~ 16 周 17 m/min, 每天 60 min, 坡度为 0°)。升主动脉灌流后, 取肝外侧叶制作 HE 切片和超薄透射电镜切片。ELISA 检测肝线粒体 8-羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2 deoxyguanosine, 8-OHdG)、白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、4-羟基壬烯醛 (4-hydroxynonenal, 4-HNE)。比色法测定肝糖原、甘油三酯 (triglyceride, TG)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、肝非血红素铁 (non-heme iron)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)、GSH。Western Blot 检测肝 GPx4、醌氧化还原酶 1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2 (NADPH oxidase 2, NOX2)、溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier protein 7 family member 11, SLC7A11) 表达量。**结果** (1) 有氧运动可有效延缓老年小鼠随年龄增长的肝细胞过氧化损伤, 保持肝细胞线粒体正常结构和糖原储备量。(2) 与 EC 组相比, EE 组小鼠肝 GSH 和 NADPH 显著增加 ($P < 0.01$)。(3) 与 EC 组相比, EE 组小鼠肝线粒体 8-OHdG 和 4-HNE、MDA、铁含量和血清炎症因子 IL-6 含量显著下降 ($P < 0.01$)。(4) 运动增加肝 GPx4、NQO1、SLC7A11 表达量 ($P < 0.01$), 降低 NOX2 表达量 ($P < 0.01$)。**结论** 有氧运动通过 SLC7A11 增加 GSH 合成, 为 GPx4 提供充足的反应底物, 激活 GSH/GPx4 通路, 抑制铁死亡进程, 改善增龄引发的肝细胞过氧化损伤, 维持肝细胞正常结构与生理功能。

【关键词】 谷胱甘肽; 谷胱甘肽过氧化物酶 4; 有氧运动; 铁死亡; 衰老小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2023) 12-1581-07

Role of the ferroptosis pathway mediated by GSH/GPx4 in preventing hepatocyte peroxidative injury following aerobic exercise in an elderly mouse model

LIU Yuqian^{1,2}, YANG Wenqian^{2,3}, WANG Haitao^{1,2*}

【基金项目】 岭南师范学院人才专项 (ZL2008, ZL2009), 湛江市科技局项目 (2022B01077, 2023B01168)。
Funded by Talent Introduction Special Funds of Lingnan Normal University Presented (ZL2008, ZL2009), Zhanjiang City Science and Technology Research Program (2022B01077, 2023B01168)。
【作者简介】 刘玉倩 (1973—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 运动与铁代谢紊乱相关疾病防治。Email: yuqianht@126.com
【通信作者】 王海涛 (1973—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 运动与健康促进。Email: wanght@lingnan.edu.cn

(1. Institute of Exercise and Health Promotion, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048, China. 2. School of Physical Education and Sports Science, Lingnan Normal University, Zhanjiang 524048. 3. School of Physical Education and Sports Science, South China Normal University, Guangzhou 510631)

Corresponding author: WANG Haitao. E-mail: wanght@lingnan.edu.cn

【Abstract】 Objective To elucidate the role of the glutathione (GSH)/glutathione peroxidase 4 (GPx4)-mediated ferroptosis pathway in preventing age-related hepatocyte peroxidation injury following aerobic exercise in mice, and to provide a new target for improving liver aging and metabolism disorders. **Methods** Twenty specific-pathogen-free C57BL/6 male mice aged 52 weeks were divided randomly into an elderly control group (EC group) and elderly exercise group (EE group) ($n = 10$ per group). The mice performed moderate-intensity exercise with incremental loads (1 ~ 2 weeks 14 m/min, 3 ~ 4 weeks 15 m/min, 5 ~ 10 weeks 16 m/min, 11 ~ 16 weeks 17 m/min, 60 min/day, slope 0°) for 16 weeks. After perfusion of the ascending aorta, the lateral liver lobes were harvested and sectioned for hematoxylin and eosin staining and ultrathin sections were used for transmission electron microscopy. Levels of 8-hydroxy-2 deoxyguanosine (8-OHdG) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) in the liver and serum interleukin-6 (IL-6) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Hepatic glycogen, triglycerides (TG), malondialdehyde (MDA), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), and GSH were determined by colorimetry. Hepatic GPx4, glucose transporter (GLUT2), NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1), and solute carrier protein 7 family member 11 (SLC7A11) were detected by Western Blot. **Results** (1) Oxidative damage to hepatocytes was effectively delayed, normal mitochondrial structure and glycogen storage in hepatocytes were maintained. (2) Hepatic GSH and NADPH contents were significantly increased in EE mice compared with EC mice ($P < 0.01$). (3) In addition, liver levels of 8-OHdG, 4-HNE, MDA, and non-heme iron were significantly decreased in the EE group compared with the EC group ($P < 0.01$). (4) Expression levels of GPx4, NQO1, and SLC7A11 in the liver were increased ($P < 0.01$) while NOX2 expression was decreased ($P < 0.01$) in the EE group compared with the EC group. **Conclusions** GSH synthesis was increased in aged mice following aerobic exercise, providing reaction substrates for GPx4 and activating the GSH/GPx4 pathway. Ferroptosis was inhibited, thus improving hepatocyte peroxidation damage caused by aging, and maintaining the normal structure and physiological function of hepatocytes.

【Keywords】 glutathione; glutathione peroxidase 4; aerobic exercise; ferroptosis; elderly mice model

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

铁死亡 (ferroptosis) 特指一种铁依赖的非凋亡性细胞死亡, 主要以脂质过氧化为特征^[1]。自 2012 年首次提出铁死亡概念^[2], 近 10 年来, 关于铁死亡通路的调控在过氧化损伤所致相关疾病防治中的作用已成为新的研究热点^[3]。过量铁累积产生的 Fenton 反应是 ROS 的主要来源, 也是引发铁死亡的主要机制。肝细胞是铁在体内储存的主要场所 (13 ~ 15 mg/g), 肝也是机体糖、脂代谢的枢纽。因此, 肝细胞更易遭受过量铁引发的铁死亡, 出现过氧化损伤, 破坏物质代谢平衡, 加速衰老进程^[4]。谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 通过为谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPx4) 提供反应底物而在抑制铁死亡中起重要作用。GPx4 以 GSH 为辅因子将脂质氢过氧化物 (R-OOH) 转化为脂质醇 (R-OH) 而防止铁死亡^[5]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 是 GSH 的辅酶, 有助于维持细胞内 GSH 水平^[6]。溶质载体家族 7 成员 11 (solute carrier protein

7, family member 11, SLC7A11) 可为细胞提供半胱氨酸用于合成 GSH^[7]。肝既是机体最大的实质器官, 也是在衰老进程中最易受累的器官之一。以铁死亡通路为干预靶点, 可能是许多肝代谢类疾病防治的新思路^[8]。有氧运动在维持机体物质代谢平衡和防治器官衰老中的过氧化损伤发挥重要的作用^[9]。但运动是否会影响自然衰老进程中肝细胞因铁死亡而引发的过氧损伤还缺少充足的实验证据。因此, 本实验通过对自然衰老进程中的小鼠进行长期的有氧运动, 观察 GSH/GPx4 调控的铁死亡通路的变化, 为运动预防增龄引发的器官功能衰退提供实验依据, 也为相关疾病预防提供新的作用靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 52 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 健康小鼠, 体重 30.65 ± 3.27 g, 购于广东省医学实验动物中

心【SCXK(粤)2018-0002】，基础饲料(AIN-93G)购自广东省医学实验动物中心(粤饲证(2019)05073)。饲养环境:自然光照,自由饮水,饲养温度20~25℃,湿度50%~70%,饲养于华南师范大学体育科学学院。所有动物实验均经华南师范大学体育科学学院科研伦理小组委员会批准(SCNU-SPT-2019-002)。

1.1.2 主要试剂与仪器

ELISA 试剂盒:8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG)(上海生工);白介素6(interleukin-6, IL-6)、4-羟基壬烯醛(4-Hydroxynonenal, 4-HNE)(南京建成)。生化试剂盒:肝糖原试剂盒、甘油三酯(triglyceride, TG)、肝非血红素铁(non-heme iron)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)、GSH 测试盒(南京建成),NADPH 测试盒(Beyotime)。兔抗小鼠抗体:NOX2(Abcam ab131088),NQO1(Abcam, ab80588),GPx4(Abcam, ab125066),SLC7A11(Thermo, MA5-35360)。3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)为内参(GAPDH 兔多克隆抗体),羊抗兔 IgG/HRP(二抗,YJ0189 艺佳生物)。线粒体分离试剂盒(Beyotime)。

超声细胞破碎仪(上海天呈科技有限公司), Synergy H4 多功能酶标仪(Thermo scientific),电泳和转膜系统(Bio-Rad),PVDF 膜(Bio-Rad, Immun-Blot),光学显微镜(Leica DM1000 徕卡显微系统(上海)有限公司),透射电子显微镜(JEM-1400HC 日本电子)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

小鼠随机分为对照组(EC组)和老年运动组(EE组),每组10只。实验室适应运动1周后,小鼠进行16周中等强度递增负荷运动(1~2周14 m/min, 3~4周15 m/min, 5~10周16 m/min, 11~16周17 m/min,每天60 min,坡度为0°,大约相当于70%~75%最大摄氧量)^[10]。所有动物运动干预前均无跑台运动史。小鼠取材时为69周龄,大约相当于人的65岁。

1.2.2 动物取材

用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠。小鼠麻醉后,取血,室温静置30 min后,4℃,3000 r/min 离心10 min,取血清并分装后置于-80℃冰箱备用。升主动脉冷0.9% NaCl 灌流后,于冰盘

上取肝左外侧叶,0.9% NaCl 清洗后滤纸吸去水分,投入液氮冷冻,分装后储存于-80℃冰箱备用。另取肝左外侧叶组织0.5 cm × 0.5 cm × 1 cm 投入4%多聚甲醛置于4℃冰箱备用。

1.2.3 肝细胞组织结构观察

取4%多聚甲醛固定的肝组织进行梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋后制作石蜡切片(6 μm),HE 染色后光学显微镜下10 × 40 倍镜下观察肝组织形态变化。取2 mm × 2 mm 小块于2.5%戊二醛+4%多聚甲醛溶液中4℃固定,1%锇酸过夜后,梯度乙醇脱水后环氧丙烷逐步置换乙醇,Spurr 树脂浸透后环氧树脂包埋固化,制作超薄电镜切片。透射电镜拍片,观察线粒体膜、细胞器膜变化。

1.2.4 生化指标检测

采用线粒体分离试剂盒差速离心获得肝组织线粒体^[11]。ELISA 法测定肝线粒体8-OHdG,4-HNE 波长450 nm 检测吸光值。比色法测定肝糖原,620 nm 测吸光值。TG 波长546 nm,测吸光值。比色法测定肝非血红素铁(non-heme iron),520 nm 测吸光值。NADPH 于450 nm 测吸光值。

1.2.5 Western Blot 检测肝铁死亡相关蛋白表达

取20 mg 肝组织加入200 μL 蛋白裂解液,超声破碎仪制备肝组织匀浆,用BCA法测定蛋白浓度,加样50 μg,恒压电泳(Bio-Rad),转膜后5%脱脂奶粉封闭,加入一抗4℃孵育过夜,抗体稀释度为1:500。洗膜后加入IgG/HRP(稀释度为1:2500),ECL 发光显影后用Image J 软件分析条带灰度值,并统计其与内参GAPDH 比值。

1.3 统计学分析

所有实验数据均表示为平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),采用SPSS 26.0 对数据进行独立样本 *t* 检验。以 *P* < 0.05 表示差异具有显著性。

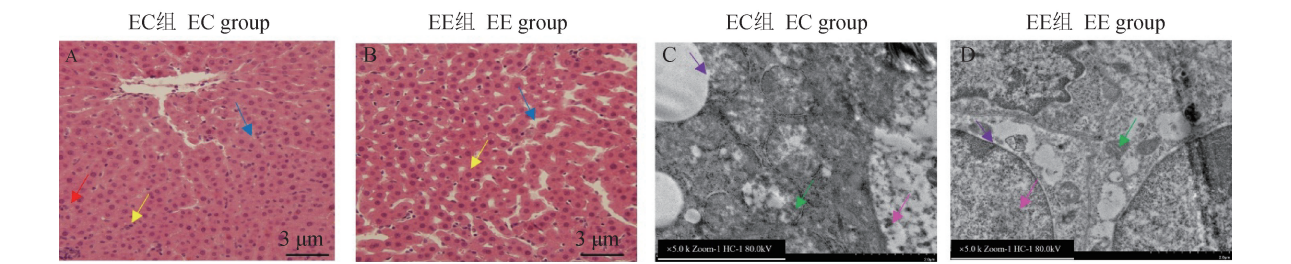
2 结果

2.1 有氧运动对自然衰老小鼠模型肝细胞超微结构的影响

光镜下可见EC组小鼠肝细胞有一定程度水肿,部分肝血窦受挤压变窄甚至消失(见图1A 蓝色箭头),肝细胞出现轻度脂肪样变性(见图1A 红色箭头),有少量肝细胞出现细胞核固缩深染(见图1A 黄色箭头),肝索排列紊乱。EE组小鼠肝组织HE 染色可见细胞膜完整,肝血窦清晰(见图1B 蓝色箭头),肝索排列较整齐,肝细胞脂肪样变较少,

细胞核形态完整(见图 1B 黄色箭头)。透射电镜显示的超微结构表明,EC 组小鼠肝细胞内线粒体皱缩、嵴断裂、膜破裂(见图 1C 绿色箭头),细胞内见脂滴沉积,细胞核膜破裂(见图 1C 紫色箭头),染色

质固缩、染色加深(见图 1C 粉色箭头)。EE 组小鼠肝细胞线粒体嵴排列较整齐、线粒体膜完整(见图 1D 绿色箭头),细胞核膜完整(见图 1D 紫色箭头),染色质均匀(见图 1D 粉色箭头)。



注:A,B:肝组织 HE 染色;C,D:透射电镜显示肝组织超微结构($\times 5.0\text{K}$)。
图 1 各组自然衰老小鼠模型肝细胞组织结构变化
Note. A, B. Histological structure of liver using HE. C, D. Ultrastructure of liver tissue using transmission electron microscopy sections($\times 5.0\text{K}$).

Figure 1 Changes of hepatocytes histology in each group

2.2 有氧运动对自然衰老小鼠模型肝重及肝铁含量的影响

与 EC 组相比,EE 组的肝重明显下降($P < 0.05$),肝 GSH 含量显著增加($P < 0.01$),肝糖原含量显著提高($P < 0.01$)。EE 组肝 TG 含量和非血红素铁含量均显著低于 EC 组小鼠($P < 0.01$),见表 1。

2.3 有氧运动对自然衰老小鼠模型肝细胞过氧化损伤的影响

与 EC 组相比,EE 组肝线粒体 8-OHdG 含量明显下降($P < 0.01$),肝细胞 4-HNE 含量和 MDA 显著降低($P < 0.01$)。EE 组肝 NADPH 含量显著高于 EC 组小鼠($P < 0.01$),见表 2。

2.4 有氧运动对自然衰老小鼠模型血清炎症和过氧化损伤的影响

与 EC 组相比,EE 组炎症相关因子,如血清 IL-6 含量明显下降($P < 0.01$)。EE 组血清脂质过氧化产物 4-HNE 和 MDA 含量显著低于 EC 组小鼠($P < 0.01$),线粒体过氧化损伤产物 8-OHdG 也显著低于 EC 组($P < 0.01$),见表 3。

2.5 有氧运动对自然衰老小鼠模型肝铁死亡相关蛋白表达的影响

与 EC 组相比,EE 组肝 NOX2 表达显著下降($P < 0.01$),NQO1、SCL7A11 和 GPx4 表达量显著增加($P < 0.01$),见图 2。

表 1 各组小鼠肝重、GSH、铁和糖原的变化($n = 10$)					
Table 1 Changes in liver weight, GSH, iron and glycogen in each group($n = 10$)					
组别 Groups	肝重(g) Liver weight(g)	GSH($\mu\text{mol/g}$)	TG($\mu\text{mol/g}$)	铁($\mu\text{mol/g}$) Iron($\mu\text{mol/g}$)	糖原(mg/g) Glycogen(mg/g)
EC 组 EC group	1.52 $\pm$ 0.22	15.04 $\pm$ 3.23	23.17 $\pm$ 3.65	25.84 $\pm$ 2.79	11.83 $\pm$ 0.81
EE 组 EE group	1.27 $\pm$ 0.19 *	39.42 $\pm$ 9.87 **	11.49 $\pm$ 2.85 **	18.10 $\pm$ 1.47 **	15.60 $\pm$ 1.13 **

注:与 EC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图/表同)
Note. Compared with EC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

表 2 各组小鼠肝细胞过氧化损伤的变化($n = 10$)				
Table 2 Changes in peroxidation damage of mouse hepatocytes in each group($n = 10$)				
组别 Groups	线粒体 8-OHdG (ng/mg) Mitochondrial 8-OHdG (ng/mg)	4-HNE (ng/g)	MDA (nmol/mg)	NADPH ($\mu\text{mol/g}$)
EC 组 EC group	6.74 $\pm$ 0.81	54.77 $\pm$ 8.49	29.74 $\pm$ 5.01	0.35 $\pm$ 0.04
EE 组 EE group	2.46 $\pm$ 0.69 **	28.36 $\pm$ 4.86 **	18.29 $\pm$ 4.72 **	0.78 $\pm$ 0.09 **

表 3 各组小鼠血清炎症和过氧化损伤的变化($n = 10$)				
Table 3 Changes in serum inflammation and peroxidation damage in each group($n = 10$)				
组别 Groups	IL-6 (ng/L)	4-HNE (ng/L)	8-OHdG (ng/mL)	MDA (nmol/mL)
EC 组 EC group	152.36 $\pm$ 16.87	198.42 $\pm$ 22.07	16.59 $\pm$ 2.64	17.56 $\pm$ 1.37
EE 组 EE group	107.26 $\pm$ 11.42 **	148.39 $\pm$ 12.94 **	11.35 $\pm$ 1.82 **	9.24 $\pm$ 1.61 **

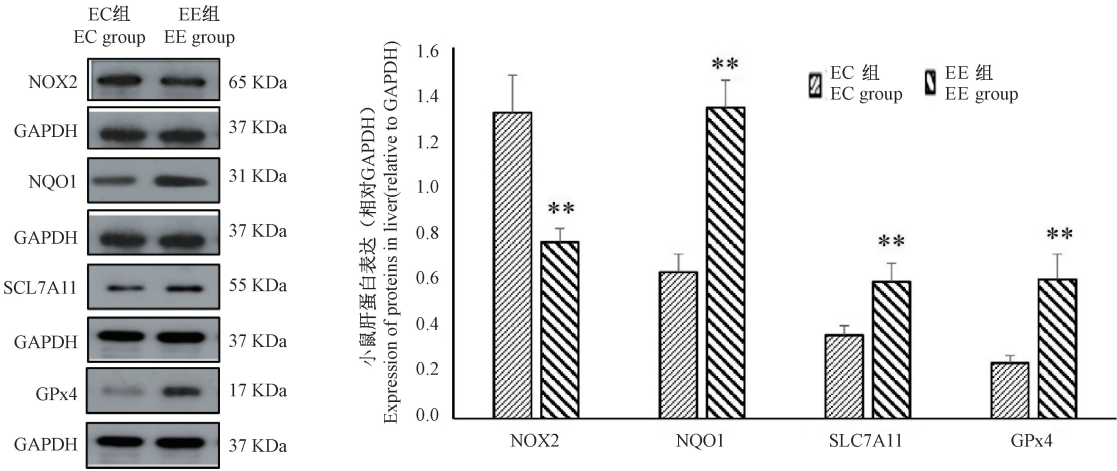


图2 各组小鼠肝细胞铁死亡相关蛋白表达的变化

Figure 2 Changes in the expression of ferroptosis-related proteins in mouse hepatocytes in each group

3 讨论

铁广泛参与机体氧的运输及物质代谢等过程,维持铁的动态平衡才能保证机体正常生理功能。近年研究发现衰老与过量铁蓄积引发的铁死亡密切相关^[12]。过量铁通过 Haber-Weiss 和 Fenton 反应产生活性氧(ROS),触发细胞的过氧化损伤。随年龄增长,哺乳动物模型及人的脑、肝、肾、骨骼肌等组织易出现铁的累积,导致出现神经退行性病变、肝损伤、糖尿病、肾疾病、椎间盘退变和肌少症等^[13-16]。在本实验中 16 周有氧运动显著降低了肝组织中铁含量,降低 EE 组小鼠肝重量、肝组织中 TG 含量明显下降,肝糖原含量增加。透射电镜下观察到 EE 组小鼠的线粒体膜、细胞核膜完整、线粒体嵴排列整齐,光镜下可见肝索排列较为整齐,说明 EE 组小鼠的肝细胞保持了较好的组织形态结构和功能。而 EC 组则出现了细胞核膜破损,边界不清晰,线粒体嵴断裂等典型的铁死亡所致的形态结构改变,说明 EC 组小鼠肝细胞发生了铁死亡所致的过氧化损伤。过量铁累积产生的 ROS 与 EC 组小鼠肝细胞生物膜的脂质反应,导致形成醛类反应产物,如 4-HNE 和 MDA,这些物质会进一步攻击蛋白质或 DNA,放大细胞损伤。因此导致 EC 组小鼠肝线粒体 DNA 损伤严重(8-OHdG 为线粒体过氧化损伤的标志物)。脂质过氧化作用影响所有脂质双分子层和亚细胞结构,如线粒体、内质网和溶酶体的膜^[17]。过多的 MDA 与许多疾病有关,如阿尔茨海默病、帕金森病、癌症、心血管疾病、糖尿病和脂肪肝等^[18]。EE 组小鼠肝细胞中 4-HNE 和 MDA 显著

低于对照组,说明其遭受的过氧化损伤较轻,这与 EE 组小鼠肝组织中较少的铁含量是一致的。线粒体正常的结构与功能是维持肝细胞生理功能的基础。EE 组小鼠 8-OHdG 显著下降,说明其线粒体 DNA 的过氧化损伤较轻,因此运动组肝细胞线粒体具有较完整的组织形态结构,保持了正常生理功能,减少脂肪累积,增加肝糖原储备等。EE 组血清中的过氧化产物也明显低于对照组,这说明运动不仅降低了 EE 组肝细胞的过氧化损伤,对其他组织的过氧化损伤也起到了较好的缓解作用。

目前研究衰老相关疾病的动物模型,多采用注射 D-半乳糖,以期获得快速衰老模型^[19-20]。本次研究中采用了自然衰老小鼠,使其更接近真实衰老进程。自然衰老的小鼠肝也出现了明显的水肿及轻度脂肪变性,GSH 和 NADPH 降低。与其他研究中发现的衰老动物模型出现肝细胞水肿和肝血窦受到挤压变窄,并出现脂肪变性是一致的^[21-22]。

GSH 是机体重要的抗氧化底物,是一种由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸连接成的三肽,其在体内主要有还原型(GSH)和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione disulfide,GSSG)两种形式。GSH 遍布全身各个器官系统,但其主要来源为肝细胞。GSH 是机体对抗 ROS 的重要防御系统^[6],在维持机体氧化还原平衡和正常生理功能中发挥重要作用。近年研究发现 GSH 与肝细胞过氧化损伤和衰老密切相关。许多天然食品或植物提取物(如天然二肽环^[23]、白藜芦醇^[24]、姜黄素^[25]、五味子精油^[26]等)可通过促进 GSH 表达减轻肝过氧化损伤及衰老进程。EE 组肝组织 GSH 含量显著增加,使肝组织中

线粒体 DNA 过氧化损伤降低及脂质过氧化产物减少。NOX2 是一种 NADPH 氧化酶, 主要是以 NADPH 为底物产生 ROS, 对细胞产生过氧化损伤。NOX2 表达增加会使肝细胞内 NADPH 耗竭, 细胞内氧化自由基积累, 增加细胞对铁死亡的敏感性。NOX2 表达和活性氧产生的增加密切相关^[27]。高淀粉饮食显著提升小鼠肝内 NOX2 表达, 而敲低 NOX2 在动物及细胞水平均可特异性地抵抗高淀粉饮食介导的非酒精性脂肪肝^[1]。抑制 NOX2 活性可以降低过氧化损伤, 改善胰岛移植的结局^[28]。EE 组小鼠肝细胞 NOX2 表达下降, 因此对 NADPH 消耗减少, 表现为肝 NADPH 含量增加。NADPH 是氧化型 (GSSG) 转化为还原型 GSH 的重要底物。SLC7A11 (胱氨酸/谷氨酸反向转运体) 可提供半胱氨酸, 半胱氨酸是合成 GSH 三肽 (Cys-Gly-Glu) 所必需的^[29]。如果抑制 SLC7A11, 会降低细胞内半胱氨酸和谷胱甘肽水平, 导致纤维肉瘤细胞坏死^[30]。EE 组小鼠肝细胞中较多的 NADPH 和高表达的 SLC7A11 也促进了 GSH 含量的提高。NQO1 是机体重要的氧化还原酶, 广泛存在于哺乳动物的肝、肺、肾、心脏和神经系统中, 能催化醌还原成氢醌, 阻止醌产生 ROS, 避免对 DNA 造成氧化损伤^[31]。NQO1 通过维持泛醌还原形式, 保护内源性抗氧化剂发挥生理作用^[6]。NQO1 参与 NADPH 的氧化还原反应。EE 组小鼠肝组织中 NQO1 含量显著增加, 也有助于维持机体的抗氧化系统功能, 减少增龄所致的过氧化损伤。

GPx4 是一种含有硒代半胱氨酸 (selenocysteine) 的酶, 在修复磷脂过氧化损伤中起重要作用。近年 GPx4 被发现与铁死亡相关^[32]。自发现铁死亡以来, 铁死亡已成为癌症和神经变性等不可治愈疾病的治疗靶点。因此, 近年 GPx4 被认为是机体抑制铁死亡及其相关疾病的明星分子, 其主要作用机制是以 GSH 为辅因子而发挥抗氧化作用, 因此, GSH/GPx4 是机体内调控铁死亡的核心通路^[33]。抑制 SLC7A11/GSH/GPx4 轴导致血管平滑肌细胞发生铁死亡^[34]。GPR116 通过抑制 SLC7A11/GSH/GPx4 系统促进脓毒症肝损伤中的铁死亡^[35]。EE 组小鼠肝组织高表达的 GSH/GPx4 发挥了较好的抗氧化作用, 减轻了铁死亡, 因此, 其循环系统和肝细胞过氧化损伤程度降低, 有助于维持 EE 组小鼠肝组织正常生理功能。

铁死亡也是一把双刃剑, 在正常细胞中, 铁死

亡使细胞物质代谢紊乱和细胞死亡, 然而诱导铁死亡近年来却被认为是抑制肝癌生长和进展的新途径^[36]。研究表明过量的铁蓄积和脂质过氧化是肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 铁死亡的主要特征, 铁死亡诱导剂联合免疫治疗成为 HCC 患者的新希望^[37]。

4 结论

适度的有氧运动一方面可促进衰老进程中的小鼠肝细胞铁含量下降, 减少铁的累积; 另一方面, 运动通过促进 SLC7A11 表达, 抑制 NOX2, 为 GPx4 提供更多的 GSH, 而发挥抗氧化功能, 减轻过量铁诱发的铁死亡, 减缓肝细胞的过氧化损伤, 有助于维持肝细胞结构的完整性, 发挥正常的生理功能。

参 考 文 献 (References)

- [1] Feng G, Byrne CD, Targher G, et al. Ferroptosis and metabolic dysfunction-associated fatty liver disease: is there a link? [J]. *Liver Int*, 2022, 42(7): 1496–1502.
- [2] Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060–1072.
- [3] Stockwell BR. Ferroptosis turns 10: emerging mechanisms, physiological functions, and therapeutic applications [J]. *Cell*, 2022, 185(14): 2401–2421.
- [4] Fleming RE, Ponka P. Iron overload in human disease [J]. *N Engl J Med*, 2012, 366(4): 348–359.
- [5] Fang X, Wang H, Han D, et al. Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(7): 2672–2680.
- [6] 王福佛. 铁死亡 [M]. 北京: 科学出版社; 2022.
- [7] Wang FD. Ferroptosis [M]. Beijing: China Science Press; 2022.
- [8] Maschalidi S, Mehrotra P, Keçeli BN, et al. Targeting SLC7A11 improves efferocytosis by dendritic cells and wound healing in diabetes [J]. *Nature*, 2022, 606(7915): 776–784.
- [9] 沈馨, 余盈盈, 陈峻逸, 等. 靶向铁死亡防治重大疾病的转化医学研究 [J]. *中国科学: 生命科学*, 2022, 52(12): 1815–1826.
- [10] Shen X, Yu YY, Chen JY, et al. Targeting ferroptosis as a potential prevention and treatment strategy for human diseases [J]. *Sci Sin Vitae*, 2022, 52(12): 1815–1826.
- [9] 谢丹煜, 何艾舟, 李婷, 等. 有氧运动对肥胖大鼠内皮功能障碍和内脂素的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2022, 30(4): 533–539.
- Xie ZY, He AZ, Li T, et al. Effect of aerobic exercise on endothelial dysfunction and visfatin in obese rats [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2022, 30(4): 533–539.
- [10] Yang W, Liu Y, Yang G, et al. Moderate-intensity physical exercise affects the exercise performance and gut microbiota of

- mice [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 712381.
- [11] 王海涛, 杨雯茜, 刘玉倩. 有氧运动对高脂膳食小鼠心肌损伤中 Nrf2/GPX4/Ferroptosis 通路的作用 [J]. 中国应用生理学杂志, 2022, 38(2): 143-148.
- Wang HT, Yang WQ, Liu YQ. Effects of aerobic exercise on Nrf2/GPX4/Ferroptosis pathway in myocardial injury in high-fat diet mice [J]. Chin J Appl Physiol, 2022, 38(2): 143-148.
- [12] Coradduzza D, Congiargiu A, Chen Z, et al. Ferroptosis and senescence; a systematic review [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3658.
- [13] Hsu CC, Senussi NH, Fertrin KY, et al. Iron overload disorders [J]. Hepatol Commun, 2022, 6(8): 1842-1854.
- [14] Wang W, Jing X, Du T, et al. Iron overload promotes intervertebral disc degeneration via inducing oxidative stress and ferroptosis in endplate chondrocytes [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 190: 234-246.
- [15] Nemeth E, Ganz T. Hepcidin and iron in health and disease [J]. Annu Rev Med, 2023, 74(1): 261-277.
- [16] Harrison AV, Lorenzo FR, McClain DA. Iron and the pathophysiology of diabetes [J]. Annu Rev Physiol, 2023, 85: 339-362.
- [17] Capelletti MM, Manceau H, Puy H, et al. Ferroptosis in liver diseases: an overview [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4908.
- [18] Bocatonda A, Andreetto L, D'Ardes D, et al. From NAFLD to MAFLD: definition, pathophysiological basis and cardiovascular implications [J]. Biomedicines, 2023, 11(3): 883.
- [19] Ru M, Wang W, Zhai Z, et al. Nicotinamide mononucleotide supplementation protects the intestinal function in aging mice and D-galactose induced senescent cells [J]. Food Funct, 2022, 13(14): 7507-7519.
- [20] Samad N, Nasir A, Rehman MHU, et al. Adenosine protects D-galactose induced alterations in rat model of aging via attenuating neurochemical profile and redox status [J]. Metab Brain Dis, 2022, 37(7): 2483-2496.
- [21] Li Y, Adeniji NT, Fan W, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and liver fibrosis during aging [J]. Aging Dis, 2022, 13(4): 1239-1251.
- [22] Chen J, Li X, Ge C, et al. The multifaceted role of ferroptosis in liver disease [J]. Cell Death Differ, 2022, 29(3): 467-480.
- [23] Zhang QY, Han SC, Huang RP, et al. Cyclo (-Phe-Phe) alleviates chick embryo liver injury via activating the Nrf2 pathway [J]. Food Funct, 2022, 13(13): 6962-6974.
- [24] 胡戈, 马欣雨, 秦菲, 等. 白藜芦醇对大鼠运动性肝损伤的保护作用 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31(6): 763-769.
- Hu G, Ma XY, Qin F, et al. Protective effect of resveratrol on exercise-induced liver injury in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31(6): 763-769.
- [25] Chen J, Fan T, Li J, et al. Curcumin/cyclodextrin polymer inclusion complex attenuates ethanol-induced liver injury by inhibition of DNA damage in mice [J]. Food Sci Nutr, 2023, 11(5): 2418-2426.
- [26] Zhao J, Ding K, Hou M, et al. *Schisandra chinensis* essential oil attenuates acetaminophen-induced liver injury through alleviating oxidative stress and activating autophagy [J]. Pharm Biol, 2022, 60(1): 958-967.
- [27] Paolillo R, Boulanger M, Gâtel P, et al. The NADPH oxidase NOX2 is a marker of adverse prognosis involved in chemoresistance of acute myeloid leukemias [J]. Haematologica, 2022, 107(11): 2562-2575.
- [28] Wrublewsky S, Glas J, Carlein C, et al. The loss of pancreatic islet NADPH oxidase (NOX)₂ improves islet transplantation [J]. Redox Biol, 2022, 55: 102419.
- [29] Li P, Yu J, Huang F, et al. SLC7A11-associated ferroptosis in acute injury diseases: mechanisms and strategies [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2023, 27(10): 4386-4398.
- [30] Toyokuni S, Yanatori I, Kong Y, et al. Ferroptosis at the crossroads of infection, aging and cancer [J]. Cancer Sci, 2020, 111(8): 2665-2671.
- [31] Alkhalifah EAR, Alobaid AA, Almajed MA, et al. Cardamom extract alleviates the oxidative stress, inflammation and apoptosis induced during acetaminophen-induced hepatic toxicity via modulating Nrf2/HO-1/NQO-1 pathway [J]. Curr Issues Mol Biol, 2022, 44(11): 5390-5404.
- [32] Nishida Xavier da Silva T, Friedmann Angeli JP, Ingold I. GPX4: old lessons, new features [J]. Biochem Soc Trans, 2022, 50(3): 1205-1213.
- [33] Zeng C, Lin J, Zhang K, et al. SHARPIN promotes cell proliferation of cholangiocarcinoma and inhibits ferroptosis via p53/SLC7A11/GPX4 signaling [J]. Cancer Sci, 2022, 113(11): 3766-3775.
- [34] Ye Y, Chen A, Li L, et al. Repression of the antiporter SLC7A11/glutathione/glutathione peroxidase 4 axis drives ferroptosis of vascular smooth muscle cells to facilitate vascular calcification [J]. Kidney Int, 2022, 102(6): 1259-1275.
- [35] Wang Y, Wang T, Xiang Q, et al. GPR116 promotes ferroptosis in sepsis-induced liver injury by suppressing system Xc⁻/GSH/GPX4 [J]. Cell Biol Toxicol, 2023, 2023: 1.
- [36] Ajoolabady A, Tang D, Kroemer G, et al. Ferroptosis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and targeted therapy [J]. Br J Cancer, 2023, 128(2): 190-205.
- [37] Long S, Chen Y, Wang Y, et al. Identification of Ferroptosis-related molecular model and immune subtypes of hepatocellular carcinoma for individual therapy [J]. Cancer Med, 2023, 12(2): 2134-2147.