

基于P62-Keap1-NRF2通路探讨铁死亡在慢性肝衰竭中的作用与机制研究

袁麒莘^{1*}, 毛德文², 陆正峰³, 蓝艳梅², 姜海行^{1#}

¹广西医科大学第一附属医院消化内科, 广西 南宁

²广西中医药大学第一附属医院中医临床研究重点实验室, 广西 南宁

³广西医科大学附属民族医院消化内科一区, 广西 南宁

收稿日期: 2026年5月29日; 录用日期: 2026年6月23日; 发布日期: 2026年6月30日

摘要

目的: 探讨P62-Keap1-NRF2通路介导铁死亡在慢性肝衰竭中的作用, 并观察铁死亡抑制剂Ferrostatin-1的干预效应。方法: 体外实验采用BRL3A大鼠肝细胞, 分为对照组、CCl₄模型组(2.5 μmol/L, 12 h)和Fer-1干预组(10 μmol/L)。CCK-8法筛选最佳造模条件, 免疫荧光检测细胞内Fe²⁺和活性氧(ROS), 生化法检测丙二醛(MDA), qPCR和Western blot检测P62、Keap1、NRF2的mRNA及蛋白表达。体内实验采用SD大鼠, 随机分为对照组、CLF模型组(50% CCl₄橄榄油腹腔注射22周)和Fer-1干预组(造模后另使用尾静脉注射Fer-1共2周)。HE及Masson染色观察肝组织病理变化, qPCR和Western blot检测肝组织中上述指标。结果: CCK-8确定2.5 μmol/L CCl₄处理12 h为最佳造模条件。体外实验显示, 与对照组相比, 模型组细胞内Fe²⁺、ROS、MDA水平显著升高(均P < 0.05), P62和NRF2的mRNA及蛋白表达降低, Keap1表达升高(均P < 0.05); Fer-1干预可显著逆转上述变化(均P < 0.05)。体内实验显示, 模型组大鼠肝组织出现典型假小叶、胶原沉积及坏死, P62和NRF2表达下降, Keap1表达升高; Fer-1干预可减轻病理损伤, 恢复通路分子表达(均P < 0.05)。结论: 铁死亡在CLF中发挥重要作用, P62-Keap1-NRF2通路是其关键调控轴, Fer-1可通过恢复该通路稳态逆转铁死亡效应, 为CLF的靶向治疗提供了新思路。

关键词

慢性肝衰竭, 铁死亡, P62-Keap1-NRF2通路, Ferrostatin-1

Study on the Role and Mechanism of Ferroptosis in Chronic Liver Failure Based on the P62-Keap1-NRF2 Pathway

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 袁麒莘, 毛德文, 陆正峰, 蓝艳梅, 姜海行. 基于 P62-Keap1-NRF2 通路探讨铁死亡在慢性肝衰竭中的作用与机制研究[J]. 临床医学进展, 2026, 16(6): 2595-2607. DOI: 10.12677/acm.2026.1662482

Qishen Yuan^{1*}, Dewen Mao², Zhengfeng Lu³, Yanmei Lan², Haixing Jiang^{1#}

¹Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning Guangxi

²The Key Laboratory of TCM Clinical Research in The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning Guangxi

³Division 1, Department of Gastroenterology, Affiliated Nationalities Hospital, Guangxi Medical University, Nanning Guangxi

Received: May 29, 2026; accepted: June 23, 2026; published: June 30, 2026

Abstract

Objective: To investigate the role of the P62-Keap1-NRF2 pathway in mediating ferroptosis in chronic liver failure (CLF) and to observe the interventional effect of the ferroptosis inhibitor Ferrostatin-1 (Fer-1). **Methods:** For *in vitro* experiments, BRL3A rat hepatocytes were divided into control group, CCl₄ model group (2.5 μmol/L, 12 h) and Fer-1 intervention group (10 μmol/L). The optimal modeling conditions were determined by CCK-8 assay. Intracellular Fe²⁺ and reactive oxygen species (ROS) levels were detected by immunofluorescence, malondialdehyde (MDA) content was measured by biochemical assay, and the mRNA and protein expression levels of P62, Keap1, and NRF2 were detected by qPCR and Western blot, respectively. For *in vivo* experiments, SD rats were randomly divided into control group, CLF model group (intraperitoneal injection of 50% CCl₄ in olive oil for 22 weeks), and Fer-1 intervention group (tail vein injection of Fer-1 for an additional 2 weeks after modeling). Liver histopathological changes were observed by HE and Masson staining, and the above indicators in liver tissues were detected by qPCR and Western blot. **Results** CCK-8 assay determined that treatment with 2.5 μmol/L CCl₄ for 12 h was the optimal modeling condition. *In vitro* experiments showed that compared with the control group, the model group exhibited significantly elevated levels of intracellular Fe²⁺, ROS, and MDA (all $P < 0.05$), decreased mRNA and protein expression of P62 and NRF2, and increased expression of Keap1 (all $P < 0.05$). Fer-1 intervention significantly reversed these changes (all $P < 0.05$). *In vivo* experiments showed that the liver tissues of rats in the model group displayed typical pseudolobule formation, collagen deposition and necrosis, with decreased expression of P62 and NRF2 and increased expression of Keap1. Fer-1 intervention alleviated the pathological damage and restored the expression of pathway molecules (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Ferroptosis plays an important role in CLF, and the P62-Keap1-NRF2 pathway is a key regulatory axis. Fer-1 can reverse the ferroptosis effect by restoring the homeostatic function of this pathway, providing a new strategy for targeted therapy of CLF.

Keywords

Chronic Liver Failure, Ferroptosis, P62-Keap1-NRF2 Pathway, Ferrostatin-1

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 前言

慢性肝衰竭(chronic liver failure, CLF)是各类慢性肝病进展至终末期的严重综合征, 以广泛肝细胞坏死、肝功能失代偿和多器官功能障碍为特征, 临床表现为在肝硬化基础上缓慢且持续出现的顽固性腹水、高度黄疸及严重凝血功能障碍等一系列标志性症候群, CLF 患者病死率高, 针对性治疗手段有

限[1]。

铁死亡(ferroptosis)是一种铁依赖性的程序性细胞死亡,其核心机制涉及铁代谢紊乱、脂质过氧化爆发及抗氧化防御系统失效[2]。与凋亡、坏死性凋亡、焦亡等其他细胞死亡形式不同,铁死亡在形态、生化及遗传调控方面均表现出独特特征。铁死亡的启动与演进是铁代谢异常、脂质过氧化连锁反应以及抗氧化系统功能耗竭三者协同进展作用的结果,Ferrostatin-1作为亲脂性自由基捕获抗氧化剂,可通过捕获脂质过氧化自由基有效阻断铁死亡。

研究表明,铁死亡参与酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝病、肝纤维化和肝癌等多种肝脏疾病发生发展[3][4]。P62-Keap1-NRF2通路是细胞抗氧化应激的核心防御系统,P62作为自噬接头蛋白可竞争性结合Keap1,促进NRF2核转位并启动下游抗氧化基因(HO-1、NQO1等)转录,从而抑制铁死亡[5]-[7],然而该通路在慢性肝衰竭中的作用尚不明确。本研究以大鼠原代肝细胞及SPF级SD大鼠作为研究对象,通过四氯化碳(CCl₄)刺激模拟慢性肝衰竭模型、Fer-1构建铁死亡抑制剂干预模型,观察细胞层面及动物个体产生的影响,检测铁死亡的特征性指标,旨在探究基于铁死亡的P62-Keap1-NRF2通路在慢性肝衰竭中的作用机制,为CLF的临床治疗提供新的潜在靶点和理论依据。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 细胞与动物

大鼠正常肝细胞株BRL3A购自南宁友辰生物科技有限公司。SPF级SD雄性大鼠60只,体质量(200±50)g,6~8周龄,购自湖南长沙市天勤生物技术有限公司【SCXK(湘)2022-0011】,饲养于广西中医药大学科学实验中心【SYXK(桂)2019-0001】。饲养环境:室内温度控制在20℃~25℃,相对湿度控制在50%~60%,12h光照昼夜交替,自由进食,常规饲料饲养。

2.1.2. 主要试剂及厂商

CCl₄、Ferrostatin-1 (Selleck); CCK-8试剂盒(Biosharp); Fe/ROS双荧光检测试剂盒(碧云天); MDA检测试剂盒(碧云天); Trizol试剂(Invitrogen); 逆转录及qPCR试剂盒(PrimeScript/Takara); P62、Keap1、NRF2及β-actin抗体(Affinity); RIPA裂解液、BCA试剂盒(索莱宝)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 细胞培养、分组及处理

BRL3A细胞培养于含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的MEM培养基,37℃、5%CO₂培养箱内培养。取对数生长期细胞,分为三组:对照组(Control组,常规培养)、CLF模型组(Model组,2.5μmol/L CCl₄处理12h)、Fer-1干预组(Fer-1组,10μmol/L Fer-1预处理2h,再加入2.5μmol/L CCl₄共处理12h)。每组设3个复孔,实验独立重复3次。

2.2.2. CCK-8法筛选CCl₄最佳浓度和时间

将BRL3A细胞以3×10³个/孔接种96孔板,培养24h后加入含不同浓度CCl₄(0,0.75,1.5,2.5,5.0,7.5μmol/L)的培养基,分别处理12h和24h。每孔加入10μL CCK-8溶液,孵育2h,酶标仪测定450nm吸光度,计算细胞增殖抑制率。

2.2.3. 双免疫荧光检测细胞内Fe²⁺和活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)含量

多孔细胞板爬片经处理后,加入试剂盒复合染液体系,37℃避光孵育2小时,孵育结束后使用PBS洗涤、DAPI染核,荧光显微镜观察相应细胞内Fe²⁺和ROS荧光情况并采集图像,ImageJ分析平均荧光

强度。

2.2.4. 细胞脂质过氧化物(Malondialdehyde, MDA)含量测定

收集细胞, RIPA 裂解液裂解, BCA 法测定蛋白浓度。按 MDA 检测试剂盒说明书, 取蛋白上清液加入 TBA 工作液, 100℃加热 15 min, 冷却后离心, 取上清于 532 nm 测吸光度, 计算 MDA 含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$ 蛋白)。

2.2.5. 细胞 qPCR 检测基因表达

Trizol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA。采用 TB Green 法进行 qPCR, 以 β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。内参基因及目的基因引物序列见表 1:

Table 1. PCR primer sequences

表 1. PCR 引物序列

Primer name	Forward (5' to 3')	Reward (5' to 3')
β -actin	AGATCAAGATCATTGCTCCTCCTG	CAGCTCAGTAACAGTCCGCC
P62	AAGAGCGGGTACTGATCCCTG	CCACCCTTGCGCAACTCTTC
Keap1	TCTACATGCACTTCGGGGAG	GCATGGAACACCTCGGACTC
NRF2	CCCACATTCCCAAACAAGATGC	GAATATCCAGGGCAAGCGAC

2.2.6. 细胞 Western Blot 检测蛋白表达

RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 定量。SDS-PAGE 电泳, 转 PVDF 膜, 5%脱脂奶粉封闭, 一抗(P62、Keap1、NRF2、 β -actin, 稀释比 1:2000) 4℃孵育过夜, 二抗室温孵育 1 h, ECL 显影, ImageJ 分析条带灰度值。

2.2.7. 动物模型构建及分组

60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为 3 组(每组 20 只): 对照组(腹腔注射等体积生理盐水); CLF 模型组(腹腔注射 50% CCl_4 橄榄油混合溶液, 1.5 mL/kg, 每周 2 次, 连续 22 周); Fer-1 干预组(同模型组造模 22 周后, 尾静脉注射 Fer-1 1 mg/kg, 每周 2 次, 再连续 2 周)。第 24 周末处死大鼠, 采集肝脏标本。

2.2.8. 动物肝脏病理学检查

肝组织 4%多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切片(4~5 μm)。HE 染色观察肝组织结构, Masson 染色观察胶原沉积。光学显微镜下拍照, 每张切片随机选取 5 个高倍视野($\times 200$ 或 $\times 400$)进行图像采集。

2.2.9. 动物组织 qPCR 和 Western Blot

取肝组织约 50 mg, Trizol 法提取 RNA 或 RIPA 裂解液提取蛋白, qPCR 和 Western blot 步骤同 2.2.5 和 2.2.6。

2.2.10. 统计学处理

采用 SPSS 26.0 软件, 计量资料以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。在开展组间比较之前首先采用 Shapiro-Wilk 检验评估各组数据的正态分布情况, 并利用 Levene 检验判断方差是否齐性。若数据满足正态分布且方差齐, 则选用参数检验方法; 若数据不满足正态分布或方差不齐, 则采用相应的非参数检验方法。多组间比较采用单因素方差分析, 对照组、Fer-1 组与模型组相比较采用 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. CCK-8 法确定 CCl₄ 最佳造模条件

CCK-8 结果显示(见表 2), 在 12 h 干预时间点, CCl₄ 浓度 $\geq 2.5 \mu\text{mol/L}$ 时细胞增殖抑制率显著升高, 结果有统计学差异($P < 0.001$), 且呈浓度依赖性。2.5 $\mu\text{mol/L}$ CCl₄ 处理 12 h 的抑制率约为 45%~50%, 细胞形态出现铁死亡特征性改变(细胞变圆、漂浮), 适合后续干预实验。因此选用 2.5 $\mu\text{mol/L}$ CCl₄ 处理 12 h 作为最佳造模条件。

Table 2. Proliferation inhibition rate of BRL3A cells treated with different doses of CCl₄ for different durations ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 2. CCl₄ 不同剂量不同时间处理 BRL3A 细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	CCl ₄ 浓度($\mu\text{mol/L}$)	12 h%	24 h%
对照组	0	0.00 \pm 0.006	0.00 \pm 0.005
CCl ₄ 0.75 μm	0.75	2.97 \pm 0.57	72.58 \pm 0.37***
CCl ₄ 1.5 μm	1.5	2.84 \pm 0.43	83.36 \pm 0.07***
CCl ₄ 2.5 μm	2.5	39.67 \pm 0.46***	88.18 \pm 0.25***
CCl ₄ 5.0 μm	5.0	87.59 \pm 0.49***	91.64 \pm 0.04***
CCl ₄ 7.5 μm	7.5	90.63 \pm 0.41***	94.83 \pm 0.29***

注: *** $P < 0.001$, vs 对照组。

3.2. Fer-1 降低 CCl₄ 诱导的肝细胞内 Fe²⁺、ROS 和 MDA 水平

免疫荧光及 MDA 检测结果(见图 1、图 2、表 3)显示, 与对照组相比, 模型组细胞内 Fe²⁺、ROS 和 MDA 含量均显著升高, 结果有统计学差异($P < 0.05$)。与模型组相比, Fer-1 干预后 Fe²⁺、ROS 和 MDA 水平显著降低, 结果有统计学差异($P < 0.05$), 且恢复至接近对照组水平。

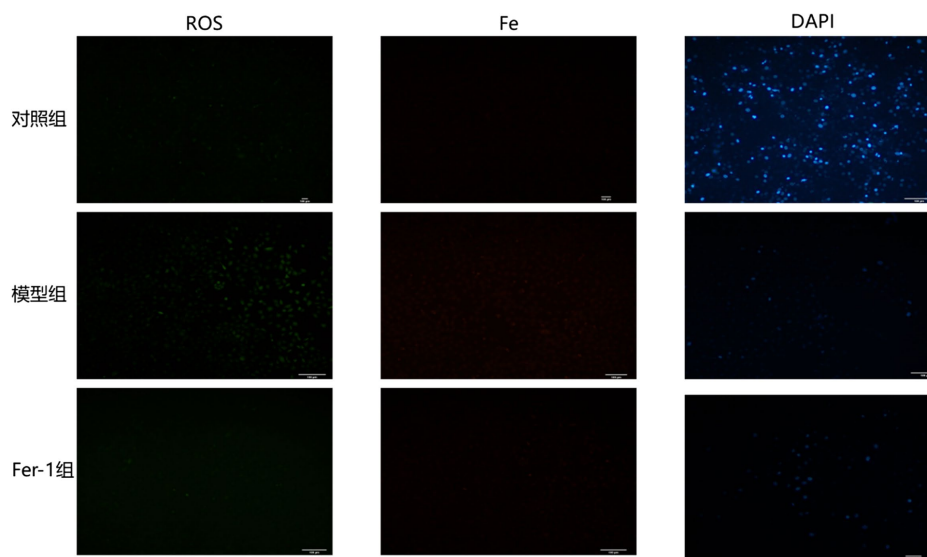
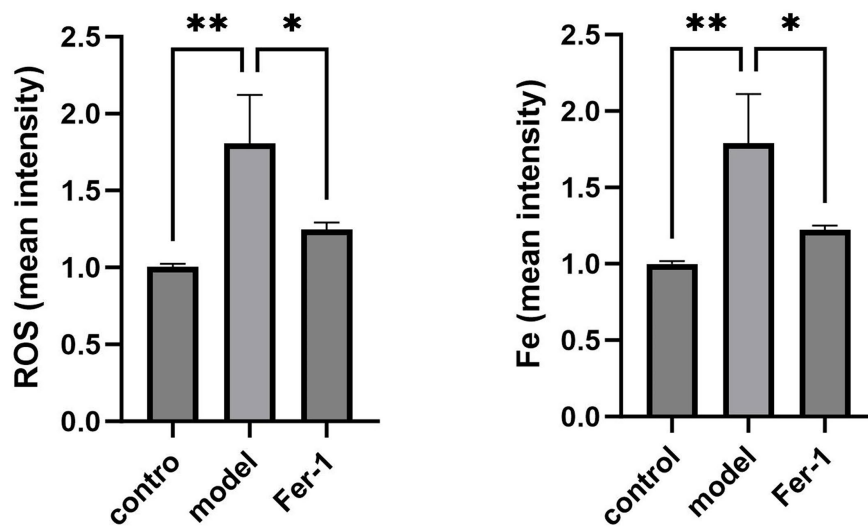


Figure 1. Determination of ROS and Fe levels, as ferroptosis-related cytokines, in cells of the control group, CLF model group, and Fer-1 group using dual immunofluorescence staining combined with DAPI staining ($n = 3$)

图 1. 双免疫荧光染色及 DAPI 染色检测 CLF 模型组、Fer-1 组细胞与对照组细胞中铁死亡特征细胞因子 ROS、Fe 的含量($n = 3$)



注: * $P < 0.05$, vs 模型组。

Figure 2. Statistical analysis of liver cell quantified mean fluorescence intensity data

图 2. 肝细胞平均荧光强度量化数据统计分析图

Table 3. Effects of the ferroptosis inhibitor Fer-1 on the levels of ferroptosis-related cytokines Fe, ROS, and MDA in hepatocytes ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

表 3. 铁死亡抑制剂 Fer-1 对肝细胞中铁死亡特征细胞因子 Fe、ROS、MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	Fe ²⁺ /($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	ROS/($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	MDA/($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)
对照组	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.19	10.56 ± 1.60
模型组	1.79 ± 0.32*	1.80 ± 0.31*	18.88 ± 1.76*
Fer-1 组	1.22 ± 0.03 [△]	1.24 ± 0.04 [△]	13.78 ± 1.90 [△]

注: * $P < 0.05$, vs 对照组; [△] $P < 0.05$, vs 模型组。

3.3. Fer-1 调控 BRL3A 细胞中 P62-Keap1-NRF2 通路的基因和蛋白表达

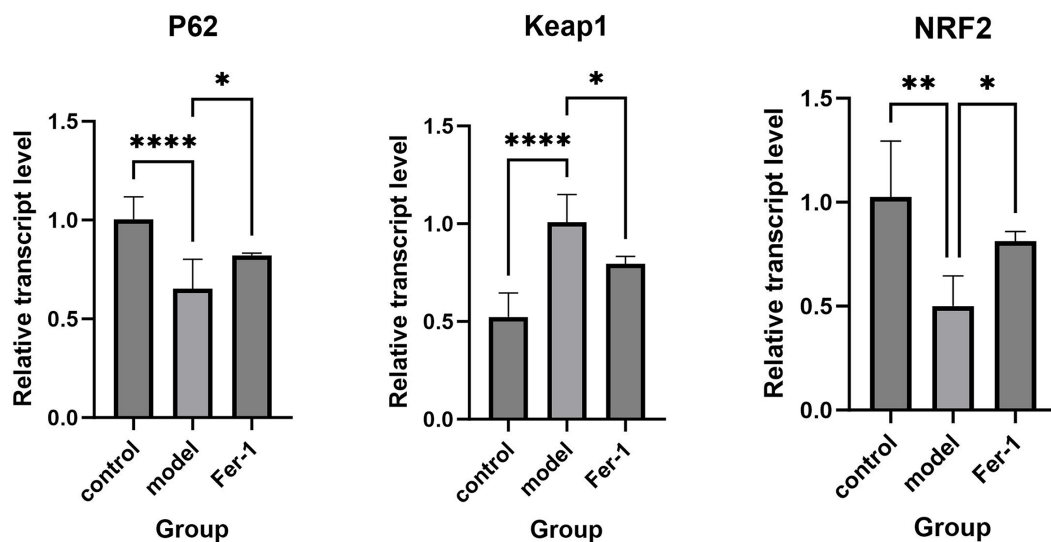
qPCR 检测结果(见表 4、图 3)显示,与对照组相比,模型组 P62 和 NRF2 mRNA 表达显著降低,Keap1 mRNA 表达显著升高,结果有统计学差异($P < 0.05$); Fer-1 干预后, P62 和 NRF2 表达回升, Keap1 表达下降,结果有统计学差异($P < 0.05$),但与对照组无显著差异($P > 0.05$)。Western blot 结果(见表 5、图 4、图 5)与 qPCR 趋势一致。

Table 4. Effects of the ferroptosis inhibitor on gene expression levels of the P62-Keap1-NRF2 pathway in hepatocytes ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 4. 铁死亡抑制剂对肝细胞 P62-Keap1-NRF2 通路基因水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	P62 (Relative Expression)	Keap1 (Relative Expression)	NRF2 (Relative Expression)
对照组	1.00 ± 0.11	0.52 ± 0.12	1.03 ± 0.27
模型组	0.65 ± 0.15***	1.00 ± 0.14***	0.50 ± 0.15***
Fer-1 组	0.82 ± 0.18 [△]	0.799 ± 0.38 [△]	0.81 ± 0.04 [△]

注: * $P < 0.05$, vs 对照组, *** $P < 0.001$, vs 对照组; [△] $P < 0.05$, vs 模型组。



注: * $P < 0.05$, vs 模型组, *** $P < 0.001$, vs 模型组。

Figure 3. Statistical analysis of liver cell qPCR quantification data

图 3. 肝细胞 qPCR 量化数据统计分析图

Table 5. Effects of the ferroptosis inhibitor on protein expression levels of the P62-Keap1-NRF2 pathway in hepatocytes ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 5. 铁死亡抑制剂对肝细胞 P62-Keap1-NRF2 通路蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	P62 (Relative Expression)	Keap1 (Relative Expression)	NRF2 (Relative Expression)
对照组	0.93 ± 0.52	0.40 ± 0.12	0.91 ± 0.03
模型组	$0.37 \pm 0.07^{***}$	$0.99 \pm 0.03^{***}$	$0.39 \pm 0.06^{***}$
Fer-1 组	$0.64 \pm 0.13^{\Delta}$	$0.71 \pm 0.07^{\Delta}$	$0.65 \pm 0.08^{\Delta}$

注: * $P < 0.05$, vs 对照组, *** $P < 0.001$, vs 对照组; $\Delta P < 0.05$, vs 模型组。

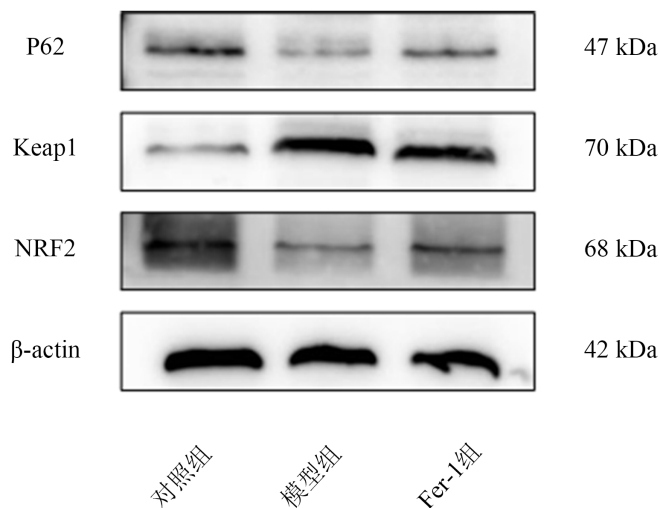


Figure 4. Effect of ferroptosis inhibitor on protein levels of the P62-Keap1-NRF2 pathway in liver cell ($n = 3$)

图 4. 铁死亡抑制剂对肝细胞 P62-Keap1-NRF2 通路蛋白水平的影响($n = 3$)

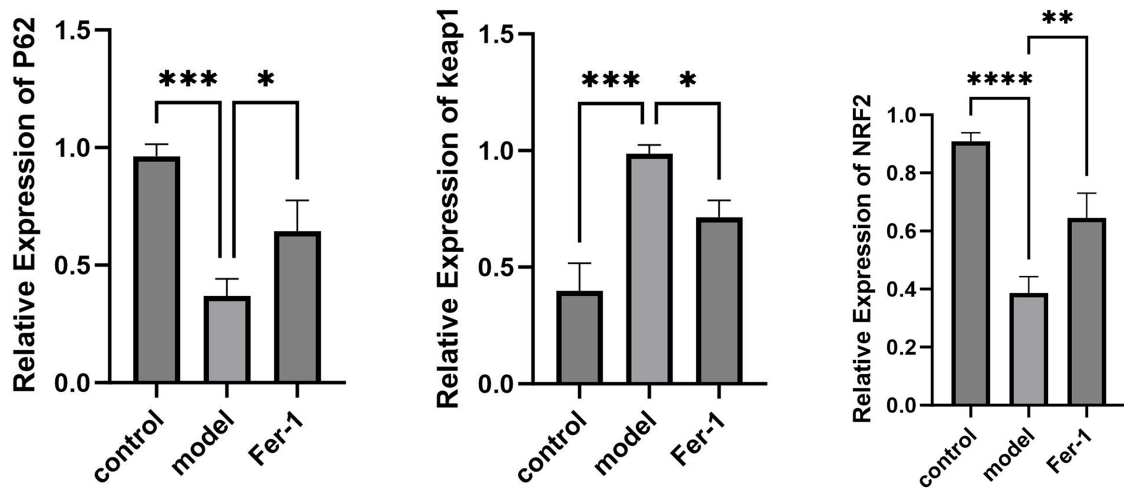


Figure 5. Statistical analysis of liver cell quantified band intensity data
图 5. 肝细胞条带灰度值量化数据统计分析图

3.4. Fer-1 减轻 CLF 模型大鼠肝脏病理损伤

HE 染色(见图 6)显示, 对照组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞索排列整齐; 模型组出现广泛假小叶形成、肝细胞气球样变、点片状坏死及炎性细胞浸润; Fer-1 组肝组织损伤明显减轻, 坏死灶减少, 肝细胞排列较规则。Masson 染色(见图 7)显示, 模型组汇管区及小叶内大量蓝色胶原沉积, 形成纤维间隔; Fer-1 组胶原沉积显著减少。表明 Fer-1 可减轻 CCl₄ 诱导的肝纤维化和坏死。

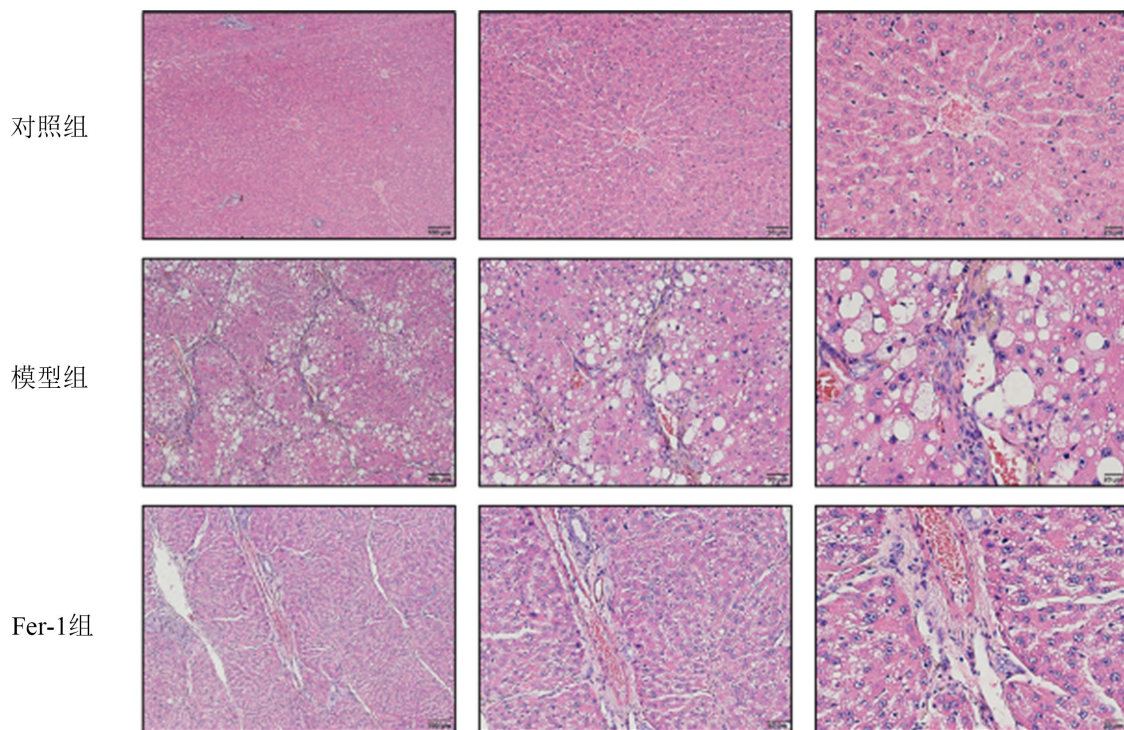


Figure 6. Evaluation of pathomorphological changes in rat liver tissue by HE staining
图 6. HE 染色评估大鼠肝组织病理形态学变化

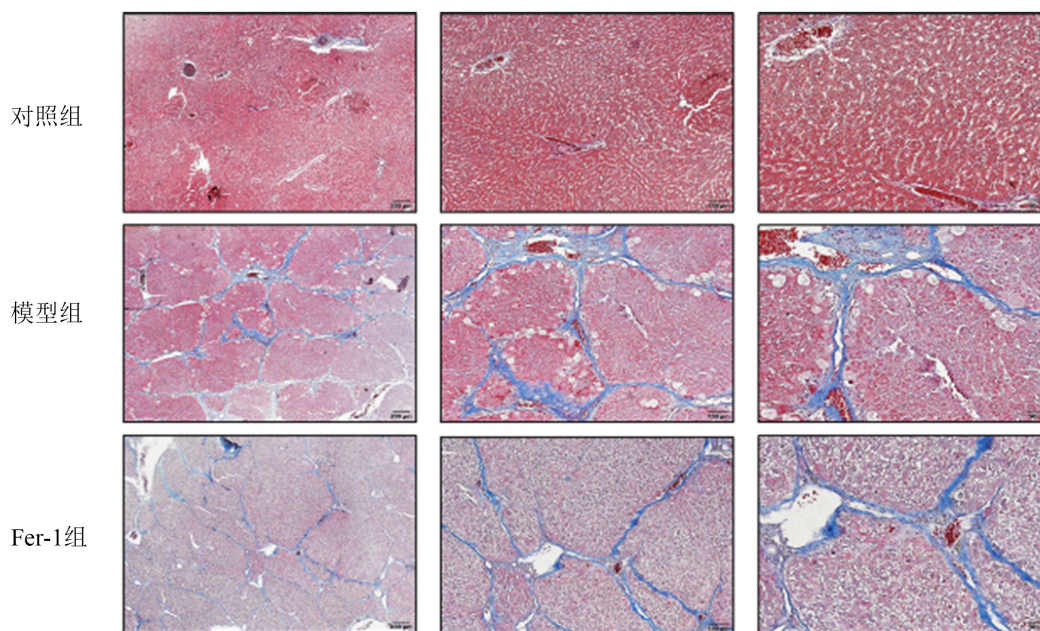


Figure 7. Observation of hepatic fibrosis deposition by Masson staining
图 7. Masson 染色观察肝纤维沉积情况

3.5. Fer-1 调控 CLF 大鼠肝脏 P62-Keap1-NRF2 通路的基因和蛋白表达

qPCR 结果(见表 6)显示, 与对照组相比, 模型组肝组织中 P62 和 NRF2 的 mRNA 表达降低、Keap1 表达升高, 结果有统计学差异($P < 0.05$); Fer-1 干预后上述指标显著改善, 结果有统计学差异($P < 0.05$)。Western blot 结果(见表 7、图 8~10)同样证实模型组 P62 和 NRF2 蛋白表达下降、Keap1 蛋白表达上升, Fer-1 可恢复其表达水平, 结果有统计学差异($P < 0.05$), 同时结果与体外实验一致。

Table 6. Effects of the ferroptosis inhibitor on gene expression levels of the P62-Keap1-NRF2 pathway in rat liver ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 6. 铁死亡抑制剂对大鼠肝脏 P62-Keap1-NRF2 通路基因水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	P62 (Relative Expression)	Keap1 (Relative Expression)	NRF2 (Relative Expression)
对照组	1.00 ± 0.12	0.54 ± 0.15	1.02 ± 0.24
模型组	0.65 ± 0.14***	1.03 ± 0.15***	0.52 ± 0.16***
Fer-1 组	0.82 ± 0.12 [△]	0.80 ± 0.34 [△]	0.82 ± 0.10 [△]

注: * $P < 0.05$, vs 对照组, *** $P < 0.001$, vs 对照组; [△] $P < 0.05$, vs 模型组。

Table 7. Effects of the ferroptosis inhibitor on protein expression levels of the P62-Keap1-NRF2 pathway in rat liver ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 7. 铁死亡抑制剂对大鼠肝脏 P62-Keap1-NRF2 通路蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	P62 (Relative Expression)	Keap1 (Relative Expression)	NRF2 (Relative Expression)
对照组	0.99 ± 0.08	0.34 ± 0.12	0.94 ± 0.98
模型组	0.31 ± 0.06***	0.99 ± 0.04***	0.58 ± 0.06*
Fer-1 组	0.54 ± 0.12 [△]	0.66 ± 0.09 [△]	0.88 ± 0.10 [△]

注: * $P < 0.05$, vs 对照组, *** $P < 0.001$, vs 对照组; [△] $P < 0.05$, vs 模型组。

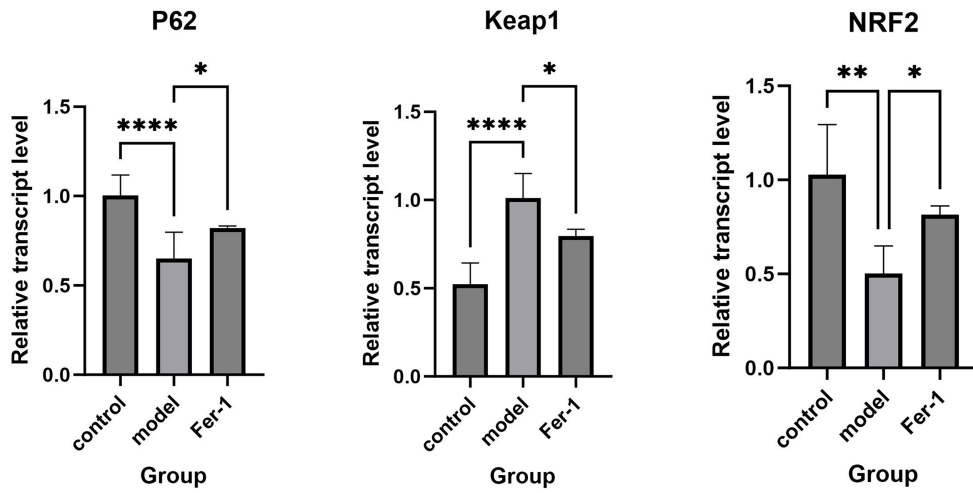


Figure 8. Statistical analysis of liver qPCR quantification data
图 8. 肝脏 qPCR 量化数据统计分析

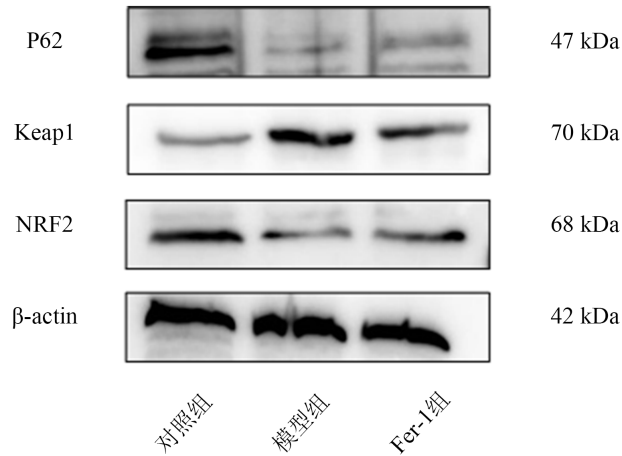
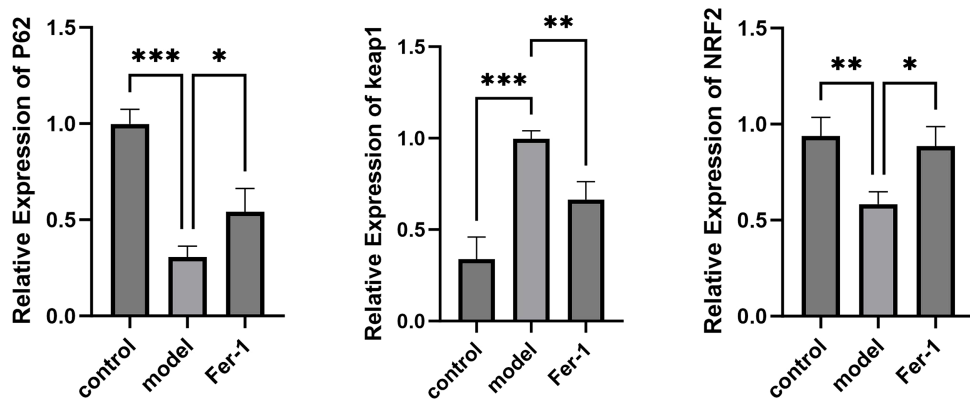


Figure 9. Effect of ferroptosis inhibitor on protein levels of the P62-Keap1-NRF2 pathway in rat liver (n = 3)
图 9. 铁死亡抑制剂对大鼠肝脏 P62-Keap1-NRF2 通路蛋白水平的影响(n = 3)



注: * $P < 0.05$, vs 模型组, *** $P < 0.001$, vs 模型组。

Figure 10. Statistical analysis of liver quantified band intensity data
图 10. 肝脏条带灰度值量化数据统计分析图

4. 讨论

本研究通过构建 CCl₄ 诱导的 CLF 细胞模型和大鼠模型,系统探讨了 P62-Keap1-NRF2 通路介导铁死亡在 CLF 中的作用机制,并观察了铁死亡特异性抑制剂 Fer-1 的干预效应。研究主要发现:① CLF 模型组细胞内 Fe²⁺、ROS 及 MDA 水平显著升高,呈现明显铁死亡特征;② 模型组 P62 和 NRF2 的 mRNA 及蛋白表达水平显著降低,Keap1 表达水平显著升高;③ Fer-1 干预可有效逆转上述指标变化,减轻肝组织病理损伤,恢复通路分子表达水平。这些结果表明,铁死亡在 CLF 发生发展中发挥重要病理作用,P62-Keap1-NRF2 通路是其关键调控信号轴,Fer-1 可通过恢复该通路稳态功能而抑制铁死亡,为 CLF 的治疗提供了新的实验依据。

铁死亡作为一种铁依赖性的程序性细胞死亡方式,其核心机制在于细胞内铁过载通过芬顿反应催化 ROS 大量生成,进而攻击膜磷脂中的多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs),引发脂质过氧化链式反应,最终导致细胞膜破裂[3] [8]。本研究中,模型组细胞内 Fe²⁺、ROS 及 MDA 水平均显著升高,与文献报道的铁死亡生化特征一致[9]。值得注意的是,在 CLF 大鼠模型中,Masson 染色显示大量胶原纤维沉积及假小叶形成,表明 CCl₄ 诱导可部分模拟人类 CLF 的肝纤维化和肝硬化病理进程。Fer-1 干预后,铁死亡相关通路指标显著下降、肝纤维化和坏死程度明显减轻,提示铁死亡是 CLF 肝损伤的重要驱动因素,抑制铁死亡可有效延缓疾病进展。

P62-Keap1-NRF2 通路是细胞抗氧化应激的核心防御系统。在正常生理条件下,NRF2 与 Keap1 结合并被泛素化降解,维持较低的基础活性。当细胞受到氧化应激刺激时,Keap1 半胱氨酸残基发生构象改变,NRF2 得以稳定并转位入核,启动下游血红素加氧酶 1 (heme oxygenase, HO-1)、NAD(P)H:醌氧化还原酶 1(NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, NQO1)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基(Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit, GCLC)等抗氧化基因的转录,增强细胞对氧化损伤的抵抗能力[5] [10]。P62 作为选择性自噬接头蛋白,可通过其 KIR 结构域竞争性结合 Keap1,从而阻止 Keap1 介导的 NRF2 降解,进一步激活该通路[11]。本研究发现,在 CLF 细胞和大鼠模型中,P62 和 NRF2 的表达均显著下调,而 Keap1 表达上调,同时上述通路分子的表达变化与铁死亡关键指标之间存在显著的相关性,在细胞实验中,模型组 P62 和 NRF2 mRNA 表达分别降至对照组的 65%和 50%,Keap1 表达升高至对照组的近 2 倍(见表 4),同时 Fe²⁺、ROS 和 MDA 水平分别升高至对照组的 1.79 倍、1.80 倍和 1.79 倍(见表 3)。在大鼠肝脏中也呈现一致趋势:模型组 P62 和 NRF2 蛋白表达分别降至对照组的 31%和 62%,Keap1 升高至对照组的 2.9 倍(见表 7),而肝组织出现典型纤维化和坏死。经 Fer-1 干预后,上述通路分子和铁死亡指标均同步显著逆转(均 $P < 0.05$)。这种同步变化提示,在 CLF 病理进程中,P62-Keap1-NRF2 通路的功能抑制(P62↓, NRF2↓, Keap1↑)与铁死亡的激活(Fe²⁺, ROS, MDA↑)高度关联,通路失代偿可能是铁死亡发生的重要上游事件。这一现象与 P62-Keap1-NRF2 通路在应激条件下的经典激活模式相悖,主要考虑 CLF 是一个长期、慢性的肝损伤过程,在疾病早期或轻度损伤时,细胞可通过上调 P62 和 NRF2 发挥代偿性保护作用;然而,当损伤因素持续存在且强度超过代偿能力时,抗氧化系统逐渐耗竭,导致 P62 和 NRF2 表达下降、Keap1 积累,通路功能失代偿,进而促进铁死亡的发生,这种“早期保护-晚期失代偿”的双重作用模式在其他慢性肝病研究中亦有报道[12] [13],为本研究提供了一定程度的支持,同时本研究检测的是造模至 CLF 成型后的终末期样本,正处于失代偿阶段,因此观察到了 P62 和 NRF2 的下调。

Fer-1 是经典的铁死亡抑制剂,属于亲脂性自由基捕获抗氧化剂(radical-Trapping Antioxidants, RTA),其核心机制在于捕获脂质过氧化自由基、中断过氧化链式反应,从而阻断铁死亡[14] [15]。本研究中,Fer-1 干预不仅显著降低了 Fe²⁺、ROS 和 MDA 水平,还逆转了 P62 和 NRF2 的下调以及 Keap1 的上调,使通路分子表达恢复至接近正常水平。这表明 Fer-1 可能通过以下两种方式发挥作用:一是直接捕获脂质过

氧化自由基,减少氧化应激对细胞造成的损伤;二是通过减轻氧化应激负担,间接恢复 P62-Keap1-NRF2 通路的转录活性,从而修复抗氧化防御系统[16]。已有研究证实, Fer-1 可通过调控谷胱甘肽过氧化物酶 4 (glutathione peroxidase 4,GPX4) - 谷胱甘肽(glutathione, GSH)系统及铁代谢相关蛋白发挥保护作用[17] [18]。本研究进一步揭示了 Fer-1 对 P62-Keap1-NRF2 通路的调控作用,为其抗铁死亡机制提供了新的视角。

虽然本研究通过研究细胞和动物实验体系探讨了 P62-Keap1-NRF2 通路介导铁死亡在慢性肝衰竭中的作用机制并取得了一定成果,仍存在一定局限性。首先,动物模型采用 CCl₄ 化学诱导,与临床 CLF 的多病因(如病毒性肝炎、酒精、代谢综合征)存在差异,未来可采用胆管结扎、高脂饮食联合低剂量 CCl₄ 等多种模型进行交叉验证。其次,本研究主要基于相关性分析,未采用基因敲除或过表达技术对 P62、Keap1、NRF2 进行功能验证,后续可利用肝细胞特异性 P62 或 NRF2 敲除小鼠进一步明确其因果作用。第三,铁死亡的确切证据尚需补充透射电镜观察线粒体超微结构(如线粒体皱缩、嵴减少)及检测 GPX4、溶质载体家族 7 成员 11 (轻链亚基) (Solute carrier family 7 member 11 xCT, SLC7A11/xCT)、酰基辅酶 A 合成酶长链家族成员 4 (Acyl-CoA synthetase long-chain family member 4, ACSL4)等特异性标志物[19] [20]。第四,缺乏临床样本验证,后续应收集 CLF 患者血清及肝组织,检测上述分子表达及其与疾病预后的关系。

5. 结论

综上所述,本研究证明了铁死亡参与 CLF 发生发展过程,阐明了 P62-Keap1-NRF2 通路是调控 CLF 铁死亡的重要信号轴,并揭示了 Fer-1 可通过恢复该通路稳态功能部分逆转铁死亡效应。这些发现为深入理解 CLF 的发病机制提供了新的理论依据,也为靶向 P62-Keap1-NRF2 通路及铁死亡治疗 CLF 提供了新的策略。未来研究应聚焦于深入解析该通路的上下游调控网络,并推动基础研究成果向临床转化。

致 谢

衷心感谢广西医科大学第一附属医院消化内科和广西中医药大学第一附属医院中医临床研究重点实验室的各位老师和同事在本研究中给予的大力支持和帮助。

声 明

所有动物实验经广西医科大学动物实验福利伦理审查(批号 2024-E049-01)。

基金项目

广西自然科学基金(2023GXNSFAA026176); 国家自然科学基金(82274434), 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2024ky0123); 广西壮族自治区民族医院孵化项目(民科 FY202404)。

参考文献

- [1] 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组, 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南(2024年版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2024, 40(12): 2371-2387.
- [2] Dixon, S.J., Lemberg, K.M., Lamprecht, M.R., Skouta, R., Zaitsev, E.M., Gleason, C.E., *et al.* (2012) Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, **149**, 1060-1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- [3] Chen, J., Li, X., Ge, C., Min, J. and Wang, F. (2022) The Multifaceted Role of Ferroptosis in Liver Disease. *Cell Death & Differentiation*, **29**, 467-480. <https://doi.org/10.1038/s41418-022-00941-0>
- [4] 张飞宇, 阿迪拉·亚克普, 赵金明, 等. 铁死亡的发生机制及在肝脏疾病中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(6): 1454-1458.
- [5] Sun, Y., Chen, P., Zhai, B., *et al.* (2023) NRF2 and Ferroptosis: Functional and Therapeutic Relevance in Liver Diseases. *Redox Biology*, **68**, Article 102800.

- [6] Zhao, Y., Lu, J., Mao, A., Zhang, R. and Guan, S. (2021) Autophagy Inhibition Plays a Protective Role in Ferroptosis Induced by Alcohol via the p62-Keap1-Nrf2 Pathway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **69**, 9671-9683. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c03751>
- [7] 丁美灵, 高铭, 包懿文, 等. 基于 p62-Keap1-Nrf2 信号通路探讨荆防颗粒对酒精性肝损伤小鼠的保护作用[J]. *中草药*, 2024, 55(19): 6588-6598.
- [8] Galy, B., Conrad, M. and Muckenthaler, M. (2024) Mechanisms Controlling Cellular and Systemic Iron Homeostasis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **25**, 133-155. <https://doi.org/10.1038/s41580-023-00648-1>
- [9] Cooke, G.S., Flower, B., Cunningham, E., Marshall, A.D., Lazarus, J.V., Palayew, A., et al. (2024) Progress Towards Elimination of Viral Hepatitis: A Lancet Gastroenterology & Hepatology Commission Update. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*, **9**, 346-365. [https://doi.org/10.1016/s2468-1253\(23\)00321-7](https://doi.org/10.1016/s2468-1253(23)00321-7)
- [10] Baird, L., Llères, D., Swift, S. and Dinkova-Kostova, A.T. (2013) Regulatory Flexibility in the Nrf2-Mediated Stress Response Is Conferred by Conformational Cycling of the Keap1-Nrf2 Protein Complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **110**, 15259-15264. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305687110>
- [11] Tan, H., Ji, Y., Cheng, X., Hu, J., Yu, X., Wang, J., et al. (2026) Chlorogenic Acid Alleviates Chronic Restraint Stress-Induced Liver Injury Potentially via Nrf2-Mediated Inhibition of Ferroptosis and Mitochondrial Apoptosis. *Food & Function*, **17**, 1061-1073. <https://doi.org/10.1039/d5fo04627k>
- [12] Park, W., Wei, S.B., Kim, B.S., Kim, B., Bae, S., Chae, Y.C., et al. (2023) Diversity and Complexity of Cell Death: A Historical Review. *Experimental & Molecular Medicine*, **55**, 1573-1594. <https://doi.org/10.1038/s12276-023-01078-x>
- [13] Zhang, H., Li, H., Liu, S., Zheng, J. and Li, P. (2025) Ferroptosis Mediated by Ferritinophagy Is Involved in Liver Injury Caused by Sepsis. *Scientific Reports*, **15**, Article No. 45489. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-29557-3>
- [14] Zhou, X., Fu, Y., Liu, W., Mu, Y., Zhang, H., Chen, J., et al. (2022) Ferroptosis in Chronic Liver Diseases: Opportunities and Challenges. *Frontiers in Molecular Biosciences*, **9**, Article 928321. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.928321>
- [15] Scarpellini, C., Klejborowska, G., Lanthier, C., Hassannia, B., Vanden Berghe, T. and Augustyns, K. (2023) Beyond Ferrostatin-1: A Comprehensive Review of Ferroptosis Inhibitors. *Trends in Pharmacological Sciences*, **44**, 902-916. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2023.08.012>
- [16] Lei, Z.Y., Li, Z.H., Lin, D.N., et al. (2024) Med1 Inhibits Ferroptosis and Alleviates Liver Injury in Acute Liver Failure via Nrf2 Activation. *Cell & Bioscience*, **14**, Article No. 54. <https://doi.org/10.1186/s13578-024-01234-4>
- [17] Liu, Y., Zhang, M., Huang, Y., Zhang, Y., Zhu, C., Guan, J., et al. (2025) Involvement of Ferroptosis in Metabolic Dysfunction-Associated Steatohepatitis-Related Liver Diseases. *Journal of Molecular Medicine*, **103**, 1299-1315. <https://doi.org/10.1007/s00109-025-02599-w>
- [18] Andrew, A.S., Burgess, J.L., Meza, M.M., Demidenko, E., Waugh, M.G., Hamilton, J.W., et al. (2006) Arsenic Exposure Is Associated with Decreased DNA Repair *in Vitro* and in Individuals Exposed to Drinking Water Arsenic. *Environmental Health Perspectives*, **114**, 1193-1198. <https://doi.org/10.1289/ehp.9008>
- [19] Zou, K., Wang, N., Wang, L., Zhu, Z., Gu, M. and Zhang, J. (2026) Regulated Cell Death in Sepsis-Associated Liver Injury: Molecular Mechanisms and Therapeutic Implications. *Frontiers in Immunology*, **17**, Article 1740461. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2026.1740461>
- [20] Zhu, L., Luo, S., Zhu, Y., Tang, S., Li, C., Jin, X., et al. (2023) The Emerging Role of Ferroptosis in Various Chronic Liver Diseases: Opportunity or Challenge. *Journal of Inflammation Research*, **16**, 381-389. <https://doi.org/10.2147/jir.s385977>