

## 酒精性肝病患者肝脏铁沉积研究进展

刘莹莹 王晓凡 丛敏

酒精性肝病(ALD)是指因长期大量饮酒导致的肝脏疾病,患者初期表现为单纯的肝脏脂肪变性,随后可进一步进展为肝纤维化,最终导致肝硬化<sup>[1]</sup>。近年来,饮酒所导致的肝硬化在所有肝硬化病因中所占比例呈现上升趋势,ALD已经成为我国最主要的慢性肝病之一<sup>[2]</sup>。而在欧盟国家,所有肝病导致的死亡中,有41%归因于酒精性肝病<sup>[3]</sup>。除酒精性肝病外,许多慢性肝脏疾病(CLDs),如血色病、病毒性肝炎(乙肝和丙肝病毒感染)和非酒精性脂肪性肝病等在肝脏纤维化进展期均会出现铁水平的升高,尤其是在遗传性血色病患者当中,发生肝纤维化和肝硬化患者的肝脏铁含量比无纤维化患者的肝脏铁含量明显升高,提示铁过载可能是导致疾病进展以及加重肝脏病理表现的重要因素<sup>[4-5]</sup>。

### 一、铁的生物学功能

铁是几乎所有生物所必须的微量元素。含铁蛋白除起到运输和储存铁的作用外,也可携带或储存氧并参与催化氧化还原反应,除此之外,铁也可参与核酸复制、宿主防御和信号转导<sup>[6-7]</sup>。然而,当过量的游离铁存在时可与活性氧(ROS)结合通过芬顿反应催化自由基的产生,从而破坏DNA、蛋白质和脂质,导致严重的细胞和组织损伤,进而诱导实质细胞和非实质细胞内促纤维化信号,加速疾病进展从而导致肝纤维化<sup>[1,4,7]</sup>。因此维持人体内铁的平衡至关重要。人体仅通过肠上皮细胞的脱落和失血每天排出1~2 mg铁,而无法通过其他生理途径的调控排出体内多余的铁,因此人体对体内铁含量的调控主要是通过对铁吸收调控而实现的<sup>[4,6-7]</sup>。食物中大部分的铁可以三种不同形式通过十二指肠被人体吸收,即无机非血红素结合铁、血红素结合铁和铁蛋白结合铁,其中最主要的吸收形式是无机非血红素结合铁。无机非血红素结合的 $\text{Fe}^{3+}$ 被十二指肠细胞色素B还原酶还原为 $\text{Fe}^{2+}$ 后,通过位于肠细胞顶端的DMT1进入肠细胞。进入胞质中的 $\text{Fe}^{2+}$ 与伴侣蛋白结合后,被转运至小肠细胞基底部通过FPN运出细胞, $\text{Fe}^{2+}$ 经FPN转运至门静脉后被氧化为 $\text{Fe}^{3+}$ ,然后与血浆中的转铁蛋白结合后进行运输<sup>[8]</sup>。80%转铁蛋白结合铁直接到达骨髓,通过转铁蛋白受体1(TFR1)进入有核红细胞,剩余20%进入不同的髓外细胞参与多种代谢过程<sup>[9]</sup>。

### 二、人体内铁稳态的调节

肝脏在人体铁稳态中发挥着关键作用,在正常生理条件

下,系统性铁平衡是由肝脏肝细胞合成和分泌的铁调素介导的<sup>[6,7]</sup>。FPN是目前哺乳动物体内已知的唯一的铁输出蛋白,主要表达于十二指肠上皮细胞、网状内皮巨噬细胞、肝细胞和胎盘合体滋养细胞的基底侧。铁调素与FPN细胞外结构结合,触发胞内区域赖氨酸残基泛素化,最终使其在溶酶体内内化和降解<sup>[10]</sup>。当红细胞生成需要较多的铁时,铁调素的合成受到抑制,因此较多的铁可通过肠细胞和巨噬细胞上的FPN进入血液循环,相反体内铁超载时如病原体增殖或炎症,可诱导铁调素的表达增加,FPN内化降解,因此进入血液循环的铁下降<sup>[11]</sup>。除此之外,细胞内铁的调节也对人体系统性铁稳态产生重要影响,其中最重要的是铁反应元件(IRE)-铁调节蛋白(IRP1和IRP2)系统。IRPs可以与多种编码铁代谢相关蛋白的mRNAs的非翻译区域(UTRs)内IRE结合。当细胞内铁的含量较低时,一方面IRPs与铁蛋白mRNA的5'-UTR结合抑制其翻译,从而生成少量的铁蛋白;另一方面,IRPs与TFR1 mRNA的3'-UTR区域内的IRE结合增加其稳定性,保证其不被降解因而通过其转运入细胞的铁增加。而当细胞内的铁含量较高时,则产生相反的效应<sup>[12-13]</sup>。

### 三、不同因素对铁调速表达的调控

铁调素作为人体内重要的铁调控因子,其表达受到多种因素的调节。目前已知的对铁调素的调控主要发生在转录水平<sup>[6,14]</sup>,其中包括人体内铁的状态、炎症和红细胞生成等。血清铁水平/转铁蛋白饱和度和肝脏内铁含量都会影响铁调素的表达<sup>[6]</sup>。当血浆中的转铁蛋白饱和度增加时,其使HFE基因编码蛋白与转铁蛋白受体2(TFR2)的相互作用增加,并与铁调素调节蛋白hemojuvelin(HJV)形成复合物,进一步稳定骨形态发生蛋白(BMP)I型受体ALK3,激活BMP/SMAD信号通路;也可活化细胞外信号调节激酶(ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,进而促进铁调素的表达。但是也有研究表明ERK/MAPK通路活化后可通过调节furin蛋白的表达而抑制铁调素的表达<sup>[7,15-16]</sup>。除血清铁水平/转铁蛋白饱和度影响铁调素表达之外,肝脏内铁含量也会影响铁调素的表达。当肝窦内皮细胞内的铁浓度增加时,可通过ROS激活核因子NF-E2相关因子进而通过转录调节BMP6的生成,活化BMP/SMAD信号通路促进铁调素的转录<sup>[7,16]</sup>。HJV是活化BMP受体重要的协同受体,其可通过与SMAD结合而促进铁调素

基金项目:国家自然科学基金(81570542);北京市自然科学基金(7142043)

作者单位:100050 北京 首都医科大学附属北京友谊医院肝病中心;肝硬化转化医学北京市重点实验室暨国家消化系统疾病临床医学研究中心

通信作者:丛敏,Email:maomao0623@sina.com

的表达<sup>[10]</sup>。HJV 的表达受到多种因素的调节,如第一个发现的肝脏铁调素表达的负性调控因子跨膜丝氨酸蛋白酶/基质酶-2(TMPRSS6)可通过裂解和灭活 HJV 而作为 BMP/SMAD 信号通路的负性调控因子,同时也可抑制铁调素启动子的活性<sup>[10,17]</sup>。体内研究发现,TMPRSS6 也可不依赖于 HJV 而抑制 HJV 敲除小鼠铁调素的表达,同时在体外研究中证实,TMPRSS6 可裂解铁代谢相关蛋白 HFE 和 TFR2 等<sup>[7]</sup>。除此之外, furin 蛋白可水解 HJV 生成可溶性 HJV(sHJV),sHJV 可与 BMP2、BMP4 和 BMP6 结合,竞争性抑制 HJV 与 BMP 的结合,进而抑制 BMP/SMAD 信号通路<sup>[6]</sup>。

炎症是除人体内铁状态外另一种调节铁调素表达的重要因素。白细胞介素-6(IL-6)与其受体结合后可活化信号转导与转录激活因子 3(STAT3),磷酸化后的 STAT3 与铁调素启动子中的 STAT3 反应元件结合上调铁调素的表达<sup>[7]</sup>。也有研究表明,炎症除了活化 IL-6/STAT3 信号通路外,也可刺激 BMP/转化生长因子  $\beta$  超家族配体激活素 B 与 BMP I 型受体结合进而活化 BMP/SMAD 信号通路,并且 IL-6/STAT3 和 BMP/SMAD 信号通路之间存在相互作用<sup>[7,18]</sup>。

红细胞生成也与人体内铁水平密切相关,因此也会影响铁调素的水平。其中由促红细胞生成素(EPO)诱导分泌的 erythroferrone(ERFE)可能是抑制铁调素表达的因子,其抑制铁调素表达的过程需要 SMAD 蛋白的参与,并且不依赖于 BMP6、HJV 和 TMPRSS6<sup>[7]</sup>。

#### 四、酒精性肝病(ALD)患者肝脏铁沉积机制

除原发性血色病外,各种 CLDs 也会出现铁调节障碍。ALD 患者中血清铁蛋白水平和转铁蛋白饱和度升高的比例分别为 63%和 29%,11%~52% ALD 患者出现肝脏铁含量的增加,并且与健康对照组相比具有统计学差异<sup>[10]</sup>。早期轻度 ALD 患者肝脏铁主要沉积于肝细胞,而晚期重度 ALD 患者肝脏铁主要沉积于网状内皮组织<sup>[19]</sup>。肝脏铁的存在被认为是影响 ALD 患者生存的一个独立危险因素,是肝纤维化相关因素之一,并且可预测酒精性肝硬化患者肝细胞肝癌甚至死亡的发生<sup>[1,10]</sup>。既然肝脏铁含量对疾病的进展会产生很大影响,那么了解 ALD 患者肝脏铁沉积机制十分必要。

(一) 铁调素表达的降低 许多 ALD 铁过载患者都会出现血清铁调素的表达量降低<sup>[10]</sup>,在 ALD 患者中铁调素水平的降低通常伴随着巨噬细胞中的铁沉积,酒精介导的肝内铁调素合成的下调可能是 ALD 患者肝脏铁过载主要的潜在的机制之一<sup>[19,20]</sup>。

1、基因突变:在一项 meta 分析中发现,HFE 基因 H63D 位点纯合突变与患 ALD 的易感性相关<sup>[17,21]</sup>,并且 HFE 单一位点突变会使 ALD 患者发生肝脏铁沉积的风险增加<sup>[22]</sup>。与无肝铁蓄积的 ALD 患者相比,HFE 突变在出现肝铁沉积的 ALD 患者中更常见,但 HFE 突变与肝纤维化、疾病严重程度或炎症活动度的增加无关。然而也有研究表明无论是 HFE 基因的 C282Y 还是 H63D 杂合突变都不会增加 ALD 患者铁沉积的风险<sup>[10,23]</sup>。这可能与两项研究的人群不同有关。

2、生长因子表达增高:表皮生长因子(EGF)和肝细胞生长因子(HGF)是肝脏损伤后肝细胞修复和再生的重要介质。EGF 和 HGF 以及其他生长因子,可能通过抑制铁调素的合成,促进肝脏中铁蓄积,进而加速肝脏疾病的进程<sup>[10,24]</sup>。体外研究表明,EGF 可通过减少 SMAD1/5/8 的核定位来抑制铁调素的表达。HGF 对铁调素的调节发生在转录水平,可通过磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路和 MAPK/ERK 通路干扰 SMAD 的核定位、增加 SMAD 转录抑制物质 TG-相互作用因子、抑制铁调素启动子活性进而抑制铁调素的表达<sup>[24]</sup>。

3、应激反应:酒精诱导的肝细胞氧化应激是其抑制肝细胞铁调素表达下降的主要机制之一<sup>[17]</sup>。酒精代谢过程中可通过增加细胞色素 P450 2E1 的活性和破坏线粒体的抗氧化反应两种方式增加 ROS 的生成<sup>[10]</sup>。除此之外,酒精也可能通过增加血液循环中脂多糖(LPS)水平,诱导巨噬细胞促炎性细胞因子尤其是肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF $\alpha$ )和 ROS 的释放。氧化应激可以增加 TMPRSS6、sHJV 和 HGF 等的表达进而抑制铁调素的表达<sup>[10]</sup>,也会抑制铁调素启动子的活性和转录调节因子 C/EBP $\alpha$ 的活性进而抑制铁调素的表达<sup>[14,17]</sup>。尽管如此,目前关于 ROS 对铁调素调节的研究仍然存在争议。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作为一种最主要的 ROS,当其浓度在 0.3~6  $\mu$ M 之间时会通过增加 STAT3 的磷酸化促进铁调素启动子的活性,而当 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的浓度大于 50  $\mu$ M 时又会抑制铁调素的表达<sup>[25]</sup>。除氧化应激外,内质网应激也会导致肝脏铁过载。在酒精和高脂饮食诱导的肝损伤小鼠模型中,肝脏铁过载会诱导发生内质网应激反应<sup>[10]</sup>,而在内质网应激的早期阶段,C/EBP 同源蛋白表达增加,作为 C/EBP $\alpha$ 的抑制剂,可显著抑制铁调素的表达<sup>[26-27]</sup>。

4、低氧:酒精可能通过增加肝代谢活性和改变肝血流量来降低肝内的氧张力<sup>[10]</sup>。体内研究表明,酒精处理组小鼠与对照组小鼠相比可发生较强的低氧反应,且这种低氧反应与铁调素的表达抑制相关<sup>[20]</sup>。研究发现,低氧时发生改变的基因主要受低氧诱导因子(HIF)调控。HIF 由 HIF $\alpha$  和 HIF $\beta$  组成,低氧发生时,HIF $\alpha$  首先在细胞浆积聚,随后易位进入细胞核与 HIF $\beta$  结合形成二聚体复合物,并进一步结合至许多参与低氧反应基因的启动子,如 TFR1、DMT1 和 FPN 等,促进其转录<sup>[20,28]</sup>,进而增加人体铁的吸收。而低氧除了通过诱导 HIF 增加人体铁吸收外,也会通过调控 EPO 的生成间接抑制铁调素的表达<sup>[29]</sup>。同时 HIF 也会通过调节 EPO 生成,进而诱导红细胞生成 ERFE 而间接抑制铁调素的表达<sup>[7]</sup>。但也有研究表明在低氧情况下铁调素水平的改变与血清 EPO 水平无关<sup>[14]</sup>。除此之外 HIF 也可介导转录调节因子 CCAAT/增强子结合蛋白  $\alpha$ (C/EBP $\alpha$ )降解进而抑制铁调素的表达,而 C/EBP $\alpha$  的过表达以及抑制肝脏 HIF 功能时则可逆转酒精对铁调素的抑制作用<sup>[20]</sup>。低氧环境下,ROS 的显著升高可进而抑制 C/EBP $\alpha$  以及 STAT3 与铁调素启动子的结合<sup>[30]</sup>。此外,在低氧情况下,血清中的血小板源性生长因子(PDGF)-BB 升高,PDGF-BB 可通过下调转录调节因子环磷酸腺苷反应元件结合蛋白(CREB)和 CREB-H 的表达,抑制生理性和 BMP6 诱导性铁调素的表

达<sup>[7,14]</sup>。

5、肝脏铁水平下降:在研究酒精对铁代谢影响的体内实验中发现,酒精会使肝脏铁含量和铁蛋白的表达显著下降,因此酒精诱导铁调素水平下降可能通过铁水平降低而实现<sup>[31]</sup>。低铁饮食或者细胞内较低水平的铁会抑制 TMPRSS6 的降解,同时也会通过 furin 蛋白裂解 HJV,增加 sHJV 的产生,以上均会抑制铁调素的产生<sup>[7]</sup>。除此之外,DMT1 转录后 mRNA 的稳定性受 IRE-IRPs 系统的调控,肝细胞内铁水平下降时,IRPs 和 IRE 结合稳定 DMT1 的转录进而使其表达水平上调,因此铁吸收增加<sup>[8]</sup>。

6、其他可抑制铁调素表达的因素:酒精的摄入可能会干扰炎症对铁调素的刺激而起到抑制铁调素表达的作用<sup>[19]</sup>。如体外实验表明,酒精并不改变铁调素水平,但是可显著抑制 IL-6 对铁调素的诱导作用<sup>[32]</sup>。除此之外,酒精也可抑制 BMP 受体和 SMAD1、5 的活化,以及 SMAD4 与铁调素启动子的结合从而抑制铁调素的表达<sup>[33]</sup>。慢性酒精摄入增加 ALD 患者门静脉中肠源性内毒素 LPS 的水平,LPS 与 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLR)4 结合后可活化核因子 (NF)- $\kappa$ B。体内实验研究表明,酒精可抑制野生型小鼠铁调素的表达而不能抑制 TLR4 突变型小鼠,并且不发生 NF- $\kappa$ B p65 亚基的磷酸化和核易位,因此酒精可通过 TLR4 信号通路发挥对铁调素的抑制作用<sup>[34]</sup>。

(二) 其他导致铁沉积的机制 铁吸收的增加是除铁调素外导致 ALD 患者肝脏铁过载的另一重要因素。除上文所提到的低氧和肝铁水平降低可导致铁吸收增加外,肠道通透性的改变以及葡萄酒中所含的铁同样被认为是促进肠道铁吸收的潜在机制。酒精可增加肠道的通透性,使铁和内毒素通过肠道进入人体循环增加<sup>[17]</sup>。有文献报道酒精代谢产物乙醛可能通过增加 IRP 的活性而增加肝细胞 TFR1 的表达,TFR1 表达增加后肝细胞摄取转铁蛋白结合铁增加<sup>[35]</sup>。同时酒精也会诱导库普弗细胞内转录因子 NF- $\kappa$ B 的活化、炎症因子 TNF- $\alpha$  等的释放,炎症因子又会增加库普弗细胞铁的摄取由此形成正反馈调节<sup>[17,35]</sup>。

## 五、展望

ALD 已成为我国最主要的肝病之一,其在同期肝病住院患者中的比例不断上升,酒精性肝硬化占肝硬化病因的构成比也在逐年上升。约有 50% 的 ALD 患者出现肝脏铁沉积。酒精介导的铁调素的表达下调,肝细胞中 TFR1 表达的上调,以及同时伴随的十二指肠 DMT1 和 FPN 表达的增加,均导致了 ALD 患者的系统性铁沉积。现有研究表明,铁调素表达的降低是 ALD 患者铁沉积的主要原因,铁沉积物和非转铁蛋白结合铁通过刺激肝细胞的氧化应激而进一步损伤肝脏。因此,深入研究酒精肝患者铁沉积机制尤其是铁调素相关机制有利于对该疾病提供新的临床诊断和治疗依据。未来对于 ALD 的研究,更应该侧重于铁调素激动剂、人工合成铁调素,以及通过干预各种代谢途径以刺激内源性铁调素合成等方向。

## 参 考 文 献

- [1] Milic S, Mikolasevic I, Orlic L, et al. The Role of Iron and Iron Overload in Chronic Liver Disease. *Med Sci Monit*, 2016, 22: 2144-2151.
- [2] Li YM, Fan JG. Guidelines of prevention and treatment for alcoholic liver disease (2018, China). *J Dig Dis*, 2019, 20: 174-180.
- [3] European Association for the Study of the Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of alcohol-related liver disease. *J Hepatol*, 2018, 69: 154-181.
- [4] Mehta KJ, Farnaud SJ, Sharp PA. Iron and liver fibrosis: Mechanistic and clinical aspects. *World J Gastroenterol*, 2019, 25: 521-538.
- [5] Tangudu NK, Buth N, Strnad P, et al. Dereglulation of hepatic Mek1/2(-)Erk1/2 signaling module in iron overload conditions. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2019, 12: 70.
- [6] Ganz T. Systemic iron homeostasis. *Physiol Rev*, 2013, 93: 1721-1741.
- [7] Wang CY, Babitt JL. Liver iron sensing and body iron homeostasis. *Blood*, 2019, 133: 18-29.
- [8] Kawabata H. The mechanisms of systemic iron homeostasis and etiology, diagnosis, and treatment of hereditary hemochromatosis. *Int J Hematol*, 2018, 107: 31-43.
- [9] Brissot P, Loreal O. Iron metabolism and related genetic diseases: a cleared land, keeping mysteries. *J Hepatol*, 2016, 64: 505-515.
- [10] Czaja AJ. Review article: iron disturbances in chronic liver diseases other than haemochromatosis - pathogenic, prognostic, and therapeutic implications. *Aliment Pharmacol Ther*, 2019, 49: 681-701.
- [11] Pietrangelo A. Ferroportin disease: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Haematologica*, 2017, 102: 1972-1984.
- [12] Anderson GJ, Frazer DM. Current understanding of iron homeostasis. *Am J Clin Nutr*, 2017, 106: 1559s-1566s.
- [13] Brissot P, Pietrangelo A, Adams PC, et al. Haemochromatosis. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18016.
- [14] Sonnweber T, Nachbaur D, Schroll A, et al. Hypoxia induced downregulation of hepcidin is mediated by platelet derived growth factor BB. *Gut*, 2014, 63: 1951-1959.
- [15] Poli M, Lusciati S, Gandini V, et al. Transferrin receptor 2 and HFE regulate furin expression via mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MAPK/Erk) signaling. Implications for transferrin-dependent hepcidin regulation. *Haematologica*, 2010, 95: 1832-1840.
- [16] Loreal O, Cavey T, Robin F, et al. Iron as a therapeutic target in hfe-related hemochromatosis: usual and novel aspects. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2018, 11: 131.
- [17] Harrison-Findik DD. Is the iron regulatory hormone hepcidin a risk factor for alcoholic liver disease? *World J Gastroenterol*, 2009, 15: 1186-1193.