

网络出版时间: 2021-8-19 14:10 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210819.1123.015.html>

ferrostatin-1 保护对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性肝损伤

蒋慰瀛¹, 秦明强¹, 张 程², 屈明超¹, 徐德祥², 王建青¹

摘要 目的 探究铁死亡抑制剂 ferrostatin-1(fer-1) 对对乙酰氨基酚(APAP) 过量所导致的小鼠急性肝损伤(ALI) 是否有保护作用。方法 ① 生存实验: 将 40 只雄性 ICR 小鼠随机分为 4 组, 分别为 APAP 模型组、fer-1 预处理组、fer-1 后处理组、N-乙酰-L-半胱氨酸(NAC) 后处理组。处理后观察 7 d, 记录小鼠的死亡情况。② 将 48 只雄性 ICR 小鼠随机分为 0 h 组、fer-1 组、APAP 模型组(1、4、24 h) 、fer-1 预处理组(1、4、24 h) 。通过 HE 染色观察小鼠肝脏的病理学变化; 生化仪检测小鼠血清中天冬氨酸氨基转移酶(AST) 和丙氨酸氨基转移酶(ALT) 以及肝匀浆中氧化应激指标丙二醛(MDA) 的水平; RT-PCR 检测铁死亡标志基因长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(ACSL4) 和前列腺素内过氧化物酶 2(ptgs2) 以及铁代谢相关基因转铁蛋白受体 1(TFR1) 、铁调素调节蛋白(HJV) 、转铁蛋白受体 2(TFR2) 和铁调节蛋白 1(IRP1) 的表达。结果 fer-1 前后处理与 NAC 后处理相比, 能提高小鼠的生存率; 相比于 APAP 模型组 fer-1 预处理组的小鼠肝脏系数下降, 肝功能指标 ALT、AST 得到改善, 脂质过氧化指标 MDA 降低, 铁死亡基因表达降低以及铁代谢紊乱得到改善。结论 fer-1 预处理可减轻 APAP 诱导的小鼠急性肝损伤, 其机制主要可能是通过抑制铁死亡并改善了小鼠肝脏铁代谢相关基

因的表达。

关键词 急性肝损伤; 对乙酰氨基酚; ferrostatin-1; 铁死亡; 铁代谢

中图分类号 R 966

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)10-1584-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.10.015

对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP) 是临幊上常用的解热镇痛药物, 应用非常广泛。在治疗剂量下 APAP 不会引起急性肝损伤(acute liver injury, ALI) , 然而 APAP 一旦过量就会导致急性肝损伤甚至是急性肝功能衰竭^[1-2]。据统计, 在美国每年 APAP 中毒的急诊患者约 56 000 例, 其中约 450 例死亡^[3]。

铁死亡(ferroptosis) 是近年来发现的一种细胞死亡方式, 其具有与其他细胞死亡不同的形态和生化特征^[4]。研究^[5]表明, 在体外条件下, 铁死亡抑制剂 ferrostatin-1(fer-1) 对 APAP 诱导的小鼠肝细胞的死亡有保护作用, 但其具体机制并不明确。该研究探讨 fer-1 保护 APAP 诱导的小鼠 ALI 的机制, 为临幊预防和治疗 APAP 过量导致的 ALI 提供新的方向和思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用 88 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠, 8 周龄, 体质量为 36~42 g, 购买于北京维通利华实验动物技术有限公司。小鼠饲养在适宜的环境中,

2021-05-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81373495、82073566); 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目(编号: gxyq2019014)

作者单位: ¹安徽医科大学第四附属医院药学部, 合肥 230012

²安徽医科大学公共卫生学院环境毒理学系安徽高校省重点实验室, 合肥 230032

作者简介: 蒋慰瀛, 男, 硕士研究生;

王建青, 女, 教授, 主任药师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: jianqingwang81@126.com

abdomen, the oxidative stress cells in the small intestinal epithelium of the hydrogel group and the temporary abdominal closure group were detected by immunohistofluorescence. The levels of malondialdehyde (MDA) and 8-OHDG in intestinal homogenate of the three groups were measured at specific time points by TBA and ELISA respectively. **Results** At 4 h after open abdomen, no oxidative stress injury was observed in intestinal epithelial cells in the CPT group and oxidative stress injury of intestinal epithelial cells was observed in the TAC group. Four hours after open abdomen, MDA and 8-OHDG levels were significantly highest in the TAC group, followed by CPT group, with Sham group was the least. At 8 h and 24 h after open abdomen, MDA and 8-OHDG levels in CPT group returned to Sham values, whereas these levels in TAC group were higher than those of Sham group. **Conclusion** The biomaterial chitosan-polyethylene glycol-tyramine molecular hydrogels can significantly reduce oxidative stress levels and protect against intestinal damage in small intestine after open abdomen.

Key words open abdomen; oxidative stress; intestine injury; hydrogel

具体环境如下: 温度保持在(25±1)℃, 湿度保持在(55±5)%, 保持12 h/12 h昼夜交替, 可自由饮水摄食。本研究所使用的动物实验均已通过安徽医科大学动物伦理委员会审查并批准(许可证编号: 20131179)。

1.2 试剂 fer-1 购自美国 MCE 公司; APAP、NAC 购自美国 Sigma 公司; 聚氧乙烯蓖麻油 EL(Cremophor[®] EL) 购自上海阿拉丁生化有限公司; 天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT) 检测试剂盒购自浙江伊利康生物技术有限公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; RT-PCR 相关试剂购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司以及美国 Promega 公司; 研究中引物均由实验室设计并交给上海 Invitrogen 有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 生存实验 将40只雄性 ICR 小鼠随机分为4组($n=10$)。APAP 模型组: 对小鼠进行单次 APAP 腹腔注射, 剂量为 500 mg/kg; fer-1 预处理组: 在 APAP 注射前 1 h 提前腹腔注射 fer-1(5 mg/kg); fer-1 后处理组: 在 APAP 注射后 1 h 腹腔注射 fer-1(5 mg/kg); NAC 后处理组: 在 APAP 注射后 1 h 腹腔注射 N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)(300 mg/kg)。在处理完后, 观察并记录 7 d 内小鼠的死亡情况。小鼠的存活率以生存小鼠数目/原有小鼠数目×100% 计算所得, 并以生存率作图。

1.3.2 时效实验 小鼠随机分为以下几组($n=6$): 0 h 组、fer-1 组、APAP 模型组(1、4、24 h)、fer-1 预处理组(1、4、24 h)。fer-1 预处理组在小鼠腹腔注射 400 mg/kg APAP 的前 1 h 腹腔注射 5 mg/kg 的 fer-1, 随后在注射 APAP 的 0、1、4、24 h 对小鼠进行取材^[6]。

1.3.3 血清生化指标检测 实验动物血清中肝功能指标通过贝克曼全自动生化检测仪检测, 检测指标为 ALT 和 AST。

1.3.4 肝脏 MDA 含量测定 精密称取 100 mg 小鼠肝脏组织, 放入 1 ml 预先 4 ℃冷藏的 0.9% 氯化钠溶液中, 随后批量放入自动匀浆仪中进行匀浆, 制备浓度为 20% 的匀浆液。制备好的组织匀浆液在 3 500 r/min、4 ℃下离心 15 min, 取上清液备用。提前配置好所需试剂, 根据试剂盒中提供的说明书进行相关操作, 使用酶标仪用 532 nm 波长检测上清液的吸光度, 并采用 BCA 法检测上清液中的总蛋白浓

度后, 根据公式 [(测定管吸光度 - 空白管吸光度) / (标准管吸光度 - 空白管吸光度) × 标准管浓度 / 待测蛋白浓度] 计算结果后分析。

1.3.5 组织病理学检测 取小鼠肝大叶 4% 多聚甲醛固定后, 进行包埋、切片、HE 染色、封固、透明、脱水、封片、光镜下观察。选取各组切片中连续的 3 个视野下的图像照片(×100), 采用 ImageJ 软件对图像进行分析并定量。

1.3.6 肝脏组织基因检测

1.3.6.1 肝脏 RNA 的提取和逆转录 采用 TRIzol 法提取小鼠肝脏总 RNA 后, 使用酶标仪进行 RNA 样品定量分析, 测定样品在 260、280 nm 波长处的吸光度值(OD) 并计算 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值, 加入无酶水将所有 RNA 样品的终浓度定量在 500 ng/μl。依据逆转录试剂盒中所提供的说明书, 使用逆转录仪将 RNA 逆转录成 cDNA。

1.3.6.2 RT-PCR 扩增反应 设计好的引物用无酶水稀释后, 与逆转录的 cDNA、PCR Mix、无酶水配置成 20 μl 的扩增反应体系。把扩增体系加入到 96 孔板后, 将扩增板放入离心机中离心, 放入 Light Cycler[®] 480 PCR 仪, 选择预定程序进行扩增。选取 18S 作为内参基因, 计算长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(long-chain acyl-coa synthetase, ACSL4) 和前列腺素内过氧化物酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase, ptgs2)、转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, TFR1)、铁调素调节蛋白(hemojuvelin, HJV)、转铁蛋白受体 2(transferrin receptor 2, TFR2)、铁调节蛋白 1(iron regulatory protein, IRP1) 和 18S 核糖体 RNA(18S ribosomal RNA, 18S) 基因的相对表达水平。引物序列如表 1 所示。

表 1 基因的引物序列

基因名	引物序列(5'-3')
ACSL4	F: CTTCTCTTAAGGCCGGAC R: TGCCATAGCGTTCTCTAGATT
ptgs2	F: GGGCTCAGCCAGGCAGCAAAT R: CCACTCTCTTCCGGCTGGCT
IRP1	F: GAGACTCTCTCCAGCCATCTT R: TGATCTCTCTGCATCCTGTC
TFR1	F: CGAACTGGCTGGTCATCT R: TGTCTCTGTCTACATTCT
TFR2	F: CTCAATGAGGCTGACGAGAAGG R: TCAGCGTGCTACACCTCAAAGC
HJV	F: ATGGGCCAGTCCCCTAGTC R: GACGAGACATACTCGGCATTG
18S	F: GTAACCCGTTGAACCCCAT R: CCATCCAATCGGTAGTAGCC

1.4 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件来进行分析, 分析结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。任意两组间差异比较使用 *t* 检验来分析, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 生存率采用 Kaplan-Meier 法分析并绘制生存曲线, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 fer-1 处理对 APAP 诱导的 ALI 小鼠的生存率的影响 生存实验结果如图 1 所示, APAP 处理后仅 10% 的小鼠在第 7 天处于存活状态。NAC 处理后的小鼠存活率提高到 70%, 而 fer-1 预处理和后处理与 NAC 后处理相比, 小鼠的存活率进一步提高到 90% 和 80%。采用 Kaplan-Meier 法分析数据, fer-1 预处理和后处理与 NAC 后处理组相比, 生存率都得到了提升 ($P < 0.05$, $F = 19.32$), 表明 fer-1 与 NAC 相比, 可能治疗效果更佳。

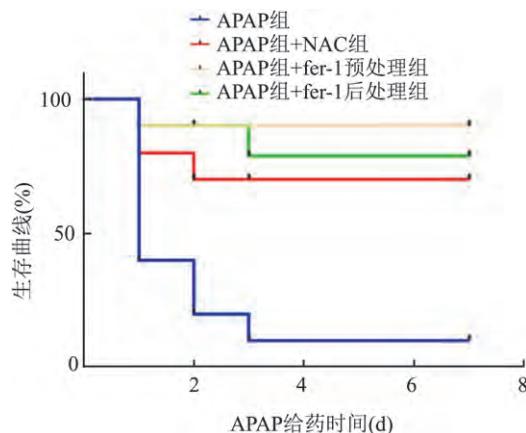


图 1 fer-1 处理对 APAP 诱导的急性肝损伤小鼠生存率的影响

2.2 fer-1 预处理对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝重系数的影响 结果如图 2 所示, 与 APAP(0 h) 组

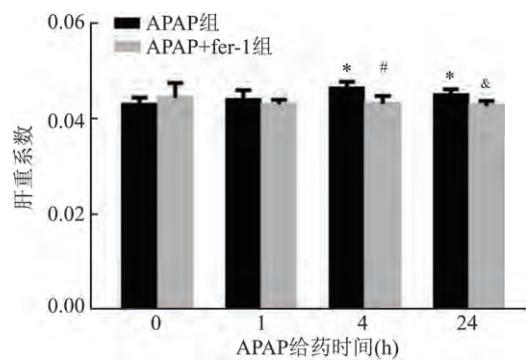


图 2 各组小鼠肝重系数

与 APAP(0 h) 组比较: $^* P < 0.05$; 与 APAP(4 h) 组比较: $^{\#} P < 0.05$; 与 APAP(24 h) 组比较: $^{\&} P < 0.05$

相比, 单独注射 fer-1 对小鼠的肝重系数差异无统计学意义; 与 APAP(0 h) 组相比, 单独 APAP 处理的各组中给予 APAP 4、24 h 后, 小鼠的肝重系数均有所升高 ($P < 0.05$, $F = 3.222$); 与单独 APAP 处理各组相比, fer-1 预处理在 4 h 时小鼠肝脏系数降低 ($P < 0.05$, $t = 2.466$) 24 h 时小鼠肝脏系数也降低 ($P < 0.05$, $t = 3.272$)。

2.3 fer-1 预处理对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝细胞坏死情况的影响 结果如图 3 所示, 与 APAP(0 h) 组相比, 单独注射 fer-1 对小鼠肝脏组织没有明显的毒副作用; 与 APAP(0 h) 组相比, 单独 APAP 处理的 1、4、24 h 组随着 APAP 注射时间的增加, 小鼠肝脏组织中的炎症浸润区域和组织坏死面积也增加 ($P < 0.01$, $F = 254.9$); 与单独 APAP 组相比, fer-1 预处理对 APAP 造成的小鼠肝脏组织的炎性浸润和组织坏死有一定的改善作用, APAP 处理 24 h 时炎性浸润区域和组织坏死面积下降, 治疗效果明显 ($P < 0.01$, $t = 11.12$)。

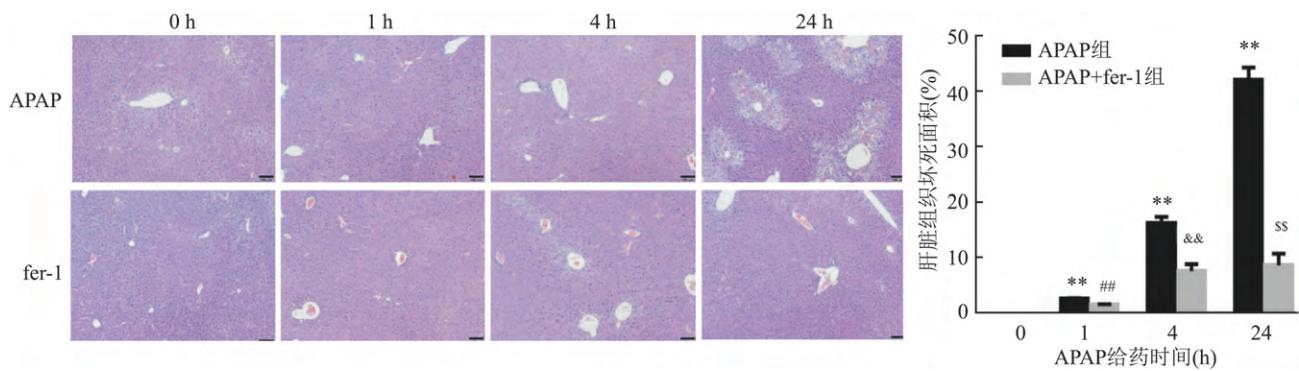
2.4 fer-1 预处理对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝功能的影响 检测结果如表 2 所示, fer-1 对小鼠的肝功能并没有影响; 与 APAP(0 h) 组相比, 给予了 APAP 的各组小鼠各项肝功能指标均发生了较为明显的改变, 各时间点小鼠血清中的 ALT、AST 随之增加, 在 24 h 达到最高远超正常水平且差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $F = 144$), 与单独 APAP 处理组相比, 使用 fer-1 预处理组小鼠的血清 ALT 和 AST 在各个时间点均有所降低, 在 24 h 时下降水水平最明显, 接近正常水平, 治疗效果明显 ($P < 0.01$, $t = 13.11$)。

表 2 各组小鼠血清中 ALT、AST 水平 (U/L $\bar{x} \pm s$)

组别	ALT	AST
APAP(0 h)	52.73 ± 4.64	157.47 ± 11.31
fer-1	45.12 ± 3.24	151.73 ± 11.90
APAP(1 h)	94.90 ± 12.47	$345.80 \pm 27.61^{**}$
APAP(4 h)	$100.83 \pm 9.97^*$	$330.77 \pm 10.66^{**}$
APAP(24 h)	$783.33 \pm 56.08^*$	$1420.07 \pm 100.89^{**}$
APAP+fer-1(1 h)	$55.03 \pm 6.27^{\#}$	$186.67 \pm 16.11^{\#}$
APAP+fer-1(4 h)	$62.37 \pm 4.91^{\&}$	$236.40 \pm 13.86^{\&}$
APAP+fer-1(24 h)	$46.37 \pm 3.60^{**}$	$139.73 \pm 17.46^{**}$

与 APAP(0 h) 组比较: $^* P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$; 与 APAP(1 h) 组比较: $^{\#} P < 0.05$; 与 APAP(4 h) 组比较: $^{\&} P < 0.05$; 与 APAP(24 h) 组比较: $^{**} P < 0.05$, $^{**} P < 0.01$

2.5 fer-1 预处理对 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝脏中 MDA 水平的影响 结果如图 4 所示, 与 APAP

图3 各组小鼠肝脏组织H&E染色以及组织坏死面积 $\times 100$

与 APAP(0 h) 组比较: ** $P < 0.01$; 与 APAP(1 h) 组比较: # $P < 0.01$; 与 APAP(4 h) 组比较: & & $P < 0.01$; 与 APAP(24 h) 组比较: & & $P < 0.01$

(0 h) 组相比,单独给予 fer-1 并不影响小鼠肝脏组织中 MDA 的水平;与 APAP(0 h) 组相比,单独给予 APAP 后 1、4 h 时,小鼠肝脏 MDA 水平有所上升($P < 0.05$, $F = 5.87$)到 24 h 时恢复至正常水平;与同一时点的单纯 APAP 组相比,fer-1 预处理 1、4 h 时,小鼠肝脏 MDA 水平降低,1 h 时最明显($P < 0.05$, $t = 2.683$)到 24 h 时基本恢复至正常水平。

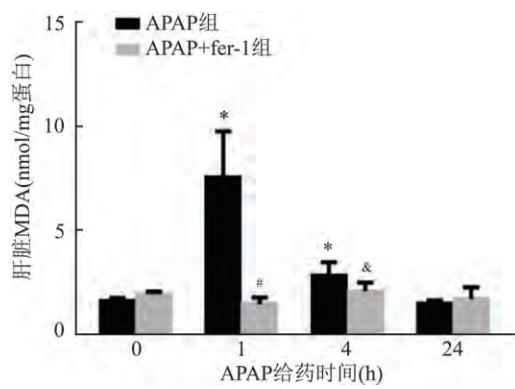


图4 各组小鼠肝脏组织MDA水平

与 APAP(0 h) 组比较: * $P < 0.05$; 与 APAP(1 h) 组比较: # $P < 0.05$; 与 APAP(4 h) 组比较: & $P < 0.05$

2.6 fer-1 预处理可降低 APAP 诱导的 ALI 小鼠铁死亡相关基因的表达 采用 RT-PCR 实验检测 fer-1 预处理后各组小鼠铁死亡相关基因 ACSL4 和 ptgs2 的表达变化。如图 5 所示,与 APAP(0 h) 组相比,单纯 APAP 处理组给予 APAP 4、24 h 后,铁死亡标志基因 ACSL4 和 ptgs2 在小鼠肝脏组织中的表达水平升高($P < 0.05$, $F = 8.133$);与单纯 APAP 处理组相比,fer-1 预处理在 4、24 h 组小鼠肝脏组织中的 ACSL4 和 ptgs2 的表达降低 4 h 时有统计学意义($P < 0.05$, $t = 4.098$),提示 fer-1 预处理可以降低 APAP 诱导的小鼠肝脏组织中铁死亡相关基因 AC-

SL4 和 ptgs2 的高表达。

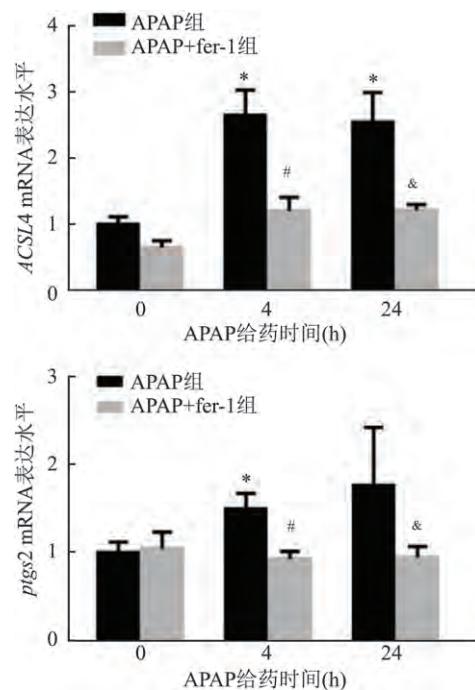


图5 各组小鼠肝脏组织铁死亡相关基因的表达

与 APAP(0 h) 组比较: * $P < 0.05$; 与 APAP(4 h) 组比较: # $P < 0.05$; 与 APAP(24 h) 组比较: & $P < 0.05$

2.7 fer-1 预处理可改善 APAP 诱导的 ALI 小鼠铁代谢紊乱 采用 RT-PCR 实验检测 fer-1 预处理 4、24 h 后各组小鼠肝脏中铁代谢相关基因转铁蛋白受体 1(*TFR1*)、铁调素调节蛋白(*HJV*)、转铁蛋白受体 2(*TFR2*) 和铁调节蛋白 1(*IRP1*) 的表达变化。如图 6 所示,与 APAP(0 h) 组相比,单纯给予 fer-1 对小鼠肝脏组织中 *TFR1*、*HJV*、*TFR2* 和 *IRP1* 的表达差异无统计学意义;与 APAP(0 h) 组相比,单纯 APAP 处理组给予 APAP 4、24 h 后,小鼠肝脏

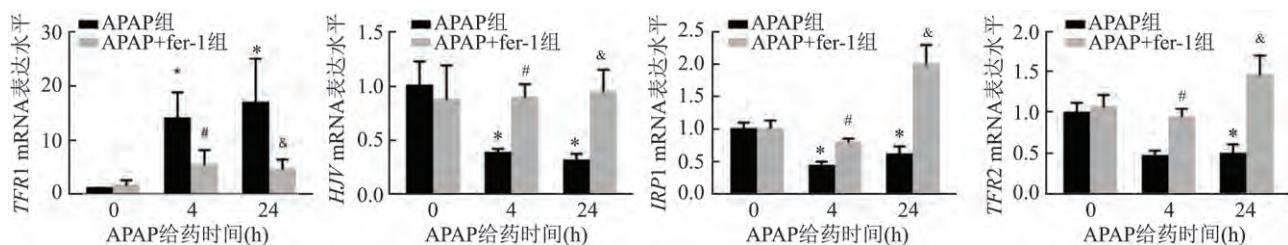


图6 各组小鼠肝脏组织铁代谢相关基因的表达

与 APAP(0 h) 组比较: *P < 0.05; 与 APAP(4 h) 组比较: #P < 0.05; 与 APAP(24 h) 组比较: &P < 0.05

组织中的 *TFR1*、*HJV*、*TFR2* 和 *IRP1* 的表达异常, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 与同一时点的单纯 APAP 组相比, *fer-1* 预处理在 4、24 h 组改善了小鼠肝脏组织中 *TFR1*、*HJV*、*TFR2* 和 *IRP1* 的表达异常, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 提示 *fer-1* 预处理可以改善 APAP 诱导的 ALI 小鼠肝脏组织中铁代谢紊乱。

3 讨论

APAP 过量诱导的肝毒性的具体机制目前尚不完全清楚, 其主要涉及氧化应激和炎症反应, 从而引起各种形式的肝细胞死亡^[7-8]。因此, 确定细胞死亡的可能机制对于临幊上治疗 APAP 过量引起的 ALI 乃至肝衰竭有着重要意义。

本实验首先采用阳性对照药 NAC 与 *fer-1* 分别处理 APAP 诱导的 ALI 小鼠, 观察 *fer-1* 预处理和后处理对小鼠生存率的影响, 并且与 NAC 作比较, 结果显示与 NAC 预处理相比, *fer-1* 无论是预处理还是后处理, 均能提高小鼠的生存率。病理观察、肝脏系数和 ALT、AST 结果均表明, *fer-1* 预处理可以减轻 APAP 诱导的 ALI。

铁死亡抑制剂在铁死亡中的作用主要是改善铁代谢和降低细胞内的脂质过氧化水平^[9-10]。先前的研究^[11]表明 *ACSL4* 和 *ptgs2* 是标志铁死亡发生的重要标志物。该实验结果显示 APAP 各组中的 *ACSL4* 和 *ptgs2* 表达上升, 而使用 *fer-1* 预处理后, 升高的 *ACSL4* 和 *ptgs2* 水平降低。这些结果提示铁死亡在 APAP 诱导的急性肝损伤中可能确实发挥着部分作用, 并且铁死亡抑制剂 *fer-1* 预处理具有一定的保护作用。

肝脏铁过载引起细胞内铁水平的增加, 这增强了 APAP 过量诱导的急性肝损伤作用, 也加剧了氧化应激反应。铁调素是肝脏内分泌的调节铁稳态的蛋白^[12], 报道表明, *HJV* 和 *TFR2* 是铁调素表达的重要调节因子^[13]。而 *TFR2* 在肝中表达时可以与

HJV 相互作用, 发挥诱导铁调素转录的作用^[14]。该研究结果显示, 在小鼠接受 APAP 处理后, *HJV* 和 *TFR2* 的 mRNA 水平均有不同程度的降低, 这可能与 APAP 诱导的氧化应激有关。研究^[15]表明, 细胞内铁稳态的关键介质是铁调节蛋白/铁反应元件 (IRP / IRE) 系统, 该系统包括 *IRP1*/*IRP2* 和储存铁蛋白等。该研究表明, APAP 过量处理后小鼠肝脏 *IRP1* 的转录水平降低。当细胞内铁过多时, *IRP1* 与 IRE 的结合活性就会降低, 从而引起铁蛋白 mRNA 的翻译, 促使过多的细胞内铁进行储存。这些结果提示, 过量服用 APAP 的确对肝脏铁稳态有一定影响。

综上所述, 该研究表明新型细胞死亡方式铁死亡与 APAP 诱导的小鼠 ALI 的发生发展有关。此外, 铁死亡抑制剂 *fer-1* 可以防治 APAP 过量引起的 ALI。*fer-1* 对 APAP 诱导的 ALI 的保护作用一方面可能由于其特定的自由基清除能力, 同时还可能与其对肝脏铁代谢功能障碍的改善有关。因此, 铁死亡抑制剂可能是 APAP 过量引起小鼠 ALI 的有效解毒剂, 并且可能在未来应用于 APAP 过量引起的 ALI 的临床治疗。

参考文献

- [1] Yan M, Huo Y, Yin S, et al. Mechanisms of acetaminophen-induced liver injury and its implications for therapeutic interventions [J]. *Redox Biol*, 2018, 17: 274-83.
- [2] Jaeschke H, Williams C D, Ramachandran A. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity [J]. *Liver Int*, 2012, 32(1): 8-20.
- [3] Nourjah P, Ahmad S R, Karwoski C. Estimates of acetaminophen (paracetamol)-associated overdoses in the United States [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2006, 15(6): 398-405.
- [4] Dixon S J, Lemberg K M, LamPrecht M R, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5): 1060-72.
- [5] Lörincz T, Jemnitz K, Kardon T, et al. Ferroptosis is involved in acetaminophen induced cell death [J]. *Pathol Oncol Res*, 2015,

21(4):1115-21.

[6] 刘晓庆,鲁桓兵,刘瑞雪,等. Bruton酪氨酸激酶在对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤中变化及意义[J].安徽医科大学学报,2020,55(8):1180-4.

[7] Torres S, Baulies A, Insausti-Urkia N, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced upregulation of STARD1 promotes acetaminophen-induced acute liver failure[J]. Gastroenterology, 2019, 157(2):552-68.

[8] Tseng S H, Chang T Y, Shih C K, et al. Effect of endoplasmic reticular stress on free hemoglobin metabolism and liver injury[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(7):1977.

[9] Zilka O, Shah R, Li B, et al. On the mechanism of cytoprotection by ferrostatin-1 and liproxstatin-1 and the role of lipid peroxidation in ferroptotic cell death[J]. ACS Cent Sci, 2017, 3(3):232-43.

[10] Miotto G, Rossetto M, Di Paolo M L, et al. Insight into the mechanism of ferroptosis inhibition by ferrostatin-1[J]. Redox Biol, 2020, 28:101328.

[11] Doll S, Proneth B, Tyurina Y Y, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. Nat Chem Biol, 2017, 13:91-8.

[12] 王珊珊,汪静,张浩等.肝细胞癌中膜铁转运蛋白的表达及意义[J].安徽医科大学学报,2020,55(5):772-5.

[13] Pietrangelo A. Genetics, genetic testing, and management of hemochromatosis: 15 years since hepcidin[J]. Gastroenterology, 2015, 149(5):1240-51.

[14] D'Alessio F, Hentze M W. The hemochromatosis proteins HFE, TFR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation[J]. J Hepatol, 2012, 57:1052-60.

[15] Huang B W, Miyazawa M, Tsuji Y. Distinct regulatory mechanisms of the human ferritin gene by hypoxia and hypoxia mimetic cobalt chloride at the transcriptional and post-transcriptional levels[J]. Cell Signal, 2014, 26(12):2702-9.

Protective effect of ferrostatin-1 on acetaminophen-induced acute liver injury in mice

Jiang Weiying¹, Qin Mingqiang¹, Zhang Cheng², et al

(¹Institutional Pharmacy, The Fourth Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230012;

²Provincial Key Laboratory of Toxicology, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate whether the ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 (fer-1) has a protective effect on acute liver injury (ALI) in mice caused by overdose of acetaminophen (APAP). **Methods** ① Survival experiment. The 40 male ICR mice were randomly divided into 4 groups, namely APAP model group, fer-1 pre-treatment group, fer-1 post-treatment group, and N-acetyl-L-cysteine (NAC) post-treatment group. They were observed for 7 days after treatment and their deaths were recorded. ② The 48 male ICR mice were randomly divided into 0 h group, fer-1 group, APAP model group (1, 4, 24 h), and fer-1 pretreatment group (1, 4, 24 h). The pathological changes of mouse liver were observed by HE staining. The aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) in mouse serum and oxidative stress indicator malondialdehyde (MDA) in liver homogenate were detected by biochemical instrument. RT-qPCR was used to detect the expressions of ferroptosis marker genes long-chain fatty acid-CoA synthase 4 (ACSL4), prostaglandin endoperoxidase 2 (PTGS2), iron metabolism-related genes transferrin receptor 1 (TFR1), hepcidin regulatory protein (HJV), transferrin receptor 2 (TFR2) and iron regulatory protein 1 (IRP1). **Results** Compared with NAC post-treatment, fer-1 pretreatment and post-treatment could improve the survival rate of mice; compared with the model group, in the fer-1 pretreatment group, the liver coefficient of mice decreased, liver function indicators ALT, AST improved, lipid peroxidation index MDA decreased, ferroptosis gene expression decreased and iron metabolism disorders were ameliorated. **Conclusion** Fer-1 pretreatment can alleviate ALI induced by APAP in mice. The mechanism may be through inhibiting ferroptosis and improving the expression of iron metabolism-related genes in the liver of mice.

Key words acute liver injury; acetaminophen; ferrostatin-1; ferroptosis; iron metabolism