

细胞自噬在急性肝损伤中的变化及作用

丁剑波, 张佳莹, 李秀惠(首都医科大学附属北京佑安医院 中西医结合科, 北京100069)

近年来, 细胞自噬已成为热点研究领域, 而细胞自噬在肝脏疾病中的作用也越来越受到重视, 抑制或促进自噬可能成为一个新的治疗靶点, 本文就细胞自噬在急性肝损伤中的变化及作用作一综述。

1 细胞自噬的概述

细胞自噬 (autophagy) 是存在于真核细胞内的一种溶酶体依赖的降解途径, 形成过程包括膜状结构包裹部分胞质和细胞内需降解的长寿蛋白质、受损的细胞器等形成自噬小体, 再与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解其所包裹的内容物, 产生的氨基酸、脂肪酸、核糖酸等降解产物再被细胞重新利用^[1,2]。在自噬发生过程中, I型微管相关蛋白轻链3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 脂酰化形成II型LC3并聚集到自噬小体膜上^[9], 当自噬小体和溶酶体融合形成自噬溶酶体后, LC3-II就会去脂酰化又转变成LC3-I 释放到胞质中, 因此可知LC3-II可在一定程度上反映出自噬的变化。根据底物转运到溶酶体途径的不同, 细胞自噬可分为3种类型: 巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬, 通常说的自噬泛指巨自噬, 本文若无特殊说明均指巨自噬。

自噬在细胞分化、生长发育、预防神经变性、调节免疫等方面都发挥着积极作用^[3-5], 在基础条件下, 细胞中均存在较低水平的自噬, 但在饥饿、缺氧、DNA损伤等条件下皆可诱导自噬增多来保护细胞^[6,7]。但是, 如果自噬过度活跃就会损伤正常的细胞器, 造成自噬性死亡, 又称II型程序性细胞死亡^[8]。

自噬目前常用的检测方法包括: ①电子显微镜: 是最传统最直接的方法, 观察到自噬小体或自噬溶酶体是检测的金标准; ②免疫印记、免疫荧光: 检测LC3或绿色荧光蛋白-微管相关蛋白轻链3 (green fluorescent protein-microtubule-associated protein light chain 3, GFP-LC3) 的变化, 目前已制备出GFP-LC3转基因小鼠, 并已将GFP-LC3用于哺乳动物体内检测自噬的变化^[10]。

2 细胞自噬在急性肝损伤中变化及作用

2.1 酒精性急性肝损伤

急、慢性酒精中毒均可导致肝细胞线粒体损伤、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生和脂肪变性, 从而引起肝细胞毒性^[11-13], 其中酒精导致的肝

细胞脂肪变性在随后的细胞死亡、炎症、纤维化的发生过程中占有重要的地位^[12,14]。用大量酒精急性攻击GFP-LC3转基因小鼠和野生型小鼠, 免疫荧光、免疫印迹、电镜的方法均观察到肝组织的自噬水平比对照组明显增加。这种自噬是有选择性, 称为线粒体自噬 (mitophagy), 其中受损的线粒体是主要靶细胞器^[15], 线粒体自噬能够清除受损的线粒体, 从而减少ROS的主要来源, 进而限制受损线粒体诱导的继发性损伤和ROS导致的肝细胞死亡^[16], 另一靶细胞器是酒精诱导的肝细胞内增多的脂滴, 这种自噬称为脂滴自噬 (lipophagy), 其能够清除脂滴, 从而减少游离的脂肪酸、减轻酒精性脂肪变^[15]。自噬抑制剂氯喹或特异性抑制自噬基因 (autophagy genes, Atg) 7表达的小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA) 能够加重小鼠酒精性肝损伤的程度^[15], 由此可知, 自噬在急性酒精性肝损伤中起保护性作用, 而这种保护性作用是通过清除受损的线粒体和积累的脂肪酸实现的。

2.2 脂多糖联合D-氨基半乳糖诱导的急性肝损伤

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰阴性菌细胞壁的一种成分^[17], 当菌体死亡崩解后游离出来形成内毒素, 其可以激活枯否细胞, 从而引起肝损伤^[18]。D-氨基半乳糖 (D-galactosamine, D-GalN) 为一种特异性损害肝脏的药物, 能够耗竭肝细胞内三磷酸尿嘧啶核苷, 抑制RNA合成和蛋白质的表达^[19], D-GalN可促使肥大细胞脱颗粒释放组胺, 造成结肠水肿, 使肠源性内毒素吸收增加^[20], 同时肝细胞弥漫性损伤导致其对LPS的解毒能力大大降低, 从而增强了LPS的肝毒性^[21]。脂多糖联合D-氨基半乳糖 (LPS/D-GalN) 诱导的野生型小鼠和孕烷X受体基因缺陷型 (pregnane X receptor-null, PXR⁻) 小鼠急性肝损伤过程中自噬水平平均升高, 但自噬水平在PXR⁻小鼠肝脏中很快减少, 而在野生小鼠肝脏可以维持较长时间, 并且PXR⁻小鼠比野生小鼠展现出更严重的肝损伤, 由此推断, 自噬在LPS/D-GalN诱导的急性肝损伤中可能对肝脏起保护性作用^[22]。但此报道仅应用了免疫印迹方法观察自噬水平的变化。

2.3 对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤

标准剂量的对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 是一种安全有效的解热镇痛药物^[23], 但过量的APAP可引起人类或动物发生肝损伤甚至肝衰竭, 这与APAP的反应代谢物N-乙酰苯醌亚胺

表 1 自噬在急性肝损伤中的变化及作用

急性肝损伤的原因	自噬在肝组织中的变化	自噬的作用
酒精	增多	保护肝细胞
脂多糖联合D-氨基半乳糖	增多	保护肝细胞
对乙酰氨基酚	增多	保护肝细胞
刀豆球蛋白A	增多	肝细胞自噬性死亡

(N-acetyl-p-benzoquinone imine, NAPQI) 耗尽肝细胞内的谷胱甘肽从而与细胞内的蛋白结合有重要关系^[23,24], NAPQI 与线粒体蛋白结合能够抑制线粒体的呼吸链, 导致三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 减少及ROS产生, 从而引起细胞膜通透性改变和细胞坏死^[25-27]。临床上惟一的解毒药物是N-乙酰半胱氨酸 (N-acetylcysteine, NAC)^[28]。应用大剂量APAP (500 mg/kg) 经腹腔注射急性攻击GFP-LC3转基因小鼠和野生型小鼠, 可导致小鼠血清ALT水平明显升高和肝细胞坏死, 导致急性肝损伤的标准。同时, 免疫荧光、免疫印迹、电镜的方法可以观察到肝细胞自噬水平明显增加, 而且这种自噬是有选择性的, 主要是线粒体自噬^[23], 线粒体自噬能够及时清除受损的线粒体从而限制细胞死亡^[29]。自噬抑制剂氯喹可以加重APAP诱导的肝损伤程度, 而自噬促进剂雷帕霉素可以减轻肝损伤的程度^[23], 由此可知, 自噬在过量APAP诱导的急性肝损伤中起保护性作用, 而这种保护性作用主要是通过清除受损的线粒体实现的。

2.4 刀豆球蛋白A诱导的急性肝损伤 刀豆球蛋白A (concanavain A, Con A) 是从刀豆中提取的一种植物凝血素, 可与多种细胞表面糖分子残基结合的蛋白分子^[30]。Con A在可作为有丝分裂刺激原, 激活T淋巴细胞、巨噬细胞等释放多种细胞因子, 从而引起肝损伤^[31]。Con A可引起野生型小鼠依赖T细胞性的急性肝损伤, 也能引起免疫功能不全的SCID/NOD小鼠非依赖T细胞性急性肝损伤, 在后者肝损伤中可以观察到肝组织内无淋巴细胞的浸润, 这两种急性肝损伤模式中Con A都会诱导细胞自噬的发生, 但在野生型小鼠中细胞凋亡是引起急性肝损伤的原因, 而在SCID/NOD小鼠中肝细胞和肝窦状隙内皮细胞发生自噬性死亡是引起急性肝损伤的原因, 而且内皮细胞发生自噬性死亡发生于肝细胞发生损伤之前^[30,32]。由此可知, 自噬是引起Con A诱导的SCID/NOD小鼠急性肝损伤的主要原因。

3 总结与展望

自噬在酒精、LPS/D-GalN、APAP、Con A诱导的急性肝损伤中的发生均增多, 但其作用并不完全相同, 在酒精、LPS/D-GalN、APAP诱导的急性肝损伤中起保护性作用, 而在Con A诱导的急性肝损伤中则促进肝细胞死亡, 见表1。在酒精、APAP诱导的急性肝损伤中自噬主要通过清除受损的线粒体从而发挥保护性作用; 在LPS/D-GalN诱导的急性肝损伤中自噬保护肝细胞的机制目前尚无相关文献报道, 仅进行了间接的推测, 仍需更深一步的研究。同样在Con A诱导的急性肝损伤中, 自噬性死亡仅是观察到了现象, 并未对其机制进行更进一步的研究。随着自噬在肝脏疾病中作用的更深入认识, 通过调节自噬变化来治疗肝脏疾病将会成为可能。

参考文献

[1] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature,2008,451:1069-1075.

[2] Mizushima N. Autophagy: process and function[J]. Genes Dev,2007, 21:2861-2873.

[3] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease[J]. Cell,2008,132:27-42.

[4] Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations[J]. Cell Host Microbe,2009,5:527-549.

[5] Rubinsztein DC. The roles of intracellular protein-degradation pathways in neurodegeneration[J]. Nature,2006,443:780-786.

[6] Cecconi F, Levine B. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death[J]. Dev Cell,2008, 15:344-357.

[7] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. Cell,2010,140:313-326.

[8] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict?[J]. J Clin Invest,2005,115:2679-2688.

[9] Chen Y, Azad MB, Gibson SB. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death[J]. Can J Physiol Pharmacol,2010,88:285-295.

[10] Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, et al. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker[J]. Mol Biol Cell, 2004,15:1101-1111.

[11] Bailey SM, Cunningham CC. Contribution of mitochondria to oxidative stress associated with alcoholic liver disease[J]. Free Radic Biol Med,2002,32:11-16.

[12] Lieber CS. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis[J]. Alcohol,2004,34:9-19.

[13] Zakhari S, Li TK. Determinants of alcohol use and abuse: Impact of quantity and frequency patterns on liver disease[J]. Hepatology,2007, 46:2032-2039.

[14] Day CP, James OF. Hepatic steatosis: innocent bystander or guilty party?[J]. Hepatology,1998,27:1463-1466.

[15] Ding WX, Li M, Chen X, et al. Autophagy reduces acute ethanol-induced hepatotoxicity and steatosis in mice[J]. Gastroenterology, 2010,139:1740-1752.

[16] Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ. Selective degradation of mitochondria by mitophagy[J]. Arch Biochem Biophys,2007,462:245-253.

[17] Jacob AI, Goldberg PK, Bloom N, et al. Endotoxin and bacteria in portal blood[J]. Gastroenterology,1977,72:1268-1270.

[18] Van Bossuyt H, Wisse E. Endotoxin injection affects the Kupffer cell

- morphology in the rat liver[J]. Prog Clin Biol Res,1988,272:161-171.
- [19] Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1979,76:5939-5943.
- [20] Harada M. Autophagy in liver diseases[J]. J UOEH,2011,33:337-344.
- [21] Yan LX, Wong V. Spectrum of epileptic syndromes with electrical status epilepticus during sleep in children[J]. Pediatr Neurol,2000,22:371-379.
- [22] Wang K, Damjanov I, Wan YJ. The protective role of pregnane X receptor in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury[J]. Lab Invest,2010,90:257-265.
- [23] Ni HM, Bockus A, Boggess N, et al. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity[J]. Hepatology,2012,55:222-232.
- [24] Larson AM, Polson J, Fontana RJ, et al. Acetaminophen-induced acute liver failure: results of a United States multicenter, prospective study[J]. Hepatology,2005,42:1364-1372.
- [25] Kon K, Kim JS, Jaeschke H, et al. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes[J]. Hepatology,2004,40:1170-1179.
- [26] Ramachandran A, Lebofsky M, Baines CP, et al. Cyclophilin D deficiency protects against acetaminophen-induced oxidant stress and liver injury[J]. Free Radic Res,2011,45:156-164.
- [27] Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death[J]. Toxicol Sci,2006,89:31-41.
- [28] Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine[J]. Hepatology,2010,51:246-254.
- [29] Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2011,12:9-14.
- [30] Yang MC, Chang CP, Lei HY. Endothelial cells are damaged by autophagic induction before hepatocytes in Con A-induced acute hepatitis[J]. Int Immunol,2010,22:661-670.
- [31] Kaneko Y, Harada M, Kawano T, et al. Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis[J]. J Exp Med,2000,191:105-114.
- [32] Chang CP, Lei HY. Autophagy induction in T cell-independent acute hepatitis induced by concanavalin A in SCID/NOD mice[J]. Int J Immunopathol Pharmacol,2008,21:817-826.

收稿日期: 2013-03-12

· 消息 ·

本刊对来稿中名词术语的要求

医学名词应该使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未审定的学科名词, 可选用最新版医学名词应使用全国科学技术名词审定委员会公布的名词。尚未通过审定的学科名词, 可选用最新版《医学主题词表(MeSH)》、《医学主题词注释字顺表》、《中医药主题词表》中的主题词。对无通用译名的名词术语于文内第一次出现时应注明原词。冠以外国人名体的征、病名、试验、综合征等, 人名可以用中译文, 但人名后不加“氏”(单字名除外); 也可用外文, 但人名后不加“’s”。

文中尽量少用缩略语。已被公知公认的缩略语可以直接使用, 如CT、CDFI等。尚未被公知公认的缩略语以及原词过长、在文中多次出现者, 若为中文可于文中第一次出现时写出全称, 在圆括号里写出缩略语; 若为外文可于文中第一次出现时写出中文全称, 在圆括号内写出外文全称及其缩略语。不超过4个汉字的名词不宜使用缩略语。西文缩略语不得拆开转行。

本刊编辑部