

急性肾损伤中自噬的研究进展

赵永录 郭秀全 段建敏 吕海迪 杨宁强 包军胜

自噬是细胞中高度保守的维持细胞内环境稳定的一种重要细胞内降解机制,通过清除细胞内少量受损的线粒体等细胞器和生物大分子维持细胞正常的生理功能,抑制细胞的凋亡,但目前对于自噬在急性肾损伤中信号转导机制及病理作用尚未完全阐明,本文综述如下。

一、急性肾损伤

肾衰竭是常见的一组临床综合征,根据其特点一般分为两大类:急性肾衰竭(acute renal failure, ARF)和慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)。2002年急性透析质量小组(acute dialysis quality initiative, ADQI)制定了急性肾衰竭的RIFLE分级诊断标准,该标准包括血浆肌酐水平和尿量两部分。2005年9月急性肾损伤工作网络(acute kidney injury network, AKIN)国际专家组对该标准进行了修订,并提出采用AKI代替ARF^[1]。AKI定义为:由导致肾脏结构或功能变化的损伤引起的肾功能突然(≤ 48 h)下降,涵盖了从肾功能的轻微受损到需要进行肾脏替代治疗的严重病变,是一个严重的疾病谱。急性肾损伤的特点是肾小球滤过率的降低,导致含氮废物如尿素氮等的积累以及电解质和酸碱平衡紊乱,导致肾功能的丧失^[2]。此外,AKI的发病率近年来有所增加,越来越多的患者需要采用肾脏替代疗法。

二、急性肾损伤中肾近端小管自噬

自噬最初被定义为细胞在饥饿状态的“自食”过程,最近很多研究都证实了自噬是细胞对应激刺激的反应。在过去的几年里,越来越多的证据表明肾缺血再灌注诱导期间和顺铂、环孢霉素和环境毒素等肾毒性药物在近端管状细胞都可诱导自噬的发生。

Wu等^[3]发现在缺血再灌注大鼠肾小管中自噬相关(ATG)蛋白BECN1和LC3表达增加,发现肾在此病理条件下自噬被激活。Suzuki等进一步研究发现人肾近端小管细胞株(HK-2)缺氧后大批LC3和

LAMP2阳性液泡生成,在大鼠肾脏缺血-再灌注期间也有明显增多。LC3阳性液泡与LAMP2阳性液泡增殖提示自噬小体与溶酶体为降解而产生了融合。通过电子显微镜(EM)在肾脏移植患者的小管细胞中也发现自噬小体。最近一项体外和体内肾缺血-再灌注模型系统研究分析自噬结果发现大鼠近端小管细胞株(RPTC)缺氧条件下可诱导自噬的产生。自噬诱导是一个低氧应激早期反应,发生于管状细胞凋亡之前。在体外缺血-再灌注的缺氧-复氧模型中,单独的缺氧可诱导LC3-II积累但没有导致GFP-LC3液泡的形成^[4],这些研究结果与在体外缺血-再灌注的心肌细胞株的自噬反应相一致。在C57BL/6小鼠自噬由肾缺血再灌注诱导产生。电子显微镜(EM)可观察到LC3-II在肾组织再灌注期间近端管状细胞自噬空泡的蓄积具有时间依赖性,但在缺血期不明显。研究发现GFP-LC3转基因大鼠在肾缺血再灌注模型中近端小管GFP-LC3点形成增加^[5]。存在和缺乏溶酶体抑制剂的情况下自噬通量结合LC3-II水平和自噬小体数量均可被检测。溶酶体抑制剂在肾组织缺血再灌注细胞缺氧条件下可增加RPTC中LC3-II积累。同样,Suzuki等发现在低氧条件下溶酶体抑制剂处理的HK-2可使LC3-阳性液泡的数量显著增加。这些研究表明,肾缺血再灌注期间确实诱导自噬的发生。

在AKI的肾毒性模型中,RPTC(鼠)、LLC-PK1(猪)和NRK-52E(鼠)的肾近管细胞株中顺铂可诱导自噬^[6]。在3个细胞株中,顺铂诱导自噬体形成和LC3-II积累呈时间依赖性。顺铂诱导的RPTC细胞自噬小体在电镜下具有特征性结构。顺铂在数小时内可激活自噬,比凋亡早。Inoue等^[6]在转基因小鼠GFP-LC3肾组织中监测顺铂肾毒性自噬,发现自噬主要发生在近端小管。在环孢霉素肾毒性近端管状细胞中也有自噬的发生。此外一些环境毒素,如镉和砷,在近端小管细胞中也明显诱导自噬^[7]。

三、急性肾损伤中肾小管细胞自噬信号转导调节

过去的几年里针对自噬的调节进行了大量研究,

作者单位:730050 兰州军区兰州总医院泌尿外科

通讯作者:王养民,教授,硕士生导师,电子信箱:wangymmr@163.

com

从酵母到哺乳动物自噬分子机制和信号通路都取得了巨大的进展^[8]。ATG 蛋白质构成自噬分子机制和级联反应功能的核心,在该核心机制的上游,自噬受一个复杂的信号网络调控。各种应激对应不同的信号通路调节自噬,这些信号通路决定自噬特异性。尽管取得巨大的进展,但 AKI 导致小管细胞自噬的信号通路仍不清楚。

1. 氧化应激: Bolisetty 等^[9]对顺铂诱导 AKI 中 HMOX1/血红素加氧酶 1 自噬的调节进行研究,发现在培养肾小管细胞和小鼠的肾脏中顺铂诱导 HMOX1 发生氧化应激和自噬。在 HMOX1 - null 模型中氧化应激水平增高可提高细胞对自噬和死亡的敏感度。恢复肾小管细胞 HMOX1 自噬反应逆转。高表达 HMOX1 减少氧化应激,延迟自噬诱导和对顺铂导致细胞死亡有保护作用。这些结果表明氧化应激可在肾小管细胞导致自噬。

2. ER 应激:环孢菌素处理的人类肾小管细胞,内质网(ER)应激诱导自噬激活。ER 应激抑制剂 Salubrinal 可抑制环孢菌素诱导自噬,表明在环孢菌素肾毒性的 ER 应激参与小管细胞自噬。在哺乳动物中 ER 应激通过展开的蛋白质反应(UPR)和胞内 Ca^{2+} 参与自噬调节。Gozuacik 等在 ER 应激诱导肾小管细胞自噬信号通路研究中发现 ER 应激通过蛋白质磷酸酶 2 进行调节。ER 应激诱导细胞自噬可被 Dapk1 - null 细胞所抑制,表明 DAPK1 可能是一种自噬调节因子。Kawakami 等^[10]使用促蛋白激酶的抑制剂(MAPKs)研究发现 MAPK1/3 的激活在 ER 应激诱导的肾小管细胞自噬中发挥重要作用,而 MAPK8 和 MAPK14/p38 无此功能。但 DAPK1 和 MAPK1/3 参与肾小管细胞自噬调节的机制尚未阐明。

3. TP53:在顺铂处理的肾小管细胞,自噬被 TP53/p53 部分抑制表明 TP53 对自噬具有调节作用。在细胞应激过程中 TP53 被激活,并在细胞核中蓄积,激活的蛋白激酶 AMPK 抑制 MTOR 导致自噬。TP53 可以通过调节自噬小体 - 溶酶体融合转录激活自噬体膜蛋白 DRAM1 诱导自噬。TP53 可诱发糖酵解和凋亡调节因子 C12orf5 / TIGAR 抑制氧化应激,通过抑制 MTOR 依赖的通路抑制自噬^[11]。TP53 对自噬的调节可能取决于其亚细胞定位。TP53 对自噬的具体调节机制有待进一步研究。

4. BCL2 家族蛋白:BCL2L1 或 BCL2/Bcl - xl 在 AKI 患者肾小管细胞自噬中的抑制作用一直在被研究。在大鼠缺血再灌注后含 Bcl2l1 基因的血液可减

少自噬的发生,在这种情况下通过 GFP - LC3 BCL2 双转基因小鼠 BCL2 也可抑制自噬的发生^[12],顺铂诱导自噬被 BCL2 完全抑制。自噬是 BCL2 - BCL2L1 通过 BCL2 同调因子 3(BH3)结构域结合 BECN1 来抑制 BECN1 在Ⅲ类 PtdIns3K 复合体上组装,且只有具有 ER 靶点的 BCL2 可抑制自噬,这是公认的 BCL2 - BCL2L1 调节自噬的机制。Chang 等^[13]研究表明,营养剥夺自噬因子 1(NAF1)在内质网中结合 BCL2 通过 BECN1、BCL2 之间的相互作用抑制自噬。内质网内的 BCL2 除了联合 BECN1,也可以通过减少应激激活 Ca^{2+} 的释放和顺向 Ca/钙调素依赖的蛋白激酶 AMPK 的信号通路抑制自噬。

5. ULK1 和缺氧反应:ULK1 是一个在自噬核心调节机制的启动激酶。研究发现 ULK1 在严重缺氧的肾小管细胞中抑制 MTOR 复合体分离而使其部分去磷酸化。研究进一步证实,在自噬持续存在或有细胞死亡引起的 DNA 损伤的情况下 TP53 可上调 ULK1 转录诱导自噬^[14]。此外,ULK1 可使Ⅲ类 PtdIns3K 复合体的活化所必须的 BECN1 反应蛋白 AMBRA1 磷酸化,释放复杂动力蛋白,从而诱导自噬^[15]。

四、急性肾损伤中肾小管细胞自噬的病理作用

AKI 中肾小管细胞自噬发生在凋亡之前表明自噬是细胞应激和凋亡的早期反应而不是结果。但是此过程中自噬到底发挥什么作用仍有争议。

在顺铂处理的 RPTC 细胞,通过药理抑制剂或基因敲除 Becn1 或短发卡结构 RNA Atg5 抑制自噬可增加细胞凋亡表明在顺铂诱导肾小管细胞损伤中自噬具有保护作用。Yang 等研究发现 LLC - PK1 细胞中顺铂诱导的自噬对细胞凋亡有抑制作用。研究进一步证实了通过氯喹药理阻断自噬通路的顺铂肾毒性小鼠模型中顺铂诱导的肾损伤显著增强。具有环孢霉素肾毒性的近端管状细胞在原代培养中也发现自噬具有细胞保护作用。这些结果表明自噬是在急性缺血性肾损伤中具有细胞保护作用^[4]。

研究也发现 AKI 中小管细胞自噬可能导致细胞死亡。Wu 等^[3]在大鼠的肾脏缺血 - 再灌注实验中发现损伤的肾小管中 BECN1 和 LC3 表达以及细胞凋亡表达同时增加。自噬和凋亡均能被 BCL2L1 过表达或缺血性预处理所抑制,同时肾损伤的程度得到改善。Suzuki 等发现 GFP - LC3 转基因小鼠肾缺血 - 再灌注后肾小管中自噬小体的形态发生变化,而且伴随 BCL2 - GFP - LC3 双转基因小鼠中自噬减少,肾小管的损伤也相应减轻,在体外观察到自噬抑制剂

对 H_2O_2 引起的 HK2 细胞死亡具有保护作用说明在肾缺血 - 再灌注自噬可能是有害的。Gozuacik 等研究发现 ER 应激诱发的细胞凋亡和自噬在相同的小管细胞产生同等的损伤,自噬本身的抑制并不能改变细胞死亡或生存的状态。Dapk1 基因敲除小鼠因自噬受到抑制使其对 ER 应激导致的肾小管细胞损伤不耐受。因此自噬可作为在 ER 应激中协同细胞凋亡引起肾损伤的第 2 个细胞损伤机制。

导致上述研究差异明显的原因尚不清楚,但学者普遍认为在不同实验条件下,自噬可以是有益的也可能是有害的。考虑到药理抑制剂可能在细胞自噬过程以外有非特异性的影响,ATG 蛋白质的基因敲除不能完全阻断自噬。Kimura 等^[5]建立了肾小管特异性 Atg5 敲除的大鼠模型,研究发现其细胞内变形线粒体的蓄积,膜结构异常收缩,SQSTM1 和泛素阳性蛋白质在细胞质内聚集导致细胞变性。缺血 - 再灌注期间,肾小管细胞在 Atg5 基因敲除小鼠中自噬受到抑制,与野生型大鼠相比这些大鼠肾缺血 - 再灌注引起的肾损伤更严重^[16]。最近大鼠近端小管的 Atg7 基因敲除 (Atg7 PTKO) 模型研究发现 Atg7 基因的敲除使自噬共轭系统受到损伤导致自噬抑制。与野生型相比 Atg7 PTKO 大鼠肾损伤更加明显,肾损伤和肾小管细胞凋亡加重。Atg7 PTKO 大鼠对顺铂诱导细胞凋亡蛋白酶活化和细胞凋亡的细胞比野生型大鼠更敏感。Atg7 PTKO 大鼠肾缺血再灌注损伤比野生型也更敏感。总之以上研究可证实在 AKI 的肾小管细胞中自噬具有保护作用。

肾小管细胞损伤和凋亡中自噬的保护机制尚未阐明。在代谢应激条件下,氧气和营养物质的有效性差,此时通过异化的途径可以使氨基酸,脂质合成蛋白质和 ATP 产物满足机体生存需要。自噬对错误折叠的蛋白质和受损的细胞器进行清除以维持细胞内稳态,从而提高诱导细胞凋亡的阈值。Atg5 敲除大鼠的近端小管细胞自噬功能受损,受损的线粒体和异常蛋白质在细胞内蓄积。因此这些缺乏自噬大鼠肾损伤野生型大鼠更为敏感^[17]。一定的应激刺激可以激活其他细胞保护反应配合自噬达到最优的修复和适应性^[18]。对胚胎发育的细胞程序性死亡研究数据发现自噬是保持高 ATP 水平所必需的,其反过来促进凋亡细胞的清除。自噬在正常的生长发育和暴露于病理刺激情况下均可以减少有害的炎症反应发生,自噬负调节炎症反应,对缺血性脑损伤和内毒素诱导肠上皮损伤也具有保护作用^[19]。

一般都认为自噬的诱导主要是为细胞生存提供一种适应和防御保护,Atg 基因敲除可加速而不是延迟细胞死亡,但是在某些条件下不受控制的大规模的自噬可能导致细胞死亡。自噬从促存活转换到促细胞死亡机制尚不清楚,这可能是由于胞质内容物非特异性的破坏或细胞保护因子选择性降解导致细胞活力的不可逆瓦解造成的^[20]。自噬除了触发细胞死亡也可能加入凋亡协调决定细胞的命运。自噬功能和凋亡的关系是复杂的,通常表现为以下 3 种情况^[21]。首先,这两个通路共用调节信号并调节和修饰对方的活性。其次,自噬行为既可以使细胞凋亡上游的信号转导中断,也可在细胞凋亡最后阶段通过提供 ATP 参与某些形态改变。再次,在一定条件下自噬和凋亡以互斥的方式共同发展,可能在不同的阈值下一方受到对方抑制或双方之间的相互抑制^[22]。

五、问题及展望

大量研究都证实自噬对于 AKI 患者肾小管细胞有保护作用,但目前自噬保护小管细胞的机制还不清楚。此外细胞中自噬促生存机制到促死亡机制的转换是如何进行的知之甚少,AKI 中诱导和调节自噬的关键信号通路也尚未阐明。随着自噬研究的进一步加深,我们对 AKI 小管细胞自噬诱导、信号通路的转导的了解必将更加深入,自噬在 AKI 中的功能和作用将更加清晰。肾小管细胞自噬调节网络的全面了解必将促进包括 AKI 在内的各种肾病的基因和药理调节因子的发现,为其预防和治疗提供依据和方向。

参考文献

- 1 Palevsky PM. Renal replacement therapy in acute kidney injury[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2013, 20(1): 76 - 84
- 2 Li PK, Burdmann EA, Mehta RL, et al. Acute kidney injury: global health alert[J]. Transplantation, 2013, 95(5): 653 - 657
- 3 Wu HH, Hsiao TY, Chien CT, et al. Ischemic conditioning by short periods of reperfusion attenuates renal ischemia/reperfusion induced apoptosis and autophagy in the rat[J]. J Biomed Sci, 2009, 16(19): 1 - 10
- 4 Jiang M, Liu K, Luo J, et al. Autophagy is a renoprotective mechanism during in vitro hypoxia and in vivo ischemia - reperfusion injury[J]. Am J Pathol, 2010, 176(3): 1181 - 1192
- 5 Kimura T, Takabatake Y, Takahashi A, et al. Autophagy protects the proximal tubule from degeneration and acute ischemic injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(5): 902 - 913
- 6 Inoue K, Kuwana H, Shimamura Y, et al. Cisplatin - induced macroautophagy occurs prior to apoptosis in proximal tubules in vivo[J]. Clin Exp Nephrol, 2010, 14(2): 112 - 122
- 7 Chargui A, Zekri S, Jacquillet G, et al. Cadmium - induced autophagy in rat kidney: an early biomarker of subtoxic exposure[J]. Toxi-

- col Sci, 2011(1), 121: 31 – 42
- 8 Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation[J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 124 – 131
- 9 Bolisetty S, Traylor AM, Kim J, *et al.* Heme oxygenase – 1 inhibits renal tubular macroautophagy in acute kidney injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(10): 1702 – 1712
- 10 Kawakami T, Inagi R, Takano H, *et al.* Endoplasmic reticulum stress induces autophagy in renal proximal tubular cells[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(9): 2665 – 2672
- 11 Bensaad K, Cheung EC, Vousden KH. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy[J]. EMBO J, 2009, 28(19): 3015 – 3026
- 12 Isaka Y, Suzuki C, Abe T, *et al.* Bcl – 2 protects tubular epithelial cells from ischemia/reperfusion injury by dual mechanisms [J]. Transplant Proc, 2009, 41(1): 52 – 54
- 13 Chang NC, Nguyen M, Germain M, *et al.* Antagonism of Beclin 1 – dependent utophagy by BCL – 2 at the endoplasmic reticulum requires NAF – 1[J]. EMBO J, 2010, 29(3): 606 – 618
- 14 Gao W, Shen Z, Shang L, *et al.* Upregulation of human autophagy – initiation kinase ULK1 by tumor suppressor p53 contributes to DNA – damage – induced cell death[J]. Cell Death Differ, 2011, 18(10): 1598 – 1607
- 15 Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, *et al.* The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy[J]. J Cell Biol, 2010, 191(1): 155 – 168
- 16 Liu S, Hartleben B, Kretz O, *et al.* Autophagy plays a critical role in kidney tubule maintenance, aging and ischemia – reperfusion injury [J]. Autophagy, 2012, 8(5): 826 – 837
- 17 Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, *et al.* Autophagy guards against cisplatin – induced acute kidney injury [J]. Am J Pathol, 2012, 180(2): 517 – 525
- 18 Kroemer G, Marifio G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. Mol Cell, 2010, 40(2): 280 – 293
- 19 Fujishima Y, Nishiumi S, Masuda A, *et al.* Autophagy in the intestinal epithelium reduces endotoxin – induced inflammatory responses by inhibiting NF – kB activation[J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 506(2): 223 – 235
- 20 Chen Y, Klionsky DJ. The regulation of autophagy unanswered questions[J]. J Cell Sci, 2011, 124(2): 161 – 170
- 21 Eisenberg – Lerner A, Bialik S, Simon HU, *et al.* Life and death partners; apoptosis, autophagy and the cross – talk between them[J]. Cell Death Differ, 2009, 16(7): 966 – 975
- 22 Huber TB, Edelstein CL, Hartleben B, *et al.* Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging[J]. Autophagy, 2012, 8(7): 1009 – 1031

(收稿日期:2013 – 07 – 15)

(修回日期:2013 – 07 – 29)

(上接第 116 页)

- 2 Briguori C, Visconti G, Focaccio A, *et al.* Novel approaches for preventing or limiting events (Naples) II trial: impact of a single high loading dose of atorvastation on periprocedural myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2009, 54(23): 2175 – 2163
- 3 罗育坤,林朝贵,范林,等. 阿托伐他汀序贯治疗择期经皮冠状动脉介入患者的有效性和安全性[J]. 中国动脉硬化杂志,2012,20(9):824 – 828
- 4 Ballantyne CM, Raichlen JS, Nicholls SJ, *et al.* Effect of rosuvastatin therapy on coronaryartery stenoses assessed by quantitative coronary angiography:a study to evaluate the effect of rosuvastatin on intravascularultrasound – derivedcoronary atheromaburden [J]. Circulation, 2008, 117(19):2458 – 2466
- 5 Navarro VJ, Senior JR. Drug – related hepatotoxicity [J]. N Engl J Med, 2006, 354:731 – 739
- 6 LaRosa JC, Grundy SM, Waters DD, *et al.* Intensive lipid lowering with atorvastatin in patients with stable coronary disease[J]. N Engl J Med,2005, 352(14): 1425 – 1435
- 7 Waters DD. Safety of high – dose atorvastatin therapy[J]. Am J Cardiol,2005,96(5A):69F – 75F
- 8 Juliana C, Weihang B, Rana F, *et al.* Analysis of safety of atorvastatin in Asian patients in clinical trials[J]. Heart,2012,98(Suppl 2): E316 – E319
- 9 Bjornsson E, Jacobsen EI, Kalaitzakis E. Hepatotoxicity associated with statins: reports of idiosyncratic liver injury post – marketing[J]. J Hepatol,2012,56(2):374 – 380
- 10 曾含清,张琼,彭文兴. 阿托伐他汀致肝损伤的机制[J]. 药物不良反应杂志,2012,14(4):232 – 236
- 11 Black DM. A general assessment of the safety of HMG CoA reductase inhibitors (statins) [J]. Curr Atheroscler Rep,2002,4(1):34 – 41
- 12 Bays H. Statin safety: an overview and assessment of the data – 2005 [J]. Am J Cardiol,2006,97(8A):6C – 26C
- 13 Newman CB, palmer G, silbershatz H, *et al.* safety of atorvastatin derived from analysis of 44 completed trials in 9416 patients [J]. Am J cardiol,2003,92:670 – 676
- 14 Kim JS, Kim J, Choi D, *et al.* Efficacy of high – dose atorvastatin loading before primary percutaneous coronary intervention in ST – segment elevation myocardial infarction: the STATIN STEMI trial [J]. JACC Cardiovasc Interv,2010,3(3):332 – 339
- 15 Liu HL, Yang Y, Yang SL, *et al.* Administration of a loading dose of atorvastatin before percutaneous coronary intervention prevents inflammation and reduces myocardial injury in STEMI patients: a randomized clinical study [J]. Clin Ther,2013,35(3):261 – 272
- 16 Sun Y, Qi G, Gao Y, *et al.* Effect of different loading doses of atorvastatin on percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes [J]. Can J Cardiol,2010,26(9):481 – 485

(收稿日期:2013 – 07 – 13)

(修回日期:2013 – 07 – 28)