

抗凋亡策略在肝脏缺血再灌注损伤中的研究进展

李 冲 赵海芳

摘 要 肝脏缺血再灌注损伤临床常见于休克、肝叶切除及肝移植等外科手术中,常常引起术后肝脏代谢障碍和组织结构破坏甚至远隔脏器损伤。肝脏的缺血和随后的血液再灌注可通过直接或间接作用导致肝细胞发生程序性凋亡,这一过程被认为在肝脏缺血再灌注后组织损伤和器官功能障碍中发挥着重要作用。细胞凋亡的发生依赖于细胞内基因的调控和信号的转导,其基本途径包括两种:死亡受体途径和线粒体途径。近年来研究发现通过阻断肝细胞内程序性凋亡的级联信号,抑制肝脏缺血细胞凋亡来减轻肝脏损伤,可以作为改善肝移植、休克和肝叶切除术预后的一种有效的治疗手段,并且具有广阔的应用前景。

关键词 肝脏 凋亡 缺血

[中图分类号] R605

[文献标识码] A

肝脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)临床常见于休克、感染、肝脏外伤、肝叶切除及肝移植,是由暂时的血流中断和随后的再灌注而引起的组织氧自由基的激活、炎症因子的释放等导致的一系列病理生理改变。其发病机制复杂,可分为两个阶段:初始阶段的活性氧(ROS)与趋化因子和细胞因子的激活和随后的嗜中性粒细胞介导的肝脏再灌注损伤^[1]。最终,通过不同类型细胞和分子途径直接或间接地导致了肝细胞坏死和凋亡的发生。其中凋亡被认为在缺血再灌注损伤的发展结局中具有重要的作用,且通过阻断凋亡的级联信号,抑制肝脏缺血细胞凋亡减轻肝脏损伤,作为肝脏缺血再灌注损伤的一种治疗手段,在国外已有较深入的研究。本文就肝脏缺血再灌注损伤细胞凋亡的保护机制的研究进展综述如下^[2]。

一、细胞凋亡的死亡受体途径

目前认为细胞凋亡发生于两种基本途径:死亡受体信号途径和线粒体途径。在细胞水平上,死亡受体(death receptor, DR)是缺血/再灌注损伤的抗凋亡策略的第一个潜在目标^[3]。死亡受体属于肿瘤坏死因子受体超家族成员,包括死亡受体 Fas(CD95 或 Apo-1)、TNF-R1(p55 或 CD120a)、TNF-R2(p75 或 CD120b)、TRAIL-R1(DR4)和 TRAIL-R2(DR5)^[4]。其中 Fas、TNF-R1、TRAIL-R1 和 TRAIL-R2 能够通过直接活化胞内死亡结构域诱导细胞凋亡。因此,Fas 和 TNF-R1 和 TRAIL 受体已

被认为具有相关的生理和病理功能,在肝脏缺血再灌注损伤起着重要作用。由于它们各自参与诱导细胞凋亡的途径不尽相同,现分述如下。

1. Fas/FasL 系统:同源三聚体化的 FasL 分子与 Fas 结合后使 Fas 激活,导致受体死亡域相聚成簇。带有死亡结构域的 Fas 相关蛋白(FADD),通过结合到群集的死亡结构域的受体,并自我裂解导致 caspase-8 的活化^[6]。caspase-8 的活化,将直接导致效应 caspase 的激活及 Bid 蛋白的裂解。tBid 与 Bax 蛋白的相互作用诱导 Bax 蛋白的构象变化,通过使线粒体外膜的通透性改变。导致细胞色素 C 和其他凋亡因子的释放,最终引发细胞凋亡的发生^[7]。使用 Jo-2 诱导大鼠 Fas 激活,可使大鼠肝细胞 AST 升高、caspase-3 和 Bid 表达增加,诱导肝细胞凋亡^[8]。最近研究发现,在大鼠肝缺血再灌注损伤的后期阶段,肝脏细胞通过 Fas/FasL 相互作用诱导的肝细胞凋亡,从而导致肝细胞损伤。此外,组织学研究表明炎性细胞,包括巨噬细胞、中性粒细胞和 NK 细胞的浸润参与了这一过程。其中 Fas 表达于肝细胞,而 FasL 表达在免疫细胞,提示炎性细胞浸润可能是 Fas 系统介导的凋亡过程的执行者,并且注射抗-Fas 抗体或抗-FasL 抗体可以显著减少大鼠肝脏炎性细胞浸润,减轻细胞凋亡以及肝损伤的发生^[9]。

2. TNF-R1:TNF-R1 通过其配体结合,导致受体的三聚化反应并导致死亡域相聚成簇。随后,TNF-R 相关死亡结构域(TRADD)与聚集的死亡域结合,它作为一个平台,以招收至少有 3 个进一步的介质:FADD,受体相互作用蛋白 1(RIP1)和 TNF-R 的相关因子 2(TrAF2)。FADD 可激活 Fas 诱导的细胞

凋亡途径,而 RIP1 和 TRAF2 可同时激活 NF- κ B 依赖的抗细胞凋亡程序,以及 NF- κ B 和 AP-1 依赖的促炎性和增生性基因转录^[10]。近年来,TNF-R1 在 I/R 损伤中的作用尚存争议。在生理条件下,TNFR1 信号的激活不会导致肝细胞凋亡,反而早期能促进抗凋亡基因的表达而产生抗凋亡作用。肝脏 I/R 时,TNFR1 与 TNF- α 结合后可产生促凋亡信号,通过激活 NF- κ B 依赖的炎症反应和 caspase-8 介导的细胞凋亡而产生组织损伤。并且在动物实验中减少 TNF-R1 的表达可观察到明显的细胞凋亡的减少和生存率的提高^[11]。

3. TRAIL: 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 又称凋亡素 2 配体 (APO2L), TRAIL 胞外区 c 末端有一同源三聚体亚单位结构,与受体结合而发挥生物学效应^[12]。TRAIL 有 5 种受体,包括 DR4、DR5、DcR1、DcR2 和 OPG,其中 TRAIL 与 DR4、DR5 结合后能将 TRAIL 的死亡信息传递至细胞内,激活 caspase 系统,最终引起细胞凋亡^[13]。

二、细胞凋亡的线粒体途径

线粒体不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心,参与调控细胞生命活动,同时还是细胞凋亡调控中心,在脊椎动物细胞中细胞凋亡的主要形式是通过线粒体途径。其中促凋亡蛋白家族 Bcl-2 导致的线粒体膜通透性改变和核酸酶、蛋白酶活化剂的释放,是导致细胞凋亡发生的主要原因^[14]。主要机制可能为:①由 Bcl-2 蛋白家族如 Bax 蛋白等促凋亡成员在线粒体外膜形成的大通道或孔;②位于线粒体内外膜之间的通透性转换孔复合体 (PTPC) 的活化^[15]。不管确切的机制是什么,线粒体膜的膜通透性改变导致促凋亡介体细胞色素 C,细胞凋亡诱导因子 (AIF) 和核酸内切酶 G 的释放,是细胞凋亡的关键步骤。细胞色素 C 一旦释放到胞质中结合于细胞凋亡蛋白酶激活因子-1 (APAF-1),并且在 dATP 或 ATP 的存在下,招募并激活促 caspase-9 形成凋亡复合物。进而激活执行 caspase,导致 caspase 依赖的细胞凋亡^[16]。

1. Bcl-2 蛋白家族:Bcl-2 基因 (即 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因) 是一种原癌基因,通过调控线粒体结构与功能的稳定性,在细胞凋亡过程中起关键性的作用。Bcl-2 基因按照功能它们可分为促凋亡和抗凋亡成员两大类,其中抗细胞凋亡成员包括:Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w、A-1、Mcl-1、Bfl-1 及 Bhfl 等,这些抗凋亡分子通过结合促凋亡成员,抑制它们的构象变化和激活,从而抑制阻断膜通透性的起始。促凋

细胞凋亡成员包括 Bcl-XS、Bax、bad、Bak、Bim 及 Bnip-3 等^[17]。由于 Bcl-2 蛋白家族广泛存在于 I/R 损伤的介导过程,关于调控 Bcl-2 蛋白家族表达的保护策略被认为在肝脏 I/R 损伤具有广阔的前景。在一项肝移植小鼠的研究中,使用 mitoKATP 通道开放剂二氮嗪可以显著上调 Bcl-2 蛋白的表达,降低移植后的 6h 凋亡细胞的百分比,其机制可能与上调的抗凋亡蛋白阻止细胞色素 C 在细胞质的释放,减轻线粒体损伤有关。而且使用 siRNA 敲除 Bcl-2 的表达可以取消二氮嗪的这种细胞保护作用^[18]。Lin 等^[19]发现 17 β -雌二醇 (E_2) 也可上调小鼠 Bcl-2 和 Bax 表达的比值,通过维持跨膜电位的稳定性,抑制细胞色素 c 释放,减少启动 caspase 的激活,进一步减弱执行 caspase-3 介导的细胞内 DNA 的裂解,从而产生细胞保护作用。

2. 半胱氨酸蛋白酶:Caspase 即半胱天冬蛋白酶,是一类在其活性中心含有半胱氨酸的蛋白酶。它们以酶原的身份通过一系列的切割事件激活,在细胞凋亡的启动和执行中发挥重要作用。根据它们的功能,可以将它们分成 3 个家族:caspase-1 家族包括 caspase-1、caspase-4、caspase-5、caspase-11、caspase-12 和 caspase-14,其主要涉及细胞因子的处理和激活 caspase 参与的炎症反应。caspase 的第二系列包括 caspase-2、caspase-8、caspase-9、caspase-10。本组既可通过激活效应 caspase,还可通过裂解促凋亡 Bcl-2 家族成员 Bid 触发线粒体途径参与的细胞凋亡。第三家庭,即执行 caspase,包括 caspase-3、caspase-6、caspase-7。它们的活化必须依赖于启动 caspase,一旦被激活,执行 caspases 通过水解性切割广谱性的细胞靶点,最终导致细胞死亡^[20]。研究发现在肝 I/R 损伤小鼠中使用 siRNA 靶向干扰 caspase-3 和 caspase-8 的表达可以显著减少组织内中性粒细胞浸润,维持细胞组织形态学的完整,并提高再灌注后的生存率。其原因可能与凋亡过程中 caspase-8 介导的死亡受体信号转导途径和 caspase-3 介导的线粒体信号转导途径的抑制有关^[21]。

三、细胞内其他抗凋亡目标

1. P53: 肿瘤抑制蛋白 P53 是一种人体抑癌基因,具有防止正常细胞癌变,帮助细胞修复基因缺陷的功能。P53 同时还有重要的促凋亡作用。通过各种应激反应激活,P53 可以上调 Bid、Bax、Fas 和其他死亡促进分子,下调抗凋亡蛋白,如 Bcl-2 蛋白,通过死

亡信号受体蛋白途径诱导凋亡。且这种 P53 依赖性转录激活和凋亡可被 pifithrin - α 可逆地阻断^[16,22]。研究发现,与普通的冷藏液相比,加入 pifithrin - α 的冷藏液大鼠肝脏冷存储后的肝细胞凋亡情况减轻,组织 ALT 和 AST 的水平显著降低,治疗组整体肝脏组织学的保存状况较对照组明显改善^[23]。这说明通过抑制 P53 依赖的细胞凋亡途径可以有效的减少肝脏保存再灌注损伤,改善肝脏器官的代谢和功能^[23]。

2. MAPK:丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)是一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族,通过磷酸化特异性丝氨酸、靶蛋白的苏氨酸残基,调节细胞活动。包括基因的表达、有丝分裂、运动、细胞程序性死亡。MAPK 的 3 个家庭已经确定:细胞外信号调节激酶(ERKs)、c - JunN - 末端激酶(JNKs)和 P38。在动物再灌注损伤研究中,已有很多证据证明 MAPK,特别是 P38 和 JNK,他们的活化与细胞凋亡和坏死有关,并且通过抑制 P38 和 JNK 的活性可以有效的减轻肝脏缺血再灌注损伤。其机制与抑制死亡受体信号转导途径,减少炎性细胞因子的活化,同时增加肝细胞内 F - 肌动蛋白含量,维持细胞完整性和胞质运输功能稳定性有关。近期研究发现,阿魏酸(FA)能够减弱 I/R 诱导的肝脏 c - Jun 氨基末端激酶 1(JNK1)和 JNK2 的磷酸化,通过衰减氧化应激和 JNK 活化减轻小鼠肝脏缺血再灌注导致的 caspase - 3 活性增高和细胞色素 C 的释放,同时下调 Bax、tBid 及 Bcl - 2 蛋白的表达,减轻肝细胞凋亡。

总之,细胞凋亡作为多基因调控和多信号分子参与的病理生理过程,在肝缺血再灌注损伤中发挥着重要的作用。近年来动物实验发现,通过一定手段阻断肝细胞凋亡的发生,可以有效地减轻缺血再灌注损伤的程度。抗凋亡策略的研究已成为缺血再灌注损伤保护的热点问题,相信随着对抗凋亡策略的深入研究以及相关抑制凋亡药物的研发和使用,将为临床上肝脏缺血再灌注损伤的治疗和预后的改善提供新方法和途径。

参考文献

- 1 Jaeschke H. Mechanisms of liver injury II. Mechanisms of neutrophil - induced liver cell injury during hepatic ischemia - reperfusion and other acute inflammatory conditions[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006, 290: 1083 - 1088
- 2 Eefting F, Rensing B, Wigman J, *et al*. Role of apoptosis in reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 414 - 426
- 3 Wang K. Molecular mechanisms of hepatic apoptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e996
- 4 Yan X, Zhou T, Tao Y, Salvianolic acid B attenuates hepatocyte ap-

- optosis by regulating mediators in death receptor and mitochondrial pathways[J]. *Exp Biol Med*, 2010, 235(5): 623 - 632
- 5 Contassot E, Gaide O, French LE. Death receptors and apoptosis[J]. *Dermatol Clin*, 2007, 25(4): 487 - 501
- 6 Wang Y, Singh R, Lefkowitz JH, *et al*. Tumor necrosis factor - induced toxic liver injury results from jnk2 - dependent activation of caspase - 8 and the mitochondrial death pathway[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(22): 15258 - 15267
- 7 Feldmann G. Liver apoptosis[J]. *Gastroenterol Clin Biol*, 2006, 30(4): 533 - 545
- 8 Gottschalk S, Zwingmann C, Raymond VA, *et al*. Hepatocellular apoptosis in mice is associated with early upregulation of mitochondrial glucose metabolism[J]. *Apoptosis*, 2012, 17(2): 143 - 153
- 9 Nakajima H, Mizuta N, Fujiwara I, *et al*. Blockade of the Fas/Fas ligand interaction suppresses hepatocyte apoptosis in ischemia - reperfusion rat liver[J]. *Apoptosis*, 2008, 13(8): 1013 - 1021
- 10 Schutze S, Schneider - Brachert W. Impact of TNF - R1 and CD95 internalization on apoptotic and antiapoptotic signaling[J]. *Results Probl Cell Differ*, 2009, 49: 63 - 85
- 11 Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver[J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(1): 202 - 210
- 12 Pobezinskaya YL, Liu Z. The role of TRADD in death receptor signaling[J]. *Cell Cycle*, 2012, 11(5): 871 - 876
- 13 Gonzalez F. New insights into apoptosis signaling by apo2L/TRAIL[J]. *Oncogene*, 2010, 29: 4752 - 4765
- 14 Ola MS, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl - 2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1 - 2): 41 - 58
- 15 Shamas - Din A, Kale J, Leber B, *et al*. Mechanisms of action of Bcl 2 family proteins[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(4): a008714
- 16 Estaquier J, Vallette F, Vayssiere JL, *et al*. The mitochondrial pathways of apoptosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 942: 157 - 183
- 17 Martinou JC, Youle RJ. Mitochondria in apoptosis: Bcl - 2 family members and mitochondrial dynamics[J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92 - 101
- 18 Wu Q, Tang C, Zhang YJ, *et al*. Diazoxide suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury after mouse liver transplantation by a BCL - 2 - dependent mechanism[J]. *J Surg Res*, 2011, 169(2): 155 - 166
- 19 Lin FS, Shen SQ, Chen ZB, *et al*. 17 β - estradiol attenuates reduced - size hepatic ischemia reperfusion injury by inhibition apoptosis via mitochondrial pathway in rats[J]. *Shock*, 2012, 37(2): 183 - 190
- 20 Delogu G, Famularo G, Tellan G. Lymphocyte apoptosis, caspase activation and inflammatory response in septic shock[J]. *Infection*, 2008, 36(5): 485 - 487
- 21 Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, *et al*. Caspase - 8 and caspase - 3 small interfering RNA decreases ischemia/reperfusion injury to the liver in mice[J]. *Surgery*, 2004, 136(2): 390 - 400
- 22 Amaral JD, Xavier JM, Steer CJ, *et al*. Targeting the p53 pathway of apoptosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16(22): 2493 - 2503
- 23 El - Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, *et al*. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin - alpha - mediated inhibition of hepatocyte necroapoptosis[J]. *Hepatology*, 2004, 39(6): 1553 - 1562

(收稿日期:2014 - 02 - 13)

(修回日期:2014 - 02 - 20)