

非酒精性脂肪肝病自噬机制的研究进展

舒泳翔 谭诗云 吴鹏波

摘要 非酒精性脂肪肝病是一种无过量饮酒史,组织学改变与酒精性脂肪肝病相似的疾病,是西方国家肝脏疾病最常见的病因之一。其发病机制目前尚未完全阐明,被认为是代谢综合征在肝脏的表现形式,与肥胖,胰岛素抵抗等多种致病因素相关。近年来研究表明,细胞自噬作为一种细胞自我保护机制,在非酒精性脂肪肝病中的作用不容忽视,可通过影响肝细胞内多种代谢途径参与其发病机制。本文就非酒精性脂肪肝病中,自噬相关离子通道,自噬与脂代谢、胰岛素抵抗、内质网应激、凋亡的关系,药物与生物活性物质对自噬的影响方面的研究进展做一综述。

关键词 非酒精性脂肪肝 细胞自噬 机制 综述

中图分类号 R575.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.01.002

非酒精性脂肪肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)与酒精性脂肪肝病难以区分,鉴别诊断只能依靠有无过量饮酒史。其病理过程由单纯肝细胞脂肪变性到非酒精性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH),甚至进一步发展为肝纤维化,肝硬化甚至肝细胞癌。流行病学研究表明,NAFLD在西方国家的发生率为20%~30%,而NASH为2%~3%,在我国也成为仅次于病毒性肝炎的第2大慢性肝病病因,形势严峻^[1,2]。目前认为该病的发生是遗传、环境、代谢因素共同作用的结果,多种致病机制参与,与肥胖、2型糖尿病关系密切,因此被认为是代谢综合征在肝脏的表现形式。

自噬是真核细胞特有的一种相对保守的分解代谢过程,在缺氧、饥饿、高温等应激状态时,细胞通过上调自噬水平,降解细胞内多余的组分以维持细胞的能量代谢,并能降解细胞内错误折叠的蛋白,受损细胞器和病原微生物从而保护细胞不受进一步破坏,因此,自噬在维持细胞稳态中起到至关重要的作用。自噬主要有3种类型:巨自噬,分子伴侣介导的自噬和微自噬。其中,巨自噬是自噬的最主要形式,通常所说的自噬一般即指巨自噬^[3,4]。

一、NAFLD中肝细胞自噬信号通路的调节

以往研究表明,自噬的调节途径有3种,其中I型PI₃K/Akt/mTOR信号途径和III型PI₃K/Beclin1通路被认为是自噬的经典信号通路。哺乳动物雷帕霉

素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)激活后对自噬起负性调节作用,而自噬基因Beclin1能够激活自噬。第3种调节途径是由自噬基因Atg3和Atg7调节的微管结合蛋白1(LC3-I)与膜脂质磷脂酰乙醇胺结合形成LC3-II的过程^[5]。最近的研究表明,在NAFLD的肝细胞中还存在其他信号调节通路。

1. JNK信号通路:涂芊茜^[4]观察到高脂饮食小鼠肝脏以及体外NAFLD细胞模型中自噬呈较高的活性状态,进一步探索自噬增强的分子机制后发现mTOR信号通路并没有参与自噬的调节过程。在干扰了Beclin1和自噬相关基因Atg5后,发现自噬水平部分下调,因此认为Beclin1和Atg5参与脂肪酸诱导肝损伤过程中自噬的调控,但仍有其他信号通路参与调节。c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)通路隶属于促分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路,分为JNK1、JNK2、JNK3 3个亚型,对JNK2进行干扰后,自噬的活性降低,而干扰了JNK1后,细胞自噬水平没有明显变化,由此认为,JNK2基因可能参与自噬的非经典途径的调节,而同样隶属于MAPK通路的细胞外调节蛋白激酶ERK1/1信号通路则未参与自噬调节。

2. AMPK/ULK1信号途径:Jiang等^[6]用H₂O₂和肿瘤坏死因子α(TNF-α)处理脂肪酸培养的小鼠和人HepG₂肝癌细胞,观察其对自噬水平的影响。结果表明H₂O₂和TNF-α能够激活自噬,且细胞中磷酸ULK1(一种与酵母Atg1蛋白同源的哺乳动物自噬调控蛋白)水平显著上升,证明H₂O₂和TNF-α是通

作者单位:430060 武汉大学人民医院消化内科

通讯作者:谭诗云,主任医师,教授,博士生导师,电子信箱:tan-shiyun@medmail.com.cn

过激活腺苷酸活化蛋白激酶 AMPK/ULK1 信号途径激活自噬,由于 ULK1 可以被 AMPK 或 mTOR 直接激活,为明确究竟是由哪种方式激活,进一步测定细胞内磷酸 AMPK 和 mTOR 水平,发现前者显著升高,后者无变化,证明 AMPK 参与由过氧化氢和 TNF- α 激活 ULK1 的过程,引发肝癌细胞自噬启动。

3. PKC α 途径:Cai 等^[7]用 Palmitate (PA) 培养肝细胞发现 PA 能够诱导自噬激活,并阻止 PA 诱导的肝细胞凋亡。P70 S6 激酶 (P70S6K) 和 4E 结合蛋白 1 (4E-BP1) 是 mTOR 信号通路的两个关键的下游调控分子, mTOR 磷酸化可将正性调节信号传递给 P70S6K,引起 4E-BP1 灭活。与对照组相比,由 PA 培养的肝细胞中磷酸 mTOR, P70S6K 和 4E-BP1 的水平差异无统计学意义,这表明 PA 诱导的自噬激活并非通过抑制 mTOR 信号通路实现的。PKC α 是蛋白激酶 C (PKC) 家族中的一员,通过检测肝细胞中的 PKC α 后发现存在磷酸化的 PKC α ,证明其被激活,因此认为 PA 可能是通过激活 PKC α 途径,而不是 mTOR 信号途径激活自噬发生。

4. p53-PUMA-Bax 信号通路:凋亡和自噬的信号通路紧密相关,自噬也被认为是一种促细胞凋亡机制,引起 2 型程序性细胞死亡。凋亡与炎症进展和纤维化有关,肝细胞脂肪变程度越重,凋亡水平越高。p53-PUMA-Bax 系统是介导细胞凋亡发生的经典信号通路。p53 是凋亡调控因子 PUMA 和 BAX 的转录因子,PUMA 是一种促凋亡蛋白,能够激活 BAX 并诱导线粒体依赖的细胞凋亡。DRAM 和 Sestrin2 是 p53 信号通路中能够调控自噬水平的分子,被认为是联接自噬和凋亡的重要分子。在 NAFLD 中,Liu 等^[8]研究发现在轻度肝细胞脂肪变性时,p53 信号激活促进了 DRAM 表达水平显著上调,表明在 NAFLD 早期,可能由 p53 激活 DRAM,从而介导自噬发生,且为线粒体自噬。而在重度脂肪变性时,p53 促进了 BAX 的表达,表明 PUMA/BAX 信号通路在 NAFLD 病变严重阶段发挥主要作用,并介导细胞凋亡发生。

二、NAFLD 肝细胞自噬与脂代谢的关系

脂质沉积是 NAFLD 最基本的病变特征,脂代谢紊乱是造成脂质沉积的根本原因,有关自噬对脂代谢影响的结论并不一致。虽然,目前有关自噬对肝脏脂代谢影响的研究结果绝大多数表明自噬促进了肝细胞脂质分解代谢,能够改善肝脏脂肪变性,但仍有部分研究持不同观点。Ma 等^[9]研究发现肝细胞自噬受损或自噬缺陷时,并未加重肝脏脂肪变程度,相反细

胞内甘油三酯的含量有所下降,肝脂肪变性减轻。另外,肝脏自噬能够保护肝脏不受脂多糖诱导的内毒素性肝脏损伤,证明了肝细胞脂肪变和肝损伤是分离的,自噬并不能促进脂肪分解。Shibata 等^[10]报道称 LC3 基因敲除的肝细胞与对照组相比,脂肪滴形成减少,甘油三酯含量下降。自噬缺乏的并进行饮食控制的成年老鼠与对照组比较,其禁食性脂肪变性程度较轻。这些均表明自噬可能对脂质形成起促进作用。另有研究表明在短期高脂饮食后,自噬水平降低,而在长期高脂饮食后自噬逐渐正常化,说明自噬在对脂代谢的影响中表现出动态的变化,这似乎能够解释不同实验观察到的结果不一致的原因。因此,有理由认为,自噬对脂肪合成代谢和分解代谢的影响是共同存在的,自噬是一个动态变化的连续性过程,不同时间段的自噬可能对脂代谢的影响结果不同。

在体外实验中,基础自噬被认为在脂代谢中是比诱导性自噬更为重要的机制。然而,大多数实验都是在完全阻断自噬的情况下进行的,这使基础自噬与诱导性自噬之间的作用差异很难区分,因此,对两种不同水平的自噬与脂代谢的关系行进一步的研究,可能为自噬在脂代谢影响方面存在分歧提供解释^[11]。

三、NAFLD 肝细胞自噬与胰岛素抵抗、内质网应激、凋亡的关系

胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR) 是 NAFLD “二次打击”学说的第 1 次打击,而内质网应激和细胞凋亡在 NASH 的发生、发展中至关重要,因此,研究自噬与这 3 种代谢过程的相互影响十分有意义。

最近研究发现自噬与高胰岛素血症和 IR 有关。在高胰岛素血症和高脂饮食的小鼠中发现,自噬功能降低,胰岛素能够通过调节 mTOR 信号通路影响自噬基因的表达从而抑制自噬,而 Liu 等发现在肝癌细胞中胰岛素可通过抑制 Forkhead 转录因子 (FOXO1) 介导的转录调节抑制自噬。刺激肝脏自噬基因 Atg7 过表达恢复自噬功能后,能够对抗内质网应激并提高胰岛素敏感度,这表明自噬缺陷可导致内质网应激加重,从而进一步加重 IR。因此,IR 导致脂肪变性,高胰岛素血症可损伤自噬,而自噬功能的减弱又会进一步促进脂质沉积和胰岛素抵抗,产生恶性循环^[3,12]。

众所周知,细胞自噬与凋亡是两个密切相关的生理过程,自噬和凋亡的调节通路存在明显的交叉,p53 是由抑癌基因 p53 编码的蛋白分子,在自噬和凋亡中起纽带作用,被认为在 NAFLD 中发挥重要作用。最近的研究表明自噬在细胞保护和细胞毒性方面扮演

双重角色。p53 - 2 (ASPP2) 是一种促凋亡分子, 与 p53 结合后发挥促凋亡作用, 但 Xie 等^[13] 研究发现 ASPP2 可以通过抑制自噬, 减轻肝细胞内脂质沉积, 减轻细胞凋亡。刘凯等^[14, 15] 观察油酸诱导的 NAFLD 细胞模型中不同时段自噬流量和凋亡细胞百分比后, 推断在 NAFLD 的早期, 自噬能够通过降解细胞内脂滴阻止或减轻脂肪沉积, 并能抑制脂质沉积诱导的凋亡发生, 而在脂质沉积的长期作用下, 自噬能够介导凋亡的发生。另外, 线粒体功能障碍介导的细胞凋亡被认为与自噬密切相关。有报道称敲除 Atg5 基因后, 肝细胞对线粒体功能障碍引起的应激敏感度增加, 自噬缺乏激活了 JNK/c-Jun 信号通路, 诱导细胞死亡。然而, 自噬是怎样对该信号通路进行选择调节尚不清楚, 有待于进一步研究^[12]。

四、生物活性物质和药物对 NAFLD 肝细胞自噬的影响

多种生物活性成分和药物可以通过影响 NAFLD 肝细胞自噬的调节通路或影响细胞内其他代谢途径间接影响自噬水平。白藜芦醇是一种具有抗氧化功能的天然多酚类化合物, 以往研究表明, 白藜芦醇对 NAFLD 具有一定的治疗作用。Li 等^[16] 用白藜芦醇治疗野生型和 ULK1 基因敲除型 NAFLD 模型小鼠后发现, 内源性 ULK1 表达缺陷损害了白藜芦醇对 NAFLD 的治疗效果。白藜芦醇治疗自噬缺陷组小鼠时, 与对照组相比, 脂质沉积改善受到损害。另外, 白藜芦醇改善肝细胞氧化应激和炎症的疗效也明显下降, 这表明, 白藜芦醇可能通过激活自噬, 改善肝细胞脂代谢和炎性损害, 但其具体机制有待研究。

最近的研究表明咖啡因的消费与 NAFLD 风险性的降低有关, 虽然已知咖啡因能够刺激肝细胞脂肪氧化, 但其动员脂肪的机制尚不清楚。Sinha 等^[17] 研究发现咖啡因能够刺激自噬水平上调并改善 NAFLD 动物模型的肝脂肪变性程度, 其机制是通过抑制 mTOR 信号通路激活自噬对脂滴进行降解, 减轻细胞内脂肪含量并刺激其氧化磷酸化。该研究还发现咖啡因亦能够降低神经酰胺并升高鞘氨醇的水平, 由于鞘脂类能够对自噬激活产生影响, 因此该机制也可能参与了其对自噬的促进作用。另外, 大蒜提取物烯丙半胱氨酸 (S-allylmercaptocysteine, SAMC) 也被发现可通过增强自噬作用减轻慢性肝损伤。Xiao 等^[18] 研究发现, SAMC 通过抑制 mTOR 通路增强肝细胞自噬, 且 LKB1/AMPK 和 PI₃K/Akt 信号通路未参与该过程的调节, 然而, SAMC 影响自噬调控的具体机制还有待

进一步研究。

既往研究明确了雷帕霉素能够通过抑制 mTORC1 诱导自噬激活, 并能改善慢性酒精性脂肪肝病中脂肪变性的程度。卡马西平过去作为一种抗癫痫药物最近也被证实能够通过干扰肌醇代谢诱导自噬发生, 但两种药物是否能够影响 NAFLD 肝细胞自噬活性从而起到治疗作用尚缺乏研究。最近, Lin 等^[19] 发现在 NAFLD 动物模型中, 这两种药物均能够上调肝脏自噬水平, 改善肝脂肪变性程度和甘油三酯水平。雷帕霉素可能是通过对 p70S6 激酶和 4E-BP1 的去磷酸化作用抑制肝细胞内 mTOR 的活性, 卡马西平的作用机制尚不明确, 其激活自噬的机制可能与其抑制 1-磷酸肌醇合酶, 降低肌醇和三磷酸肌醇的水平有关。

胰高血糖素样肽 1 (GLP-1) 是一种肠促胰岛素, 能够刺激胰岛 β 细胞分泌胰岛素, 减少胰高血糖素生成。研究发现人肝细胞表达 GLP-1 受体, 激活此受体后可减少肝细胞内脂质含量。艾塞那肽-4 (Exendin-4) 是 GLP-1 类似物, Sharma 等^[20] 在实验中观察到艾塞那肽 4 能够诱导自噬水平上调, 减轻肝细胞脂质含量, 内质网应激和凋亡程度, 并推测艾塞那肽 4 通过激活巨自噬和分子伴侣介导的自噬减轻脂质超载, 但具体机制有待研究。

肥胖是 NAFLD 发生、发展的重要风险因子, 肝细胞脂质累积可产生脂毒性物质, 干扰肝细胞能量代谢, 进一步加重肝损伤。有研究表明, 脂毒性物质通过可下调自噬水平, 进而加重胰岛素抵抗和肝脏炎症, 从而提高肝细胞癌发生风险, 成为 NAFLD 及 NASH 进展的重要机制。Park 等^[21] 发现肥胖可引起 NAFLD 模型肝细胞胞质钙离子浓度升高, 从而影响了自噬体与溶酶体的融合。钙通道阻滞剂维拉帕米能够在体内外模型中成功地恢复自噬流量, 抑制蛋白包涵体形成, 并减少脂滴累积, 改善胰岛素抵抗和脂肪变性。由于钙阻滞剂在长期的临床使用中并无不良反应, 因此, 钙阻滞剂被认为在促进自噬的同时对细胞内其他重要生理过程并未产生不良影响。

五、总结与展望

随着自噬在细胞代谢与疾病的发生、发展中的作用越来越受到重视, 自噬在非酒精性脂肪肝病影响方面的研究也越来越多, 认识也逐渐深入。NAFLD 发病机制复杂, 被认为是多种代谢机制紊乱并相互影响的结果, 因此, 进一步加深自噬与脂代谢紊乱、胰岛素抵抗、内质网应激等相关机制的研究具有重要意义。

另外,生物活性物质与药物对自噬在 NAFLD 的影响方面的研究尚处于探索阶段,其具体机制尚不十分明确,仍须大量研究进行揭示。有报道称其他药物,如抗 2 型糖尿病药物和降脂药物对改善 NAFLD,但其是否通过影响自噬发挥作用有待于进一步研究。总之,自噬机制对 NAFLD 发生、发展的影响不容忽视,对其进一步研究,尤其在能够通过干预自噬改善 NAFLD 的药物方面,具有重要的临床与科研价值。

参考文献

- 1 Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease[J]. Q J Med, 2010, 103(2):71-83
- 2 王素琴,黄缘.非酒精性脂肪肝病的研究进展[J].世界华人消化杂志, 2014, 22(23):3410-3415
- 3 Lavallard VJ, Gual P. Autophagy and non-alcoholic fatty liver disease[J]. BioMed Research International, 2014, 2014:1-13
- 4 涂芊茜.自噬在脂肪酸诱导肝损伤中的作用及机制的初步研究[D].上海:第二军医大学, 2011
- 5 González-Rodríguez A, Mayoral R, Agra N, et al. Impaired autophagic flux is associated with increased endoplasmic reticulum stress during the development of NAFLD[J]. Cell Death and Disease, 2014, 5:1-13
- 6 Jiang P, Huang Z, Zhao H, et al. Proxide impairs autophagic flux in a cell model of nonalcoholic fatty liver disease[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2013, 433(4):408-414
- 7 Cai N, Zhao X, Jing Y, et al. Autophagy protects against palmitate-induced apoptosis in hepatocytes[J]. Cell & Bioscience, 2014, 4(28):1-9
- 8 Liu K, Lou J, Wen T, et al. Depending on the stage of hepatosteatosis, p53 causes apoptosis primarily through either DRAM-induced autophagy or BAX[J]. Liver International, 2013, 33(10):1566-1574
- 9 Ma D, Molusky MM, Song J, et al. Autophagy deficiency by hepatic FIP200 deletion uncouples steatosis from liver injury in NAFLD[J]. Mol Endocrinol, 2013, 27(10):1643-1654
- 10 Shibata M, Yoshimura K, Tamura H, et al. LC3, a microtubule-associated protein 1A/B light chain 3, is involved in cytoplasmic lipid droplet formation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 393(2):

274-279

- 11 Kwanten WJ, Martinet W, Michielsens PP, et al. Role of autophagy in the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease: a controversial issue[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(23):325-7338
- 12 Amir M, Czaja MJ. Autophagy in nonalcoholic steatohepatitis[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 5(2):159-166
- 13 Xie F, Jia L, Lin M, et al. ASPP2 attenuates triglycerides to protect against hepatocyte injury by reducing autophagy in a cell and mouse model of non-alcoholic fatty liver disease[J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(1):155-164
- 14 刘凯,徐树莹,徐斌.早期自噬在非酒精性脂肪肝中的保护作用[J].北京医学, 2011, 33(12):947-949
- 15 刘凯,徐树莹,徐斌.晚期自噬在非酒精性脂肪肝中的保护作用[J].北京医学, 2011, 33(12):950-952
- 16 Li L, Hai J, Li Z, et al. Resveratrol modulates autophagy and NF- κ B activity in a murine model for treating non-alcoholic fatty liver disease[J]. Food Chem Toxicol, 2014, 63:166-173
- 17 Sinha RA, Farah BL, Singh BK, et al. Caffeine stimulates hepatic lipid metabolism by the autophagy-lysosomal pathway in mice[J]. Hepatology, 2014, 59(4):1366-1380
- 18 Xiao J, Guo R, Fung ML, et al. Garlic-derived S-allylmercaptocysteine ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in a rat model through inhibition of apoptosis and enhancing autophagy[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013:1-11
- 19 Lin CW, Zhang H, Li M, et al. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice[J]. J Hepatol, 2013, 58(5):993-999
- 20 Sharma S, Mells JE, Fu PP, et al. GLP-1 analogs reduce hepatocyte steatosis and improve survival by enhancing the unfolded protein response and promoting macroautophagy[J]. PLoS One, 2011, 6(9):e25269
- 21 Park HW, Lee JH. Calcium channel blockers as potential therapeutics for calcium channel blockers as potential therapeutics for obesity-associated autophagy defects and fatty liver pathologies[J]. Autophagy, 2014, 10(12):2385-2386

(收稿日期:2015-03-30)

(修回日期:2015-04-07)

欢迎订阅 2016 年《医学研究杂志》

《医学研究杂志》(原名《医学研究通讯》)于 1972 年创刊,是由国家卫生和计划生育委员会(原卫生部)主管、中国医学科学院主办的国家级医学学术期刊。本杂志为“中国精品科技期刊”以及“领跑者 F5000——中国精品科技期刊顶尖论文”来源期刊,中国科技论文统计源期刊,中国科技核心期刊,世界卫生组织西太区医学索引(WRPIM)收录期刊。月刊。CN11-5453/R,ISSN1673-548X。

本杂志信息量大,装帧精美。每册定价 10 元,全年 120 元(含邮费)。国内外公开发行。邮发代号:2-590。编辑部电话:010-52328677,52328678,52328679;传真:010-65230946。投稿网址: <http://www.yxyjzz.cn>。编辑部地址:北京市朝阳区雅宝路 3 号(邮编:100020)。