

自噬在急性肺损伤炎症中的研究进展

瞿利花 陈 超 陈阳晔 李 懿 宋 祁 申 丽

摘 要 急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是指由直接或间接肺部损伤 (细菌感染、脓毒症、药物等) 引起的全身炎症反应, 肺部和全身炎症之间的相互影响可加快肺部炎症反应过程并促进了 ALI 的发展。炎症细胞 (包括巨噬细胞、中性粒细胞等)、肺泡上皮细胞和血管内皮细胞在 ALI 炎症反应中发挥重要作用。目前, 越来越多的证据表明, 自噬与 ALI 等肺部疾病的发病机制有关, 但其详细的作用机制尚需进一步研究。在 ALI 的发生、发展过程中自噬与细胞因子的分泌相互影响。对于不同的细胞, 不同的病原体刺激, 自噬的作用不尽相同, 是近年来研究的热点。本综述总结了自噬在 ALI 中的作用, 为研发 ALI 治疗策略的改善提供参考。

关键词 自噬 急性肺损伤 炎症反应

中图分类号 R714.253

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.06.004

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 可由严重感染、高氧、外伤、药物、机械通气或海水刺激等因素诱发, 主要表现为大量中性粒细胞、巨噬细胞等炎症细胞浸润以及肺毛细血管内皮和肺泡上皮细胞屏障功能紊乱, 严重时发展为急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1]。Máca 等^[2]报道 ALI 是重症监护室患者病死率高的主要原因。目前临床上对 ALI 的治疗主要是药物如激素类和机械通气等手段来改善患者的呼吸困难, 近年来研究表明, 调节细胞自噬可以减轻 ALI, 提示自噬可能成为 ALI 治疗的新靶点^[3]。

自噬是一种进化上保守、动态的细胞分解代谢过程, 可由溶酶体降解途径清除受损细胞器、变性蛋白以及入侵的病原体并释放能量, 对于维持细胞的正常功能、维持细胞稳态中具有重要的作用^[4]。近年来研究表明, 自噬在 ALI 的发生、发展中发挥重要的作用, 一方面适度的自噬能抑制炎症因子的释放; 另一方面过度的自噬能加重细胞损伤。提示对自噬的调节可能成为 ALI 治疗的新策略。本综述介绍了自噬途径及其分子机制, 以及在 ALI 模型中的作用。

一、自噬的机制

自噬是将某些细胞内可溶性大分子或细胞器等物质运送至溶酶体进行降解的过程。自噬有 3 种不同类型, 即巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬

(CMA)^[5]。巨自噬也称自噬, 需通过形成双层膜自噬体将物质递送至溶酶体, 微自噬通过溶酶体直接摄取物质而无自噬体的形成, CMA 通过分子伴侣协助目标蛋白直接进入溶酶体。在 3 种自噬中, 巨自噬的研究最为广泛, 与 ALI 的发生密切相关。

自噬过程主要包含 5 个阶段: 启动、吞噬泡、自噬体、自噬溶酶体形成以及吞噬物的降解。这些阶段主要由自噬相关蛋白家族 (ATGs) 调节。ATG 蛋白按其作用可分为 4 类: ① Atg1/unc-51 样激酶 (ULK1) 复合物, 包括 Ulk1、Atg13、FIP200 和 Atg101, 其作用主要是调节自噬启动; ② III 类磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI₃K)/Vps34 复合物, 包括 PI₃K、Vps34、Vps15/P150、Beclin-1/Atg6 和 Atg14, 参与早期自噬体形成; ③ 两个泛素类似复合物 [Atg16L1-Atg12-Atg5 和微管相关蛋白轻链 3 (LC3)/Atg8], 参与自噬体的延伸与闭合; ④ 两种跨膜蛋白 Atg9/mAtg9 (参与其运动的相关蛋白如 Atg18/WIP1) 和 VMP1, 有利于膜的传递形成自噬体^[6]。自噬体形成后与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 随后由溶酶体蛋白水解酶降解被包裹的物质, 生成的小分子物质回到细胞质中重新利用。

二、在 ALI 中自噬对不同细胞的作用

大量研究结果表明自噬在 ALI 的炎症发生、发展以及发病机制中起关键作用, 但其调控 ALI 炎症的最终结果与不同的细胞类型有关。

1. 巨噬细胞: 巨噬细胞通常存在于肺间质和肺泡中, 是在感染等损伤时启动肺部炎症的重要细胞。当发生炎症时更多的巨噬细胞聚集到肺部维持和加重

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81100054); 湖南省自然科学基金资助项目 (2018JJ2255); 湖南省教育厅科研项目 (16C0959)

作者单位: 410013 长沙, 湖南师范大学医学院

通讯作者: 申丽, 副教授, 电子信箱: shenli16@hotmail.com

炎症损伤。研究发现在脂多糖(LPS)诱导的炎症反应中巨噬细胞自噬能抑制炎症反应,而自噬缺陷小鼠巨噬细胞内大量异常线粒体聚集,进一步激活NALP3炎性体和线粒体活性氧(ROS)诱导炎症发生,同时观察到小鼠死亡率增加^[7]。Harris等^[8]发现用Toll样受体配体处理巨噬细胞后,促炎性因子能结合到自噬体上,而用自噬诱导剂雷帕霉素(rapamycin, RAPA)能使促炎性因子降解同时抑制炎症因子分泌。在研究盲肠结扎穿孔(CLP)诱发的小鼠模型中,自噬基因Beclin1敲除可增加CLP后患败血症的概率,而CO增强小鼠体内以及巨噬细胞中Beclin1基因的表达,从而促进巨噬细胞对细菌的吞噬作用^[9]。

2. 中性粒细胞:在ALI早期阶段中性粒细胞大量产生,释放颗粒内容和促炎细胞因子。Zhu等^[10]的研究表明在LPS诱导的小鼠ALI中,中性粒细胞的自噬为中性粒细胞的活化及颗粒内容物的释放所必须的;在ALI期间中性粒细胞自噬增加,导致颗粒内容物释放增加;故通过抑制中性粒细胞自噬,敲低自噬基因Atg5消除了LPS和fMLP对中性粒细胞释放MPO的作用,限制颗粒内容物的释放,从而减轻ALI。而RAPA预处理显著抑制粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)诱导的中性粒细胞趋化和激活,抑制肺中性粒细胞积聚,减少支气管肺泡灌洗液中细胞因子的水平,减轻了肺损伤。

3. 肺泡上皮细胞:肺泡上皮细胞有I型和II型两类。上皮的破坏导致上皮通透性增高及液体转运发生障碍。目前自噬在上皮细胞的研究多数显示过度的自噬能使细胞发生程序性死亡。而自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-MA)可减少纳米颗粒诱导的上皮细胞死亡并改善小鼠ALI。有研究发现,自噬基因Beclin1敲除或自噬抑制剂3-MA来抑制H5N1感染引起的肺上皮细胞自噬性细胞死亡,从而缓解了ALI,降低小鼠死亡率^[11]。

自噬与高氧、香烟烟雾诱导的上皮细胞死亡有关。在高氧诱导人支气管上皮细胞(Beas-2B)中,LC3B-siRNA促进高氧诱导的Beas-2B死亡,而LC3B的过表达对细胞起保护作用,发现这种保护作用与LC3B调节高氧下细胞凋亡信号基因Fas有关^[12]。一氧化碳(CO)对高氧刺激起保护,并抑制高氧相关的ROS产生,而LC3B-siRNA减弱CO对高氧诱导的上皮细胞死亡的保护作用^[13]。然而,研究发现在支气管上皮细胞中,使用LC3B-siRNA能阻

断自噬,减弱了香烟烟雾诱导的细胞死亡和凋亡。

4. 肺血管内皮细胞:肺血管内皮细胞参与构成呼吸膜,对于维持肺泡腔的干燥发挥重要的作用。血管内皮细胞的损伤引起毛细血管通透性增高,是炎症渗出的重要环节^[14]。自噬对于血管内皮细胞正常功能的维持发挥重要作用。Ma等^[15]发现高氧增加自噬蛋白LC3B的表达,引起肺内皮细胞线粒体分裂,加重肺损伤。在缺氧条件下引起肺动脉高压,敲低自噬基因LC3B小鼠出现大量肺动脉内皮细胞受损以及肺动脉高压加重。自噬可以调节肺动脉内皮细胞的凋亡和过度增殖从而在肺血管重构中起重要作用。用ssAtg101-TNP形成的纳米颗粒来敲低肺动脉内皮细胞自噬基因Atg101表达,抑制细胞自噬,在缺氧刺激下促进细胞凋亡,细胞通透性增加,而增加自噬逆转了这些现象,提示自噬的调节可能成为内皮损伤有关疾病治疗的新策略^[16]。然而,Slavin等^[17]研究表明,用自噬抑制剂3-MA或敲低自噬基因Atg5可以减轻LPS诱导的肺损伤模型中肺内皮细胞屏障破坏以及炎症反应,从而减轻了ALI。

三、自噬与ALI炎性介质

ALI发生过程中炎性细胞在肺内的聚集和激活可以产生大量细胞因子,根据其在炎症反应中的作用,这些细胞因子可以分为促炎和抗炎两类。促炎细胞因子包括IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-8、IL-6等;抗炎因子包括IL-4、IL-10和IL-13等。这些细胞因子能与自噬相互调节,从而影响炎症反应的过程。

1. 细胞因子调节自噬:ALI中,炎症反应的过程与多种细胞因子有关。巨噬细胞产生的细胞因子对自噬蛋白调节起重要作用。研究表明Th1细胞因子包括IFN- γ 、TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-6和TGF- β 为促炎因子,具有诱导自噬作用;而Th2细胞因子为抗炎因子,包括IL-4、IL-10和IL-13,具有抑制自噬作用^[18]。用IFN- γ 激活巨噬细胞通过Irgm1/IRGM依赖性方式引起分枝杆菌的吞噬体和自噬增加,导致细胞内病原体减少。用TNF阻断剂可以解除IFN- γ 诱导的吞噬体的成熟,这表明IFN- γ 诱导的吞噬体成熟和自噬可能依赖TNF- α 。研究表明,在不同细胞中TNF- α 可以通过不同的机制刺激细胞自噬,发挥不同的作用^[19]。例如,在血管平滑肌细胞中TNF- α 可以通过激活Jun激酶信号通路以及抑制Akt活化来上调自噬基因LC3和Beclin1的表达^[20]。在乳腺癌细胞中TNF- α 通过ERK1/2途径

诱导自噬,而 NF- κ B 的激活可以抑制 TNF- α 诱导的自噬,这依赖于 ROS 的产生。IL-6 和 IL-1 被证明都可以刺激自噬^[21,22]。

研究表明,在饥饿或炎症刺激诱导下 Th2 细胞因子如 IL-4、IL-13 和 IL-10 通过不同途径抑制自噬,饥饿引起的自噬抑制依赖于 Akt 途径,RAPA 诱导的自噬依赖于 STAT 信号通路。另外,其他相关的细胞因子,如生长因子和趋化因子也参与自噬的调节。Ding 等研究已表明 TGF- β 可增加自噬基因 Atg7 和 Atg5 的表达并诱导自噬体形成。趋化因子 CCL2(单核细胞趋化蛋白-1)能刺激自噬和上调抗凋亡蛋白的表达。

2. 自噬调节细胞因子:自噬可影响细胞因子的分泌。自噬可能通过多种机制调节 IL-1 β 分泌。巨噬细胞的自噬缺失或 Atg7、Atg16L1、Beclin1 自噬基因敲低以及用自噬抑制剂 3-MA 处理,在 TLR 激动剂下能刺激 IL-1 β 分泌,这种影响可能依赖于含有 TIR 结构域的接头诱导 IFN- β (TRIF)、线粒体 ROS 以及线粒体 DNA,也可能与 NLRP3 有关,或不依赖于 TRIF,而是依赖于 p38 MAPK 信号转导^[23]。RAPA 诱导自噬可抑制树突状细胞 IL-1 β 分泌,由于 IL-1 α 和 IL-1 β 都能诱导自噬,这可能作为负反馈机制来控制 IL-1 参与的炎症反应。此外,IL-18、IL-6 和 TNF- α 的分泌也受自噬的调节。自噬的抑制增强了 IL-18 的分泌,但可减少 IL-6、IL-8 和 TNF- α 的分泌^[8]。

四、自噬在不同模型中的作用

研究不断发现,自噬与人类疾病存在密切关系。一些研究已揭示了自噬与肺部炎症性疾病(如免疫性肺炎、肺结核、肺癌、ALI 等)的发生、发展有关。近几年自噬在 ALI 动物模型的研究越来越多,例如细菌感染、脓毒症、海水等因素引起的 ALI 模型,详细的细胞分子机制尚未阐明。这些研究大多数使用自噬激活剂如 RAPA 和自噬抑制剂如 3-MA,来激活或阻断自噬,然后观察 ALI 的变化。

在 LPS 诱导的 ALI 中,LPS 引起的过度自噬是 ALI 发生的主要原因,用 3-MA 处理能抑制 TLR4-NF- κ B 通路、自噬蛋白的表达,减轻 ALI^[3]。而饱和氢盐水能下调 NF- κ B 的表达,引起 Beclin1 转录减少抑制自噬,从而达到治疗 ALI 的作用^[24]。也有报道发现在 ALI 小鼠中提高自噬能激活 SIRT/MAPK 信号通路显著减轻了肺水肿和炎症细胞浸润^[25]。可见,自噬在 LPS 诱导的 ALI 中的作用还远未阐明。

CLP 诱导的小鼠 ALI 中,LC3-II、Atg5 表达下调自噬受到抑制,用 RAPA 激活肺组织自噬,抑制了白细胞浸润、促炎反应和细胞凋亡^[26]。与此结果一致的是,过表达 LC3 的转基因小鼠表现出自噬体的清除增加,中性粒细胞积聚减少,减轻 ALI 从而显著提高生存率^[27]。在海水诱导的 ALI 模型过程中,自噬抑制剂 3-MA 能减少肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-8 的表达并一定程度减轻了肺损伤^[28]。在机械通气诱导的肺损伤(VILI)中的作用。López 等^[29]研究表明 VILI 能诱导自噬,而在自噬基因 Atg4b 敲除的小鼠 NF- κ B 激活受抑制机械通气引起的炎症反应改善,减轻肺损伤。

五、展 望

自噬在 ALI 中具有重要的调节作用。目前关于自噬在 ALI 中的作用研究取得了一定的进展,自噬的分子机制、途径与 ALI 关系需进一步探索。由于生物化学途径的相互影响、广泛联系和复杂多变,将有关自噬的基础研究成果转化为应用还需漫长的探索。从治疗角度来看,自噬的调节对 ALI 具有潜在的治疗价值。由于自噬的功能可能与细胞类型而异,在不同条件下对患者使用自噬诱导剂或抑制剂可能会产生不同的作用。症状改善或恶化可能会难以预测。从诊断的角度来看,自噬的标记蛋白 LC3B 在细胞凋亡开始之前增加,提示可用作一些 ALI 的早期生物标志物。今后的研究将集中于自噬详细机制及途径在 ALI 中的作用,从而为进一步改善 ALI 策略奠定基础。

参考文献

- Guillamat-Prats R, Puig F, Camprubi-Rimblas M, *et al.* Intratracheal instillation of alveolar type II cells enhances recovery from acute lung injury in rats[J]. J Heart Lung Transplant, 2017, 37(6):782-791
- Máca J, Jor O, Holub M, *et al.* Past and present ARDS mortality rates: a systematic review[J]. Respirat Care, 2017, 62(1):113-122
- Ding D, Xu S, Zhang H, *et al.* 3-Methyladenine and dexamethasone reverse lipopolysaccharide-induced acute lung injury through the inhibition of inflammation and autophagy[J]. Exp Therapeut Med, 2018, 15(4):3516-3522
- Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19:349-364
- Fougeray S, Pallet N. Mechanisms and biological functions of autophagy in diseased and ageing kidneys. Nature reviews[J]. Nephrology, 2015, 11(1):34-45
- Suzuki H, Osawa T, Fujioka Y, *et al.* Structural biology of the core autophagy machinery[J]. Curr Opin Struct Biol, 2017, 43:10-17

- 7 Nakahira K, Haspel JA, Rathinam VA, *et al.* Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(3):222-230
- 8 Harris J, Hartman M, Roche C, *et al.* Autophagy controls IL-1 β secretion by targeting pro-IL-1 β for degradation[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(11):9587-9597
- 9 Lee S, Lee SJ, Coronata A, *et al.* Carbon monoxide confers protection in sepsis by enhancing beclin 1-dependent autophagy and phagocytosis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3):432-442
- 10 Zhu Q, Wang H, Wang H, *et al.* Protective effects of ethyl pyruvate on lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibition of autophagy in neutrophils[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(3):1272-1278
- 11 Sun Y, Li C, Shu Y, *et al.* Inhibition of autophagy ameliorates acute lung injury caused by avian influenza A H5N1 infection[J]. *Sci Signal*, 2012, 5(212):ra16
- 12 Tanaka A, Jin Y, Lee SJ, *et al.* Hyperoxia-induced LC3B interacts with the Fas apoptotic pathway in epithelial cell death[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 46(4):507-514
- 13 Lee SJ, Ryter SW, Xu JF, *et al.* Carbon monoxide activates autophagy via mitochondrial reactive oxygen species formation[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 45(4):867-873
- 14 Wang T, Gross C, Desai AA, *et al.* Endothelial cell signaling and ventilator-induced lung injury: molecular mechanisms, genomic analyses, and therapeutic targets[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 312:L452-L476
- 15 Ma C, Beyer AM, Durand M, *et al.* Hyperoxia causes mitochondrial fragmentation in pulmonary endothelial cells by increasing expression of pro-fission proteins[J]. *Arterioscler, Thrombos, Vasc Biol*, 2018, 38(3):622-635
- 16 Du J, Xu Z, Liu Q, *et al.* ATG101 single-stranded antisense RNA-loaded triangular DNA nanoparticles control human pulmonary endothelial growth via regulation of cell macroautophagy[J]. *ACS Appl Mater Interface*, 2017, 9(49):42544-42555
- 17 Slavin SA, Leonard A, Grose V, *et al.* Autophagy inhibitor 3-methyladenine protects against endothelial cell barrier dysfunction in acute lung injury. *American journal of physiology*[J]. *Lung Cell Mol Physiol*, 2018, 314(3):L388-L396
- 18 Wu TT, Li WM, Yao YM. Interactions between autophagy and inhibitory cytokines[J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(7):884-897
- 19 Chen D, Liu J, Lu L, *et al.* Emodin attenuates TNF- α induced apoptosis and autophagy in mouse C2C12 myoblasts through the phosphorylation of Akt[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 34:107-113
- 20 Jia G, Cheng G, Gangahar DM, *et al.* Insulin-like growth factor-1 and TNF- α regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells[J]. *Immunol Cell Biol*, 2006, 84(5):448-454
- 21 Venkatesan T, Choi YW, Mun SP, *et al.* Pinus radiata bark extract induces caspase-independent apoptosis-like cell death in MCF-7 human breast cancer cells[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2016, 32(5):451-464
- 22 Ansari MY, Khan NM, Haqqi TM. A standardized extract of *Butea monosperma* (Lam.) flowers suppresses the IL-1 β -induced expression of IL-6 and matrix-metalloproteases by activating autophagy in human osteoarthritis chondrocytes[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96:198-207
- 23 Wang Q, Ren J. mTOR-Independent autophagy inducer trehalose rescues against insulin resistance-induced myocardial contractile anomalies: role of p38 MAPK and Foxo1[J]. *Pharmacol Res*, 2016, 111:357-373
- 24 Liu Y, Zhang J. Saturated hydrogen saline ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by reducing excessive autophagy[J]. *Exp Therapeut Med*, 2017, 13(6):2609-2615
- 25 Yang X, Jing T, Li Y, *et al.* Hydroxytyrosol attenuates LPS-induced acute lung injury in mice by regulating autophagy and sirtuin expression[J]. *Curr Mol Med*, 2017, 17(2):149-159
- 26 Yen YT, Yang HR, Lo HC, *et al.* Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis-induced acute lung injury[J]. *Surgery*, 2013, 153(5):689-698
- 27 Lo S, Yuan SS, Hsu C, *et al.* Lc3 over-expression improves survival and attenuates lung injury through increasing autophagosomal clearance in septic mice[J]. *Ann Surg*, 2013, 257(2):352-363
- 28 Liu Q P, Zhou DX, Lin P, *et al.* Participation of autophagy in acute lung injury induced by seawater[J]. *Exp Lung Res*, 2013, 39(10):441-452
- 29 López-Alonso, Aguirre A, Gonzalez-Lopez A, *et al.* Impairment of autophagy decreases ventilator-induced lung injury by blockade of the NF- κ B pathway[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013, 304(12):L844-L852

(收稿日期:2018-06-22)

(修回日期:2018-08-15)

(接第 79 页)

- 15 龙第, 吴垣轶, 赵露, 等. NoX 与 2 型糖尿病肾功能及尿清蛋白排泄率的相关性研究[J]. *重庆医学*, 2016, 45(29):4065-4067
- 16 Call JA, Chain KH, Martin KS, *et al.* Enhanced skeletal muscle expression of extracellular superoxide dismutase mitigates streptozotocin-induced diabetic cardiomyopathy by reducing oxidative stress and aberrant cell signaling[J]. *Circulat Heart Fail*, 2015, 8(1):188-197

- 17 Zaho JS, Jin HX, Gao JL, *et al.* Serum extracellular superoxide dismutase is associated with diabetic retinopathy stage in Chinese patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Dis Markers*, 2018, 2018(8):1-8
- (收稿日期:2018-08-12)
- (修回日期:2018-09-16)