

自噬在肾缺血再灌注损伤中作用机制的研究进展

彭显月 梁国标

摘 要 自噬是一种细胞代谢过程,它可以通过溶酶体降解途径使不同细胞质成分和受损细胞器被降解并作为能量来源循环利用以维持细胞稳态。近年来研究证实,自噬参与了肾缺血再灌注损伤的发生、发展,并且对肾缺血再灌注损伤的作用具有双面性,受多种因素的调控,与多种蛋白信号通路相关联。虽然目前自噬在肾缺血再灌注损伤中的机制尚未完全阐明,但自噬参与肾缺血再灌注后一系列病理生理变化是毋庸置疑的。本文综述了自噬在肾缺血再灌注损伤中的作用及相关调控机制。

关键词 自噬 肾缺血再灌注损伤 作用机制 研究进展

中图分类号 R692

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.07.003

缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion injury, IRI)是临床上常见且复杂的病理生理过程,是导致急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的主要原因之一。肾 IRI 临床常见于肾移植、休克后微循环再通、主要的血管外科手术以及体外循环等,其发病机制尚未完全阐明^[1]。目前认为肾 IRI 与氧自由基生成、钙离子超载、ATP 减少和凋亡等机制有关。近年来有研究表明,通过调节细胞自噬(autophagy)可以减轻肾 IRI,提示自噬可能成为肾 IRI 治疗的新切入点^[2]。

自噬是维持机体内环境平衡的重要生理过程,它是一个多方面、连续的过程,由一系列高度保守的细胞自噬相关蛋白(Atgs)参与并通过多种信号通路构成自噬的分子机制^[3]。研究发现,自噬在肾 IRI 的发生、发展中发挥着重要的作用,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。因此对自噬的调节可能成为肾 IRI 治疗的新策略。

一、自噬的基本概述

自噬这一现象最早由比利时科学家 Christian de Duve 发现并提出,他在观察细胞时发现有一种新型的囊泡可运输细胞货物进入溶酶体进行降解,而这种新的囊泡被称为自噬体,Deve 创造了自噬这个词来形容这一过程。2016 年诺贝尔生理学或医学奖获得者大隅良典培育出因突变而缺乏液泡降解酶的酵母细胞,并通过饥饿来激发自噬。随后有研究者在此基

础上进一步研究发现,细胞自噬通过对细胞部件的降解和回收利用参与了许多重要的生理功能(如脂质代谢、蛋白质聚集体降解和 RNA 降解等)。

自噬的标志是双层膜结构的自噬小体的形成,主要包括诱导、成核、延伸和完成 4 个步骤。根据自噬发生的分子机制、功能的不同可将自噬分为巨自噬、分子伴侣介导的自噬和微自噬。巨自噬指细胞在饥饿、缺氧等刺激诱导下,细胞质内产生双层囊泡结构包裹非特定蛋白形成自噬体,随后自噬体与溶酶体融合,最终将自噬体包裹的物质降解的过程。分子伴侣介导的自噬是指具有特定基序的蛋白质被分子伴侣识别后,与溶酶体膜上的特殊受体——溶酶体相关膜蛋白结合,进入溶酶体被降解的过程。微自噬是指溶酶体或液泡膜直接内陷包裹胞质物或者细胞器进行降解的过程。目前关于巨自噬的研究最为广泛,与肾 IRI 的发生、发展最为紧密。

二、自噬对肾缺血再灌注损伤的影响

自噬是维持肾脏固有细胞内稳定、细胞活力和生物学功能的重要生理机制。大量研究证实自噬参与了肾 IRI 的发生、发展,但其在肾小管细胞中的作用仍存在争议,特别是在急性肾损伤模型中^[1,4]。IRI 是 AKI 的主要原因,肾近端小管细胞对氧化应激非常敏感,是氧化应激介导的急性肾损伤的重要靶点,在缺血再灌注(IR)后常导致小管细胞坏死^[5]。特别是在由 IR 引起的 AKI 等病理状态下,自噬在小管细胞维持其完整性的机制中发挥着不可替代的作用^[6]。然而,一些研究者认为,IR 后产生的过量自噬对肾细胞有害,并可能导致 IR 中的自噬性细胞死亡^[7]。通过对近端小管细胞和体外小鼠肾 IR 模型的研究发现,自噬在缺血期不太明显,在再灌注期显著

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460135);贵州省科技基金资助项目[黔科合 SY 字(2012)3419];贵州省教育厅创新群体重大项目[黔教合 KY 字(2017)045]

作者单位:563000 遵义医科大学附属医院泌尿外科

通讯作者:梁国标,博士生导师,电子信箱:lgb1111@126.com

增强^[8]。由此可知,自噬是一个动态过程,它在肾 IRI 中的作用受多种病理生理环境因素的影响并在肾 IRI 中发挥着重要作用。

三、肾缺血再灌注损伤中自噬的调控

近年来,自噬在缺血再灌注损伤领域的研究一直是一个热点,缺血再灌注损伤的机制如氧化应激、凋亡、炎症、内质网应激等均可诱导自噬的发生。自噬也在一定程度上参与 IRI 并发挥着一定的作用。

1. 线粒体自噬的调控:目前调控线粒体自噬的通路主要有以下 3 条:① PINK1 (PTEN - induced kinase1)/Parkin 通路;② BNIP3/NIX (NIP3 - like protein X) 通路;③ FUNDC1 (FUN14 domain containing 1) 通路。其中后两条通路主要是通过线粒体外膜蛋白直接与 LC3 相结合发挥作用。PINK1/Parkin 通路主要参与哺乳动物线粒体自噬的调控,PINK1 和 Parkin 分别是丝氨酸/苏氨酸激酶和 E₃ 泛素连接酶^[8]。当线粒体功能正常时,PINK1 通过线粒体膜上的转位酶转移到线粒体基质进行降解;当线粒体受损后,Parkin 能被丝氨酸/苏氨酸激酶 PINK1 磷酸化,促使其由胞质转移到线粒体膜外,从而被选择性地募集到受损的线粒体,紧接着通过介导线粒体膜蛋白的泛素化而参与线粒体自噬^[9]。哺乳动物雷帕霉素靶点 (mammalian target of rapamycin, mTOR),是一种重要的线粒体自噬调控因子,它的激活可抑制细胞的线粒体自噬^[10]。雷帕霉素能够抑制 mTOR 的功能,减弱 mTOR 对线粒体自噬的负性调节,并通过激活线粒体自噬减轻 IR 导致的肾损伤^[3]。

2. 内质网应激自噬的调控:内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 应激诱导的自噬介导了一种适应性反应,可在体外保护机体免受氧化和 ATP 耗竭诱导的细胞毒性,并在体内改善 IRI^[11]。在 ER 腔中,新合成的蛋白质在离开 ER 之前折叠到细胞的不同区域和细胞外空间。当 ER 受到不利条件刺激时,蛋白质被错误地折叠,且过早错误折叠的蛋白质不能从 ER 腔中排出并在 ER 中累积,导致 ER 应激^[12]。细胞通过激活高度保守的未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 促进 ER 应激,促进修复以重建正常的 ER 功能^[13]。ER 跨膜蛋白的 UPR 包括需肌醇酶 1 (inositol - requiring kinase 1, IRE1)、蛋白激酶 R 样内质网激酶 (protein kinase R - like ER kinase, PERK) 和活化转录因子 6 (activating transcription factor 6, ATF6),可同时触发促生存和促死亡通路^[14]。ER 应激可诱导包括肾上皮细胞在内的哺乳动物细胞

自噬^[15]。在 ER 应激时,细胞通过激活诸如 UPR 和自噬信号转导通路进行调控,以确保细胞内环境稳定。UPR 和相关的 ER 伴侣蛋白 Grp78 已被证明主要参与诱导自噬^[16]。UPR 相关的 PERK 通路可上调 Atg12 并将 LC3 - I 转化为 LC3 - II;IRE1 通路可从 Bcl - 2 复合物中释放 Beclin1 以促进自噬诱导。此外,内质网是 Ca²⁺ 储存库,其在应激期间可将大量的 Ca²⁺ 释放到胞质中,从而抑制 mTOR 信号通路的活性,允许自噬体以 Beclin1 和 Atg7 依赖的形式大量产生,促进自噬^[17]。自噬通过上述信号通路清除内质网应激反应产生的受损蛋白和细胞器等来减轻细胞损伤和肾 IRI。

3. 氧化应激自噬的调控:活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 是在多种病理条件下产生的,包括过氧化氢 (H₂O₂)、超氧阴离子 (O₂⁻)、羟基自由基 (·OH) 等,可引起多种细胞器的损伤。ROS 的过量产生会引起氧化应激,导致肾近端小管细胞 (renal proximal tubular cells, PTC) 的损伤,是引起肾 IRI 的主要原因。因此,抑制 ROS 诱导的 PTC 凋亡是治疗氧化应激损伤的关键^[18]。自噬是一个动态过程,通过溶酶体降解途径去除受损蛋白质和细胞器,具有抗氧化作用,可减轻氧化应激导致的细胞损伤。ROS 通常在组织缺血后的血流再灌注阶段产生,可通过抑制 Atg4 的活性,促进 LC3 向 LC3 - II 转化,从而有利于自噬的上调^[19]。ROS 诱导自噬亦可通过调控 mTOR 通路实现,若 ROS 过度产生则可通过 PI₃K - Akt - mTOR 通路启动自噬^[20,21]。最新研究发现,在肾脏氧化应激的情况下,典型瞬时受体电通道 6 (canonical transient receptor potential channel 6, TRPC6) 广泛表达并发挥着关键作用。氧化应激触发 PTC 中 TRPC6 依赖性 Ca²⁺ 内流以抑制自噬,使细胞更容易死亡。TRPC6 选择性抑制剂 SAR7334 可通过抑制 PI₃K - Akt - mTOR 和 ERK1/2 信号通路促进自噬,减轻氧化应激诱导的 PTC 凋亡。由此推断 TRPC6 可能成为未来肾氧化应激损伤治疗的新靶点^[18]。此外,氧化应激过程中伴随着炎性介质的释放,可加剧肾缺血再灌注损伤。

自噬在炎症损伤过程中可通过抑制炎性复合物或清除受损的蛋白质和细胞器减轻炎症损伤。有研究证实炎性介质 IL - 6、IL - 10、HMGB1 和 TNF - α 均参与了自噬在肾 IR 后的调控,可诱导自噬的产生。Chen 等^[22]的研究表明,在 TLR (Toll - like receptor) 介导的信号通路中,上调 HMGB1 可激活 TLR4 信号通

路的调节,刺激炎症和免疫反应加剧肾 IRI。然而,TLR 又可通过促进 MyD88 或 TRIF 与 Beclin1 相互作用,抑制 Beclin1 - Bcl - 2 复合体形成从而促进自噬^[23]。此外,NOD 样受体(NOD - like receptor, NLR)介导的通路能参与炎症反应的正向调节,NOD 样受体蛋白 3(NOD - like receptor protein 3, NLRP3)是 NLR 家族成员之一,激活时可促进炎症因子如 IL - 1 β 、IL - 18 的释放^[23]。NLRP3 介导的炎症反应可激活小 G 蛋白 RalB,活化的 RalB 可同时与 Exo84、ULK1 - PI₃KC3 复合体结合形成一个多蛋白复合物来诱导自噬^[23]。这样,自噬在氧化应激和炎症反应中被激活,吞噬受损的蛋白和细胞器,从而减轻机体损伤。

四、自噬对肾缺血再灌注损伤的双重作用

1. 自噬减轻缺血再灌注引起的肾小管上皮细胞损伤:越来越多的证据支持自噬通过抑制细胞凋亡来预防肾小管细胞 IRI。在这方面 Jiang 等^[3]的研究表明,通过 ptdlns3k 抑制剂 3 - 甲基腺嘌呤(3 - MA)或小干扰 RNA(siRNA)对 Beclin1 或 Atg5 转录体的自噬抑制,可增加缺氧/复氧条件下体外大鼠近端小管细胞的凋亡。在体内,3 - MA 和溶酶体抑制剂氯喹在 30min 的双侧肾缺血小鼠模型中加重了 48h 灌注后肾细胞的损伤。自噬缺陷(近端肾小管特异性 Atg7 敲除)小鼠双侧肾缺血 25min 后也观察到类似的结果。此外,两种不同的近端小管特异性 Atg5 敲除小鼠模型,在双侧肾缺血 25min 或 35min 后,也观察到肾脏损伤的加剧,细胞凋亡增加以及 p62 和泛素阳性包涵体的积累^[5]。

2. 自噬加剧缺血再灌注引起的肾小管上皮细胞损伤:尽管有充分的证据表明自噬有保护作用,但自噬在肾 IRI 过程中也有不利影响。Chien 等^[24]用单侧肾切除的大鼠模型,通过腺病毒传递 Bcl - 2 家族蛋白 Bcl - 2 和 Bcl - xL,保护另一侧肾脏免受 IRI(缺血 45min),这一效应被认为是由这些蛋白的抗凋亡和抗自噬特性介导的。在过表达 Bcl - 2 的转基因小鼠中,也观察到了 Bcl - 2 的保护作用,当这些动物双侧肾缺血 45min 后,凋亡和自噬功能均下降。此外,在缺血和重复性缺氧预处理保护作用的研究中,观察到自噬在单侧肾缺血 45min 大鼠模型中的表达也是降低的。由此可见,在肾 IRI 中自噬的激活和过度激活受多种因素的影响并发挥着截然相反的作用。自噬在肾缺血再灌注损伤中的确切作用为什么难以确定可能与自噬本身的动态性、动物模型的缺血阶段、

造模时间、动物模型年龄、药物种类及剂量等的不同有关,这将在今后的研究中进一步加以证实^[3,5]。

五、展 望

自噬是细胞存活与死亡的核心因素之一,在肾 IRI 中发挥着重要作用。激活自噬既可以对受损肾小管上皮细胞起保护作用,又可能加重肾组织损伤,笔者认为这可能与自噬激活的方式、程度、缺血时间、阶段和个体差异等因素有关。虽然自噬与肾 IRI 相互作用关系仍存在着矛盾与争议,但自噬在肾 IRI 中的作用不可否认。从自噬的角度研究肾 IRI 的过程,深入了解该疾病的发病机制,发现潜在的药物治疗靶点是目前重要的研究方向。

参考文献

- Ponticelli C. Ischaemia - reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(6): 1134 - 1140
- Livingston MJ, Dong Z. Autophagy in acute kidney injury[J]. *Semin Nephrol*, 2014, 34(1):17 - 26
- Jiang M, Wei Q, Dong G, *et al.* Autophagy in proximal tubules protects against acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2012, 82(12): 1271 - 1283
- Salvadori M, Bertoni E, Rosso G. Update on ischemia - reperfusion injury in kidney transplantation: pathogenesis and treatment[J]. *World J Transplant*, 2015, 5(2):52 - 67
- 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
- 向镜芬, 杨祥, 龚剑锋, 等. PI₃K/Akt 信号通路在脓毒症肾脏损伤诱导的自噬中的调节作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2014, 30(6):1052 - 1058
- Suzuki C, Isaka Y, Takabatake Y, *et al.* Participation of autophagy in renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2008, 368(1):100 - 106
- Wu X, Li X, Yi L, *et al.* Hydrogen exerts neuroprotective effects on OGD/R damaged neurons in rat hippocampal by protecting mitochondrial function via regulating mitophagy mediated by PINK1/Parkin signaling pathway[J]. *Brain Res*, 2018, 1698:89 - 98
- Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3):460 - 473
- Hung CM, Garcia - Haro L, Sparks CA, *et al.* mTOR - dependent cell survival mechanisms[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(12):653 - 660
- Chandrika BB, Yang C, Ou Y, *et al.* Endoplasmic reticulum stress - induced autophagy provides cytoprotection from chemical hypoxia and oxidant injury and ameliorates renal ischemia - reperfusion injury[J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0140025
- Ellgaard L, Helenius A. Quality control in the endoplasmic reticulum[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(3):181 - 191

(下转第 16 页)

- 5 Pires DP, Cleto S, Sillankorva S, *et al.* Genetically engineered phages: a review of advances over the last decade[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016,80(3):523–543
- 6 Zhang G, Zhao Y, Paramasivan S, *et al.* Bacteriophage effectively kills multidrug resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates from chronic rhinosinusitis patients[J]. *Int Forum Allergy Rhinol*, 2018,8(3):406–414
- 7 Kaur S, Harjai K, Chhibber S. In vivo assessment of phage and linzolid based implant coatings for treatment of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) mediated orthopaedic device related infections[J]. *PLoS One*, 2016,11(6):1–23
- 8 Fish R, Kutter E, Wheat G, *et al.* Compassionate use of bacteriophage therapy for foot ulcer treatment as an effective step for moving toward clinical trials[J]. *Methods Mol Biol*, 2018,16(3):159–170
- 9 Patey O, McCallin S, Mazure H, *et al.* Clinical indications and compassionate use of phage therapy: personal experience and literature review with a focus on osteoarticular infections[J]. *Viruses*, 2018,11(1):1–21
- 10 Yilmaz C, Colak M, Yilmaz BC, *et al.* Bacteriophage therapy in implant – related infections: an experimental study[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2013,95(2):117–125
- 11 Rogers DE. Studies on bacteriemia. I. Mechanisms relating to the persistence of bacteriemia in rabbits following the intravenous injection of staphylococci[J]. *J Exp Med*, 1956,103(6):713–742
- 12 Greenlee – Wacker MC, Rigby KM, Kobayashi SD, *et al.* Phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils prevents macrophage efferocytosis and induces programmed necrosis[J]. *J Immunol*, 2014,192(10):4709–4717
- 13 Chung PY, Toh YS. Anti – biofilm agents: recent breakthrough against multi – drug resistant *Staphylococcus aureus*[J]. *Pathog Dis*, 2014,70(3):231–239
- 14 Weinbauer MG. Ecology of prokaryotic viruses[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 2004,28(2):127–181
- 15 Rashel M, Uchiyama J, Ujihara T, *et al.* Efficient elimination of multidrug – resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysin derived from bacteriophage phi MR11[J]. *J Infect Dis*, 2007,196(8):1237–1247
- 16 Pearl S, Gabay C, Kishony R, *et al.* Nongenetic individuality in the host – phage interaction[J]. *PLoS Biol*, 2008,6(5):1–8
- 17 Nguyen S, Baker K, Padman BS, *et al.* Bacteriophage transcytosis provides a mechanism to cross epithelial cell layers[J]. *MBio*, 2017,8(6):1–14
- 18 Channabasappa S, Chikkamadaiah R, Durgaiah M, *et al.* Efficacy of chimeric ectolysin P128 in drug – resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia in mice[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018,73(12):3398–3404
- 19 Chan BK, Abedon ST. Bacteriophages and their enzymes in biofilm control[J]. *Curr Pharm Des*, 2015,21(1):85–99
- 20 Yan J, Mao J, Xie J. Bacteriophage polysaccharide depolymerases and biomedical applications[J]. *BioDrugs*, 2014,28(3):265–274
- 21 Pei R, Lamas – Samanamud GR. Inhibition of biofilm formation by T7 bacteriophages producing quorum – quenching enzymes[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014,80(17):5340–5348
- 22 Alves DR, Gaudion A, Bean JE, *et al.* Combined use of bacteriophage K and a novel bacteriophage to reduce *Staphylococcus aureus* biofilm formation[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2014,80(21):6694–6703
- 23 Mendes JJ, Leandro C, Corte – Real S, *et al.* Wound healing potential of topical bacteriophage therapy on diabetic cutaneous wounds[J]. *Wound Repair Regen*, 2013,21(4):595–603
- 24 Rahman M, Kim S, Kim SM, *et al.* Characterization of induced *Staphylococcus aureus* bacteriophage SAP – 26 and its anti – biofilm activity with rifampicin[J]. *Biofouling*, 2011,27(10):1087–1093

(收稿日期:2020–02–02)

(修回日期:2020–02–17)

(上接第 11 页)

- 13 Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation[J]. *Science*, 2011,334(6059):1081–1086
- 14 Ma M, Song L, Yan H, *et al.* Low dose tunicamycin enhances atherosclerotic plaque stability by inducing autophagy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016,100:51–60
- 15 徐静尊, 鲁敏. 内质网应激与自噬及其交互作用影响内皮细胞凋亡[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018,35(3):240–250
- 16 Li J, Ni M, Lee B, *et al.* The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress – induced autophagy in mammalian cells[J]. *Cell Death Differ*, 2008,15(9):1460–1471
- 17 Song S, Tan J, Miao Y, *et al.* Crosstalk of ER stress – mediated autophagy and ER – phagy: involvement of UPR and the core autophagy machinery[J]. *J Cell Physiol*, 2017,233(5):3867–3874
- 18 Hou X, Xiao H, Zhang Y, *et al.* Transient receptor potential channel 6 knockdown prevents apoptosis of renal tubular epithelial cells upon oxidative stress via autophagy activation[J]. *Cell Death Dis*, 2018,9(10):1015
- 19 Li L, Tan J, Miao Y, *et al.* ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms[J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015,35(5):615–621
- 20 Wu C, Jing M, Yang L, *et al.* Alisol A 24 – acetate ameliorates non-alcoholic steatohepatitis by inhibiting oxidative stress and stimulating autophagy through the AMPK/mTOR pathway[J]. *Chem Biol Interact*, 2018,291:111–119
- 21 Portalnuñez S, Esbrit P, Alcaraz MJ, *et al.* Oxidative stress, autophagy, epigenetic changes and regulation by miRNAs as potential therapeutic targets in osteoarthritis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2016,108:1–10
- 22 Chen CB, Liu LS, Zhou J, *et al.* Up – regulation of HMGB1 exacerbates renal ischemia – reperfusion injury by stimulating inflammatory and immune responses through the TLR4 signaling pathway in mice[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,41(6):2447–2460
- 23 Cadwell K. Crosstalk between autophagy and inflammatory signalling pathways: balancing defence and homeostasis[J]. *Nat Rev Immunol*, 2016,16(11):661–675
- 24 Chien CT, Shyue SK, Lai MK. Bel – xL augmentation potentially reduces ischemia/reperfusion induced proximal and distal tubular apoptosis and autophagy[J]. *Transplantation*, 2007,84(9):1183–1190

(收稿日期:2019–11–05)

(修回日期:2020–03–17)