

自噬与内分泌代谢性疾病专题

· 综述 ·

自噬在非酒精性脂肪性肝病中的变化及作用

张雅楠 郝光霞 杨翠萍 冯瑜

【摘要】 自噬是一种溶酶体依赖性降解途径,已有大量研究报道,自噬参与了非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 的发生及发展。在 NAFLD 早期,自噬增强,并可以通过抑制引起 NAFLD 的“二次打击”延缓 NAFLD 的进展。在 NAFLD 晚期,由于自噬相关基因 (Atg)7 降解、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路过度激活、高胰岛素血症、自噬-溶酶体蛋白水解功能减弱、自噬体膜及溶酶体膜脂质构成改变、肝细胞内钙离子水平增加引起自噬减弱,加重了 NAFLD。

【关键词】 自噬;非酒精性脂肪性肝病;哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

基金项目: 山西省归国留学基金资助项目 (2011-108); 山西省自然科学基金资助项目 (2013011048-3); 山西省卫计委科技攻关计划项目 (2014002)

The change and function of autophagy in nonalcoholic fatty liver disease Zhang Yanan*, Xi Guangxia, Yang Cuiping, Feng Yu. * Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China
Corresponding author: Xi Guangxia, Email: bettyxgx2006@hotmail.com

【Abstract】 Autophagy is a pathway of degradation dependent on lysosome. A number of studies reported autophagy was involved in the occurrence and development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Autophagy is enhanced in the early stage of NAFLD, and can delay the progress of NAFLD by inhibiting the "secondary stroke" which can induce NAFLD. In the late stage of NAFLD, degradation of autophagy related gene (Atg)7, activation of excessive mammalian rapamycin target protein pathway, hyperinsulinemia, dysfunction of autophagy-lysosome membrane protein hydrolysis, change of lipid composition in autophagosome and lysosome membrane, increase of calcium in the hepatocyte can inhibit autophagy, thus aggravate NAFLD.

【Key words】 Autophagy; Nonalcoholic fatty liver disease; Mammalian rapamycin target protein

Fund program: Shanxi Province Returned in Foundation (2011-108); Shanxi Province Natural Science Foundation (2013011048-3); Health and Family Planning Commission of Shanxi Province Science and Technology Projects (2014002)

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是代谢综合征的肝脏表现,与胰岛素抵抗、脂代谢紊乱密切相关,是糖尿病及心血管疾病的独立危险因素。近年来越来越多的研究发现,自噬在 NAFLD 的发生、发展中发挥重要作用,自噬增强可以通过多种机制缓解 NAFLD 的发展,并且随着 NAFLD 病程的变化自噬水平亦随之变化。研究报道,糖尿病合并 NAFLD 大鼠模型成模后的第 12 周、第 20 周自噬相关蛋白表达增加,自噬增强,但在第 32 周时表达开始下降,自噬减弱。NAFLD 患者自噬增强,非酒精性脂肪性肝炎及肝纤维化患者自噬标志物 LC3-II/LC3-I 比值增加, p62/SQSTM1 (p62) 聚集。p62 作为一种支架蛋白,在选择性地清除受损蛋白和细胞器方面发挥重

要作用,其自身主要包括 PB1 区域、LIR 区域、UBA 绑定区域等。LIR 结合域可以介导 LC3 和 p62 的结合,从而使 p62 通过 LC3 和自噬泡结合实现了 p62 蛋白本身自噬降解。p62 聚集,表明自噬减弱^[1]。本文对 NAFLD 早期自噬增强延缓其进展的机制及晚期自噬减弱的原因进行综述。

1 自噬概述

1.1 自噬的过程及相关基因 在饥饿、缺血、氧化应激、DNA 损伤等情况下,来源于粗面内质网、高尔基体等的自噬体膜脱落形成杯状分隔膜;之后分隔膜逐渐延伸包绕被降解物形成自噬体 (autophagosome);自噬体通过细胞骨架微管系统运输至溶酶体,与之融合形成自噬-溶酶体,并利用溶酶体内的酶降解其内成分,之后自噬体膜脱落再循环利用^[2-3]。在酵母的研究中发现了多种酵母 Atg 及复合物,它们的编码蛋白在自噬的诱导、产生、成熟、再循环中起重要作用,包括:磷脂酰肌醇-3-结合蛋白、

磷脂酰肌醇-3-磷酸酶类、Atg9-Atg2-Atg18 复合体、Vps34-Atg6/beclin1 Ⅲ型磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 复合体及 Atg12 和 Atg8/LC3 共轭系统。自噬-溶酶体系统和泛素样蛋白酶体系统是两种主要的蛋白降解系统。

1.2 自噬的调控通路 自噬的调控通路主要有两条:一是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 途径,是自噬的主要调控途径,可以抑制自噬的发生。结节性硬化复合物 (TSC) 1/2 蛋白位于 PI3K/蛋白激酶 B (PKB/Akt) 途径的下游,可抑制 mTOR 的激酶活性,对自噬发挥正向调节作用。TSC2 被 Akt 磷酸化后,抑制作用减弱, mTOR 活性增强。在细胞氧化应激、能量不足时, AMP/ATP 比值增加, AMPK 活性增强,磷酸化激活 TSC1/2 蛋白,从而抑制 mTOR,促进自噬形成^[4-6]。mTOR 活性受抑制时,促进自噬体形成,在酵母中通过使 Atg1 和 Atg13 去磷酸化而促进下游自噬信号。mTOR 活性增强时,通过激活核糖体蛋白激酶 1,促进核糖体与内质网的黏附而抑制内质网膜脱落形成自噬体膜^[7-8]。二是 PI3K 通路,有控制溶酶体的成熟、体积和活性,以及稳定溶酶体的作用。磷脂酰肌醇二磷酸和磷脂酰肌醇三磷酸是自噬抑制信号,磷酸化磷脂酰肌醇是自噬激活信号。PI3K 通过对细胞膜上的磷酸肌醇进行磷酸化修饰来控制细胞的生长、分化及细胞内物质运输等过程。

2 NAFLD 时自噬的变化及作用

2.1 NAFLD 早期自噬增强,缓解 NAFLD “二次打击”学说是目前阐述 NAFLD 发病机制的主导学说。“初次打击”是指通过胰岛素抵抗 (IR) 诱导肝细胞内脂质蓄积、肝细胞脂肪变。“二次打击”以脂质过氧化、线粒体功能损伤及炎症反应为主,脂肪变性的肝细胞发生炎症反应、坏死甚至纤维化。NAFLD 早期自噬增强,并可以通过以下机制延缓 NAFLD 的发展。

2.1.1 抑制“初次打击” 荧光显微镜观察到脂滴与自噬-溶酶体的共定位,在电子显微镜中也观察到自噬囊泡中有大量脂滴^[9]。表明自噬通过包裹脂滴并将其运送至溶酶体中降解为脂肪酸,从而减少脂质在肝细胞内沉积,即所说的“脂质吞噬”^[10]。最近研究显示,内质网应激与肥胖及 IR 相关,抑制内质网应激可减少 IR 及肝细胞脂肪变性^[11]。未折叠蛋白的聚集可引起内质网应激,自噬可通过对未折叠蛋白的降解减少内质网应激。

2.1.2 抑制“二次打击” 自噬可通过 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2)-胞质伴侣蛋白 1 (Keap1)-抗氧化反应元件 (ARE) 信号通路保护肝细胞免受氧化应激损伤。Nrf2 是调节抗氧化应激反应的重要转录因子,在肝脏中高表达,Keap1 是 Nrf2 的关键调节因子,在常态下 Nrf2 与 Keap1 结合,促使胞质内的 Nrf2 持续泛

素化并被蛋白降解,抑制 Nrf2 从胞质转移到核内;而在氧化应激等情况下,Keap1 使 Nrf2 释放出来,进入细胞核内与下游靶基因启动子的 ARE 结合,启动抗氧化酶基因的表达,清除超氧化物并保存内源性抗氧化剂,增加细胞对氧化应激的抵抗性,从而在氧化应激状态下起到保护细胞的作用。当细胞恢复氧化还原平衡后,Keap1 再次将 Nrf2 从其靶基因上的 ARE 中带走,回到胞质后重新降解 Nrf2,如此循环往复,实现 Nrf2-Keap1-ARE 的信号转导^[12]。研究发现,脂肪酸可以诱导自噬性 Keap1 降解,从而增加 Nrf2 的活性,减少肝细胞的氧化损伤^[13]。自噬对 Keap1 的降解可能与 p62 有关。p62 是自噬的作用底物,通过与 LC3 结合被降解, p62 可与 Nrf2 竞争 Keap1 的结合位点,从而形成 p62-Keap1-LC3 复合物,引起自噬性 Keap1 降解^[14]。

2.1.3 有助于脂滴降解 自噬有助于将大脂滴分解小脂滴,增加胞质内脂酶与脂滴的接触面积使其更好的发挥脂解作用,研究显示,中性脂酶对脂滴的利用需要激活自噬以提供能量^[15]。但自噬对脂酶活性是否有影响需进一步研究。

2.2 NAFLD 晚期自噬减弱

2.2.1 Atg7 降解增加 钙依赖性钙调蛋白酶-2 (calpain-2) 增加可导致 Atg7 降解增加。Atg7 通过调节 Atg12-Atg5 的融合及与 Atg3 共同将 LC3-I 转化为 LC3-II,促进自噬泡的形成,LC3 的转换参与自噬体的形成,并且可被 calpain-2 降解。研究显示,高脂喂养的肥胖脂肪肝模型小鼠在 16 周时 Atg7 的表达开始下降,22 周时几乎检测不到,同时伴随 calpain-2 表达的明显增加,而快速抑制 calpain-2 可恢复 Atg7 的表达^[16]。

2.2.2 mTOR 过度激活 合并 NAFLD 的肥胖小鼠肝脏 mTOR 过度激活,抑制自噬的信号通路,考虑与营养过剩引起的氨基酸浓度增加有关。研究显示,注入氨基酸混合物后, mTOR 过度激活,同时通过核糖体蛋白激酶 1 引起胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 的酪氨酸磷酸化下降,导致肝脏及肌肉组织出现 IR^[17]。IRS-1 同时拥有酪氨酸及丝氨酸磷酸化位点,丝氨酸残基磷酸化抑制了酪氨酸磷酸化。IRS-1 的丝氨酸磷酸化依赖 mTOR 信号途径,该通路通过其下游信号分子核糖体蛋白激酶 1 引起丝氨酸磷酸化,抑制了 IRS-1 的酪氨酸磷酸化,使其不能进一步激活下游信号通路,进而干扰了胰岛素代谢导致 IR^[18]。抑制 mTOR 可以减少 IRS-1 的丝氨酸磷酸化,阻止 PI3K 的快速失活,调节胰岛素代谢^[19]。

2.2.3 高胰岛素血症 NAFLD 是高胰岛素血症、IR 的独立危险因素,NAFLD 多伴有高胰岛素血症,过多的胰岛素通过 FoxO3 转录因子抑制自噬。FoxO3 转录因子调控 Atg12 的转录,LC3、Atg12 参与自

噬体的形成,胰岛素信号通路中的关键分子 Akt/PKB 的激活可以抑制 FoxO3 的活性,进而抑制自噬^[20]。

2.2.4 自噬-溶酶体的蛋白水解功能减弱 与正常小鼠相比,在合并 NAFLD 的肥胖小鼠肝脏中观察到参与自噬-溶酶体内物质降解的组织蛋白酶 L 减少及溶酶体酸化缺失,同样在 NAFLD 患者的肝脏中也观察到组织蛋白酶 B、D、L 的表达明显下降^[21]。自噬清除能力下降,引起受损细胞器如线粒体、内质网的聚集,内质网应激及线粒体产生的活性氧簇会进一步加重肝损害,形成恶性循环。

2.2.5 自噬体膜及溶酶体膜脂质构成改变 自噬泡是自噬体内的双膜囊泡,包裹待降解物并与溶酶体融合利用溶酶体内的酸性水解酶降解其包裹物。研究显示,长期暴露于高脂状态下的肝细胞自噬体及溶酶体囊泡内胆固醇含量较正常肝细胞减少,同时自噬泡与溶酶体的融合显著下降^[22]。另有研究表明,溶酶体膜胆固醇含量减少可导致自噬泡与溶酶体的融合功能下降。考虑可能与胆固醇直接参与融合过程中微管、微丝的连接,并在其流动过程中提供能量或改变了细胞膜稳定性、渗透性有关^[22]。

2.2.6 脂毒性诱导肝细胞内钙离子水平增加 最近, Park 等^[23] 研究显示,高脂喂养的肥胖脂肪肝小鼠模型肝细胞内钙离子水平增加,同时观察到自噬流减弱,待降解的自噬底物如未折叠蛋白、p62 及脂滴聚集,考虑与细胞内长期的高钙离子抑制了自噬体与溶酶体的融合有关。同时该研究将钙离子拮抗剂异搏定作用于肥胖大鼠,发现这种抑制作用消失,肝细胞内脂滴明显减少。

综上所述,在 NAFLD 的早期,自噬增强,并通过抑制“二次打击”,缓解 NAFLD 向脂肪性肝炎及肝纤维化发展,后期自噬减弱,加重了 NAFLD 的进展。利用现有的一些调节自噬的药物,如雷帕霉素、卡马西平、芦丁、姜黄素等对 NAFLD 中的自噬进行调节,进而延缓其进展,有望成为 NAFLD 治疗的关键靶点;同时也为肥胖、2 型糖尿病、代谢综合征等疾病的防治开辟新的方向。

参 考 文 献

- [1] 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 Dis*, 2014, 5; e1179. DOI: 10.1038/cddis.2014.162.
- [2] Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118 (Pt 1): 7-18. DOI: 10.1242/jcs.01620.
- [3] Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy [J]. *Mol Med*, 2003, 9 (3-4): 65-76.
- [4] 朱伦, 陈增良. mTOR 的结构与功能 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2006, 26 (1): 31-33. DOI: 10.3969/j. issn. 1673-2588. 2006. 01. 009.
- [5] Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2005, 11 (8): 353-361. DOI: 10.1016/j. molmed. 2005. 06. 007.
- [6] Meijer AJ, Codogno P. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease [J]. *Mol Aspects Med*, 2006, 27 (5-6): 411-425. DOI: 10.1016/j. mam. 2006. 08. 002.
- [7] 叶青, 郑民华. 自噬的分子机制与病理生理意义 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2007, 27 (4): 358-362. DOI: 10.3969/j. issn. 1673-2588. 2007. 04. 020.
- [8] Meijer AJ, Codogno P. Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease [J]. *Mol Aspects Med*, 2006, 27 (5-6): 411-425. DOI: 10.1016/j. mam. 2006. 08. 002.
- [9] Lavallard VJ, Gual P. Autophagy and non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 120179. DOI: 10.1155/2014/120179.
- [10] 马海芬, 董方元, 胡晓娜, 等. Nrf2 和自噬对非酒精性脂肪性肝病的作用机制 [J]. *国际消化病杂志*, 2014, 34 (2): 80-83. DOI: 10.3969/j. issn. 1673-534X. 2014. 02. 003.
- [11] Codogno P, Meijer AJ. Autophagy: a potential link between obesity and insulin resistance [J]. *Cell Metab*, 2010, 11 (6): 449-451. DOI: 10.1016/j. cmet. 2010. 05. 006.
- [12] Sun Z, Zhang S, Chan JY, et al. Keap1 controls postinduction repression of the Nrf2-mediated antioxidant response by escorting nuclear export of Nrf2 [J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 27 (18): 6334-6349. DOI: 10.1128/MCB.00630-07.
- [13] Park JS, Kang DH, Lee DH, et al. Concerted action of p62 and Nrf2 protects cells from palmitic acid-induced lipotoxicity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466 (1): 131-137. DOI: 10.1016/j. bbrc. 2015. 08. 120.
- [14] Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, et al. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Cell Biol*, 2011, 193 (2): 275-284. DOI: 10.1083/jcb.201102031.
- [15] Martinez-Lopez N, Singh R. Autophagy and lipid droplets in the liver [J]. *Annu Rev Nutr*, 2015, 35: 215-237. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071813-105336.
- [16] Yang L, Li P, Fu S, et al. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance [J]. *Cell Metab*, 2010, 11 (6): 467-478. DOI: 10.1016/j. cmet. 2010. 04. 005.
- [17] Gual P, Le Marchand-Brustel Y, Tanti JF. Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation [J]. *Biochimie*, 2005, 87 (1): 99-109. DOI: 10.1016/j. biochi. 2004. 10. 019.
- [18] Giraud J, Leshan R, Lee YH, et al. Nutrient-dependent and insulin-stimulated phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine 302 correlates with increased insulin signaling [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (5): 3447-3454. DOI: 10.1074/jbc. M308631200.
- [19] Gual P, Grémeaux T, Gonzalez T, et al. MAP kinases and mTOR mediate insulin-induced phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on serine residues 307, 612 and 632 [J]. *Diabetologia*, 2003, 46 (11): 1532-1542. DOI: 10.1007/s00125-003-1223-4.
- [20] Liu HY, Han J, Cao SY, et al. Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (45): 31484-31492. DOI: 10.1074/jbc. M109. 033936.
- [21] Inami Y, Yamashina S, Izumi K, et al. Hepatic steatosis inhibits autophagic proteolysis via impairment of autophagosomal acidification and cathepsin expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 412 (4): 618-625. DOI: 10.1016/j. bbrc. 2011. 08. 012.
- [22] Koga H, Kaushik S, Cuervo AM. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion [J]. *FASEB J*, 2010, 24 (8): 3052-3065. DOI: 10.1096/fj. 09-144519.
- [23] Park HW, Park H, Semple IA, et al. Pharmacological correction of obesity-induced autophagy arrest using calcium channel blockers [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 4834. DOI: 10.1038/ncomms5834.

(收稿日期: 2016-01-08)