



自噬在脑死亡肝脏缺血再灌注损伤中的作用*

杨东阁¹, 孙煦勇^{2△}

(1. 桂林医学院, 桂林 541004; 2. 中国人民解放军第 303 医院移植医学研究院, 广西移植医学重点实验室, 南宁 530021)

关键词 脑死亡; 自噬; 肝移植; 再灌注损伤

中图分类号: R617

文献标志码: A

文章编号: 1005-930X(2017)08-1243-04

DOI: 10.16190/j.cnki.45-1211/r.2017.08.038

随着肝脏终末期患者增加, 供体短缺的问题日益显现, 脑死亡供体器官捐献为目前供肝主要来源之一, 脑死亡后供体器官可发生一系列的生理病理变化, 提高供体的质量与利用率成为缓解器官短缺的一种重要手段。肝脏具有其独特的双供血结构和高度需氧的特性, 易出现缺血性损伤。供体肝脏缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI) 是肝移植手术过程中造成手术失败或患者生存预后不佳的一个主要原因^[1]。肝热缺血和再灌注过程中的自噬与调亡的均衡关系是目前研究的热点, 在一定程度上反映供体肝损伤程度^[2]。关于自噬的双重性仍然存在争论^[2-3]; 适度自噬对细胞具有保护性, 但过度自噬可导致各种疾病的发生; 缺血再灌注损伤可过度激活自噬, 但作用机制仍是模糊的。

肝移植过程中供肝容易发生缺血再灌注损伤。供肝发生缺血再灌注损伤后, 肝细胞会发生坏死、自噬和凋亡。自噬是一个吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡, 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 降解其所包裹的内容物的过程, 以此实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。研究发现, 自噬主要表现在三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 的消耗和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, 而造成 ATP 消耗和 ROS 产生的原因为局部缺血性损伤和急性炎症介导的再灌注损伤^[4]。自噬可导致肝功能紊乱, 增加肝移植术后和失血性休克患者的发病率和病死率。目前尚未有实验表明自噬对 HIRI 有保护作用, 本文就脑死亡供体肝脏的病理生理改变、HIRI 的病理机制及自噬在 HIRI 中的作用作一综述。

1 脑死亡的概念

脑死亡分为全脑死亡、大脑皮质死亡与脑干死亡。目前全脑死亡为最普遍的脑死亡概念, 认为脑死亡是脑干和大脑半球活动缺失的总和, 即大脑皮层和脑干神经功能的不可逆损伤^[5]。

脑死亡后可发生一系列病理生理变化, 如血流动力学、内分泌、炎症反应等, 均可影响供体器官的质量和免疫活性, 进而影响移植后移植植物以及受体的长期生存率。因此, 深入了解脑死亡供肝病理生理变化有利于提高供体利用率, 改善器官质量, 降低移植后器官衰竭发生率^[6]。

2 脑死亡的生理病理变化

2.1 血流动力学变化 在脑死亡过程中会普遍出现副交感神经激活、心动过缓、低血压的现象。如果中脑受到损伤, 迷走神经的心脏运动中枢被摧毁, 副交感神经活动将停止。因此, 儿茶酚胺大量释放, 可出现“交感风暴”, 导致心动过速、高血压及氧输送量均迅速增加。最后, 交感神经张力失活, 导致血流动力学不稳定加剧了低血容量, 外围血管阻力失调。由于脏器血流灌注不足导致体内微循环功能紊乱、无氧代谢增加、乳酸及自由脂肪酸水平升高, 从而发生酸中毒现象^[7]。总之, 由机体血流动力学紊乱导致脏器血流灌注不足所产生的一系列现象已成为脑死亡早期的重要标志之一。

2.2 内分泌变化 脑死亡不仅能引起机体血流动力学紊乱, 也可引起机体内分泌的变化。其变化的主要原因是由下丘脑、垂体、靶腺轴功能部分丧失或完全丧失造成。脑死亡过程中, 机体垂体分泌抗利尿激素水平下降, 可能尿崩症的发生, 进一步加重了机体有效循环血容量不足、内环境紊乱、电解质失调^[8-9]。这些因素可进一步加重机体低血压的发生

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81670596)

△通信作者, E-mail: sxywn@sohu.com

收稿日期: 2017-06-12

及脏器低灌注,从而造成脏器缺血性损伤。

2.3 炎症反应 脑死亡发生前合并创伤、颅内出血、感染、呼吸机通气等可诱发炎症反应,绝大多数脑死亡患者在早期可出现全身炎症综合征。在大脑组织缺血时可释放炎症反应因子,从而导致机体一系列炎症反应的发生。多项研究表明,蛛网膜下腔出血或颅脑外伤均可导致颅内释放炎症因子白介素-6(IL-6)^[10-11]。由于脑死亡后机体内分泌紊乱,脑死亡后儿生长激素、茶酚胺、皮质醇及胰高血糖素的变化可以引起炎症反应发生。这些因素可加重脑死亡后器官功能的损伤。

3 HIRI 的病理机制

脑死亡可激发供肝的炎症反应,脑死亡及活体供肝冷缺血后活检发现均呈多样化表现,与活体供肝比较,脑死亡供肝的细胞因子表达增加,并与移植后原发无功及放弃移植发生率呈正相关关系。与活体供肝相比,脑死亡供肝的黏附因子 ICMV-1、VC-MV-1 表达水平上调,但移植手术并未出现预后差异^[12]。

肝脏因冷热缺血导致的肝细胞受损在血供恢复后,损伤非但没有减轻,反而出现加重的现象,称为 HIRI,其致病机制尚未完全明确。肝细胞氧化应激可引起 HIRI,并在肝移植术后进一步诱导原发性移植植物无功能或功能衰竭。此外,HIRI 可限制边缘供体肝脏的应用^[13]。肝脏的热缺血是由于肝切除术或出血性休克期间引起肝脏的血管闭塞导致供氧不足造成。热缺血和冷缺血的顺序是供肝在获取过程中血管闭塞然后采用冷保存的方式造成,供肝植入受者体内视为热再灌注阶段,这些阶段导致了 HIRI^[14-15]。

Thurman 等^[16-19]提出,HIRI 分为冷缺血损伤和热缺血损伤,但损伤的机制截然不同,冷缺血再灌注损伤主要导致肝窦内皮细胞的损伤,而热缺血再灌注损伤导致对肝细胞的原发性损害。有文献报道,在 HIRI 初始阶段,激活巨噬细胞的 Kupffer 细胞,主要通过 ROS 诱导的氧化应激的产生,6~24 h 后再灌注,激活中性粒细胞释放炎症介质引起的直接组织损伤,最终加速肝细胞的凋亡^[20]。这些因素可以导致供肝微循环功能障碍,血栓形成,并最终导致组织坏死。由于边缘供体肝脏的 HIRI 发生率较高,所以,降低 HIRI 的发生率可提高供体肝脏的利用率,也可降低等待肝移植患者的死亡率^[21]。

热缺血导致肝细胞损伤的方式有 3 种:缺氧、营养耗竭、细胞内酸中毒。缺氧会造成肝细胞内 ATP 损耗,钠离子、氯离子和钙离子的平衡依赖于 ATP,从而导致肝功能紊乱^[2],乳酸和氢离子通过无氧糖酵解和 ATP 水解在细胞质中堆积,从而产生酸性环

境^[22]。由此可推断,抑制该过程的最佳环境为酸性环境,虽然长时间的缺血缺氧和严重的组织性酸中毒最终导致肝细胞死亡,但酸性环境可在肝脏急性缺血期保护肝实质。

4 自噬

自噬是一种细胞内细胞质的分解代谢过程;用于传递蛋白质和细胞器,是一个双层膜包裹的溶酶体,则称为自噬体。自噬在细胞发育、分化、寿命延长中起着至关重要的作用,并且与多种疾病相关,如癌症、神经变性疾病和缺血性损伤^[23-24]。在正常生理条件下,自噬的发生率较低;在应激条件下,如氧化应激、营养限制、缺氧、内质网应激时,发生率较高。

4.1 线粒体自噬与肝脏预缺血再灌注损伤 线粒体通过不断的融合、裂变来保持高的功能质量,并通过自噬介导线粒体损伤和功能失调产生过量 ROS 的过程,称为线粒体自噬^[25]。有实验证实,HIRI 发生后,线粒体释放促凋亡因子并产生大量 ROS^[26],这可能导致细胞凋亡和坏死,所以线粒体自噬可能改善 HIRI。

有文献报道,线粒体在亚细胞水平的改变,尤其是线粒体的肿胀,在肝细胞的自噬和凋亡过程中扮演重要角色^[27]。由于缺血再灌注过程中 ROS 的产生是不可避免的,进一步将 ROS—线粒体—自噬—凋亡综合分析,可发现 ROS—线粒体在自噬与凋亡中可能扮演触发角色,所以,HIRI 可造成线粒体损伤并产生过多的 ROS。

研究表明,线粒体来源 ROS 可以作为细胞信号分子起重要调控作用^[2]。仅对自噬而言,在生理状况下,基础低水平 ROS 可诱导细胞自噬,满足机体新陈代谢需要,甚至参与生理性凋亡调控;但随着衰老和各种致病因素作用,机体清除自由基能力逐渐减弱,ROS 增加,则表现出经典细胞毒作用,引起病理性细胞凋亡或坏死。

4.2 自噬与肝脏预缺血干预(Ischemic preconditioning, IPC) IPC 是一个短暂的、非致命性的缺血过程。在 IPC 诱导缺血再灌注损伤下,通过上调内源性保护机制,自噬的激活可产生 ATP、维持细胞内平衡、抑制细胞凋亡并对 HIRI 有保护作用^[28],若抑制自噬,反而引起肝细胞凋亡增加,肝损害加重。未经干预的肝脏热缺血再灌注期,可诱发活性氧 ROS 大量增多,甚至出现“ROS-ROS”连锁激活现象,使肝细胞发生线粒体介导的细胞凋亡,导致肝功能损伤^[2]。因此,我们认为在适度低水平氧化应激时,引发适度自噬可以在一定程度上起细胞保护作用;若氧化应激水平过高,引发过度自噬可以直接诱导细胞死亡。

4.3 信号通路分子介导的自噬 几乎所有的信

号通路均可引发自噬,一些为激活,一些为抑制。饥饿、能量不足或一定程度缺血(预缺血干预)时,细胞内均可产生一定量的 H_2O_2 等 ROS 物质^[29],激活 c-jun 氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(rapamycin, MOT)、腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)等细胞信号通路,并通过 Atg4、Atg8 等分子介导线粒体自噬,可选择性地降解氧化损伤的线粒体,产生一定的细胞保护作用,且其中自噬相关的 Bcl-2 等分子还可抑制凋亡,表现为自噬增强而凋亡抑制;若 ROS 作用时间延长或浓度过高,可能是自噬转向凋亡重要的转折点,变成以凋亡为主导的肝损伤^[30-33]。因此,认为在一定程度的缺血再灌注状态下,一定水平的自噬对肝脏具有保护作用,且可以抑制凋亡;随着损伤程度加重,细胞可出现过度自噬,表现形式以凋亡为主。

大量实验表明,自噬在 HIRI 时上调。自噬以消化细胞质来产生必要的代谢底物和能量来保持细胞活性作为对缺血再灌注损伤的应激反应^[34]。低水平 ROS 状态可以诱导肝细胞保护性自噬^[35];若 ROS 水平升高,则可以导致线粒体膜转换孔通透性增加,细胞色素 C 等物质释放,引发 caspase 系列反应,导致细胞凋亡^[36]。Xu 等^[37]、Duan 等^[38]提出,ROS-JNK 信号通路在缺血再灌注过程中与自噬发生过程中的 ROS 水平密切相关,在低水平 ROS 状态下,JNK 信号激活持续时间有限,可引发保护性自噬;而持续的高水平 ROS 刺激,则可引起线粒体自噬介导的细胞凋亡,但这多见于肿瘤与心肌细胞自噬与凋亡研究,在肝缺血再灌注研究不多。

5 小 结

在 HIRI 过程中,ROS 可以参与自噬,同时也受自噬调节。ROS 通过氧化应激诱导自噬并清除线粒体和由 ROS 损伤的蛋白质。降低 HIRI 过程中 ROS 的水平,可能使 ROS 相关信号通路 ROS/Akt/JNK 介导保护性自噬,抑制线粒体介导的细胞凋亡,以维持大部分肝细胞存活,其中 Akt 和 JNK 均是可介导自噬和凋亡的双向调控分子^[39]。目前的研究大多倾向于 ROS 过量产生可加重细胞损伤,自噬通过非功能性蛋白和细胞器的持续交换来维持细胞内环境的稳定,自噬的激活水平可能是细胞存活或凋亡的关键,自噬双重性的具体作用机制目前尚未明确,需要进一步研究。

参考文献:

- [1] YE D, LI H, WANG Y, et al. Circulating fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker for severe ischemia/reperfusion injury in patients with liver transplantation[J]. Scientific Reports, 2016, 6(1):19776.
- [2] CURSIO R, COLOSETTI P, GUGENHEIM J. Autophagy and liver ischemia-reperfusion injury[J]. Biomed Res Int, 2015(2015):1-16.
- [3] THAPALIA B A, ZHOU Z, LIN X. Autophagy, a process within reperfusion injury: an update[J]. International Journal of Clinical & Experimental Pathology, 2014, 7(12):8322.
- [4] KIM K H, LEE M S. Autophagy-a key player in cellular and body metabolism[J]. Nature Reviews Endocrinology, 2014, 10(6):322.
- [5] GHOSHAL S, GREER D M. Why is diagnosing brain death so confusing? [J]. Current Opinion in Critical Care, 2015, 21(2):107.
- [6] 郭明晓, 李幼生. 脑死亡供体器官研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2013(10):1183-1187.
- [7] SIMAS R, FERREIRA S G, MENEGAT L, et al. Mesenteric hypoperfusion and inflammation induced by brain death are not affected by inhibition of the autonomic storm in rats[J]. Clinics, 2015, 70(6):446-452.
- [8] GRAMM H J, MEINHOLD H, BICKEL U, et al. Acute endocrine failure after brain death? [J]. Transplantation, 1992, 54(5):851-857.
- [9] HOWLETT T A, KEOGH A M, PERRY L, et al. Anterior and posterior pituitary function in brain-stem-dead donors. A possible role for hormonal replacement therapy[J]. Transplantation, 1989, 47(5):828.
- [10] MCKEATING E G, ANDREWS P J, SIGNORINI D F, et al. Transcranial cytokine gradients in patients requiring intensive care after acute brain injury[J]. British Journal of Anaesthesia, 1997, 78(5):520.
- [11] BARKLIN A, LARSSON A, VESTERGAARD C, et al. Insulin alters cytokine content in two pivotal organs after brain death: a porcine model[J]. Acta Anaesthesiologica Scandinavica, 2008, 52(5):628.
- [12] 窦晓婧, 王清平. 炎性反应对脑死亡供体器官影响的研究进展[J]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4(5):315-318.
- [13] GUAN L, LIU H, FU P, et al. The protective effects of trypsin inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury and liver graft survival[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016(2):1-9.
- [14] FARMER D G, AMERSI F, KUPIEC-WEGLINSKI J, et al. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver[J]. Transplantation Reviews, 2000, 14(2):106-126.
- [15] CURSIO R. Caspase inhibition in liver transplantation: from basic research to clinical studies[J]. HPB, 2010, 12(1):1-3.
- [16] THUEMAN R G, MARZI I, SEITZ G, et al. Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat[J]. Transplantation, 1988, 46(4):502-506.
- [17] MCKEOWN C M, EDWARDS V, PHILLIPS M J, et al. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat[J]. Transplantation, 1988, 46(2):178-191.
- [18] CALDWELL-KENKEL J C, CURRIN R T, TANAKA Y, et al. Reperfusion injury to endothelial cells following

- cold ischemic storage of rat livers[J]. *Hepatology*, 1989,10(3):292-299.
- [19] MENDES-BRAZ M, ELIAS-MIRO M, JIMENEZ-CASTRO M B, et al. The current state of knowledge of hepatic ischemia reperfusion injury based on its study in experimental models[J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2012,2012(4):298657.
- [20] NASTOS C, KALIMERIS K, PAPOUTSIDAKIS N, et al. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Oxidative Medicine & Cellular Longevity*, 2014, 2014(1):906965.
- [21] XIAO Z Y, BANAN B, JIA J, et al. CD47 blockade reduces ischemia/reperfusion injury and improves survival in a rat liver transplantation model[J]. *Liver Transplantation*, 2015,21(4):468-477.
- [22] GUAN L Y, FU P Y, LI P D, et al. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide[J]. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, 2014,6(7):122-128.
- [23] MEI Y, THOMPSON M D, COHEN R A, et al. Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, 1852(2):243.
- [24] LEKLI I, HAINES D D, BALLA G, et al. Autophagy: an adaptive physiological countermeasure to cellular senescence and ischaemia/reperfusion-associated cardiac arrhythmias[J]. *Journal of Cellular & Molecular Medicine*, 2016,21(6):1058-1072.
- [25] CEDIKOVA M, PITULE P, KRIPNEROVA M, et al. Multiple roles of mitochondria in aging processes[J]. *Physiol Res*, 2016,65 (Supple 5):S519-S531.
- [26] GO K L, LEE S, ZENDEJAS I, et al. Mitochondrial dysfunction and autophagy in hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. *Biomed Res Int*, 2015,2015(7):1-14.
- [27] KOOK C S, KRISTINA G, YANG M J, et al. Autophagy in ischemic livers: a critical role of sirtuin 1/mitofusin 2 axis in autophagy induction;[J]. *Toxicological Research*, 2016,32(1):35-46.
- [28] SHIN J K, KANG J W, LEE S M. Enhanced nitric oxide-mediated autophagy contributes to the hepatoprotective effects of ischemic preconditioning during ischemia and reperfusion[J]. *Nitric Oxide*, 2016,58:10-19.
- [29] SCHERZ-SHOVAL R, SHVETS E, FASS E, et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 [J]. *Embo Journal*, 2007,26(7):1749.
- [30] GUO L, XU J M, MO X Y. Ischemic postconditioning regulates cardiomyocyte autophagic activity following ischemia/reperfusion injury [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015,12(1):1169.
- [31] YAN W, DONG H, XIONG L. The protective roles of autophagy in ischemic preconditioning[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2013,34(5):636-643.
- [32] THAPALIA B A, ZHOU Z, LIN X. Autophagy, a process within reperfusion injury: an update[J]. *International Journal of Clinical & Experimental Pathology*, 2014,7(12):8322.
- [33] LIU A, FANG H, WEI W, et al. Ischemic preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1-mediated autophagy[J]. *Critical Care Medicine*, 2014,42(12):e762.
- [34] LIEN J C, LIN M W, CHANG S J, et al. Tetrandrine induces programmed cell death in human oral cancer CAL 27 cells through the reactive oxygen species production and caspase-dependent pathways and associated with beclin-1-induced cell autophagy[J]. *Environmental Toxicology*, 2017,32(1):329-343.
- [35] GE X Y, YANG L Q, JIANG Y, et al. Reactive oxygen species and autophagy associated apoptosis and limitation of clonogenic survival induced by zoledronic acid in salivary adenoid cystic carcinoma cell line SACC-83 [J]. *PLoS One*, 2014,9(6):e101207.
- [36] LI L, JIN T, MIAO Y, et al. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms[J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2015,35(5):615-621.
- [37] XU J, QIN X, CAI X, et al. Mitochondrial JNK activation triggers autophagy and apoptosis and aggravates myocardial injury following ischemia/reperfusion[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015,1852(2):262-270.
- [38] DUAN P, HU C, QUAN C, et al. 4-Nonylphenol induces apoptosis, autophagy and necrosis in Sertoli cells: Involvement of ROS-mediated AMPK/AKT-mTOR and JNK pathways[J]. *Toxicology*, 2016,s341-343:28-40.
- [39] GUO C, YANG M, JING L, et al. Amorphous silica nanoparticles trigger vascular endothelial cell injury through apoptosis and autophagy via reactive oxygen species-mediated MAPK/Bcl-2 and PI3K/Akt/mTOR signaling[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2016,11:5257-5276.

(本文编辑:周幸锴)