

· 综 述 ·

NF- κ B、Bcl-2 在非酒精性肝病肝细胞凋亡中作用的研究进展石海燕 综述,李昌平[△] 审校

(泸州医学院附属医院消化内科,四川泸州 646000)

关键词: Bcl-2; NF- κ B; 肝疾病; 细胞凋亡

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.16.041

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)16-1895-03

非酒精性脂肪性肝病 (NAFLD) 是目前临床常见的肝病之一, 其发病机制尚未完全阐明, 肝细胞凋亡在 NAFLD 发生进展中起着重要作用。核因子- κ B (NF- κ B) 是一类重要的转录调控因子, 参与了包括肝细胞凋亡在内的 NAFLD 发病的多个环节, 其下游因子 Bcl-2 是重要的细胞凋亡调节因子, 对 NF- κ B、Bcl-2 细胞凋亡信号通路的研究可能为探讨 NAFLD 的发病机制和治疗方案提供新的线索。本文就 NF- κ B、Bcl-2 对 NAFLD 细胞凋亡的调节作一综述。

1 NAFLD

NAFLD 是以肝实质细胞脂肪变性和脂肪储积为特征的综合临床综合征, 病理学改变与酒精性肝病 (ALD) 相似, 但无过量饮酒史^[1]。其病理过程包括单纯性脂肪肝、脂肪性肝炎和脂肪性肝纤维化, 最后导致肝硬化、肝功能衰竭, 并可能引起肝癌、移植肝复发等问题。近年来, 随着社会发展, NAFLD 发病率逐年增加, 成为一种危害人类健康的常见慢性肝脏疾病。全球流行病学调查表明, 成人的 NAFLD 发病率为 20%~33%, 肥胖或 2 型糖尿病患者中 NAFLD 发病率达 75%^[2]。

NAFLD 的发病多与胰岛素抵抗和遗传易感性有关, 但其具体机制尚不十分明确。1998 年 Day 等^[3] 提出的“二次打击”学说是目前解释 NAFLD 发病机制的主要理论, 即 2 型糖尿病、高脂血症、肥胖等导致的胰岛素和瘦素抵抗引起脂质代谢紊乱, 导致肝细胞脂肪变性, 为初次打击, 此时由于适应性反应机制等防御功能与之抗衡, 肝细胞的结构和功能改变大多可逆; 第二次打击主要是各种原因所致的氧化应激和脂质过氧化损伤, 导致肝细胞酶活性和线粒体功能异常, 以及肝星状细胞激活增殖, 炎性细胞因子释放增多, 肝细胞发生炎症、坏死、凋亡和纤维化, 病程向脂肪性肝炎、肝纤维化、肝硬化发展。

2 肝细胞凋亡与 NAFLD

2.1 肝细胞凋亡在 NAFLD 中的作用 随着对 NAFLD 研究的深入, 肝细胞凋亡在 NAFLD 发病中的作用也逐渐被重视^[4]。Feldstein 通过对非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 患者肝组织活检标本应用 TUNEL 法检测肝细胞凋亡比单纯脂肪肝组或正常对照组显著增加, 并随 NASH 炎症与纤维化严重程度增加而增加, 而 Shimizu 等^[5] 也发现在酒精性肝炎和非酒精性肝病以及相关的肝纤维化中, 均有明显的肝细胞凋亡现象发生。Nan 等^[6] 在小鼠 NASH 实验模型中也证实此观点。

NAFLD 出现肝细胞凋亡可能是在二次打击中肝细胞凋亡调控因子 Fas 系统、TNF 家族、Bcl-2 蛋白家族被激活, 进一步引起 Caspase 家族成员 Caspase-8 活化, 进而活化下游的 Caspase-3 等级联反应导致肝细胞凋亡^[7]。活化后失控的肝细胞凋亡会进一步促进 NAFLD 的进展, 首先破坏肝细胞的完整性, 导致细胞功能障碍, 同时凋亡小体自发破裂释放其内含物引起组织损伤和炎症。动物实验发现, 小鼠人为介导凋亡后, 其肝功能急剧下降并进展为重症肝坏死, 伴随大量炎症、坏

死^[8]; 其次, 肝细胞凋亡趋化中性粒细胞, 将中性粒细胞募集到肝实质形成炎症瀑布反应, 加重炎症^[9], 而炎症则进一步活化肝细胞凋亡途径, 最终形成恶性循环。

2.2 NAFLD 中肝细胞凋亡的途径 NAFLD 肝细胞凋亡有 3 种途径: 由 Fas、Fas-L 介导的死亡受体途径、线粒体损伤途径和内质网应激 (ERS) 途径。其中 ERS 为高同型半胱氨酸血症和氧化应激等因素所诱导的机体的一种保护机制^[10], 而线粒体损伤途径是 NAFLD 中肝细胞发生凋亡的中心环节, 是诱导肝细胞凋亡的执行人, 因为所有的信号物质均直接或间接地以线粒体为靶目标, 另 2 种途径均需要经过线粒体途径进一步放大^[11]。线粒体途径主要由 NF- κ B 介导的 Bcl-2 家族蛋白调控, 包括抑制凋亡的 Bcl-2 家族蛋白 (如 Bcl-2 和 Bcl-xL) 和促进凋亡的 Bcl-2 家族蛋白 (如 Bid、Bax 和 Bak)。现阶段研究认为 NF- κ B、bcl-2 信号途径在肝细胞凋亡中发挥着主导作用^[12]。

3 NF- κ B、Bcl-2 的生物学特征

NF- κ B 是一种能与免疫球蛋白 K 链基因启动子序列特异性结合的核蛋白因子, 1986 年在 B 淋巴细胞核提取物中首次发现, 属于 NF- κ B/Rel 家族一员。该家族包含 2 类共 5 种蛋白: NF- κ B1 (p50)、NF- κ B 2 (p52)、RelA (p65)、RelB、c-Rel, 它们可以两两之间形成同源或异源二聚体, NF- κ B 多以 p50 和 p65 的异源二聚体形式存在, 由于 p50、p65 的前体包含有 NF- κ B 的抑制因子 I κ B, 故在细胞静息状态下此异源二聚体尚与 I κ B 结合, 以保证 NF- κ B 处于失活状态。Rel 家族蛋白都有一个由 300 个氨基酸组成的氨基末端, 称为 Rel 同源区, 此区域即为 Rel 蛋白与 DNA、其他细胞因子结合或形成二聚体的功能区, 该区域可以识别不同的 κ B 序列而产生不同的细胞特性, 故 NF- κ B 活化后因刺激源的不同而结合不同的 κ B 序列, 产生多种生物学效应^[13]。Bcl-2 基因最初是从人的滤泡性 B 细胞淋巴瘤中分离出来的, 定位于人的第 18 号染色体, 主要由位于羧基端的跨膜结构域和数量不等的 Bcl-2 同源结构域构成。Bcl-2 蛋白则是由 Bcl-2 抑制基因表达控制线粒体中致凋亡因子释放的抗凋亡类蛋白组成, 主要分布于线粒体外膜、内质网膜和核膜等。Bcl-2 通过抵抗多种形式的细胞死亡, 延长细胞寿命, 使细胞数目累计增多来促进肿瘤的形成。已有足够的实验证实 Bcl-2 是多细胞动物的“长寿基因”^[14]。

4 NF- κ B、Bcl-2 在 NAFLD 肝细胞凋亡中的作用

4.1 NF- κ B 的活化及对肝细胞凋亡的调节 NF- κ B 活化关键环节是 I κ B 的降解, NAFLD 二次打击时活性氧 (ROS) 和脂质过氧化产物明显增加, 激活 NF- κ B 复合物, 首先通过分裂素活化蛋白激酶 (MAP kinase, MAPK) 家族催化丝氨酸激酶 (IKK) 磷酸化和 IKK 复合体与胞膜上的偶联受体结合发生自体磷酸化 2 条途径, 使 IKK^[15] 被激活, 再在 IKK 作用下使 I κ B 磷酸化, 活化的 I κ B 在泛酸、蛋白酶小体作用下三维结构被破坏, 暴

露可以被泛酸连接酶识别的序列,发生泛酸化,而被水解,NF- κ B 获得活性。NF- κ B 活化过程受多种细胞因子的调节,如 TNF- α 、IL-4、IL-10 等,包括正反馈和负反馈 2 种调控方式。

可能因为 NF- κ B 二聚体的组成不同,以及调控不同靶基因时 DNA 序列各异,NF- κ B 对肝细胞凋亡调节具有抑制和诱导的双向作用,其作用主要通过包含 Bcl-2 家族蛋白在内的一系列与凋亡蛋白酶相作用的抗凋亡蛋白及凋亡抑制蛋白来实现。首先,NF- κ B 活化后主要作用于 TNF- α ,并产生大量炎症介质,激活 bax 等线粒体上的促凋亡蛋白,导致肝细胞凋亡;其次,活化的 NF- κ B 又能促进抗凋亡基因如 Bcl-2、FLICE 抑制蛋白和 X 连锁凋亡抑制蛋白的转录,这些抗凋亡蛋白可从不同水平干扰 TNF 引起的半胱天冬酶活化从而抑制肝细胞凋亡。研究发现肝凋亡同时伴随有细胞内 NF- κ B 活性的增加和 ROS 的聚积增多,细胞间还原型谷胱甘肽水平降低,并且 NF- κ B 的活性增强达到一定程度可以阻断肝凋亡的效应^[16]。

4.2 Bcl-2 的活化及对肝细胞凋亡的调节

4.2.1 Bcl-2 的活化 NAFLD 发生肝细胞凋亡时 Bcl-2 及其家族相关蛋白的活化受多个途径调节,数条途径均有 NF- κ B 参与。(1)NF- κ B 直接途径:NAFLD 时 Kupffer 细胞中的 NF- κ B 活化,活化的 NF- κ B 激活其下游基因 Bcl-2,Bcl-2 过度表达后可与 NF- κ B 在细胞质内形成 Bcl-2-NF- κ B 复合物。该复合物通过限制 NF- κ B p65-p50 进入细胞核,同时还与 NF- κ B p65-p50 在细胞核内竞争结合位点来抑制肝细胞凋亡,NF- κ B 通过调控 Bcl-2 的表达发挥抗凋亡作用^[17]。(2)TNF- α 途径:NAFLD 时,在 NF- κ B 和其他细胞因子的刺激下,血清中 TNF- α 明显升高,血清中 TNF- α 与其受体 TNF-R1 结合,刺激 Bcl-2 家族的另一促凋亡因子 bid,bid 介导 bax 改变自身构象,并向线粒体移动,插入线粒体内启动凋亡机制,而 ROS 增多亦能放大这一信号途径。另外,TNF- α 还可以通过死亡受体通路激活一系列 Caspase 分子引起肝细胞凋亡^[18-19]。(3)ROS 途径:二次打击时肝细胞发生氧化应激和脂质过氧化,活性氧产生增多,体内抗氧化物质被不断消耗,蓄积的 ROS 破坏细胞结构和功能的完整性,直接活化线粒体膜上的 Bcl-2、bax 蛋白,导致 Bcl-2/bax 比例失调诱发凋亡。因为 Bcl-2 具有抗 ROS、而 bax 能促使 ROS 产生增多的作用,二者比例失调后会进一步增加 ROS 产生,进而加剧肝细胞凋亡。同时 TNF- α 、ROS 增多后通过正反馈调节再次激活 NF- κ B 形成炎症瀑布效应。

4.2.2 Bcl-2 对肝细胞凋亡的调控 Bcl-2 蛋白调节肝细胞凋亡的确切机制是多种途径的共同作用。在体外实验中,bax 和 Bcl-2 形成脂质双分子层通道,二者有不同的离子选择性,bax 促进线粒体通透性转换孔(PTP)开放,而 Bcl-2 则抑制 PTP 开放,阻止细胞凋亡 Bcl-2 抑制细胞凋亡的其他机制包括阻断了细胞色素 C 从线粒体释放,细胞色素 C 是凋亡蛋白酶激活的关键因素,Bcl-2 可以直接或间接阻止 cytoC 释放,但不是惟一功能;另有研究表明,细胞内 Ca^{2+} 是细胞凋亡的始动因素。应用转基因方法研究发现,定位于内质网膜上的 Bcl-2 可能通过阻断 Ca^{2+} 从内质网向胞质中的流动,使依赖 Ca^{2+} 的核酸内切酶活性降低,从而阻断细胞凋亡;当 NAFLD 出现肝细胞凋亡时上游基因 bax 会率先表达,继而通过副反馈调节 Bcl-2 表达增加,与 bax 形成异源二聚体,从而阻断 bax 介导的凋亡信号通路^[20];Bcl-2 还可通过抗氧化剂和抑制氧自由基的产生而发挥其抑制细胞凋亡的功能^[21],在 Bcl-2 基因缺陷小鼠可发现 2 种与氧化还原有潜在联系的疾病——多囊肾和色素沉着不足,揭示 Bcl-2 具有抗氧化作用,它可阻止产生的活性氧族通过脂质过氧化反应造成细胞损害,但以后研究发现 Bcl-2 过表达可

阻止 cytoC 的释放,改变了与 cytoC 依赖激活 Caspase 途径相伴的氧化还原信号,减少活性氧族的生成,同时阻止线粒体膜电位的下降、抑制细胞凋亡,这进一步证实活性氧族有抗氧化作用。Verhaegen 等^[22]在新生鼠心肌细胞的研究中认为 Bcl-2 基因调控是通过细胞内 GMP 含量的增加来实现的。

4.2.3 Bcl-2/bax 的“凋亡开关”效应 Bcl-2 家族成员的构成比是调解死亡受体通路及线粒体通路的重要机制之一,尤其是这一家族的 2 个代表性成员 bax 和 Bcl-2 是目前公认细胞凋亡的正负调控剂。实验发现在正常大鼠肝组织中二者均表达,且比值保持平衡,而 NAFLD 大鼠肝组织中 bax 的表达较正常组增加,并随着脂肪性表达程度和凋亡指数的加重逐渐增多,Bcl-2 的表达则随着造模时间的延长逐渐减少,Bcl-2/bax 二者比值逐渐下调,并由此推测 Bcl-2、bax 比例失调可能是 NAFLD 中肝细胞损伤发生凋亡的重要原因^[23]。其机制与 Bcl-2 蛋白家族成员的存在形式有关,Bcl-2 和 bax 既可以从同源二聚体形式存在,也可以形成异源二聚体,Bcl-2、bax 和 Bcl-x 三者形成了一个凋亡调控系统:当 bax 同源二聚体形成,使诱导细胞凋亡;随着 Bcl-2 蛋白表达量上升,越来越多的 bax 二聚体分开,与 Bcl-2 形成比 bax-bax 更稳定的 bax-bcl-2 异源二聚体,从而“中和”了 bax-bax 诱导细胞凋亡的作用,即 Bcl-2 与 bax 的比例调节了凋亡的发生;而当 Bcl-x 存在时,优先与 Bcl-2 形成异源二聚体,而使游离的 bax 得以形成同源二聚体诱导凋亡。这一模型也许可以解释为什么 Bcl-2 表达并不完全是抑制细胞凋亡作用。

参考文献:

- [1] 中华医学会. 非脂肪性肝酒精性病诊疗指南[J]. 中华肝脏杂志,2010,18(3):163-170.
- [2] Luthra A, Nigam P, Misra A. Metabolic correlation and management strategies of non-alcoholic fatty liver disease; an asian indian perspective, diabetes and metabolic syndrome[J]. Clin Res Rev,2007,13(3):279-281.
- [3] Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits” [J]. Gastroenterology,1998,114(4):842-845.
- [4] Nishitani Y, Okazaki S, Imabayashi K, et al. Saturated and monounsaturated fatty acids increase interleukin-10 production in rat hepatocytes[J]. Nihon Arukoru Yakubutsu Igakkai Zasshi,2007,42(1):32-35.
- [5] Shimizu I, Kohno N, Tamaki K, et al. Female hepatology: favorable role of estrogen in chronic liver disease with hepatitis B virus infection[J]. World Gastroenterol,2007,13(21):4295-4305.
- [6] Nan YM, Wu WJ, Yao XX, et al. The role of apoptosis and the related genes in non-alcoholic steatohepatitis[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi,2007,15(1):41-46.
- [7] 李鹏,李昌平. 细胞凋亡在非酒精性肝病中的作用[J]. 世界华人消化杂志,2008,16(20):2253-2258.
- [8] Siebler J, Schuchmann M, Strand S, et al. Enhanced sensitivity to CD95-induced apoptosis in ob/ob mice[J]. Dig Dis Sci,2007,52(9):2396-2402.
- [9] Carter-Kent C, Zein NN, Feldstein AE. Cytokines in the pathogenesis of fatty liver and disease progression to steatohepatitis: implications for treatment[J]. Am J Gastroenterol,2008,103(4):1036-1042.
- [10] 吴涛,季光,郑培永,等. 内质网应激与肝细胞凋亡[J]. 世

界华人消化,2007,15(23):2507-2515.

- [11] Chen DF, Wang CH. The relationship between the opening of mitochondrial permeability transition pores of cultured hepatocytes with their apoptoses in a non-alcoholic fatty liver disease model[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi,2007,15(11):837-839.
- [12] Fujiyoshi M, Ozaki M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci,2011,18(1):13-22.
- [13] Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis[J]. Hepatology,2007,46(5):590-597.
- [14] 刘秉文,陈俊杰. 医学分子生物学[M]. 2 版. 北京:中国协和医科大学出版社,2006:177-178.
- [15] Basak S, Hoffmann A. Crosstalk via the NF-kappaB signaling system[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2008,19(2):187-197.
- [16] Montiel-Duarte C, Ansorena E, Lopez-Zabalza MJ, et al. Role of reactive oxygen species, glutathione and NF-kappaB in apoptosis induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine("Ecstasy") on hepatic stellate cells[J]. Biochem Pharmacol,2004,67(8):1025-1033.
- [17] Wang CY, Fan YQ, Chi BR, et al. Roles of nuclear factor-kappaB, tumor necrosis factor- α and Bcl-2 in acute he-

patic injury and their mechanisms[J]. World Chin J Digestol,2008,16(25):2804-2808.

- [18] Xiao N, Zhuang H. The Molecular pathogenesis investigation advance of alcoholic liver disease[J]. Chinese Hepatology,2010,15(4):299-302.
- [19] Dai XF, Lv XW, Li J. Research development of the role of Kupffer cell in the pathogenesis of alcoholic liver disease[J]. Anhui Med Pharmaceutical J,2010,14(1):1-4.
- [20] 张静,赵景民,周光德. 非酒精性脂肪性肝炎肝细胞凋亡及凋亡相关蛋白的表达[J]. 解放军医学杂志,2008,33(5):521-523.
- [21] Hajnoczky G, Csordas G, Das S, et al. Mitochondrial calcium signaling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca^{2+} uptake in apoptosis[J]. Cell Calcium,2006,40(5):553-560.
- [22] Verhaegen M, Bauer JA, Martin de la Vega C, et al. A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species[J]. Cancer Res,2006,66(23):11348-11359.
- [23] 解燕茹,赵和平. 非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝组织 Bcl-2 和 bax 的表达及其意义[J]. 实用肝脏病杂志,2009,12(6):411-413.

(收稿日期:2012-12-12 修回日期:2013-01-29)

· 综 述 ·

转基因小鼠模型在特应性皮炎中的应用研究进展

刘娟娟 综述,刁庆春 审校[△]

(重庆市第一人民医院皮肤科 400010)

关键词: 皮炎, 特应性; 模型, 动物; 小鼠, 转基因

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.16.042

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)16-1897-04

特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种慢性、复发性皮肤炎症性疾病,易反复发作,伴剧烈瘙痒,严重影响了患者的生活质量,近年来发病率呈逐年升高的趋势。该病确切发病机制尚不清楚,可能涉及遗传、免疫、感染等众多因素。转基因小鼠在确定特定基因和蛋白的生理功能及在疾病状态所起的作用方面是非常有价值的工具,近年来 AD 的转基因小鼠模型有了很大发展,白细胞介素(interleukin, IL)-4 转基因小鼠、IL-18 转基因小鼠、半胱天冬酶 1(caspase-1, CASP1)转基因小鼠、IL-31 转基因小鼠、胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin, TSLP)转基因小鼠、RelB 缺陷小鼠、组织蛋白酶 E(cathepsin E, Cat E)缺乏小鼠、缓激肽释放酶(stratum corneum chymotryptic enzyme, SCCE)转基因小鼠、载脂蛋白 C1(apolipoprotein C1, APOC1)转基因小鼠等从不同的角度显示疾病的特征,对研究疾病的发病机制和开发药物提供了广阔的前景,有助于阐明单个细胞因子和蛋白在 AD 的发生与发病机制、生物治疗等方面的作用。为此,本文就转基因小鼠模型在 AD 中的应用研究进展进行简述。

1 IL-4 转基因小鼠

Chan 等^[1]报道了 IL-4 转基因小鼠(K14-IL-4-Tg/CByB6 小鼠),在角蛋白(keratin, K)14 启动子的调控下过度表达 IL-4。该鼠一般在 4 月龄时自发出现慢性瘙痒性皮肤病,如浸润肥厚,鳞屑,苔藓样变。皮肤病理早期表现为角化过度,棘层轻度肥厚,肥大细胞脱颗粒和单核细胞浸润。晚期表现为角化不全和嗜酸粒细胞浸润。免疫病理表现为血清总 IgE 和 IgG1 水平升高。该鼠早期皮损中 IL-2 和 IL-12p40 明显升高,随着病程进展,分泌 IL-2、IL-4、IL-10 及干扰素(interferon, IFN)- γ 的 T 淋巴细胞和 IL-12 的抗原提呈细胞明显增多。作为 Th2 表现型的 IgG1 和 IgE 在 AD 的早期升高,而 Th1 表现型的 IgG2a 则升高较晚。提示 Th2 型细胞因子首先触发了 AD,随后 Th1 型细胞因子也参与了 AD 的进展。该鼠也存在皮肤屏障功能受损的表现,易引起葡萄球菌性脓皮病^[1]。临床研究表明金黄色葡萄球菌的定植与 AD 发病、皮损类型、皮损的严重程度有密切关系^[2]。这种转基因小鼠模型可以用来探讨 IL-4 以及金黄色葡萄球菌在 AD 发病过程中的作用等。近来,部分