retinal gene therapy[J]. Mol T her,2013,21(3):509-519.

[39] Feng L,Chen H,Yi J,et al. Long-term protection of retinal ganglion cells and visual function by brain-derived neurotrophic factor in mice with ocular hypertension[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2016,57(8):3793-3802.

[40] Valiente-Soriano FJ,Nadal-Nicolás FM,Salinas-Navarro M,et al. BDNF rescues RGCs but not intrinsically photosensitive RGCs in ocular hypertensive albino rat retinas[J]. IOVS,2015(56):1924-1936.

(收稿日期:2017-07-18 修回日期:2017-09-26)

·综 述· doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.33.045

自噬与酒精性脂肪肝的研究进展*

陈家海[1]综述,龚建平[2],张译尹[3△]审校

(1.重庆市忠县人民医院外科 404300;2.重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010;3.重庆市江津区中心医院麻醉科 402260)

[关键词] 自噬;酒精性脂肪肝;乙醇

[中图法分类号] R575 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2017)33-4738-03

酒精性脂肪肝(AFLD)是一种世界范围内普遍存在的肝脏疾病。有研究表明,当肝细胞失去了自噬能力的时候,细胞将发生凋亡,这可能会导致肝脏炎症、纤维化和肿瘤的发生。乙醇降低自噬的作用,这可能是乙醇诱导肝损伤的原因[1]。自噬作为其中一种保护机制,对肝细胞内的稳态起着至关重要的作用[2]。乙醇摄入将会扰乱细胞内肝脏的稳态,然后乙醇氧化产生许多活性氧(ROS),这可能促使 AFLD 的变性和形成 Mallory-Denk 小体。乙醇或其他代谢产物可通过 ROS 的固醇调节元件结合蛋白转录因子,激活脂肪的生成。此外,ROS 也会诱导线粒体能量和氧化还原电位结构和功能的改变[3]。在酒精性肝细胞中,自噬不仅能去除受损的细胞器和细胞内的成分,还可以表现出较高的细胞凋亡阈值。

1 自噬的本质

自噬是细胞的一种降解过程。双层膜自噬体与溶酶体是组成自噬细胞的材料。自噬可能负责大部分正常细胞的自噬活性,并能降解大细胞成分比如蛋白质、线粒体、脂滴或内质网膜。自噬过程发生包括 3 个步骤:(1)自噬体形成;(2)溶酶体与自噬体融合;(3)溶酶体降解并再生为代谢前体,如氨基酸和脂肪酸。自噬促进脂质水解和自由脂肪酸的生成。自噬调节复杂信号转导途径,其中 mTORC1 和磷酸腺苷活化的蛋白激酶(AMPK)是细胞内的信号传感器,分别抑制和刺激自噬。自噬的核心机制是 atg 分子形成复合物,这些分子复合物包括:(1)ulk1-fip200-atg13 激酶复合物;(2)beclin1-vps34 PI3 激酶复合物Ⅲ类;(3)atg9-atg2-atg18 复合物;(4)atg5-atg12-atg16 和 atg8/LC3 共轭系统。这些 atg 复合体的重要作用在自噬调节时已被广泛验证。

2 乙醇诱导肝细胞自噬机制的研究

乙醇对乙醛的氧化是由酶介导的,其中包括乙醇脱氢酶(ADH)、细胞色素 P450 2E1(CYP2E1)、过氧化氢酶(CAT),然后经乙醛脱氢酶转化为乙酸。经乙醇处理后的肝细胞与正常的肝细胞相比具有更强的抗利尿激素作用和 CYP2E1 表达,进而诱导生成更多的自噬小体,缺乏代谢能力或已预处理的 ADH-CYP2E1、抑制剂 4-甲基吡唑(4MP)和脱氢酶等抑制剂阻断自噬的诱导。这些研究结果表明,乙醇代谢可能会导致乙醇诱导的自噬氧化产生很多的 ROS。乙醇刺激肝细胞可能会受到自噬的抑制,这表明 ROS 是乙醇诱导细胞自噬的重要抗氧化剂。目前发现,抑制氧化应激和激活物促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路能有效地保护肝脏免受急性酒精的刺激[4]。乙醇可快速诱导 JNK1 和 JNK2 的磷酸化[5]。JNK 抑制剂抑制 mTOR 下游的磷酸化,磷酸化 S6K1 和真核起始因子 4ebinding 蛋白-1(4EBP1),从而最终促进自噬,这表明 JNK 的活化可抑制自噬[6]。这个明显矛盾的原因可能是 JNK1 和 JNK2 通路之间的活化差异造成的。乙醇代谢导致内质网分裂和未折叠蛋白反应[7]。内质网应激还可以刺激自噬肌醇酶(IRE1)的增加,atg1 的表达和 atg8 功能的加强,另一个内质网压力传感器-PERK,有助于 LC3 和 atg5 的表达。降低 S6K1 和 4EBP1 的磷酸化状态,抑制 mTOR 下游蛋白质的磷酸化[8],在酒精性肝细胞中可能抑制自噬的作用。然而,mTOR 中具体的信号级联对抑制自噬的作用还未完全清楚,有报道称激活 AMPK 导致 TSC1/2 的一个亚基磷酸化,mTORC1 的亚基抑制自噬。在肝细胞中,乙醇激活能量传感器 AMPK,由于 ATP 在线粒体的消耗和 AMPK 活性的增加来诱导肝细胞的自噬。有越来越多的证据表明乙醇诱导的自噬包括 PI3K/Akt 通路[9]。

3 自噬是如何影响酒精性肝病的发病机制

酒精性肝病的病理特点包括脂肪变、炎症、纤维化和肝硬化。通常认为酒精性肝病的发病机制与氧化应激,活性中间体(包括乙醛、NADH/NAD+和 ROS)的生成增加密切相关。乙醇被 ADH 氧化生成乙醛,随后被乙醛脱氢酶氧化[10]。在这两个步骤中,NADH 的生成和氧化间接通过线粒体电子传递系统。过多数量的 NADH 降低线粒体电子传递系统的能力,这被认为可使线粒体 ROS 增加,并引起乙醇诱导的氧化应激。酒精性肝病线粒体结构与功能的改变被认为可引起氧化应激,包括氧化磷酸化,增加线粒体 DNA 链的断裂与缺失,线粒体蛋白质组的改变和线粒体动力学的改变。增加氧的自由基组合和乙醇引起的脂质代谢会导致脂质过氧化反应和酒精性肝

* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会 2016 年医学科研计划项目(2016MSXM206)。 作者简介:陈家海(1968-),副主任医师,本科,主要从事肝胆、胃肠外科方面的研究。 △ 通信作者,E-mail:595633794@qq.com。

病线粒体损伤，二者可以形成一个恶性循环，进一步加深氧化损伤。在这种情况下，降低脂肪酸水平和清除受损的线粒体可以降低伤害。去除脂质液滴可能有利于平衡酯化反应，降低细胞内游离脂肪酸的水平。脂肪分解和线粒体自噬的发生基于自噬体与线粒体脂滴的共存[11]。抗氧化剂可以抑制乙醇诱导的线粒体自噬[12]，或改善脂肪肝的急慢性症状。这通常取决于自噬所选择的底物类型，但区别往往不明显。这些机制的探索，可以给改善疾病带来新的治疗方式。同时可以通过自噬诱导剂（如雷帕霉素）增强自噬[13]，减少乙醇中毒和其他环境细胞的损伤，但这种方法可能有局限性。自噬相关选择性的增强可能会更好地控制个体疾病的发展。

4 自噬在酒精性肝细胞的作用

自噬主要是一种保护机制，作为一种清洁剂去除受损的细胞器和细胞内的成分。针对急性酒精的治疗，自噬的信号作用伴随溶酶体相关膜蛋白 1（LAMP1）呈剂量依赖性增加。把预处理的小鼠 atg7 siRNA（一种自噬蛋白质）或缺陷小鼠 atg7（错误折叠的蛋白质）与野生型小鼠相比，发现脂肪酸和受损的线粒体水平是升高的[14]。atg 被认为是自噬调控机制的关键。atg7 已确定参与自噬囊泡的延伸。除了 atg7、atg1、atg11 和 atg13 等其他蛋白也被广泛的研究于 PI3K 通路中，引发上游信号级联来调节 mTOR 的活性[15]。另外，抗凋亡蛋白（Bcl-2）也是重要的蛋白质，它在自噬调控中扮演主导角色[16]。在不同的 Bcl-2 蛋白家族成员中，Beclin-1 家族蛋白参与自噬体的形成。Beclin-1 包括 Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-w 和 Mcl-1 作为自噬诱导脂质激酶的活化剂。当自噬被抑制时，Beclin-1 灭活后激活 Bcl-2，因此 Beclin-1 的代谢是自噬重要的调控机制。然而，与急性乙醇治疗相比，慢性乙醇侵蚀导致自噬小体的密度下降，从而诱导蛋白质和脂滴降解。因此，自噬可以保护被乙醇侵蚀的肝细胞。

5 乙醇在酒精性肝病的自噬动力学

乙醇激活自噬是由于可以激活体内和体外培养的肝细胞[17]。这些激活需要乙醇代谢，从而需要 ADH 和 CYP2E1 的激活[18]。正如上面所讨论的，乙醇会导致氧化应激，这是许多乙醇致使细胞变性的基础。氧化应激似乎是诱导自噬的，乙醇主要的代谢物——乙醛（亲氧化剂）可以触发自噬[19]。抗氧化剂如 N-乙酰半胱氨酸（NAC）能抑制乙醇诱导的自噬。此外，亲环素 D 如果缺失，乙醇诱导的线粒体自噬受损，可由于渗透的减少，从而减少 ROS 的生成，抑制 mTORC1、AMPK 的激活来促进乙醇诱导的自噬氧化应激作用，自噬被雷帕霉素激活来减轻乙醇诱导的肝损伤。最近，已证明转录调节因子（FoxO3a）在乙醇治疗期间被激活，并负责几个自噬基因的转录。众所周知，白藜芦醇可应对乙醇所致的肝损伤，它也可以激活自噬并通过脱乙酰作用增加 FoxO3a 和 SIRT1 的活性。

乙醇摄入可导致蛋白酶体抑制和内质网应激，二者都是已知的与自噬激活有关。通过内质网应激介导的 UPR 抑制蛋白酶体引起的自噬代偿激活，其中涉及 IRE-1 和 JNK 途径。事实上，蛋白酶体活性与乙醇诱导的细胞自噬激活呈负相关。另外，金属元素如锌也可在乙醇侵蚀基础水平下的肝癌细胞中参与自噬[20]。因此，锌培养基有刺激自噬的作用，乙醇刺激可以改变锌转运体的金属硫蛋白表达，从而激活自噬。

目前研究表明，乙醇对细胞自噬在疾病的不同阶段有着不同的影响。在疾病的早期阶段，乙醇代谢可激活自噬体，反过来刺激自噬小体促进脂滴回收，导致恶性循环。然而，在慢性乙醇摄入的疾病后期，可能因为一些原因自噬囊泡密度会减少。首先，蛋白酶体经过长期接触活性氧，其降解未折叠蛋白的能力可能会下降。这可能会促使未折叠蛋白反应，最终导致内质网应激。因此，来自内质网的主要 atg 蛋白质自噬体和细胞器膜形成减少。内质网应激的生化过程与自噬的时间调节有复杂关联，这是一个有待进一步研究的领域。因此，在疾病的早期阶段，内质网应激可能抑制自噬[21]。其次，中间产物乙醛可能会损害细胞骨架微管蛋白的结构，从而阻断自噬运输。最后，自噬的正调节能明显抑制慢性乙醇的侵蚀。此外，蛋白水解的效率由于溶酶体酸化和含量的下降，组织蛋白酶 B 和 L 可能会降低。总之，慢性乙醇摄入可能妨碍自噬溶酶体的功能。

此外，自噬通过调控可抑制 Bcl-2 蛋白细胞凋亡。然而，肝毒性物质的积累，包括脂滴、受损的线粒体、未折叠的蛋白质，特别是 ROS 有抑制自噬的能力。因此对肝细胞产生内在和外在的损伤，这对乙醇侵蚀肝细胞产生更大的影响，由此看来自噬或凋亡仍然是一个不能完全回答清楚的问题。

回顾过去，针对乙醇诱导自噬机制的各项研究工作已经开展，虽然少部分机制在很大程度上已被解开，但大部分分子水平上的细节仍然未被发现。相互矛盾的条件可以减轻自噬在急性和慢性乙醇中毒的诱导作用。激活 JNK1 和 JNK2 的通路状态，之间存在的差异可导致部分肝脏的损伤，而 P62 和自噬的关系也还没有明确。应该认识到由单一的乙醇引起的肝脏疾病阶段，乙醇摄入可引起不同阶段不同严重程度的肝脏疾病。自噬的情况可能更复杂，如果没有对酒精性肝病有一个充分的了解，自噬在临床上的应用可能仍然是难以把握的。

参考文献

[1] Cho I，Choi W，Lee M. Impairment of autophagosome-lysosome fusion contributes to chronic ethanol-induced liver injury[J]. Alcohol，2014，48(7)：717-725.

[2] Aki T，Funakoshi T，Unuma K，et al. Impairment of autophagy：from hereditary disorder to drug intoxication[J]. Toxicology，2013，311(3)：205-215.

[3] Das S，Hajnóczky N，Antony N，et al. Mitochondrial morphology and dynamics in hepatocytes from normal and ethanol-fed rats[J]. Pflugers Arch，2012，464(1)：101-109.

[4] Matsugo S，Kanamori K，Sugiyama H，et al. Physiological roles of peroxido-vanadium complexes：Leitmotif as their signal transduction pathway[J]. J Inorg Biochem，2015，147(1)：93-98.

[5] Thomes G，Trambly S，Thiele M，et al. Proteasome activity and autophagosome content in liver are reciprocally regulated by ethanol treatment[J]. Biochem Biophys Res Commun，2012，417(1)：262-267.

[6] Yang L，Rozenfeld R，Wu DF，et al. Cannabidiol protects liver from binge alcohol-induced steatosis by mechanisms including inhibition of oxidative stress and increase in autophagy[J]. Free Radic Biol Med，2014，68(3)：260-267.

[7] Cederbaum I，Yang LL，Wang XD，et al. CYP2E1 sensitizes the liver to LPS-and TNF α-Induced toxicity via elevated oxidative and nitrosative stress and activation of ASK-1 and JNK Mitogen-Activated kinases[J]. Int J Hepatol，2012，2012：582790.

[8] Lu H,Zhang XY,Wang YQ,et al. Andrographolide Sodium bisulfate-induced apoptosis and autophagy in human proximal tubular endothelial cells is a ROS-mediated pathway[J]. Environ Toxicol Pharmacol,2014,37(2):718-728.

[9] Howarth L,Vacaru M,Orkhontuya T,et al. Alcohol disrupts endoplasmic reticulum function and protein secretion in hepatocytes[J]. Alcohol Clin Exp Res,2012,36(1):14-23.

[10] Zeng T,Zhang L,Song Y,et al. PI3K/Akt pathway activation was involved in acute ethanol-induced fatty liver in mice[J]. Toxicology,2012,296(1/2/3):56-66.

[11] Henningsen M,Hon S,Covalla F,et al. Increasing anaerobic acetate consumption and ethanol yields in Saccharomyces cerevisiae with NADPH-specific alcohol dehydrogenase[J]. Appl Environ Microbiol,2015,81(23):8108-8117.

[12] Sid B,Verrax J,Calderon B. Role of AMPK activation in oxidative cell damage: Implications for alcohol-induced liver disease[J]. Biochem Pharmacol,2013,86(2):200-209.

[13] Lin CW,Zhang H,Li M,et al. Pharmacological promotion of autophagy alleviates steatosis and injury in alcoholic and non-alcoholic fatty liver conditions in mice[J]. J Hepatol,2013,58(5):993-999.

[14] Yuan N,Song L,Zhang SP,et al. Bafilomycin a1 targets both autophagy and apoptosis pathways in pediatric b-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Haematologica,2015,100(3):345-356.

[15] Nepal S,Park H. Activation of autophagy by globular adiponectin attenuates ethanol-induced apoptosis in HepG2 cells: involvement of AMPK/FoxO3A axis[J]. Biochim Biophys Acta,2013,1833(10):2111-2125.

[16] Schroeder B,Schulze J,Weller G,et al. The small GTPase Rab7 as a central regulator of hepatocellular lipophagy[J]. Hepatology,2015,61(6):1896-1907.

[17] Lizaso A,Tan T,Lee H. β-adrenergic receptor-stimulated lipolysis requires the RAB7-mediated autolysosomal lipid degradation[J]. Autophagy,2013,9(8):1228-1243.

[18] Thomes G,Ehlers A,Trambly S,et al. Multilevel regulation of autophagosome content by ethanol oxidation in HepG2 cells[J]. Autophagy,2013,9(1):63-73.

[19] King L,Swain M,Mao ZK,et al. Involvement of the mitochondrial permeability transition pore in chronic ethanol-mediated liver injury in mice[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol,2014,306(4):G265-277.

[20] Zhang Q,Li Y,Liang T,et al. ER stress and autophagy dysfunction contribute to fatty liver in diabetic mice[J]. Int J Biol Sci,2015,11(5):559-568.

[21] Donohue J,Thomes PG. Ethanol-induced oxidant stress modulates hepatic autophagy and proteasome activity[J]. Redox Biol,2014,3(1):29-39.

(收稿日期:2017-05-21 修回日期:2017-07-16)

·综 述· doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.33.046

维生素 D 与肝脏疾病相关性的研究进展*

王君宜 综述,李江发,杨丽莎△审校

(桂林医学院附属医院消化内科,广西桂林 541004)

[关键词] 维生素 D;慢性肝病;病毒性肝炎;肝硬化;肝细胞肝癌

[中图法分类号] R575 [文献标识码] A [文章编号] 1671-8348(2017)33-4740-03

维生素 D 具有多种生物学效应,包括调节细胞的增殖、分化、凋亡和血管生成,具有免疫调节和抗炎的特性,最主要的作用是维持人体骨健康。在维生素 D 发挥生物学效应中,肝脏起着重要作用。所以维生素 D 与肝脏相关疾病的发生、发展具有紧密相关性。通过对文献的回顾,笔者对维生素 D 在肝脏相关疾病中的作用作一综述。

1 维生素 D

维生素 D 是一种类固醇激素,作用是调节人体内的骨与钙的代谢。人体直接摄入或合成的维生素 D 不具有生物活性,需要在肝脏中合成为 25 羟维生素 D[25(OH)D],然后在肾脏合成具有生物活性的 1,25-羟维生素 D[1,25(OH)2D]。1,25(OH)2D 是维生素 D 生物学活性最强的一种形态,可以通过控制多种基因直接或间接的调节细胞的增殖、分化、凋亡和血管生成。

临床上主要是通过检测血清 25(OH)D 来评价维生素 D 的水平及是否缺乏。血清维生素 D 的正常值为 75～125 nmol/L[1],不足定义为低于 75 nmol/L,缺乏定义为低于 50 nmol/L。25(OH)D 在被运输到肾小管近端通过 1α 羟化酶作用经羟基化形成活性更强的 1α,25(OH)2D 或骨化三醇[2]。在人体其他组织包括肝脏、脂肪组织和先天免疫系统的细胞中存在 CYP27B1[3],其中免疫系统的细胞包括巨噬细胞、树突状细胞和 T、B 淋巴细胞,通过表达 CYP27A1 或 CYP27B1 将 25(OH)D 转化为骨化三醇,最后在肠道或肾脏经 24 羟化酶分解为胆汁后排出体外。这些组织共同维持维生素 D 在体内的代谢平衡。因此当患者出现肾功能障碍也会影响到维生素 D 的血清水平。维持正常的血清维生素 D 水平对人体的代谢具有

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81260602)。 作者简介:王君宜(1986－),医师,硕士,主要从事消化肝脏疾病研究。 △ 通信作者,E-mail:yangsha@glmc.edu.cn。