doi:10.11659/jjssx.12E016092

·综述·

肝缺血再灌注损伤分子机制的研究进展

吴鹏俐[1],钟坪杉[2],阳德飞[2],肖 莉[3] (1.成都医学院麻醉学学员队,四川 成都 610500;2.成都医学院临床医学学员队,四川 成都 610500;3.成都医学院人体解剖学教研室,四川 成都 610500)

Research progress of molecular mechanism of liver ischemia-reperfusion injury

WU Peng-li[1],ZHONG Ping-shan[2],YANG De-fei[2],XIAO Li[3] (1.Institute of Anesthesia,Chengdu Medical College,Chengdu Sichuan 610500,China;2.School of Clinical Medicine,Chengdu Medical College,Chengdu Sichuan 610500,China;3.Department of Human Anatomy,Chengdu Medical College,Chengdu Sichuan 610500,China)

[摘 要] 肝缺血再灌注损伤(HIRI)是肝手术、肝移植中常见的病理生理现象,是由于进行手术时肝血管被阻断,在阻断移除后,肝血供恢复,然而肝并没有因此恢复正常生理功能,反而造成并加重损伤的现象。现有关于 HIRI 的研究,主要可以归纳为3种损伤原因:氧化应激,白细胞的聚集,钙超载。这几个方面可以同时发生,相互影响,互相作用。然而关于信号通路方面的研究较少。研究具体的信号通路可以更好地解释 HIRI 在分子层面的损伤机制,有利于形成预防 HIRI 的措施,减轻 HIRI,促进新药的研发。因此,本文着重信号转导和分子学机制方面的作用,就最新的研究进行描述。

[关键词] Notch 信号途径;β-certain 蛋白;PTEN/PI3K;p38MAPK;肝缺血

[中图分类号] R575 [文献标识码] A [收稿日期] 2016-12-25

肝缺血再灌注损伤(hepatic ischemia reperfusion injury,HIRI)是肝手术、肝移植中常见的病理生理现象,是因为进行手术时肝血管被阻断,在阻断移除后,肝血供恢复,然而肝并没有因此恢复正常生理功能,反而造成并加重损伤。HIRI 造成肝细胞的损伤原因在于再灌注过程中,细胞会凋亡。现在有关于 HIRI 的研究显示,细胞凋亡的主要原因为氧化应激、白细胞的聚集和钙超载[1]。这几个方面可以同时发生,相互影响,互相作用,这些可以称为细胞层面上的损伤机制,但并未揭示其分子层面的损伤机制。细胞凋亡是通过各种分子层面上的信号通路进行的,那么弄清楚这些信号通路便可以人为影响其凋亡。有目的地阻断或促进凋亡信号通路中的某个物质,阻碍细胞的凋亡过程,这样减少了细胞的凋亡,可减轻 HIRI。因此,本文着重信号转导分子学机制方面的作用,就最新的研究进行描述。

1 PTEN/PI3K/AKT 信号通路

磷酸酶和张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten,PTEN)即人第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因,是1997年发现的一种位于10q23染色体的抑癌基因。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K)是一类能够特异性磷酸化肌醇磷脂3位羟基的激酶,称为PI3Ks家族。AKT 蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB),是 PI3K 的直接靶蛋白,可活化下游的多种靶分子[1]。

磷酸化和脱磷酸化是细胞的基本活动过程中起关键性作用的调节机制。磷酸化可活化功能,脱磷酸化可关闭功能。PTEN 具有双重磷酸酶活性。它的蛋白表达产物有脱磷酸作用,在 PTEN/PI3K/AKT 信号通路中,能使 PIP3 的3磷酸脱磷酸形成 PIP2,使 PIP3 丧失功能,从而阻断 PIP3/AKT 信号通路,导致细胞增殖的抑制和细胞凋亡[2]。目前对 PTEN/PI3K/AKT 的研究主要是在肿瘤方面,许多研究都表明,PTEN 在子宫内膜癌、口腔鳞癌、肝癌、结肠癌中都是失活沉默的[3-6]。近年来,对 PTEN 的研究已从肿瘤领域延伸至非肿瘤领域。在肝硬化中,PTEN 发挥重要作用。肝硬化的主要发生细胞是肝星形细胞(HSC),郝礼森等[7]发现如果上调 PTEN 通路,肝硬化可减轻。其机制可能为活化 PTEN 使 PI3K 受到抑制,进而抑制了 HSC 的增殖、功能发挥,促进 HSC 的凋亡,使肝硬化减轻。白丽等[8]的研究发现,PTEN/PI3K 在肝缺血再灌注损伤中发挥关键的调控作用。抑制 PTEN 的活性可减轻 HIRI。PTEN/PI3K 可以引起缺血再灌注的保护性自我调节机制,在肝中触发一种“自我调节”机制,让缺血期去磷酸化的 AKT 于再灌注过程中恢复其磷酸化活性,磷酸化活化的 p-AKT 通过激活或抑制下游多种靶蛋白发挥抗凋亡作用[9]。其具体过程为:①直接调节。AKT 直接磷酸化促凋亡分子 BAD、Bcl-2 或 Bcl-xl 等抗凋亡分子发生游离,发挥抗凋亡作用。同时 BAD 与伴侣蛋白 14-3-3 形成复合物,其促凋亡作用

[基金项目] 2015 年四川省大学生创新实验项目(201513705042);2016 年四川省大学生创新实验项目(201613705033)

[通信作者] 肖 莉,E-mail:18692990@qq.com

受到抑制。AKT 也可直接活化 IKKs,使之降解 I-κB,促进某些抗凋亡基因的转录。AKT 也可抑制 caspase-9,阻止凋亡级联反应的进行。②间接调节。AKT 磷酸化 forehead 家族转录因子,抑制 Fas-L、IGFBP-1 和 Bim 等凋亡相关基因转录[10]。此为 AKT 的直接与间接调节。并同时因为 AKT 活化的产物胰岛素等生长因子有促进细胞生长增殖,抑制细胞凋亡的作用,因此 HIRI 中肝细胞的凋亡减少,HIRI 减轻。

2 Notch 信号途径

Notch 基因最早发现于果蝇,缺失 Notch 基因的果蝇表现为翅膀缺刻(Notch)。1983 年,Notch 基因首次被成功克隆,并定义为 Notch 受体[11]。目前已经在果蝇、线虫、爪蟾属、斑马鱼、鸡、小鼠和人体中分离出 Notch 的同源体。在各物种之间,Notch 家族成员的结构具有极高的保守性,提示 Notch 在进化上高度保守。Notch 信号途径通过细胞间相互作用的方式调控着多种细胞的发育、增殖、分化和凋亡。在哺乳动物体内,经典 Notch 信号通路由5 种配体(Jagged1、2,Delta-like DII 1,3,4)和 4 种受体(Notch1-4)组成[12]。

Notch 信号通路受体蛋白分子量为 300 kD 左右,由 180 kD 胞外区和跨膜段以及 120 kD 的胞内区组成。胞外区与配体结合后,受体在 γ-分泌酶和 ADAM 家族酶的联合作用下,胞内区发生水解,释放出胞内区活性物质即胞内域(notch intracellular domain,NICD)[13];NICD 作为将细胞信号传导至细胞核的重要结构,在其近膜段存在一个 RBP-J 的结合域,NICD 与 RBP-J 结合,激活下游靶基因的转录,其下游靶基因是 Hes1 和 Hes5,可以让细胞增殖和再生[14]。最新的研究表明,Notch 信号通路可以促进干细胞的增殖分化[15],因此,当 HIRI 时,Notch 可以促进新的肝细胞再生,以补充肝细胞凋亡所减少的数量,减轻肝细胞的凋亡。同时,Notch 还能增强对自由基的清除。Notch 通过其下游靶基因 Hes5 协助 STAT5 激活调控 MnSOD 的表达。杨阳等[16]的研究发现,在 HIRI 中,阻断 Notch 信号导致下游分子 Hes5-STAT3 复合物形成障碍,导致其磷酸化水平下调,引起 MnSOD 减少,活性氧(ROS)增加,肝损伤增加。因此激活 Notch 基因能够激活其下游的 Hes5-STAT,STAT 能够促进 MnSOD 的产生,而肝缺血再灌注中,一个主要的损害就是自由基对组织的损害,MnSOD 清除了再灌注中产生的自由基,因此肝缺血损伤大大减轻。Notch 介导的肝损伤调节方式被称为“Notch-Hes5-STAT3-MnSOD”分子调控轴。

3 p38MAPK 信号通路

丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases,MAPK)是非常保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是一类接受受体传递的信号并将其带入细胞核内的重要信号分子,具有参与基因表达调控、细胞增殖和凋亡的重要机制。p38MAPK 是一种分子量为38 000 kD 的酪氨酸磷酸化蛋白,p38MAPK 信号通路是 MAPK 家族中重要的一员,由 360 个氨基酸残基组成,最早由 Wagner 等[17]研究脂多糖(hpolysaccharide,LPS)的刺激下的噬菌体中被发现。作用于应激、炎症、细胞存活、分化、凋亡等过程,被认为是细胞众多信号转导通路的中转站[18]。

p38MAPK 的激活是缺血低灌注损伤引起神经元凋亡的重要信号转导通路之一,p38MAPK 可通过调节 Bcl、Bax 和 caspase-3 的表达影响细胞凋亡[19]。目前已有 p38MAPK 特异性的抑制剂 SB202190 减轻脑缺血再灌注损伤的报道[20],在肝缺血再灌注损伤中也发挥着相似的作用。

p38MAPK 信号转导通路在细胞凋亡中发挥着重要作用。p38MAPK 可被磷酸化激活后调节基因转录、诱导一些特定基因的表达,引起细胞增殖、分化及各种细胞因子的合成,在这里面 p38MAPK 主要是诱导 Bcl-2、caspase-3 介导的凋亡通路,引起一系列的生物效应。

胞外的应激刺激细胞时,p38MAPK 会发生级联反应。p38MAPK 的级联反应包括 4 种激酶:PAK(MAPKKKK),MLK(MAPKKK)、MKK3/6/4(MAPKK)、p38MAPK(MAPK),共同构成了一个连续的蛋白激酶反应链[21]。p38MAPK 活化后通过上调某些转录因子基因(例如激活作用转录因子、生长停滞及 DNA 损伤基因、干扰素调节因子-3、NF-κB、热休克转录因子等)的表达和生物活性以及 caspase 家族成员(caspase-3、6、7)等的表达和生物活性,影响细胞的各种生理活动[22]。当转录因子被被活化后,磷酸化的转录因子与顺式作用元件结合,然后表达大量与凋亡有关的基因表达。诱生型 NO 合酶、选择素、肿瘤坏死因子、白介素、细胞因子 MAPK APK2、转录因子 ATF2、Erk1 等基因表达的产物将引起细胞增殖、分化、凋亡及细胞因子的合成。当 HIRI 时,这时应激反应在细胞发生,p38MAPK 被激活。HIRI 所带来的信号分子与细胞膜上的酪氨酸激酶、G 蛋白偶联受体等结合,并将刺激信号转导到细胞浆中,刺激信号作用于胞浆中的 p38MAPK,p38MAPK 被磷酸化激活后(p-p38MAPK),转移到细胞核中,并激活不同的转录因子而最终激活相应基因,产生生理效应。杨清高等[23]发现在肝纤维

化中,HSC 的寿命延长,其原因是 p38MAPK 的表达下调,使得 HSC 的凋亡减少。而在 HIRI 中,p38MAPK 的表达活跃,因此肝细胞凋亡严重。

4 Wnt/β-certain 蛋白通路

Wnt 信号通路是从果蝇和非洲爪蟾的遗传学试验中发现的,Wnt 这一名字来源于 2 个同源蛋白:果蝇中的 wingless(无翅)和小鼠中的 int(线),在生物进化中极为保守。Wnt 主要控制胚胎发育、细胞命运、组织器官形态,在成年动物中能致肿瘤发生生长,在胚胎中通过下游靶基因成纤维细胞生长因子和骨形态形成蛋白作用于肝发生[24]。

Wnt 信号通路转导途径主要有 3 条:①由 β-连环(β-certain)蛋白参与的经典途径;②通过 JNK(c-jun N-terminal kinase,c-jun 氨基末端激酶)介导的 Planer 细胞极性途径[25];③通过 Ca^{2+} 介导的 Wnt/Ca^{2+} 途径,在肝中,起作用的主要是 Wnt/β-certain 经典途径。其分子机制为:在没有 Wnt 信号时,胞浆内的 β-certain 蛋白大部分与细胞膜上的钙黏蛋白结合(E-cadhein)结合,少部分与轴蛋白(axin),腺瘤性结肠息肉基因蛋白(APC)、酪蛋白激酶(CK)形成巨大的复合物,CK1 对 β-certain 蛋白进行磷酸化,蛋白酶体降解磷酸化的 β-certain 蛋白,因此胞内游离 β-certain 蛋白水平极低。当 Wnt 信号传入时,Wnt 蛋白与卷曲蛋白-7(Frizeld-7,FZD-7)的胞外区结合,在辅助受体 LRP5/6 协同作用下,胞质中的散乱蛋白(dishevelled,Dvl)被募集至胞膜附近,Dvl 能够促进 GSK-3β 等物质磷酸化,使其从轴蛋白上脱落,打散了 β-连环蛋白降解复合体,使其不能被降解,大量游离的 β-连环蛋白在胞质中聚集,这种累积打破了细胞内原有的 β-连环蛋白出核和入核平衡,使得细胞核内的 β-连环蛋白大大增加。当 HIRI 时,肝细胞发生氧化应激,产生大量活性氧 ROS。这时,β-certain 直接与叉头蛋白转录因子(Forkhead box,FOXO)结合,增强 FOXO 的转录活性,调控细胞周期,激活 FOXO 垂直同源基因 DAF-16 下游靶基因 SOD3 表达,SOD 与 ROS 结合消灭 ROS,从而减轻氧应激对肝的损害[26]。除 SOD3 之外,β-certain 还能调控 CYP2e1、CYP1a2 和 S-谷胱甘肽转移酶这些调控氧应激反应的基因[27,31]。

5 展望

因为 HIRI 是细胞凋亡造成的,所以防治介导凋亡的信号通路可以减轻 HIRI。本文主要总结了 PTEN/PI3K、Notch、p38MAPK、Wnt/β-certain 等信号途径。在凋亡的过程中,这些通路也不是单一作用。例如 PTEN 是肿瘤抑制因子,c-myc 能够调控它的启动子,当 Hes1 联合 c-myc 调控 PTEN 的启动子时,PTEN 就可以去磷酸化,活化 PI3K-AKT 信号通路。Notch 通路常与 Wnt 通路交叉,在调节细胞增殖、生长、分化上起着协同作用。在 HIRI 中,有许多这样的分子机制,但是很多仍然不清楚。它们可以相互作用,相互影响,作用复杂,信号通路的具体机制及作用关系尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] Shewan AM,Awad A,Peng J,et al. Phosphoinositides as determinants of membrane identity,apicobasal polarity,and lumen formation,cell polarity 1[M]. Berlin:Springer International Publishing,2015: 221 - 244. doi:10.1007/978 - 3 - 319 - 14463 - 4_10.

[2] Piguet AC,Dufour JF. PI(3)K/PTEN/AKT pathway[J]. J Hepatol,2011,54(6):1317 - 1319. doi:10.1016/j.jhep.2010.12.013.

[3] 赵桂凤,张艳红. PTEN 和 C-erbB-2 蛋白在子宫内膜癌的表达及临床意义[J]. 中国优生与遗传杂志,2013(6):39 - 40.

[4] 孙晓菊,左海燕,谢 洪,等. 口腔鳞状细胞癌中 PTEN、MMP-7 和 VEGF 的表达及相关性研究[J]. 中国实用口腔科杂志,2013,6(3):174 - 176.

[5] 张 萌,彭 利,乔治斌,等. PTEN、Akt 和 pAkt 蛋白在肝细胞癌组织中的表达及其与预后的关系[J]. 世界华人消化杂志,2011,19(18):1904 - 1910.

[6] 齐建康,黄晓丽,蒙张敏,等. 结肠癌组织中 PTEN 蛋白表达与 PI3K/AKT 信号通路的关系[J]. 四川大学学报(医学版),2009,40(4):644 - 646. doi:10.3969/j.issn.1672 - 173X.2009.04.018.

[7] 郝礼森,张晓岚,周智宏,等. 胆汁淤积性肝纤维化大鼠肝组织中 PTEN 表达与肝星状细胞凋亡的关系研究[J]. 解放军医学杂志,2010,35(7):836 - 838.

[8] 白 丽,任 锋,郑素军,等. PTEN/PI3K 在小鼠肝缺血再灌注损伤中的调控作用及机制[J]. 世界华人消化杂志,2014,22(2):203 - 209.

[9] Sobani ZA,Ashwin S,Mikram J,et al. Oncogenic fingerprint of epidermal growth factor receptor pathway and emerging epidermal growth factor receptor blockade resistance in colorectal cancer[J]. World J Clin Onco,2016,7(5):340 - 351. doi:10.5306/wjco.v7.i5.340.

[10] Green BD,Jabbour AM,Sandow JJ,et al. Akt1 is the principal Akt isoform regulating apoptosis in limiting cytokine concentrations[J]. Cell Death Differ,2013,20(10):1341 - 1349. doi:10.1038/cdd.2013.63.

[11] 孙建平,李 锋,万国兴,等. Notch 信号通路及上皮间质转化与乳腺癌相关性研究进展[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(7):625 - 626. doi:10.11756/j.issn.1674 - 3474.2013.07.001.

[12] Grundeken MJ,Lesiak M,Asgedom S,et al. Clinical outcomes after final kissing balloon inflation compared with no final kissing balloon inflation in bifurcation lesions treated with a dedicated coronary bifurcation stent[J]. Heart,2014,100(6):479 - 486. doi:10.1136/heartjnl - 2013 - 304912.

[13] 董 丽,孔令蕊,王 恬. Notch 信号通路对免疫细胞的调节作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2013,29(12):1106 - 1112. doi:10.11844/cjcb.2014.05.0362.

[14] 王 珏,邓宇斌,万 勇. Notch 信号通路对神经干细胞增殖分化的作用[J]. 中国细胞生物学学报,2014,36(5):708 - 712.

[15] Samuelson,Linda C,VanDussen,et al. Notch signaling regulates proliferation and differentiation of the intestinal crypt base columnar(CBC) stem cell[J]. Development,2012,139(3):488 - 497. doi:10.1242/dev.070763.

doi:10.11659/jjssx.04E017073

·综述·

海藻糖低温保护血小板的研究进展

黄梅莓,赵树铭 (第三军医大学西南医院输血科,中国人民解放军重庆血站,重庆 400038)

Research development of platelets protection with trehalose at low temperature

HUANG Mei-mei,ZHAO Shu-ming (Blood Transfusion Department,Southwest Hospital,Third Military Medical University,Chongqing Blood Station of PLA,Chongqing 400038,China)

[摘 要] 细胞治疗已经成为临床广泛采用的治疗方法,其中输注血小板制剂是治疗各种原因导致的血小板减少、外科急创伤和手术大出血的重要手段。常规使用的22 ℃震荡保存法会使血小板制剂存在细菌繁殖和血小板活化的风险。为了提高血小板制剂储存质量,减少储存损伤的发生,人们尝试在低温条件下用海藻糖保存液保护血小板,取得了一定效果。本文就低温条件下海藻糖保护血小板的研究进展进行综述。

[关键词] 血小板;海藻糖;储存损伤;低温保存;血液安全

[中图分类号] R558+.2;R457.1 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-04-25

临床上多种血液系统疾病、外科急创伤和手术大出血患者都需要输注血小板制剂。虽然22~24 ℃震荡保存血小板制剂具有相当的可靠性和稳定性,但其存在细菌繁殖和血小板活化的风险。为了延长血小板制剂的体外保存时间,提高患者输注血小板的治疗效果,人们尝试使用不同的方法保存血小板制剂,其中低温保存是重要的研究方向。海藻糖被誉为"生命之糖",广泛应用于多种细胞、组织、器官及生物制品的保存。近年来有研究表明,海藻糖在低温条件下可起到保护血小板的作用,但保护机制尚不明确[1]。本文就低温条件下海藻糖保护血小板的研究进展综述如下。

[基金项目] 国家自然科学基金(81570167);西南医院院管课题(swh2014-sx01)

[通信作者] 赵树铭,E-mail:shumingzhao123@qq.com

[16] 杨 阳,金振晓,段维勋,等.缺血再灌注前后人心肌组织中Notch信号通路相关分子的变化[J].中国体外循环杂志,2010,8(4):236-238.doi:10.3969/j.issn.1672-1403.2010.04.013.

[17] Wagner SJ,Skripchenko A,Seetharaman S,et al.Amelioration of lesions associated with 24-hour suboptimal platelet storage at 16°C by a p38MAPK inhibitor,VX-702[J].Vox Sang,2015,108(3):226-232.doi:10.1111/vox.12221.

[18] 刘 霖,王智超,丁洪涛.p38MAPK信号途径抑制剂对缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞中MAPK通路的调控[J].临床心血管病杂志,2014,30(6):538-541.

[19] 邵晓轶,周 芸,路丽明,等.p38 MAPK信号通路在B7H1-Ig融合蛋白诱导Tr1细胞分化中的作用[J].上海交通大学学报(医学版),2012,32(11):1448-1454.doi:10.3969/j.issn.1674-8115.2012.11.012.

[20] 吴建龙,巨积辉,周广良,等.SB202190对皮瓣缺血再灌注损伤时TNF-α和IL-10影响的实验研究[J].中国临床解剖学杂志,2014,32(6):698-703.doi:10.13418/j.issn.1001-165x.2014.06.017.

[21] 陈砚芬,徐海帆.P38MAPK信号传导通路与卵巢癌关系的研究进展[J].现代生物医学进展,2012,12(4):780-783.

[22] 谭金锋.p38MAPK信号通路与肝缺血再灌注损伤的关系研究[J].胃肠病学和肝病学杂志,2014,23(1):104-106.doi:10.3969/j.issn.1006-5709.2014.01.030.

[23] 杨清高,刘绍能.P38MAPK信号通路与肝纤维化[J].世界华人消化杂志,2012,20(24):2231-2236.

[24] Bordonaro M,Lazarova DL.CREB-binding protein,p300,butyrate,and Wnt signaling in colorectal cancer[J].World J Gastroenterol,2015,21(27):8238-8248.doi:10.3748/wjg.v21.i27.8238.

[25] Bertrand M,Alsaid B,Benoit G,et al.Phosphorylation by p38MAPK and recruitment of SUG-1 are required for RA-induced RAR gamma degradation and transactivation[J].EMBO J,2002,21(14):3760-3769.doi:10.1093/emboj/cdf374.

[26] 李盛村,鲍 捷,王国祥.Wnt/β-连环蛋白信号通路在骨关节炎发生过程中的作用[J].中国组织工程研究,2012,16(13):2407-2410.doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.13.029.

[27] 苏金玲,姜希娟,郭茂娟,等.Wnt信号通路对酒精性肝纤维化中肝星状细胞活化的影响以及整合素连接激酶的调节作用[J].实用医学杂志,2013,29(5):718-720.

[28] Liu X,Luo G,Jiang J,et al.Signaling through hepatocyte vasopressin receptor 1 protects mouse liver from ischemia-reperfusion injury[J].Oncotarget,2016,7(43):69276-69290.doi:10.18632/oncotarget.12472.

[29] Essers MA,de VriesSmits LM,Barker N,et al.Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling[J].Science,2005,308(5725):1181-1184.doi:10.1126/science.1109083.

[30] 尹定子,宋海云.Wnt信号通路:调控机理和生物学意义[J].中国细胞生物学学报,2011,33(2):103-111.

[31] Lehwald N,Tao GZ,Jang KY,et al.Wnt-β-catenin signaling protects against hepatic ischemia and reperfusion injury in mice[J].Gastroenterology,2011,141(2):707-718.doi:10.1053/j.gastro.2011.04.051.

(编辑:周小林)