

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2014.12.019

· 综述 ·

## 细胞自噬与脓毒症

### Autophagy and sepsis

刘 奔 (LIU Ben) 综述, 潘频华 (PAN Pin-hua) 审校

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

(Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[关键词] 脓毒症; 自噬; 感染; 免疫; 细胞

[中图分类号] R631<sup>+</sup>.2 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2014)12-0764-03

自噬可分为 3 种类型: 微自噬 (microautophagy)、分子伴侣介导的自噬 (chaperone mediated autophagy, CMA) 和巨自噬 (macroautophagy)。巨自噬 (简称自噬 autophagy) 是一种基因调控的、高度保守的细胞降解过程, 也是一种重要的自我平衡的过程, 发生于所有真核细胞中<sup>[1-3]</sup>。在针对应激的过程中, 自噬常常扮演着细胞应答的角色<sup>[4]</sup>。而且, 自噬无论在先天免疫还是适应性免疫机制中均有着不可忽视的重要作用<sup>[2]</sup>。自噬与各种疾病的病理及生理过程广泛相关 (例如感染、肿瘤、神经退行性疾病、心血管及肺部疾病等), 近期的研究<sup>[5-6]</sup> 也表明, 自噬在脓毒症中发挥一定的保护作用。本文从细胞病理学和分子生物学角度就细胞自噬在脓毒症发生发展中的作用作一综述, 为寻找脓毒症治疗的新手段提供依据与线索。

#### 1 自噬的分子生物学机制

1.1 自噬的过程 细胞自噬过程可以分为诱导、形成、转运融合、降解 4 步<sup>[7]</sup>: 细胞接受自噬诱导信号后, 在胞浆中形成一个类似“脂质体”样的膜结构的自噬泡 (autophagic vacuole), 自噬泡类似于一个由两层脂双层组成半球型的“碗”。自噬泡不断延伸扩张, 将胞浆中细胞器等成分包裹并密封成为球状的自噬体 (autophagosome)。双层膜和内含线粒体、内质网碎片等胞浆成分是自噬体的两个明显特点。自噬体可与细胞内吞的吞噬泡、吞饮泡和内体融合。

然后自噬体与溶酶体融合形成自溶酶体 (autolysosome), 两者的内容物合为一体。自噬体中的运送物及自噬体内膜会被降解生成氨基酸、脂肪酸、核苷酸等营养物质, 被细胞在胞浆中回收利用; 自噬体外膜也会脱落再循环利用, 残渣则被滞留在胞浆中或被排出细胞外。电镜下观察到自噬泡或自噬体是判断自噬发生的主要直接依据。

1.2 自噬的分子机制 自噬过程由一系列复杂的信号分子调控。自噬泡的形成是自噬诱导的第一步, 这个过程可以被自噬相关基因 (autophagy-related gene, Atg) 蛋白所调控, 这些蛋白在进化过程中是高度保守的。饥饿可以有效地诱导自噬, 启动阶段的关键分子是 TOR/mTOR 激酶, 此蛋白激酶起着营养感受器和调节细胞生长、代谢的作用, 控制细胞的自噬活性。在自噬泡形成的早期, III 型磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3-k) 及其产物 3-磷酸磷脂酰肌醇 (PI3p) 起着至关重要的作用<sup>[8]</sup>。Beclin1 (Atg6) 是磷脂酰肌醇-3-激酶复合物的一部分, 通过调节其他自噬相关蛋白在双层膜上的定位而在自噬体形成的初期发挥重要的作用<sup>[9]</sup>。

Atg5-Atg12/LC3-PE (microtubule-associated protein light chain 3, LC3; 磷脂酰乙醇胺, phosphatidylethanolamine, PE) 共价结合系统是自噬体形成的重要条件。Atg12 和 Atg5 通过一个泛素蛋白化的过程共价结合。首先具有泛素样激酶 E1 活性的 Atg7 激活 Atg12, 然后 Atg12 与具有激酶 E2 活性的 Atg10 结合, Atg12 再与 Atg5 结合, 随之 Atg10 释放。最后

[收稿日期] 2014-06-20

[基金项目] 国家自然科学基金 (81470266)

[作者简介] 刘奔 (1987-), 男 (汉族), 湖北省孝感市人, 硕士研究生, 主要从事呼吸与危重症医学研究。

[通信作者] 潘频华 E-mail: pinhuapan668@hotmail.com

Atg12-Atg5 复合物与 Atg16 以非共价键的形式结合形成 Atg12-Atg5-Atg16 复合物,该复合物再加上 LC3-PE 共同启动双层膜的伸展扩张。LC3 可以被半胱氨酸蛋白酶 Atg4 裂解成具有 C-末端甘氨酸残基的具有胞浆可溶性的 LC3I。被处理过的 LC3 像 Atg12 一样,被 Atg7 激活,然后递呈给 E2 样酶 Atg3,后者催化 LC3 I 与 PE 共价结合,然后插入分隔膜,形成 LC3 II。LC3-PE 在双层膜上的定位取决于 Atg12-Atg5 复合物。随着成熟自噬体的形成,Atg12-Atg5-Atg16 复合物分离,同时 LC3-PE 定位于自噬体的外膜上<sup>[9]</sup>。自噬体-溶酶体融合障碍时,可能会导致自噬体数目的增加<sup>[1]</sup>。

## 2 自噬与感染及免疫

研究<sup>[10]</sup>表明,在自噬参与的细胞降解过程中,细胞外病原体被吞噬隔离在一个双层膜的囊泡状自噬体中,自噬体与溶酶体融合并最终降解这些外来的病原体,这些病原体包括病毒、细菌和寄生虫。不仅如此,自噬体也降解细胞内病毒和细菌<sup>[11-12]</sup>。自噬作为宿主防御体系的组成部分,其相关基因在体内通过抵抗这些病原体的入侵而发挥保护宿主的作用。在自噬体包裹病原体和随后自噬性溶酶体依赖的病原体降解和细胞因子反应的调节过程中,自噬均发挥着重要作用<sup>[2, 10, 13-14]</sup>。

除了这些作用,研究<sup>[2, 15]</sup>还表明,自噬对先天性免疫应答和适应性的抗原呈递免疫均有调控作用。在适应性免疫应答中,自噬参与抗原呈递、淋巴细胞发育和免疫细胞因子的分泌<sup>[15]</sup>。有文献<sup>[16-17]</sup>报道,ATG12 和 ATG5 的敲除可抑制 MHC II 类抗原向 CD4+T 细胞的呈递。在抗结核的过程中,作为自噬体的靶点,流感病毒基质蛋白(MP1)可以增强抗 MP1 CD4+T 细胞反应,从而增强 CD4+T 细胞介导的保护作用。近期的研究<sup>[18]</sup>也证实了自噬在体内对结核有保护作用,其可减少组织坏死和肺的病理改变。

## 3 自噬与脓毒症

脓毒症(sepsis)是病原体感染导致的炎症反应综合征。严重脓毒症(severe sepsis)的确定依赖于急性器官功能障碍被定义,无论器官功能障碍是否归因于潜在的感染。感染性休克(septic shock)指的是即使给予足量的液体复苏后仍不可避免脓毒症诱发的低血压。严重脓毒症和感染性休克是医学上

最古老和最紧迫的问题之一,仍然是重症监护病房患者主要的死亡原因之一,而且发病率呈现出逐年上升的趋势<sup>[19]</sup>。近期研究<sup>[20-23]</sup>发现,在脓毒症的病理生理过程中可以观察到显著的自噬水平的变化,自噬在脓毒症的发生发展中扮演着重要的角色。

在脓毒症引起的损伤中,线粒体功能障碍发生较早<sup>[24]</sup>。由于线粒体是重要的能量代谢中心,为组织和细胞的正常代谢提供能量和 ATP,而自噬通常作为细胞应答被诱导,故研究脓毒症细胞线粒体的功能变化与自噬的关系很有意义。研究<sup>[25]</sup>表明,在脓毒症小鼠的骨骼肌中,自噬和线粒体功能障碍均增加。

因为脓毒症中存在全身炎症反应和细胞死亡,而自噬是细胞对应激的应答,所以不难解释在脓毒症动物模型和脓毒症患者中均观察到自噬体和自噬相关基因产物的增加。在脓毒症导致死亡患者的肝脏中可以观察到自噬体的积累<sup>[22]</sup>。而自噬形成和相关基因的表达在脓毒症小鼠的呼吸肌肉和运动肌肉中均增加,且在运动肌肉中的增加更为明显,NFκB 在自噬改变中起到重要作用<sup>[25]</sup>。在脓毒症小鼠中,抑制自噬会增强炎症细胞因子水平和增加死亡率,可能是由于未能清除损坏或不正常的线粒体,从而激活 NLRP3 炎症复合体<sup>[26]</sup>。同样的,在 ATG7 抑制的小鼠肠上皮细胞中,LPS 诱导高水平的 IL-1β mRNA<sup>[27]</sup>,而在 LPS 注射或盲肠结扎和穿刺引起的脓毒症小鼠中,LC3B<sup>-/-</sup>小鼠产生更多的 IL-1β 和 IL-18<sup>[26]</sup>。相反,在腹腔注射 LPS 引起脓毒症的小鼠中,雷帕霉素诱导的自噬抑制 IL-1β 和 IL-23 在小鼠的血清释放;在盲肠结扎穿刺引起的脓毒症小鼠中,雷帕霉素诱导的自噬可帮助小鼠抵抗金黄色葡萄球菌肠毒素引起的感染性休克<sup>[28]</sup>和心脏功能障碍<sup>[29]</sup>。氯喹抑制自噬后可导致死亡率显著增加<sup>[30]</sup>。另外,虽然 Lo 等<sup>[31]</sup>的研究发现自噬相关蛋白 LC3 的过度表达可以通过增加自噬体间隙而提高脓毒症小鼠的生存率并减轻肺损伤,但 Lee 等<sup>[32]</sup>的研究发现,一氧化碳可以通过依赖于自噬相关蛋白 Beclin1 的途径增强自噬,从而起到对盲肠结扎和穿刺引起的脓毒症小鼠的保护作用,而这并不依赖于自噬相关蛋白 LC3B。总之,自噬在脓毒症中是一种有效的保护作用,而具体机制尚不十分明确。

显而易见的是,自噬具有多样化的功能,并且能够以多种方式改善疾病中细胞的行为。脓毒症的发病机制是危重病医学的一个主要问题,自噬与脓毒症的研究成果可能有助于理解这个问题。诱导自噬有利于脓毒症细胞的修复和生存,对脓毒症的改善和治疗有

重要作用。动物模型证据<sup>[28-29,31]</sup>表明,广义的诱导自噬可能有利于治疗脓毒症,但诱导自噬的影响并没有被充分地用于脓毒症的治疗试验。因此,通过合理地诱导自噬的水平来增强其脓毒症细胞的存活和改善脓毒症预后,可能成为治疗脓毒症的有效手段。

#### [参 考 文 献]

- [1] Ravikumar B, Sarkar S, Davies J E, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(4): 1383 - 1435.
- [2] Levine B, Mizushima N, Virgin H W. Autophagy in immunity and inflammation[J]. *Nature*, 2011, 469(7330): 323 - 335.
- [3] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 27 - 42.
- [4] Nakahira K, Cloonan S M, Mizushima K, et al. Autophagy: a crucial moderator of redox balance, inflammation, and apoptosis in lung disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 474 - 494.
- [5] Mizushima N, Levine B, Cuervo A M, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion [J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069 - 1075.
- [6] Ryter S W, Mizushima K, Choi A M. The impact of autophagy on cell death modalities[J]. *Int J Cell Biol*, 2014, 2014(502676): 1 - 12.
- [7] Choi A M, Ryter S W, Levine B. Autophagy in human health and disease[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(7): 651 - 662.
- [8] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(2): 132 - 141.
- [9] He C, Levine B. The Beclin 1 interactome[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 140 - 149.
- [10] Jones S A, Mills K H, Harris J. Autophagy and inflammatory diseases[J]. *Immunol Cell Biol*, 2013, 91(3): 250 - 258.
- [11] Moy R H, Gold B, Molleston J M, et al. Antiviral autophagy restricts Rift Valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals[J]. *Immunity*, 2014, 40(1): 51 - 65.
- [12] Watson R O, Manzanillo P S, Cox J S. Extracellular *M. tuberculosis* DNA targets bacteria for autophagy by activating the host DNA-sensing pathway[J]. *Cell*, 2012, 150(4): 803 - 815.
- [13] Luciani A, Vilella V R, Esposito S, et al. Cystic fibrosis: a disorder with defective autophagy[J]. *Autophagy*, 2011, 7(1): 104 - 106.
- [14] Choi A J, Ryter S W. Autophagy in inflammatory diseases[J]. *Int J Cell Biol*, 2011(732798): 1 - 11.
- [15] Sumpter R J, Levine B. Autophagy and innate immunity: triggering, targeting and tuning[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(7): 699 - 711.
- [16] Paludan C, Schmid D, Landthaler M, et al. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy[J]. *Science*, 2005, 307(5709): 593 - 596.
- [17] Lee H K, Mattei L M, Steinberg B E, et al. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells[J]. *Immunity*, 2010, 32(2): 227 - 239.
- [18] Castillo E F, Dekonenko A, Arko-Mensah J, et al. Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(46): E3168 - E3176.
- [19] Angus D C, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(21): 2063.
- [20] Tang Z, Ni L, Javidiparsijani S, et al. Enhanced liver autophagic activity improves survival of septic mice lacking surfactant proteins A and D[J]. *Tohoku J Exp Med*, 2013, 231(2): 127 - 138.
- [21] Yen Y T, Yang H R, Lo H C, et al. Enhancing autophagy with activated protein C and rapamycin protects against sepsis-induced acute lung injury[J]. *Surgery*, 2013, 153(5): 689 - 698.
- [22] Watanabe E, Muenzer J T, Hawkins W G, et al. Sepsis induces extensive autophagic vacuolization in hepatocytes: a clinical and laboratory-based study[J]. *Lab Invest*, 2009, 89(5): 549 - 561.
- [23] Figueiredo N, Chora A, Raquel H, et al. Anthracyclines induce DNA damage response-mediated protection against severe sepsis [J]. *Immunity*, 2013, 39(5): 874 - 884.
- [24] Singer M. Cellular dysfunction in sepsis[J]. *Clin Chest Med*, 2008, 29(4): 655 - 660.
- [25] Mofarrah M, Sigala I, Guo Y, et al. Autophagy and skeletal muscles in sepsis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e47265.
- [26] Nakahira K, Haspel J A, Rathinam V A, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome[J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(3): 222 - 230.
- [27] Fujishima Y, Nishiumi S, Masuda A, et al. Autophagy in the intestinal epithelium reduces endotoxin-induced inflammatory responses by inhibiting NF-kappaB activation [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2011, 506(2): 223 - 235.
- [28] Krakauer T, Buckley M, Issa H J, et al. Rapamycin protects mice from staphylococcal enterotoxin B-induced toxic shock and blocks cytokine release in vitro and in vivo[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(3): 1125 - 1131.
- [29] Hsieh C H, Pai P Y, Hsueh H W, et al. Complete induction of autophagy is essential for cardioprotection in sepsis[J]. *Ann Surg*, 2011, 253(6): 1190 - 1200.
- [30] Takahashi W, Watanabe E, Fujimura L, et al. Kinetics and protective role of autophagy in a mouse cecal ligation and puncture-induced sepsis[J]. *Crit Care*, 2013, 17(4): R160.
- [31] Lo S, Yuan S S, Hsu C, et al. Le3 over-expression improves survival and attenuates lung injury through increasing autophagosomal clearance in septic mice[J]. *Ann Surg*, 2013, 257(2): 352 - 363.
- [32] Lee S, Lee S J, Coronata A A, et al. Carbon monoxide confers protection in sepsis by enhancing beclin 1-dependent autophagy and phagocytosis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(3): 432 - 442.