

DOI: 10.20135/j.issn.1006-8147.2024.04.0377

综述

调节性细胞死亡方式参与阻塞性黄疸引起肝细胞损伤的机制研究

缪道玉^{1,3}, 于方海² 综述, 张西波³ 审校

(1.天津医科大学研究生院,天津 300070;2.天津中医药大学附属第二医院普通外科,天津 300151;3.天津市中西医结合医院肝胆胰外科二,天津 300100)

摘要 阻塞性黄疸(OJ)是机械性因素致胆道阻塞、胆汁淤积引起黄疸。其可诱导肝细胞损伤。调节性细胞死亡(RCD)是一种受一系列信号调控的细胞死亡,对维持正常生理活动至关重要。RCD在OJ致肝细胞损伤的病理生理及病情转归方面具有重要作用。近年来,许多学者发现一些药物治疗OJ引起的肝细胞损伤涉及铁死亡、自噬、焦亡等部分RCD通路。因此,了解OJ引起的肝细胞损伤所涉及的RCD机制,对制定有效的干预策略以减轻肝脏受损并改善患者预后具有现实意义。

关键词 阻塞性黄疸;肝细胞;调节性细胞死亡;铁死亡;焦亡;自噬

中图分类号 R657.4+3

文献标志码 A

文章编号 1006-8147(2024)04-0377-04

阻塞性黄疸(OJ)是肝胆系统常见疾病,是由某些因素致肝内、外胆管阻塞,使胆汁排泄障碍并反流入血所致。其典型表现为皮肤巩膜黄染、浓茶样尿及白陶土样便等。患者常出现全身多系统损伤,包括但不限于肝功能障碍、肾功能衰竭、心血管抑制及免疫受损等^[1]。早先有研究表明,胆道梗阻时管内压增加,肝脏血流动力学改变,肝细胞缺血、缺氧并且功能受损^[2]。由于肝细胞具有再生能力,这种损伤在早期是可逆的,但随着淤积时间延长,大量肝细胞死亡,最终可导致肝功能损伤、肝纤维化。研究人员观察OJ相关肝细胞损伤的形态学发现:肝细胞胞质中出现大小不等的高电子密度物质,线粒体与内质网形态改变,DNA断裂增加和肝细胞凋亡^[3-4]。细胞死亡根据功能差异可分为意外细胞死亡和调节性细胞死亡(RCD),后者根据参与启动、执行和转导信号分子的不同,分为细胞凋亡、焦亡、铁死亡、自噬等^[5]。近年来,越来越多的学者认识到RCD在OJ相关肝细胞损伤中具有重要作用。RCD受基因调控,当外部环境压力过大时,会激活多种细胞死亡信号通路,从而清除一些受到严重损伤或对细胞群不利的细胞。

当OJ患者出现肝损伤时,血清炎症因子水平升高。对胆管结扎小鼠的检验结果显示:白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子(TNF)- α 等促炎因子释放增加^[6]。炎症在肝损伤过程中充当重要角色。一方面,胆汁淤积使胆汁酸不断累积,当其超过生理浓度范

围时,可作为炎症刺激,诱导部分细胞释放炎症介质,激活相关信号通路,导致肝细胞损伤。另一方面,胆管阻塞使胆汁无法进入肠道,缺乏营养的肠道黏膜通透性增加,细菌移位引起内毒素血症。同时,十二指肠内的大量革兰阴性菌逆行入胆管,经过体循环和肝周淋巴管进入血液,加重内毒素血症。脂多糖(LPS)可引起肝脏微循环障碍、刺激肝非实质细胞释放炎症因子,进而损伤肝脏。因此,胆汁酸、LPS以炎症为媒介,释放趋化因子和细胞因子等介质诱导肝细胞的损伤。本文介绍了外源性细胞凋亡、内源性细胞凋亡、铁死亡、焦亡及自噬几种类型RCD参与OJ致肝细胞损伤的研究现状。

1 外源性细胞凋亡

OJ发生时,蓄积的胆汁酸可通过死亡受体途径诱导肝细胞凋亡。死亡受体途径也称为外源性途径,主要依赖死亡诱导信号复合物:FADD caspase-8。研究发现,OJ小鼠肝脏TNF- α 浓度升高^[7]。TNF- α 相关死亡配体——Fas通过细胞跨膜信号传递,募集caspase-8导致链式反应,最终激活caspase-3、7,启动细胞凋亡。临床上使用熊去氧胆酸就是通过转变胆汁酸的毒性和改变胆汁的主要成分,达到保护肝细胞的作用。OJ相关的内毒素血症也可加重细胞凋亡。Wu等^[8]研究提示,LPS通过Fas介导的死亡受体途径诱导肝细胞凋亡,并且DNA断裂主要发生在细胞凋亡晚期。

2 内源性细胞凋亡

内源性细胞凋亡与DNA断裂、活性氧簇(ROS)超载、有丝分裂障碍等因素有关。内源性细胞凋亡的关键是Bcl-2家族蛋白和线粒体外膜通透性改变

基金项目 天津市中医药重点领域科研项目(2024017)

作者简介 缪道玉(1998-),女,硕士在读,研究方向:普通外科专业;

通信作者:张西波,E-mail:nkzxb@163.com。

(MOMP)。Bcl-2 具有抗凋亡效应,通过结合 Bax 或 Bak 的 BH3 区域阻止 MOMP,从而抑制细胞凋亡。肖黄满等^[9]研究发现,OJ 大鼠肝细胞中 Bcl-2 表达降低,肝细胞内源性凋亡增多。此外,Bcl-2 家族参与调节内质网稳态及线粒体氧化还原^[5]。Bcl-2 调控内质网 Ca²⁺释放,维持细胞正常生理活动。胆红素大量蓄积可抑制肝细胞线粒体功能复合体活性,使肝细胞能量代谢失调,导致内质网上 Ca²⁺泵受抑制,造成钙超载,其可通过以下途径介导细胞凋亡:(1)破坏细胞抗氧化的能力,生成大量 ROS 损伤 DNA,干扰细胞分裂。(2)破坏电子传递链,干扰氧化磷酸化,使 ATP 生成减少。甲基化调控 J 蛋白(MCJ)位于线粒体内膜,具有抑制线粒体功能复合体的作用。Iruzubieta 等^[10]发现,MJC-KO 的胆汁淤积型小鼠肝脏炎症减轻,细胞凋亡减少,提示 MCJ 可能作为该方面的潜在治疗位点。内源性凋亡和外源性凋亡之间互相关联。MOMP 促使细胞色素 C 进入胞质,经过胞内信号转导诱导胱天蛋白募集域蛋白(CARD)与 caspase-9 结合,激活细胞凋亡。胆汁淤积小鼠的 Bcl-2 表达降低,Caspase-3、9 显著升高,而甘草酸有助于保护肝细胞^[11]。

内质网应激可引起内源性凋亡^[5]。当胆汁淤积使肝细胞处于缺氧、钙稳态丧失等不利环境时,内质网中蛋白质折叠效率下降,错误折叠的蛋白质在内质网中堆积即内质网应激。内质网应激的关键分子为 CHOP。CHOP 过度表达引起 Bcl-2/Bax 比例失调,启动线粒体凋亡通路^[12]。Wu 等^[13]研究发现,OJ 可以通过激活 PERK-CHOP-GADD34 通路和调控 Bax/Bcl-2 比值来诱导肝细胞凋亡。为了维护内质网稳态,细胞通过未折叠蛋白反应(UPR)诱导翻译和转录。目前认为有 3 种经典的 UPR 通路:核酸内切酶(IRE1 α -XBP1 通路)、双链 RNA 依赖的蛋白激酶样 ER 激酶(PERK-eIF2)通路和激活转录因子 6(ATF6)通路^[13]。3 条 UPR 通路彼此协作以恢复内质网稳态,若大量未折叠或错误修饰蛋白质在内质网中堆积,则造成持续性内质网应激,促使细胞凋亡。Kriegermeier 等^[14]研究发现,胆汁淤积可抑制 IRE1 α /XBP1 信号通路,从而活化内质网应激,导致肝细胞凋亡。有研究表明,OJ 小鼠肝细胞中 ATF6 及 GRP78 表达明显增加,过度激活内质网应激,诱导肝细胞凋亡^[15]。

中药被广泛用于治疗 OJ 引起的肝损伤,其中的药理学机制引起国内学者的关注,但未完全明确。茵陈蒿汤治疗 OJ 相关肝损伤的机制与 CHOP 和 Bcl-2 有关,具体调控位点不明。此外,研究发现

姜黄素可能对脂多糖/D-氨基半乳糖诱导肝损伤途径中的内质网应激起抑制作用^[16]。

3 铁死亡

铁死亡与细胞内铁离子超载和脂质过氧化物水平有关,ROS 在其中扮演重要角色。OJ 时,LPS 刺激肝细胞、中性粒细胞释放大量 ROS,并抑制机体抗氧化酶的活性。当细胞氧化状态紊乱时,大量脂质过氧化物驱动铁死亡。一方面脂质过氧化破坏细胞膜磷脂结构,导致肝细胞膜、线粒体膜损伤;另一方面,脂质过氧化物分解的副产物对细胞具有毒性作用^[17]。丙二醛可作为脂质过氧化的指标。Stupin 等^[18]研究发现,良、恶性 OJ 患者均存在丙二醛升高和肝损伤,提示铁死亡可能在 OJ 致肝细胞损伤中发挥作用。铁死亡的特征之一是多不饱和脂肪酸(PUFA)的膜磷脂氧化,而肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)具有保护细胞膜完整性的作用,其与 PUFA 相互作用,从而抑制 ROS 对膜磷脂的氧化反应^[19]。随着胆道梗阻时间的延长,大鼠血清中 L-FABP 减少,细胞发生铁死亡,导致肝损伤加重^[20]。此外,细胞内铁超载引起 ROS 升高,从而诱导铁死亡。OJ 患者血清转铁蛋白水平降低,肝细胞中铁平衡被破坏,生成过量亚铁^[21]。超载的亚铁通过芬顿反应生成 ROS,后者引发氧化应激进而损伤肝细胞^[19]。

4 焦亡

OJ 患者发生内毒素血症时,革兰阴性菌的 LPS 触发巨噬细胞膜上的 Caspase-11,引起肝细胞焦亡。焦亡与凋亡的共同之处是两者均与半胱天冬酶有关,但前者主要由炎症性 Caspase 诱导,包括 Caspase-11、4、5 等^[5]。因此,细胞焦亡与炎症关系紧密,后者通过 GSDMD 蛋白诱导细胞膜形成膜孔,释放细胞内炎症因子,从而启动细胞焦亡。焦亡主要分为两种机制:经典途径和非经典途径。经典途径与 Caspase-1-GSDMD 通路相关。Liao 等^[22]研究结果证实,胆汁淤积激活核因子(NF)- κ B/Caspase-1/GSDMD 信号通路,启动肝细胞焦亡。此外,在经典途径中,Caspase-1 对 IL-1 β 和 IL-18 进行蛋白修饰后,促使两者释放到细胞外,引发炎症的进一步进展。Tong 等^[23]研究发现,热休克蛋白 90 抑制剂通过降低 IL-1 β 和 IL-18 表达,预防胆汁淤积对肝脏造成的损伤。非经典途径与 Caspase-4、5、11 有关。LPS 结合并激活 Caspase-4、5、11,进而裂解 GSDMD 蛋白触发焦亡。一方面,活化的 Caspase 介导 GSDMD,促进细胞焦亡;另一方面,其激活 NLRP3-Caspase-1 通路,启动焦亡。NLRP3 小体作为重要的调控分子,抑制其表达可成为治疗肝细胞损伤的手段。大柴胡

汤加碱可抑制 NF- κ B 通路并降低 NLRP3 小体含量,调节肝细胞焦亡^[24]。细胞焦亡也可联合其他机制共同参与 OJ 的肝细胞损伤。Han 等^[25]研究发现,应激诱导蛋白 Sestrin2、NLRP3 炎性小体、内质网应激、自噬与肝细胞焦亡之间存在联系。胆汁蓄积可诱导 Sestrin2 表达,后者增强自噬调节蛋白质稳态,从而抑制内质网应激,而缺乏 Sestrin2 的模型小鼠 NLRP3 表达显著增加,并介导肝细胞焦亡。Sestrin2 作为细胞应激诱导蛋白,具有保护效应,它可调节内质网应激和细胞焦亡等 RCD 类型,可能成为治疗靶点之一。

细胞焦亡与机体免疫相关,适度的细胞焦亡将激活机体的免疫系统,有效抗击细菌感染。过度的细胞焦亡加重炎症,进而诱导细胞损伤。如何利用好这把“双刃剑”是一个值得思考的问题。

5 自噬

OJ 发生时,小胆管增生、肝细胞肿胀及内毒素血症等引起肝脏微循环障碍,使肝细胞处于缺血、缺氧的条件,从而激活自身自噬。自噬中的功能体为自噬溶酶体,它通过降解运载的“货物”来完成细胞内物质与能量循环和利用,有助于维持细胞稳态。目前发现自噬参与不同肝脏疾病的发生、发展。Zhang 等^[26]研究发现,胆道引流可诱导细胞自噬,进而减少氧化应激、炎症因子释放,减轻 OJ 小鼠的脏器功能损伤。Zhao 等^[27]研究同样证实了自噬对肝细胞的保护效应。自噬可分为囊泡核形成、囊泡延伸、自噬溶酶体形成及内容物的降解几个阶段。Rab 蛋白对囊泡运输至关重要,从囊泡形成至囊泡融合全阶段均发挥不同作用。其中,Rab7 蛋白调节自噬溶酶体的形成与成熟。研究发现,胆汁酸可介导 Rab7 蛋白减少,使肝细胞自噬受损,导致肝细胞损伤^[28]。因此,胆汁酸淤积抑制自噬溶酶体形成。胆固醇 7 α -羟化酶可催化胆固醇转化为胆汁酸,后者激活核受体法尼醇 X 受体和肠道成纤维细胞生长因子 15、19,两者均可抑制自噬相关转录基因^[29]。因此,抑制自噬基因表达会进一步加重 OJ 相关肝细胞损伤。

总的来说,自噬在维护肝脏代谢稳态和正常功能方面发挥重要作用。但自噬在肝脏疾病发生、发展不同阶段存在动态变化。在肝脏疾病早期,自噬清除异常细胞发挥正向效应。例如激活维生素 D 受体可促进巨噬细胞的自噬,从而降低胆汁淤积性肝损伤^[30]。随着疾病进展,过度激活的自噬会导致肝脏受损,然而其具体机制仍亟待研究。把握自噬在 OJ 不同阶段的作用,有助于在治疗上有的放矢。

6 坏死性凋亡

在 OJ 中,坏死性凋亡对肝细胞损伤也具有影响。当存在 Caspase 抑制剂时,细胞凋亡不能正常启动,坏死性凋亡作为细胞凋亡的备选方案。坏死性凋亡的生物标志物主要为 TNF- α 、受体相互作用蛋白激酶 3(RIPK3)、混合谱系激酶结构域(MLKL)。TNF- α 是坏死性凋亡的关键上游信号元件。Kwak 等^[31]实验证实:胆管结扎造成 OJ,从而使小鼠肝脏中坏死相关因子、炎症相关因子、磷酸化 JNK 明显上调,三者之间存在显著联系。研究结果提示,坏死性凋亡可能参与 OJ 相关的肝细胞损伤。RIPK3 参与坏死性的凋亡的调控,无活性的 Caspase-8 将信号转至 RIPK3,随后激活 MLKL,破坏细胞膜。甲基化修饰 RIPK3 的启动子区域使其沉默,能够有效抑制胆汁淤积引起的肝细胞坏死性凋亡^[32]。IL-32 作为一类促炎因子,与 NF- κ B、TNF- α 等息息相关。Mao 等^[33]研究发现,坏死性凋亡的生物标志物 RIPK3、MLKL 在胆汁淤积的模型小鼠肝组织中表达增加,而在高表达 IL-32 基因的小鼠中明显降低,提示 IL-32 可作为潜在治疗靶点。

7 小结

OJ 可通过多种途径相互联系、相互协调致肝细胞损伤。在疾病发生早期及时干预、引流解除梗阻,可减少甚至预防肝细胞损伤,降低对肝功能的影响。通过胆囊胆管穿刺、胆道支架植入及内镜下取石等形式可快速、有效地达到减轻黄疸的目的,但 OJ 相关的继发性肝损伤往往不易在短期内得到恢复。越来越多的研究发现,不同类型的 RCD 之间存在交通,对关键的信号分子进行调控不仅可以抑制单一 RCD 模式,而且可能影响到其他信号通路。然而,铜死亡、内吞细胞死亡等 RCD 在 OJ 中的机制尚不明确,有待进一步探索。

参考文献:

- [1] PAVLIDIS E T, PAVLIDIS T E. Pathophysiological consequences of obstructive jaundice and perioperative management[J]. *Hepatobiliary Pancreatic Dis Int*, 2018, 17(1): 17-21.
- [2] 王长友,陈永平. 梗阻性黄疸肝细胞损伤机制[J]. *中国综合临床*, 2004(8):93-95.
- [3] GHANBARINEJAD V, JAMSHIDZADEH A, KHALVATI B, et al. Apoptosis-inducing factor plays a role in the pathogenesis of hepatic and renal injury during cholestasis[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2021, 394(6): 1191-1203.
- [4] 张慧芳,刘琳,张煦. 阻塞性黄疸患者肝脏组织形态学观察及其损伤机制[J]. *兰州大学学报(医学版)*, 2010, 36(3):13-16.
- [5] GALLUZZI L, VITALE I, AARONSON S A, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018[J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(3): 486-541.

- [6] XIE Y Y, GUO C Y, LIU Y, et al. Dexmedetomidine activates the PI3K/Akt pathway to inhibit hepatocyte apoptosis in rats with obstructive jaundice[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(6): 4461–4466.
- [7] HU Z H, KONG Y Y, REN J J, et al. Kidney and lung tissue modifications after BDL-induced liver injury in mice are associated with increased expression of IGFBP1 and activation of the NF- κ B inflammation pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(2): 192–202.
- [8] WU Y H, HU S Q, LIU J, et al. Nature and mechanisms of hepatocyte apoptosis induced by D-galactosamine/lipopolysaccharide challenge in mice[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 33(6): 1498–1506.
- [9] 肖黄满, 尚海涛, 张静宇, 等. 加味大柴胡汤对梗阻性黄疸大鼠肝损伤及 JNK、Bcl-2 表达的影响[J]. *天津医药*, 2020, 48(9): 834–838.
- [10] IRUZUBIETA P, GOIKOETXEA U N, BARBIER T L, et al. Boosting mitochondrial activity by silencing MCJ overcomes cholestasis-induced liver injury[J]. *JHEP Rep*, 2021, 3(3): 100276.
- [11] YAN M, GUO L, YANG Y, et al. Glycyrrhetic acid protects α -naphthylisothiocyanate-induced cholestasis through regulating transporters, inflammation and apoptosis[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 701240.
- [12] 蒋红, 李继昌, 王宏军. 细胞凋亡的信号通路和检测方法[J]. *中国饲料*, 2012(13): 20–25.
- [13] WU Y L, LI Z L, ZHANG X B, et al. Yinchenhao decoction attenuates obstructive jaundice-induced liver injury and hepatocyte apoptosis by suppressing protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase-induced pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(41): 6205–6221.
- [14] KRIEGERMEIER A, HYON A, LECUYER B, et al. Inositol-requiring enzyme 1 α /X-box protein 1 pathway expression is impaired in pediatric cholestatic liver disease explants[J]. *PLoS One*, 2022, 17(12): e0279016.
- [15] 孙一萌, 刘浩, 刘军舰, 等. 茵陈蒿汤对阻塞性黄疸大鼠肝细胞 ATF6/GRP78/CHOP 凋亡信号通路的影响[J]. *天津医科大学学报*, 2023, 29(3): 252–257.
- [16] 谢一激, 褚金国, 杨乃彬, 等. 姜黄素对脂多糖/D-氨基半乳糖诱导大鼠急性肝损伤中内质网应激的影响[J]. *浙江医学*, 2020, 42(13): 1359–1363, 1460.
- [17] YAN H F, ZOU T, TUO Q Z, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 49.
- [18] STUPIN V, ABRAMOV I, GAHRAMANOV T, et al. Comparative study of the results of operations in patients with tumor and non-tumor obstructive jaundice who received and did not receive antioxidant therapy for the correction of endotoxemia, glycolysis, and oxidative stress[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11(6): 1203.
- [19] ROCHETTE L, DOGON G, RIGAL E, et al. Lipid peroxidation and iron metabolism: two corner stones in the homeostasis control of ferroptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 24(1): 449.
- [20] 李福堂, 王惠群, 杨大刚, 等. 梗阻性黄疸大鼠脂质代谢及肝型脂肪酸结合蛋白的变化[J]. *贵州医科大学学报*, 2021, 46(3): 310–315.
- [21] 方驰华, 郑晓辉, 景丽华, 等. 梗阻性黄疸外周血和门静脉血转铁蛋白和铜蓝蛋白水平研究[J]. *天津医药*, 1996(8): 464–466.
- [22] LIAO M, LIAO J W, QU J Q, et al. Hepatic TNFRSF12A promotes bile acid-induced hepatocyte pyroptosis through NF κ B/Caspase-1/GSDMD signaling in cholestasis[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 26.
- [23] TONG C H, LI J D, LIN W G, et al. Inhibition of heat shock protein 90 alleviates cholestatic liver injury by decreasing IL-1 β and IL-18 expression[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 21(3): 1.
- [24] 孟宪萌, 许斌, 陈维. 经方“大柴胡汤”对梗阻性胆汁淤积性肝损伤细胞焦亡调节作用的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2022, 40(7): 220–224.
- [25] HAN D, KIM H, KIM S, et al. Sestrin2 protects against cholestatic liver injury by inhibiting endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(3): 239–251.
- [26] ZHANG X F, PENG B J, ZHANG Y, et al. Biliary drainage reduces intestinal barrier damage in obstructive jaundice by regulating autophagy[J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2022, 2022: 3301330.
- [27] ZHAO J W, RAN M J, YANG T, et al. Bicyclol alleviates signs of bdl-induced cholestasis by regulating bile acids and autophagy-mediated HMGB1/p62/nrf2 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 686502.
- [28] PANZITT K, FICKERT P, WAGNER M. Regulation of autophagy by bile acids and in cholestasis—CholestoPHAGY or CholeSTOPagy[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2021, 1867(2): 166017.
- [29] QIAN H, CHAO X, WILLIAMS J, et al. Autophagy in liver diseases: a review[J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 82(prepublish): 100973.
- [30] FU W T, XIE J, MA L M, et al. Vitamin D receptor activation reduces hepatic inflammation via enhancing macrophage autophagy in cholestatic mice[J]. *Am J Pathol*, 2023, 194(3): 369–383.
- [31] KWAK B J, CHOI H J, KIM O H, et al. The role of phospho-c-Jun N-terminal kinase expression on hepatocyte necrosis and autophagy in the cholestatic liver[J]. *J Surg Res*, 2019, 241: 254–263.
- [32] HOFF J, XIONG L, KAMMANN T, et al. RIPK3 promoter hypermethylation in hepatocytes protects from bile acid-induced inflammation and necroptosis[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(4): 275.
- [33] MAO X R, ZHANG X X, XU Z Q, et al. Hepatic interleukin 32 attenuates liver injury through repression of necroptosis in cholestasis[J]. *J Dig Dis*, 2023, 24(4): 293–304.

(2024-02-28 收稿)