

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2021.01.012

肝脏细胞自噬对肝纤维化的影响研究进展*

张 喆¹ 朱 锐² 秦仁杰^{2△}

¹华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院体检科,武汉 430014

²华中科技大学同济医学院附属协和医院中西医结合科,武汉 430022

关键词 细胞自噬;肝纤维化;肝星状细胞;肝窦内皮细胞;导管反应

中图分类号 R575.2 **文献标志码** A

细胞自噬对于维持细胞、组织及器官的稳态具有重要作用,并与多种病理生理过程密切相关。肝脏接受着肝门静脉的灌注,容易受到各种有害物质的损伤,而细胞自噬在降低肝脏损伤、调节肝脏内环境稳态中发挥重要作用^[1]。肝纤维化是由慢性肝损伤导致的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蓄积的过程,造成这一病理改变的常见诱因有病毒性肝炎、酒精性肝病、非酒精性脂肪性肝炎和自身免疫性疾病等^[2],多种细胞包括肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)、浸润的免疫细胞、肝实质细胞等都参与了肝纤维化过程。自噬在肝纤维化过程中亦具有调节作用,其中 HSC 的自噬可以促进肝纤维化的发生发展^[3],而肝细胞的自噬则被认为可减少炎症、抑制肝纤维化。自噬对肝纤维化的调节是双向且复杂的,现本文对肝脏中不同细胞的自噬对肝纤维化的影响进行综述如下。

1 自噬的概述

“自噬”一词来自于希腊语,直译是“自我吞噬”的意思,是真核生物发展中一种进化上高度保守并受严格调控的过程^[4]。Christian de Duve 最早在 1955 年发现了溶酶体,并于 1963 年定义了自噬:即将细胞内物质输送至溶酶体或液泡进行降解的细胞过程^[5]。细胞自噬具有重要的生理作用,包括对物质循环利用以适应代谢压力,清除细胞内错误折叠的蛋白及受损的细胞器等潜在有害物质^[6]。自噬发生紊乱将导致多种疾病,如肿瘤、帕金森病、克罗恩病等^[7]。

自噬受到多种自噬相关基因(autophagy related gene, ATG)的调节,其过程可大致概括如下:细胞受

外界刺激于胞内形成自噬泡,接着 Atg5-Atg12-Atg16 L 复合物形成并与自噬泡融合,随后微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)由可溶解形式(LC3-I)转变为脂溶形式(LC3-II)并与自噬泡结合形成自噬小体,最后自噬小体与溶酶体结合形成自噬溶酶体,并对其内容物进行降解^[8]。根据降解的底物不同又可分为选择性自噬和非选择性自噬。选择性自噬中根据来自的细胞组分不同又可分为线粒体自噬、内质网自噬、铁蛋白自噬等^[9]。肝脏一方面接受着门静脉运输来的可能包含炎性物质的血液,且对嗜肝病毒十分敏感,容易受各种代谢产物、毒物的损伤,另一方面肝细胞周转率较低,容易产生毒素堆积,需要通过自噬以减少细胞副产物的产生,因此自噬对于维持肝脏稳态意义重大^[10]。

2 肝纤维化的概述

肝纤维化是肝脏对各种原因所致肝损伤的病理改变,以 ECM 蓄积为主要特点。若肝损伤是急性、暂时的,纤维化可逐渐被吸收而恢复成为正常的肝脏结构;但若损伤是慢性、持续的,ECM 则会持续积累,部分纤维化会形成瘢痕组织代替肝实质,造成不可逆的肝纤维化,最终可发展为肝硬化、肝衰竭甚至肝癌^[11]。

HSC 占肝脏固有细胞总数的 15%,其受损伤刺激后会从静止状态转化为激活状态,分化出具有增殖、迁移特性的肌成纤维细胞。肌成纤维细胞通过分泌 ECM 蛋白,包括胶原蛋白、层黏连蛋白和纤维连接蛋白等,以及 ECM 相关细胞因子,包括转化生长因子- β (TGF- β)和结缔组织生长因子(CTGF)等,共同参与纤维化过程,可以说 HSC 是肝纤维化的主要促成者^[12]。除 HSC 外,多种细胞均参与了肝纤维化过程,如炎性浸润的巨噬细胞、肝细胞、肝窦内皮细胞(liver

* 湖北省自然科学基金资助项目(No. 2019CFB711);武汉市青年科技晨光计划资助项目(No. 2017050304010279)

△通信作者,Corresponding author, E-mail: m201975854@hust.edu.cn

sinusoidal endothelial cell, LSEC) 以及一种反应性导管细胞 (reactive ductular cells, RDC) 等, 这些细胞的自噬对肝纤维化均有调节作用^[13]。

3 不同细胞自噬对肝纤维化的影响

3.1 HSC 自噬

肝损伤过程中, 受损的肝细胞、上皮细胞及免疫细胞等可通过旁分泌血小板生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、TGF- β 等细胞因子激活 HSC, 促进其分化成为分泌基质蛋白的肌成纤维细胞, 这是肝纤维化的主要原因。有研究^[14]应用四氯化碳 (CCl₄) 和硫代乙酰胺 (TAA) 诱导肝损伤, 结果发现活化的 HSC 发生了自噬。随后通过敲除 Atg7 抑制 HSC 的自噬能减少基质蓄积和纤维化, 提示 HSC 的自噬可以促进肝纤维化的进程。另外 HSC 细胞质中含有大量脂滴^[15], HSC 自噬可能促进了脂滴分解成游离脂肪酸, 为其激活、分化及分泌 ECM 提供了足够的能量, 进而促进肝纤维化。目前认为脂滴的流失是 HSC 激活的特征, 但有研究^[16]通过诱导 HSC 激活发现其胞质内脂滴含量变化不大, 认为脂滴对于激活 HSC 并造成纤维化的意义有待商榷。此外, 有研究^[17]表明 HSC 中维生素 D 受体 (vitamin D receptor, VDR) 配体降低 TGF- β /SMAD3 靶基因表达并抑制纤维化。另有研究^[18]发现 p62/sequestosome-1 可通过促进 VDR 信号转导抑制 HSC 活化及纤维化, p62 的积累量与自噬活性成反比, 这意味着抑制 HSC 自噬亦有可能通过该信号通路抑制纤维化。然而 HSC 自噬普遍认为能促肝纤维化进展, 其具体机制如何、是否适用于临床仍有待于进一步深入研究。

3.2 巨噬细胞自噬

在肝损伤过程中, 巨噬细胞通过清除细胞碎片维持内环境稳态, 同时它也通过募集免疫细胞引起炎症浸润, 激活 HSC 和成纤维细胞, 从而引起纤维化^[19]。有研究^[20]显示巨噬细胞具有潜在的促纤维化作用。也有研究^[21]发现一类低表达 Ly-6C 的巨噬细胞具有修复纤维化的能力。因此, 巨噬细胞对于肝纤维化表现出双向作用。

关于巨噬细胞自噬对肝纤维化的影响, 有研究^[22]通过条件性 Atg5 基因敲除小鼠髓系细胞抑制巨噬细胞自噬, 予以脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激后发现其巨噬细胞分泌的 IL-1 α 、IL-1 β 水平升高, 与此同时 CCL₄ 诱导的肝损伤、炎症及纤维化程度加重。因此可以推测, 巨噬细胞自噬降低了 IL-1 α 、IL-1 β 的表达, 进而保护肝脏, 抑制了肝纤维化进程。另一项

研究^[23]通过 LPS 和 D-半乳糖胺诱导巨噬细胞 Atg5 缺陷型小鼠肝损伤后发现, 小鼠血清中 IL-1 β 水平上升并加重纤维化进程; 研究者认为这是 NLRP3 炎症小体和 caspase-1 的活化导致巨噬细胞中 pro-IL-1 β 的裂解增强所致。因此, 巨噬细胞自噬可能通过抑制炎症小体依赖性 IL-1 β 的产生来限制肝损伤和纤维化。

3.3 肝细胞自噬

肝实质细胞是肝脏中数量最多的细胞, 在持续性的肝损伤中, 死亡的肝细胞会释放损伤相关的分子模式 (damage associated molecular patterns, DAMPs), DAMPs 一方面激活了肝细胞的 NLRP3 炎症小体诱导了其焦亡并促进炎症反应, 另一方面也可激活 HSC, 促进肝纤维化^[24]。在其他肝脏疾病模型中, Devhare 等^[25]发现 HCV 感染的肝细胞通过分泌外泌体激活 HSC, 促进纤维化。在非酒精性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 模型中, 肝细胞通过激活 TAZ-Ihh 通路导致脂肪变性和 NASH, 从而促进肝纤维化^[26]。可见在肝损伤过程中, 受损的肝细胞主要起促进肝纤维化的作用。

而关于肝细胞自噬对肝纤维化的影响, Ni 等^[27]发现特异性敲除肝细胞 Atg5 基因的小鼠肝脏炎症和纤维化程度更为严重。其原因是 Atg5 缺失导致 p62 的积聚和 Nrf2 的活化, 诱导肝细胞凋亡, 加重肝脏炎症, 从而促进肝纤维化。Amir 等^[28]通过 GalN/LPS 诱导 Atg7 基因缺失小鼠的肝损伤, 发现自噬缺失的肝细胞中 tBid 表达上升, 细胞色素 c 释放诱导细胞凋亡, 其机制可能为自噬的缺乏导致 JNK/c-Jun 信号通路增强, 从而促进 caspase-8 的活化并诱导凋亡。通过腺病毒诱导肝细胞过表达 Atg7 和 beclin1 基因进一步研究发现, GalN/LPS 诱导肝损伤模型中剪切的 caspase-8 和 Bid 水平有所降低, 肝组织的慢性损伤也有所减少^[29]。因此肝细胞自噬可通过减少细胞凋亡、炎症浸润及 HSC 的激活, 从而缓解肝纤维化。

3.4 LSEC 自噬

LSEC 是肝脏内一种高度分化的构成肝血窦壁的内皮细胞, 在调节肝窦血流与周围组织的物质交换中起着重要作用, 其表型与肝纤维化进展息息相关。正常的 LSEC 具有正常的窗孔结构, 而毛细血管化的 LSEC 缺少了窗孔结构及相关功能。正常的 LSEC 在慢性肝损伤中能拦截凋亡小体及相关细胞因子, 阻止 HSC 活化, 并且可以逆转活化的 HSC, 维持其稳态, 然而一旦 LSEC 丢失了窗孔结构, 它不仅不能阻止反而促进了 HSC 的活化。可见 LSEC 对肝纤维化的调节具有双向作用。

有研究^[30]通过 CCL₄ 诱导小鼠肝纤维化, 结果发现, 早期肝损伤时 LSEC 的自噬活性增强并表现出保护肝脏、减少纤维化的作用。而对特异性敲除小鼠 LSEC 的 Atg7 基因并予以 CCL₄ 处理, LSEC 毛细血管化明显增加, 肝纤维化程度加重。这提示 LSEC 的自噬对于维持肝脏正常结构、减少肝损伤并降低肝纤维化具有重要作用。而 Hammoutene 等^[31]通过电镜观察 NASH 患者肝组织发现, 相比于正常组, NASH 患者的 LSEC 缺少自噬活性, 体外敲除肝内皮细胞 Atg5 基因诱导自噬缺陷导致炎症因子 IL-6 及 TGF- β 的表达增加。另外, 通过对 Atg 缺陷鼠构建 NASH 模型时也发现, LSEC 自噬缺陷导致了其功能表型的变化, 模型小鼠更容易发生凋亡并诱导炎症, 且肝脏更容易发生脂质变性和肝纤维化。但用雷帕霉素诱导体外 LSEC 过度自噬则导致小窝蛋白降解, 引起 LSEC 窗孔结构的丢失, 同时激活 HSC^[32]。故据此推测, LSEC 的自噬水平高低对自身正常的功能结构有着不同的影响, 只有适中的自噬水平才可维持自身正常的结构与功能, 减少 HSC 的激活从而降低肝纤维化。

3.5 RDC 自噬

导管反应 (ductular reaction, DR) 是在多种肝脏损伤性疾病中可见的胆管反应性增殖增生现象, 参与此过程的细胞 RDC 可能来源于胆管细胞、肝细胞或肝祖细胞, DR 的发生通常还伴随着血管增生和炎症细胞的浸润以及 HSC 的激活和肝纤维化。

早期研究通过免疫荧光检查原发性胆汁性肝硬化患者自噬相关蛋白 LC3 和 p62 的表达发现, 自噬与胆管细胞尤其是衰老的胆管细胞有显著关联^[33]。Hung 等^[34]在肝硬化患者中也发现了自噬相关蛋白 (LC3B、LAMP2 等) 与 DR 的共定位, 随后通过肝硬化模型发现, 用氯喹阻断自噬可减轻 DR 和肝纤维化。进一步研究^[35]发现肝硬化模型中 RDC 的自噬水平不仅更高, 还表现出向间充质细胞转化的表型, 同时敲除自噬相关基因可抑制 RDC 表型的转化。故 RDC 的自噬有助于维持自身向间充质细胞转化的表型, 减少肝纤维化, 但具体机制还需要进一步研究。

4 总结与展望

肝脏中不同的细胞自噬对肝纤维化有不同的影响。在慢性肝损伤过程中, HSC 的自噬通过降解脂滴为其激活提供能量, 从而促进肝纤维化; 巨噬细胞自噬可减少炎症因子的释放, 抑制肝纤维化; 肝细胞自噬可减少凋亡和炎症浸润从而降低肝纤维化; LSEC

的正常自噬水平可减少毛细血管化, 维持其正常的结构和功能, 减少 HSC 的激活并抑制肝纤维化; 而 RDC 自噬有助于维持向间充质细胞转化的表型而保护肝脏、减少肝纤维化。

肝细胞、巨噬细胞、LSEC 等细胞自噬虽然都在一定程度上影响肝纤维化, 但 HSC 的激活、转化以及分泌 ECM 依然是肝纤维化的直接原因, 且 HSC 与肝细胞、免疫细胞、上皮细胞等肝脏中多种细胞均有交流, 这些细胞或通过 HSC 间接影响了肝纤维化进程。HBV 感染的肝细胞可通过外泌体激活 HSC, Zhang 等^[36]也发现在肝纤维化模型中 TRIB3 蛋白抑制了肝细胞自噬, 并促进肝细胞分泌富含 INHBA/Activin A 的外泌体, 从而激活 HSC。可见, 肝纤维化过程中 HSC 与其他细胞及组分间的交流仍需要进一步揭示, 如何靶向抑制 HSC 凋亡或激活仍旧是治疗或逆转肝纤维化的重要研究方向。

参 考 文 献

- [1] Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger[J]. *Physiol Rev*, 2010, 90(3): 1165-1194.
- [2] Koyama Y, Brenner DA. Liver inflammation and fibrosis[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(1): 55-64.
- [3] Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2017, 121: 27-42.
- [4] Hazari Y, Bravo-San Pedro JM, Hetz C, et al. Autophagy in hepatic adaptation to stress[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(1): 183-196.
- [5] Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(5): 521-527.
- [6] Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective[J]. *Cell*, 2019, 176(1-2): 11-42.
- [7] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues[J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [8] Noda NN, Inagaki F. Mechanisms of Autophagy[J]. *Annu Rev Biophys*, 2015, 44: 101-122.
- [9] Gatica D, Lahiri V, Klionsky DJ. Cargo recognition and degradation by selective autophagy[J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(3): 233-242.
- [10] Ueno T, Komatsu M. Autophagy in the liver: functions in health and disease[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(3): 170-184.
- [11] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fi-

- brosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6:425-456.
- [12] Karin D, Koyama Y, Brenner D, et al. The characteristics of activated portal fibroblasts/myofibroblasts in liver fibrosis[J]. *Differentiation*, 2016, 92(3):84-92.
- [13] Sato K, Marzioni M, Meng F, et al. Ductular reaction in liver diseases: pathological mechanisms and translational significances[J]. *Hepatology*, 2019, 69(1):420-430.
- [14] Hernández-Gea V, Ghiassi-Nejad Z, Rozenfeld R, et al. Autophagy releases lipid that promotes fibrogenesis by activated hepatic stellate cells in mice and in human tissues[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4):938-946.
- [15] Shmarakov IO, Jiang H, Liu J, et al. Hepatic stellate cell activation: a source for bioactive lipids[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2019, 1864(5):629-642.
- [16] Jophlin LL, Koutalos Y, Chen C, et al. Hepatic stellate cells retain retinoid-laden lipid droplets after cellular transdifferentiation into activated myofibroblasts[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2018, 315(5):G713-G721.
- [17] Ding N, Yu RT, Subramaniam N, et al. A vitamin D receptor/SMAD genomic circuit gates hepatic fibrotic response[J]. *Cell*, 2013, 153(3):601-613.
- [18] Duran A, Hernandez ED, Reina-Campos M, et al. p62/SQSTM1 by binding to vitamin D receptor inhibits hepatic stellate cell activity, fibrosis, and liver cancer[J]. *Cancer Cell*, 2016, 30(4):595-609.
- [19] Tacke F, Zimmermann HW. Macrophage heterogeneity in liver injury and fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2014, 60(5):1090-1096.
- [20] Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(1):56-65.
- [21] Ramachandran P, Pellicoro A, Vernon MA, et al. Differential Ly-6C expression identifies the recruited macrophage phenotype, which orchestrates the regression of murine liver fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(46):E3186-E3195.
- [22] Lodder J, Denaës T, Chobert MN, et al. Macrophage autophagy protects against liver fibrosis in mice[J]. *Autophagy*, 2015, 11(8):1280-1292.
- [23] Ilyas G, Zhao E, Liu K, et al. Macrophage autophagy limits acute toxic liver injury in mice through down regulation of interleukin-1 β [J]. *J Hepatol*, 2016, 64(1):118-127.
- [24] Wree A, Eguchi A, McGeough MD, et al. NLRP3 inflammasome activation results in hepatocyte pyroptosis, liver inflammation, and fibrosis in mice[J]. *Hepatology*, 2014, 59(3):898-910.
- [25] Devhare PB, Sasaki R, Shrivastava S, et al. Exosome-mediated intercellular communication between hepatitis C virus-infected hepatocytes and hepatic stellate cells[J]. *J Virol*, 2017, 91(6):e02225-16.
- [26] Wang X, Zheng Z, Caviglia JM, et al. Hepatocyte TAZ/WWTR1 promotes inflammation and fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(6):848-862.
- [27] Ni HM, Woolbright BL, Williams J, et al. Nrf2 promotes the development of fibrosis and tumorigenesis in mice with defective hepatic autophagy[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(3):617-625.
- [28] Amir M, Zhao E, Fontana L, et al. Inhibition of hepatocyte autophagy increases tumor necrosis factor-dependent liver injury by promoting caspase-8 activation[J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(7):878-887.
- [29] DeLeve LD. Liver sinusoidal endothelial cells in hepatic fibrosis[J]. *Hepatology*, 2015, 61(5):1740-1746.
- [30] Ruat M, Chavarria L, Campreciós G, et al. Impaired endothelial autophagy promotes liver fibrosis by aggravating the oxidative stress response during acute liver injury[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(3):458-469.
- [31] Hammoutene A, Biquard L, Lasselin J, et al. A defect in endothelial autophagy occurs in patients with non-alcoholic steatohepatitis and promotes inflammation and fibrosis[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(3):528-538.
- [32] Luo X, Wang D, Zhu X, et al. Autophagic degradation of caveolin-1 promotes liver sinusoidal endothelial cells fenestration[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(5):576.
- [33] Sasaki M, Miyakoshi M, Sato Y, et al. Autophagy may precede cellular senescence of bile ductular cells in ductular reaction in primary biliary cirrhosis[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(3):660-666.
- [34] Hung TM, Yuan RH, Huang WP, et al. Increased autophagy markers are associated with ductular reaction during the development of cirrhosis[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(9):2454-2467.
- [35] Hung TM, Huang YJ, Lin YC, et al. A critical role of autophagy in regulating the mesenchymal transition of ductular cells in liver cirrhosis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1):10673.
- [36] Zhang XW, Zhou JC, Peng D, et al. Disrupting the TRIB3-SQSTM1 interaction reduces liver fibrosis by restoring autophagy and suppressing exosome-mediated HSC activation[J]. *Autophagy*, 2020, 16(5):782-796.