

TRAIL 及其受体在肝脏疾病中的作用研究进展

代雪飞 综述, 吕雄文 审校

摘要 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TRAIL) 是近年来发现的肿瘤坏死因子 (TNF) 家族成员之一, 越来越多的证据表明 TRAIL 及其受体介导的细胞凋亡在多种肝脏疾病的发生发展中有着重要作用, TRAIL 及其受体的发现为肝脏疾病的治疗提供了新的研究方向。

关键词 TRAIL; DR4; DR5; 肝脏疾病

中图分类号 R 91

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)02-0304-04

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.02.037

肝脏疾病是危害人类健康的一大杀手, 主要包括各种病原体如病毒、细菌引起的感染、肝脏占位性病变、肝细胞代谢障碍引起的肝病、酒精性肝病、药物性肝损伤以及自身免疫性肝病等。肝脏疾病的病程大多迁延且具有反复性, 按照严重程度临床可表现为肝炎、脂肪肝、肝纤维化、肝硬化及肝癌。肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 参与多种肝脏疾病的发生发展过程, 基于 TRAIL 及其受体在肝脏疾病中日益突出的作用, 其作用机制及用于防治肝脏疾病的药物开发成为国内外研究热点。

1 TRAIL 及其受体的结构和功能

肿瘤坏死因子家族中的凋亡分子包括肿瘤坏死因子 (TNF) 和 FasL, 而 TRAIL 是之后发现的第 3 个家族成员, TRAIL 作为一种 II 型跨膜蛋白, 参与多种病理生理过程如细胞凋亡、细胞增殖、免疫炎症反应等, 而 TRAIL 发挥这些功能的过程都是通过与不同的受体结合实现的。目前共发现了 3 类 TRAIL 受体, 分别为死亡受体、诱骗受体及可溶性受体 (osteoprotegerin, OPG)。死亡受体包括 DR4、DR5, 其含有死亡域, 能够在多种组织细胞中表达, 与 TRAIL

特异性结合后激发和传导凋亡信号, 诱导细胞凋亡; 诱骗受体包括 DcR1、DcR2, 多表达于正常组织细胞内, 不含完整的死亡域, 与 DR4、DR5 竞争性结合 TRAIL 后无法诱导细胞凋亡, 造成凋亡逃逸^[1]; OPG 主要能够抑制破骨细胞、增加骨骼密度, 由于没有死亡域, 无法诱导细胞凋亡。综上所述, TRAIL 能够特异性诱导细胞凋亡的发生, 而对正常组织无影响, 而这种作用特点是其应用于肝脏疾病诊治的基础。

2 TRAIL 及其受体诱导细胞凋亡的机制

DR4、DR5 介导细胞凋亡的转导机制目前尚不完全清楚, 大多显示是通过激活细胞内的 Fas associated death domain (FADD)-Caspase 途径而引起细胞凋亡。TRAIL 在胞外与 DR4、DR5 结合导致细胞内的死亡结构域相互聚集后与 FADD 结合, FADD 以其 N 端的死亡效应结构域结合, 形成死亡信号诱导复合物, 引发半胱天冬酶原局部募集、串联结合并自身水解活化为有活性的 Caspase-8, 通过线粒体依赖和非线粒体依赖两种途径触发细胞凋亡。在线粒体途径中, Caspase-8 活化切割 Bid (Bcl-2 inhibitory BH3-domain-containing protein) 为 tBid (truncated Bid) 形式, 随后激活 Bax, 诱导线粒体释放细胞色素 C, 脱落的细胞色素 C 随后激活 Caspase-9, 下游的 Caspase 被激活从而促进细胞凋亡; 在非线粒体依赖途径中, Caspase-8 首先自身裂解, 活化后激活下游 Caspase 级联反应, 启动效应酶 Caspase-3 进而引发细胞凋亡^[2]。

3 TRAIL 与慢性病毒性肝炎

慢性肝炎、肝硬化、肝癌的发生大多和乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 的感染有一定的相关性^[3]。研究^[4]显示, 肝癌细胞中 TRAIL 介导的细胞凋亡与乙肝病毒 X 蛋白 (HBX) 调控 DR5 的表达相关, Huh-7 细胞中 TRAIL 能够介导 DR4、DR5 在 HBX 中的表达增加, 从而诱导病毒细胞的凋亡。该研究运用流式细胞仪评估 Huh-7-HBX 细胞凋亡, 采用实时定量 PCR 及 Western blot 法检测 DR4 和 DR5 在细胞中的表达水平, 并用 Western blot 法研究了

2016-09-18 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金 (编号: 070413078); 安徽医科大学
校科研基金 (编号: 2012xkj091)

作者单位: 安徽医科大学第四附属医院药剂科, 合肥 230022

作者简介: 代雪飞, 女, 硕士, 药师;

吕雄文, 男, 教授, 责任作者, E-mail: lxw31288@yaho.com.cn

JNK 和 NF- κ B 信号通路过程。结果显示, Huh-7-HBX 细胞凋亡的百分比增加, 且观察到 DR4 和 DR5 在 Huh-7-HBX 细胞中表达升高; 进一步的研究表明在这一过程中 JNK 和 NF- κ B 信号通路活化加强, NF- κ B 途径和 HBX 阳性细胞表面 DR5 表达的增多与细胞凋亡相关, 但 JNK 信号通路与 HBX 阳性细胞中 TRAIL 受体的表达并无相关性。这项研究表明 HBX 通过 NF- κ B 通路引起 DR5 表达上调可能是细胞凋亡发生的原因。研究^[9]表明, HBX 可以通过上调 Bax 的表达, 从而促进 TRAIL 相关性细胞凋亡的发生, 其中 Bax 是一种线粒体依赖性途径介导的与细胞凋亡相关的蛋白。HBX 诱导的 NF- κ B 信号通路的活化与 HBV 感染后的多种生物活性相关^[6-8], 通过 BAY11-7082 抑制 NF- κ B 信号通路从而降低 DR5 的表达, 结果表明由 HBX 介导的 DR5 表达可能与 NF- κ B 通路相关。

TRAIL 被金属蛋白酶从膜上切下, 产生 114 ~ 281 位可溶的活性肽段, 此肽段称为可溶性肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (sTRAIL)。李金强等^[9]研究了慢性乙型重型肝炎患者血清中 sTRAIL 变化及其临床意义, 分别测定慢性乙型重型肝炎患者和正常人血清 sTRAIL 水平、HBV DNA 载量及肝功能指标, 结果提示慢性乙型重型肝炎患者血清 sTRAIL 水平显著升高且与血清总胆红素及丙氨酸氨基转移酶水平均呈正相关性 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 提示血清 sTRAIL 的检测可能对评价乙型肝炎的严重程度有临床指示意义, 同时具有判断预后的价值。魏屏等^[10]检测了 30 例重型肝炎患者外周血单个核细胞 (PBMC) TRAIL mRNA 的表达, 结果提示实验组 PBMC TRAIL mRNA 及血清 sTRAIL 水平较正常组显著升高, 提示在重型肝炎的病理损害过程中, TRAIL 介导的细胞凋亡有着重要作用, 而 sTRAIL 的表达水平在一定程度上反应患者肝脏损伤的严重程度。

长期丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染是引起肝脏坏死进而导致肝纤维化、肝硬化以及肝癌形成的主要病因之一。HCV 感染能够激活 TRAIL 介导的细胞凋亡的启动, 但 HCV 调节 TRAIL 途径的机制目前尚不完全清楚。Deng et al^[11]通过基因重组和全长病毒 JFH-1 研究表明, HCV 可引起宿主细胞中死亡受体表达上调而引起细胞凋亡, 然而此过程需要 MEK1 的活化, 而 HCV 感染后能够刺激 MEK1 的活性, 通过 MEK1 抑制剂或者对 MEK1 进行基因敲除可以改善 HCV 感染后引起的肝损伤, 因此抑制 DR4 和 DR5 的高表达或将成为

有效的治疗手段。

4 TRAIL 与脂肪肝

研究^[12]显示, 在酒精性脂肪肝过程中 DR5 能够诱导细胞凋亡, 脂肪变性的肝细胞中 TRAIL 表达增加, 用腺病毒基因转染到大鼠肝脏中表达 TRAIL, TRAIL 本身的过表达对正常肝脏没有影响, 但是如果在病毒感染之前 TRAIL 过表达能够对脂肪变性的肝细胞有促进凋亡的作用。研究^[13]显示在非酒精性脂肪肝患者中 sTRAIL 水平较对照组显著升高, 同时 sTRAIL 表达与非酒精性脂肪肝患者三酰甘油浓度呈正相关性。这项研究也提供了脂肪肝易感性测试, 作为协助脂肪肝的诊断手段。

5 TRAIL 与肝纤维化

正常肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs) 为静止型, 能够摄取和储存维生素 A, 肝损伤后 HSCs 被激活, 基因表达及细胞表型出现改变, 合成大量细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 分泌基质金属蛋白酶抑制剂, ECM 的形成是发生肝纤维化的关键, 同时肝纤维化是慢性肝病最终走向肝硬化和肝癌的关键过程, 因此抑制 HSCs 的活化增殖, 使其保持在静止期是逆转肝纤维化进程的根本措施。HSCs 的增殖和死亡受体相关, 而且对于 TRAIL 介导的细胞凋亡较为敏感。重组 TRAIL 治疗是一种改善肝纤维化的潜在方法, 然而重组 TRAIL 由于其半衰期极短而来不及发挥作用这一特性阻碍了其临床应用。国外学者将 TRAIL 用 PEG 进行结构修饰, 使其在啮齿类动物中的半衰期比修饰前延长, 而且对原代人肝细胞没有毒性, 给予四氯化碳诱导的肝纤维化或肝硬化的大鼠静脉注射 PEG 修饰后的 TRAIL, 能够直接诱导 HSCs 细胞的凋亡, 同时下调与 HSCs 相关的多个纤维化指标^[14]。该研究提示基于 TRAIL 诱导细胞凋亡的治疗方法可以成为逆转肝纤维化或肝硬化的新手段。

肝纤维化的中心环节是活化的 HSCs 合成大量的 ECM, 而肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 能够促进 HSCs 的活化, 活化的 HSCs 可以通过 TRAIL-R2 途径凋亡, 因此 TRAIL 诱导的细胞凋亡可能存在其他因子的激动和参与。张君红等^[15]研究了 HGF 在 TRAIL 促进原代肝星状细胞凋亡中的作用, 通过 Western blot 法检测 DR5 蛋白的表达时显示 HGF 预先作用 HSCs 24 h 后可以上调 HSCs 表面 DR5 蛋白的表达, DR5 是 TRAIL 的特异

性受体,在诱导 HSCs 凋亡中起主导地位,HGF 可能是 TRAIL 及 DR5 的激动剂,能够上调 DR5 的表达从而增强 TRAIL 诱导的细胞凋亡。

研究^[14]证明 TRAIL 能够产生 NK 细胞,在甘氨酸-N-甲基转移酶(GNMT)缺乏引起的肝损伤甚至肝纤维化过程中起重要作用。GNMT 在维持体内肝功能稳定中有重要作用,而肝硬化和肝癌患者体内 GNMT 表达水平较低。小鼠模型中 GNMT 缺乏可能引起脂肪性肝炎、肝纤维化和肝癌。GNMT 基因敲除的小鼠以及 TRAIL 的耗竭使得 GNMT 触发的 NK 细胞活化无法完成,从而明显缓解急性肝损伤和炎性病变。在对小鼠进行 TRAIL 和 GNMT 的双重敲除后,对于 GNMT 缺乏的小鼠,TRAIL 能够较为明显地减缓慢性肝损伤和肝纤维化。为了更好地阐明 TRAIL 产生 NK 细胞在肝纤维化中的意义,该研究对 GNMT 基因敲除以及 GNMT 和 TRAIL 双重敲除的小鼠进行了胆管结扎,结果显示对于 GNMT 敲除的小鼠,急剧的纤维化同时伴有 NK 细胞的活化,由于 TRAIL 能够特异性地产生 NK 细胞从而保护 GNMT 敲除小鼠由于胆管结扎造成的肝纤维化。

6 TRAIL 与肝癌

TRAIL 作为 TNF 超家族中的一个新成员,能够诱导肿瘤细胞凋亡^[17],TRAIL 毒性低、抗肿瘤作用强,即将成为一种新的抗癌治疗手段,目前 TRAIL 在肿瘤领域的应用在美国已经进入了 II 期临床试验阶段^[18]。TRAIL 诱导的细胞凋亡在体外能够对肝癌细胞株的生长呈现出不同程度的抑制作用,而 RIP 和 c-FLIP 的表达在这一过程中起关键作用。国外学者应用 Western blot 法检测 C-FLIP、RIP、DR4、DR5、FADD 和 Caspase-3/8/9、ERK1/2 和 DFF45 蛋白的表达,证实了 TRAIL 在肝癌细胞中能够诱导 RIP 和 c-FLIP 基因沉默,从而起到诱导细胞凋亡的作用^[19]。有研究^[20]建立了 RIP 和 c-FLIP 基因沉默的 HepG2 和 Hep3B 细胞模型,通过 Western blot 法检测蛋白基因表达,MTT 法检测细胞增殖,流式细胞术检测细胞凋亡率,JC-1 荧光探针测定线粒体膜电位等方法研究糖原类似物 2-DG 在 TRAIL 诱导肝癌细胞凋亡中的作用,结果显示,2-DG 联合 TRAIL 能够降低肝癌细胞存活率,增加细胞凋亡,这项研究提示 2-DG 可以抑制 RIP 和 c-FLIP 的表达从而增加 TRAIL 诱导 HepG2 和 Hep3B 细胞。Inoue et al^[21]发现蛋白酶抑制因子 MG132 与 TRAIL 的联合使用能够有效治疗肝癌。Mcl-1 是肝癌细胞中一种重要的

抗凋亡蛋白,其表达具有肿瘤特异性,在肝癌患者肝组织中 Mcl-1 表达上调,而在非肿瘤肝组织中表达较低,而 miRNA-26b 能够调节 Mcl-1 的表达从而致敏 TRAIL 诱导的凋亡发生^[22]。TRAIL 在肝癌治疗过程受到多种因素的影响,其机制可能更加复杂,涉及多种相关因子的激动和抑制,也为解决 TRAIL 在治疗肝癌过程中耐药性的产生提供了新的思路^[23]。

7 TRAIL 与胆汁淤积性肝硬化

长期慢性胆汁淤积最终会导致肝纤维化和肝硬化的发生,目前对于胆汁淤积性肝硬化的分子机制尚未完全证实。研究^[24]显示 DR5 介导的死亡信号可能在胆汁淤积性肝损伤中有着重要的调节作用。激动抗 DR5 单克隆抗体,能够引起胆管炎及胆汁淤积性肝损伤的小鼠发生细胞凋亡;进行胆管结扎后引起胆汁淤积的小鼠体内 DR5 表达上调。值得关注的是,抗 DR5 单克隆抗体诱导胆管炎表现出的典型的组织学变化和原发性胆汁性肝硬化十分相似。原发性胆汁性肝硬化(primary biliary cirrhosis,PBC)是一种自身免疫性肝病,主要表现为慢性肝内胆汁淤积,引起肝损伤,最终导致肝硬化,目前对于 PBC 的发病原因尚不清楚,可能与自身免疫系统出现异常有关。在 PBC 患者的胆管组织中 DR5、TRAIL 的表达及细胞凋亡均显著上升,因此 TRAIL 及 DR5 介导的细胞凋亡可能在胆汁淤积性肝病中有着重要作用。研究^[25]显示 PBC 患者血清中 sTRAIL 水平变化与体内免疫指标的水平变化呈现出一定的相关性,提示通过检测 sTRAIL 水平对患者免疫系统疾病的评估有一定的诊断意义。

8 TRAIL 与肝脏缺血再灌注损伤

缺血再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, IRI)是指组织器官缺血恢复血液再灌注后,细胞功能代谢障碍及结构破坏反而加重的现象。肝脏 IRI 是肝脏移植术、肝脏部分切除术、失血性和心源性休克等的共同的病理生理过程,严重影响患者预后,其发生机制较为复杂,包括自由基导致的脂质过氧化增强、钙超载以及激活的中性粒细胞介导的炎症反应等,多种机制的损伤途径都会引起细胞凋亡,因此抗凋亡是改善 IRI 的直接治疗方案。曹丽丽等^[26]通过建立体外肝脏 IRI 模型,给予外源性蛋白 TRAIL,检测肝细胞内 DR5 mRNA 的表达和细胞凋亡,首次报道了肝脏 IRI 对 TRAIL 介导的肝细胞毒性的影响。结果提示肝脏 IRI 组 DR5 mRNA 的表达

增多且肝细胞对 TRAIL 诱导的凋亡敏感,TRAIL 作用于肝脏 IRI 损伤的肝细胞后,细胞凋亡增多。该研究表明肝脏 IRI 后肝细胞凋亡可能是 TRAIL 及 DR5 途径的结果。

9 结语和展望

TRAIL 及其受体 DR4、DR5 在多种肝脏疾病的发生发展过程中有着重要的作用,TRAIL 能特异性诱导细胞的凋亡而对正常细胞和组织无影响,可利用 TRAIL 这种独特的“分清敌我”的作用特点进行肝脏疾病的诊治,例如通过血清 sTRAIL 的检测评价肝脏受损的严重程度;利用死亡受体在肝细胞表面的分布特征研究肝癌治疗的新靶点。然而近几年 TRAIL 及其受体在用于肝脏疾病如肝癌的治疗中耐药性的产生限制了其使用,但 TRAIL 及其受体在肝脏疾病的诊治中日益突出的地位并未动摇。基于 TRAIL 及其受体介导细胞凋亡的作用,不断开发治疗肝脏疾病的新靶点仍将会有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] Oikonomou E, Pintzas A. The TRAIL of oncogenes to apoptosis [J]. Biofactors, 2013, 39(4): 343–54.
- [2] 赵美玲, 季宇彬, 毕明刚. 细胞凋亡的死亡受体途径 [J]. 黑龙江医药, 2013, 26(2): 196–9.
- [3] Iavarone M, Colombo M. HBV infection and hepatocellular carcinoma [J]. Clin Liver Dis, 2013, 17(3): 375–97.
- [4] Kong F, You H, Zhao J, et al. The enhanced expression of death receptor 5 (DR5) mediated by HBV X protein through NF-kappaB pathway is associated with cell apoptosis induced by TNF- α related apoptosis inducing ligand (TRAIL) in hepatoma cells [J]. Vir-ol J, 2015, 12: 192.
- [5] Liang X, Liu Y, Zhang Q, et al. Hepatitis B virus sensitizes hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis through Bax [J]. J Immunol, 2007, 178(1): 503–10.
- [6] Liu Y, Lou G, Wu W, et al. Involvement of the NF-kappaB pathway in multidrug resistance induced by HBx in a hepatoma cell line [J]. J Viral Hepat, 2011, 18(10): e439–46.
- [7] Pan X, Cao H, Lu J, et al. Interleukin-32 expression induced by hepatitis B virus protein X is mediated through activation of NF- κ B [J]. Mol Immunol, 2011, 48(12–13): 1573–7.
- [8] Liu Q, Chen J, Liu L, et al. The X protein of hepatitis B virus inhibits apoptosis in hepatoma cells through enhancing the methionine adenosyltransferase 2A gene expression and reducing S-adenosylmethionine production [J]. J Biol Chem, 2011, 286(19): 17168–80.
- [9] 李金强, 蒋道荣, 周光耀, 等. 慢性乙型重型肝炎患者血清 sTRAIL 的检测及临床意义 [J]. 实用医学杂志, 2010, 26(2): 252–4.
- [10] 魏 屏, 张景辉, 刘 薇, 等. TRAIL 在重型肝炎患者 PBMC 和血清中的表达及血浆置换治疗前后的变化 [J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(19): 2063–7.
- [11] Deng Z, Yan H, Hu J, et al. Hepatitis C virus sensitizes host cells to TRAIL-induced apoptosis by up-regulating DR4 and DR5 via a MEK1-dependent pathway [J]. PLoS One, 2012, 7(5): e37700.
- [12] Afford S C, Adams D H. Following the TRAIL from hepatitis C virus and alcohol to fatty liver [J]. Gut, 2005, 54(11): 1518–20.
- [13] Yan X, Xu L, Qi J, et al. sTRAIL levels and TRAIL gene polymorphisms in Chinese patients with fatty liver disease [J]. Immunogenetics, 2009, 61(8): 551–6.
- [14] Oh Y, Park O, Swierczewska M, et al. Systemic PEGylated TRAIL treatment ameliorates liver cirrhosis in rats by eliminating activated hepatic stellate cells [J]. Hepatology, 2016, 64(1): 209–23.
- [15] 张君红, 姜海行, 覃山羽, 等. 肝细胞生长因子在 TRAIL 促进原代肝星状细胞凋亡中的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(23): 5909–11.
- [16] Fernandez-Alvarez S, Gutierrez-de Juan V, Zubiete-Franco I, et al. TRAIL-producing NK cells contribute to liver injury and related fibrogenesis in the context of GNMT deficiency [J]. Lab Invest, 2015, 95(2): 223–36.
- [17] Dao P, Smith N, Scott-Algara D, et al. Restoration of TRAIL-induced apoptosis in resistant human pancreatic cancer cells by a novel FAK inhibitor, PH11 [J]. Cancer Lett, 2015, 360(1): 48–59.
- [18] Seyman D, Yalcin A D, Oztoprak N, et al. Soluble TRAIL levels decreased in chronic hepatitis C treatment with pegylated interferon alpha plus ribavirin: association with viral responses? [J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(12): 5650–6.
- [19] Sun J, Luo H, Nie W, et al. Protective effect of RIP and c-FLIP in preventing liver cancer cell apoptosis induced by TRAIL [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(6): 6519–25.
- [20] Zhang Y, Huang F, Wang J, et al. 2-DG-regulated RIP and c-FLIP effect on liver cancer cell apoptosis induced by TRAIL [J]. Med Sci Monit, 2015, 21: 3442–8.
- [21] Inoue T, Shiraki K, Fuke H, et al. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by suppressing caspase inhibitors and AKT pathway [J]. Anticancer Drugs, 2006, 17(3): 261–8.
- [22] Jiang C, Long J, Liu B, et al. Mcl-1 is a novel target of miR-26b that is associated with the apoptosis induced by TRAIL in HCC cells [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 572738.
- [23] 徐志辉, 赵金金, 尤红娟, 等. TRAIL 联合水飞蓟素对人肝癌 Huh7 细胞凋亡的影响 [J]. 免疫学杂志, 2014, 30(6): 562–5.
- [24] Takeda K, Kojima Y, Ikejima K, et al. Death receptor 5 mediated-apoptosis contributes to cholestatic liver disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(31): 10895–900.
- [25] 陈 燕, 周 晔, 仲人前, 等. 原发性胆汁性肝硬化患者检测可溶性肿瘤坏死因子 sTRAIL 的意义 [J]. 临床军医杂志, 2010, 38(4): 555–7.
- [26] 曹丽丽, 李幼平, 李胜富, 等. TRAIL/死亡受体 5 途径在缺氧再给氧诱导人肝细胞凋亡中的作用及相关机制 [J]. 华西医学, 2006, 21(3): 516–7.