

◇ 综 述 ◇

足细胞自噬在足细胞病中的研究进展

黄 勇¹ 综述 曹式丽² 审校

摘要 对近年来足细胞自噬在足细胞病中的作用及其机制的研究进行了概述,阐述了哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路在足细胞自噬中扮演的角色。足细胞自噬活性的改变与足细胞病的进程密切相关,mTOR信号通路介导的自噬途径是足细胞保持自身稳定的重要调节器,以调控足细胞自噬平衡体系为干预靶点可能成为足细胞病防治的新靶点。

关键词 自噬;足细胞自噬;足细胞病;mTOR

中图分类号 R-1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1200-04

足细胞即肾小球脏层上皮细胞,是一种高度分化的终末细胞,其结构和功能的正常对维持肾小球滤过屏障的完整性非常重要。自噬是近年来细胞生物学领域研究的热点。自噬过度、障碍造成的细胞损伤及其诱导的细胞程序性死亡在疾病的发生、发展过程中起着重要作用。自从发现肾小球足细胞中存在自噬现象,足细胞自噬在足细胞病发生、发展中所扮演的角色已成为新的研究方向。该文就近年来足细胞自噬在足细胞病中的研究进展及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路在足细胞自噬中扮演的角色进行阐述。

1 自噬与细胞的生理病理

自噬是一种广泛存在于真核细胞内溶酶体依赖性蛋白及细胞器的分解代谢途径。目前研究将自噬分为三种:巨自噬、微自噬和分子伴侣自噬^[1]。其中巨自噬指细胞质中可溶性蛋白和变性坏死的细胞器被非溶酶体来源的双层膜结构所包裹,继而被溶酶体内水解酶降解的过程;微自噬中溶酶体膜内叠,使得一部分细胞质直接进入溶酶体腔而被分解;分

子伴侣自噬需要细胞质可溶性蛋白直接通过溶酶体膜,预先有伴侣分子将目标蛋白解构变性。而自噬通常是指巨自噬,是其中研究最多的一种。自噬是胞质中大分子物质和细胞器在双层膜包裹泡中大量降解的生物学过程,其过程大致包括4个阶段^[2]:①隔离膜的形成:在饥饿、氧化应激损伤等自噬诱导因素的刺激下,粗面内质网的非核糖体区域、高尔基体等来源的自噬体膜脱落形成杯状隔离膜,包裹在需降解的蛋白质或细胞器周围;②自噬体的形成:隔离膜逐渐延伸,将需降解的底物完全包绕形成自噬体;③自噬性溶酶体的形成:自噬体通过细胞骨架微管系统将其包裹的底物运输至溶酶体,并与之融合形成自噬性溶酶体;④自噬体内容物的降解:自噬体与溶酶体融合后,自噬体内膜及其内容物被溶酶体中多种蛋白水解酶降解,自噬体膜脱落循环利用。

生理状态下,几乎所有细胞都存在基础水平的自噬。正常水平的自噬可以清除未折叠或折叠错误的蛋白质,降解蛋白质产生氨基酸等供细胞再循环,从而维持细胞生存及内环境的稳定。自噬可被多种因素激活,如营养或生长因子缺乏、缺氧、活性氧刺激、DNA损伤、蛋白质聚集、细胞器损伤或细胞内病原体侵袭等因素^[3]。在大多数情况下,自噬参与细胞的应激反应,帮助细胞适应营养变化,维持细胞稳态,延续细胞生命,是细胞对外界因素刺激的一种适应性反应,是细胞的一种自我保护机制,可阻抑有害应激所诱导的细胞凋亡^[4]。对于肿瘤细胞,自噬具有抑制和促进的双重作用,如在肿瘤发生初期自噬活性的增强可作为一种抑制因素,而在肿瘤生长过程中却可为肿瘤扩增提供营养,促进肿瘤细胞的增殖,而且自噬在不同类型肿瘤中扮演的角色亦不相同^[5]。因此,自噬与细胞的生理和病理关系密切。目前研究对自噬在疾病中所扮演的角色尚无定论,探索其在不同疾病中的作用及其具体作用机制具有重要意义。

2 足细胞自噬与足细胞病

2002年足细胞病的概念首次被提出,以肾小球

2015-03-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:30772808)

作者单位:¹天津中医药大学研究生院;²天津中医药大学第一附属医院肾内科,天津 300193

作者简介:黄 勇,男,博士研究生;

曹式丽,女,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: shilicaoTCM@163.com

足细胞数量和(或)密度减少、肾小球基底膜增厚、肾小球基质成分改变、足突融合等为特征的肾小球疾病统称为足细胞病。足细胞是一种高度分化的终末细胞,其足突包绕在肾小球基底膜上,形成裂孔隔膜复合体,其结构的完整性与肾小球滤过屏障功能的正常密切相关。足细胞的损伤和缺失是导致肾脏疾病发生及发展至肾功能衰竭的主要原因,足细胞数量的减少是预测肾脏疾病进展的重要指标^[6]。成熟足细胞缺失后仅能依赖于足细胞的祖细胞再生,其再生能力极其微弱。且初始的局部损伤的足细胞可产生“多米诺效应”,将损伤信号传递至正常足细胞,使疾病迅速发展至肾小球硬化^[7]。因此,维护足细胞结构和功能的正常,阻抑足细胞的损伤是肾脏病防治的重要环节。

自噬在肾脏疾病的研究已历经半世纪。1956年,Clark^[8]通过电镜观察到小鼠肾组织细胞中存在大量具有膜性结构的致密体,并发现其胞质中常含有类似于线粒体的结构。当时学者们对自噬了解尚少,对自噬这一现象也没有明确定义。1983年,Berkenstam et al^[9]从大鼠近端肾小管细胞中分离出自噬性囊泡,证明大鼠肾脏固有细胞中存在自噬现象,自噬在肾脏病领域开始受到关注。2003年,Asanuma et al^[10]发现足细胞的分化和损伤修复过程存在自噬现象。加之同期足细胞病概念的提出,使得众多研究者开始探索足细胞自噬在足细胞病中所扮演的角色。Mizushima et al^[11]通过绿色荧光蛋白标记 LC3(green fluorescent protein marked LC3, GFP-LC3) 转基因小鼠模型发现肾小球足细胞显著表达自噬,提示足细胞中存在基础自噬活性。Hartleben et al^[12]用 GFP-LC3 作为自噬体免疫荧光标志物来检测机体内自噬水平,发现肾小球足细胞中 LC3-II 的堆积速度明显高于肾脏其他细胞,说明足细胞相比于肾脏其他细胞表达出更高的自噬水平。且足细胞基础自噬活性是维持足细胞结构及功能完整性的重要机制,足细胞自噬平衡体系失衡会增加肾小球疾病易感性。糖尿病肾病是一种常见的足细胞病,高糖刺激可以引起足细胞自噬活性受到抑制,给糖尿病小鼠腹腔注射雷帕霉素可以减轻肾小球病理改变和足细胞损伤,其作用可能与促进足细胞自噬有关^[13]。在肾活检病理表现为微小病变(minimal change disease, MCD) 的患者中,足细胞自噬相关基因 Beclin-1 表达明显高于局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerular sclerosis, FSGS) 患者,且对 MCD 患者重复肾活检时发现,Beclin-1 表达无明

显变化者其病理类型仍为 MCD,而 Beclin-1 表达明显下降、足细胞自噬活性降低者肾脏病理已转化为 FSGS^[14],说明足细胞自噬活性的改变与足细胞病的进程密切相关。上述研究结果提示:以调控足细胞自噬平衡体系为干预靶点或可为足细胞病的治疗提供新的可行途径。

3 mTOR 信号通路——足细胞自噬“调节器”

细胞通过自噬来循环利用破损和无用的细胞器及大分子,同时产生能量,并恢复正常生长所需要的构件前体。mTOR 和细胞自噬有着紧密联系,在 mTOR 和细胞自噬联系出现缺陷的地方,可引起肿瘤和神经退行性病变等一系列疾病的发生^[15]。mTOR 是细胞内一种高度保守的丝/苏氨酸(Ser/Thr) 蛋白激酶,其作为能量代谢的调控器,可整合营养、生长因子以及多种细胞外信号,参与基因转录、蛋白质的翻译、核糖体的合成等生物过程,在维持细胞的结构和功能中发挥着重要的作用^[15]。参与调节足细胞自噬平衡体系的分子系统非常复杂,目前研究主要集中在 mTOR、核转录因子等信号通路。其中, mTOR 是生理及应激条件下协调生长与自噬之间平衡的关键成分,是多条信号通路的汇聚点,成为目前自噬相关信号通路研究的热点。

mTOR 属磷脂酰肌醇激酶(phosphoinositide-3 kinase ELISA Kit, PI3K) 相关蛋白激酶家族,具有 Ser/Thr 蛋白激酶活性,能磷酸化蛋白底物的 Ser/Thr 残基。细胞内存在 mTOR 复合物 1(mTOR complex 1, mTORC1) 和 mTOR 复合物 2(mTOR complex 2, mTORC2) 两种复合体。mTORC1 复合体由 mTOR 蛋白和分别对复合体起正负调节作用的 mTOR 调控相关蛋白 Raptor、Deptor 等附属蛋白组成,主要参与调节细胞生长、细胞凋亡、能量代谢和细胞自噬等^[16]。mTORC2 构成包括 Rictor 及 mSin1,通过磷酸化蛋白激酶 C- α (protein kinase phosphorylation c- α , PKC- α) 通路来调节肌动蛋白,在肌动蛋白细胞骨架、细胞存活及代谢等方面发挥重要作用^[17]。由于 mTOR-Rictor 复合物不能结合 FKBP12-雷帕霉素耦联体, mTORC2 对雷帕霉素表现为不敏感。而最近研究^[18]显示延长雷帕霉素治疗时间可以影响 Rictor 与 mTORC2 的结合。细胞自噬的起始阶段是由 ULK1 及 VPS34 两种蛋白激酶调控,ULK1 是 VPS34 的上游蛋白,ULK1 会在细胞缺乏营养的时候激活,ULK1 和 VPS34 的激活使自噬基因(autophagy-related gene, ATG) 蛋白聚集成吞噬泡膜从而促进自噬

体的成熟,同时,ULK1 和 VPS34 还能与 mTORC1 信号产生相互作用从而影响自噬^[19]。mTORC1 参与自噬的调节与 PI3K/蛋白激酶 B(Akt) 信号通路密切相关。磷酸肌醇三磷酸(inositol triphosphate phosphate, PI3P) 在这个过程中是一个重要的细胞内信号,其可与多种具有同源性底物的蛋白质相结合,如磷脂酰肌醇依赖性激酶 1 和 Akt,PI3P 与 PDK1 的结合可使 Akt 磷酸化、激活,激活的 Akt 进一步使细胞核和细胞质中的其他目标蛋白磷酸化,从而抑制 mTORC1 的激活,提高细胞内的自噬活性^[20]。此外, mTOR 磷酸化的 ATG13 会降低 ATG13 和 ATG1 的亲和力,而 ATG1-ATG13 的联合以及下一步 ATG1 的激活对细胞自噬非常重要,因此在细胞营养充分时, mTOR 诱导的 ATG1 解离有效阻止了细胞自噬^[21]。上述研究提示, mTOR 介导的自噬途径是细胞自噬的重要调节器,且这一过程受多种细胞因子及信号的影响。

基础状态下,足细胞依赖于极低水平的 mTOR 活性及高水平的自噬活性以维持自身动态平衡。当肾小球应激下改变这种平衡,导致 mTOR 活性增强和自噬活性减弱,则会造成足细胞损伤。Raptor 和 Rictor 分别是 mTORC1 和 mTORC2 非常重要的亚单位。Godel et al^[22] 通过特异性敲除足细胞 Raptor 和 Rictor 显示,剔除 Raptor 导致蛋白尿,足突变宽和消失,进行性肾小球硬化;而剔除 Rictor 的足细胞只是在应激(如用牛血清蛋白刺激)情况下表达出极小的表型变化,提示 mTORC2 对足细胞的作用不是十分明显;而同时剔除了 Raptor 和 Rictor 的足细胞直接导致肾脏衰竭和快速死亡。提示 mTORC1 活性降低可导致足细胞损伤,Raptor 和 Rictor 两者都敲除比单独敲除其中一个导致更严重的足细胞损伤, mTORC1 和 mTORC2 在足细胞发育中起着重要的协同作用。此外,研究^[23]表明过度激活 mTORC1 会引起小鼠肾小球系膜扩张、足细胞胞体增大、足突消失、肾小球硬化,并在 14 周龄时因肾衰竭而死亡。这些研究^[22-23]提示,体内不表达或过度表达 mTORC1 都会导致足细胞结构和功能的改变。糖尿病高血糖状态下 mTOR 过度表达,自噬被抑制,这种持久性的刺激导致足细胞衰退,出现蛋白尿及肾小球硬化。在给予糖尿病肾病小鼠雷帕霉素后,发现足突融合明显减少^[24]。而雷帕霉素参与调节足细胞自噬的机制可能在于其与 FK-结合蛋白 12(FK-BP12) 相结合,形成 RPM/FKBP12 复合物,阻碍 Raptor 和 mTOR 结合,从而影响 mTORC1 活性,

阻止细胞周期中 G₁ 期向 S 期转化,阻断细胞钙依赖性和非钙依赖性的信号传导通路,从而抑制蛋白质翻译的启动而实现^[25]。

综上所述,自噬普遍存在于真核细胞中,可以清除细胞中损伤或衰老的细胞器及生物大分子,具有保护细胞的作用。自噬是足细胞的一种自我保护机制,自噬体系失衡与足细胞病的发生、发展密切相关。随着研究的不断深入,其在足细胞病中的具体作用机制也将逐步明朗。寻求一种有效调控足细胞自噬平衡体系以阻抑足细胞损伤的途径是目前亟待解决的问题。从自噬的角度出发,有效调控肾小球足细胞自噬内稳态的重要“调节器”——mTOR 信号通路,或可为足细胞病的防治提供新思路。

参考文献

- [1] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research [J]. Cell, 2010, 140(3): 313-26.
- [2] Cuervo A M, Wong E. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging [J]. Cell Res, 2014, 24(1): 92-104.
- [3] Liu Y, Levine B. Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy [J]. Cell Death Differ, 2015, 22(3): 367-76.
- [4] Huber T B, Edelstein C L, Hartleben B, et al. Emerging role of autophagy in kidney function, diseases and aging [J]. Autophagy, 2012, 8(7): 1009-31.
- [5] Apel A, Zentgraf H, Büchler M W, et al. Autophagy-A double-edged sword in oncology [J]. Int J Cancer, 2009, 125(5): 991-5.
- [6] Wang P, Li M, Liu Q, et al. Detection of urinary podocytes and nephrin as markers for children with glomerular diseases [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2015, 240(2): 169-74.
- [7] Ichikawa I, Ma J, Motojima M, et al. Podocyte damage damages podocytes: autonomous vicious cycle that drives local spread of glomerular sclerosis [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2005, 14(3): 205-10.
- [8] Clark S L Jr. Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studied with the electron microscope [J]. J Biophys Biochem Cytol, 1957, 3(3): 349-62.
- [9] Berkenstam A, Ahlberg J, Glaumann H. Isolation and characterization of autophagic vacuoles from rat kidney cortex [J]. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1983, 44(3): 275-86.
- [10] Asanuma K, Tanida I, Shirato I, et al. MAP-1LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis [J]. FASEB J, 2003, 17(9): 1165-7.
- [11] Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, et al. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker [J]. Mol Biol Cell, 2004, 15(3): 1101-11.

机器人辅助先天性心脏病矫治术的治疗进展

张海洋 综述 葛建军 审校

摘要 微创心脏外科手术已经发展至机器人手术系统辅助下进行,相比传统心脏手术方式,机器人辅助手术因具有创伤小、恢复快等诸多优点而广泛地被临床医师和患者所接受,近年来在临床的应用越来越多,但其手术方式独特、系统的可操控性和远期效果评价尚处于探索阶段,需要大样本的案例循证分析。现简要综述机器人辅助先天性心脏病矫治术的治疗进展。

关键词 机器人;微创手术;先心病

中图分类号 R 654.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2015)08-1203-04

机器人手术系统是目前微创手术设备的典型代表,在其基础上诞生一系列微创外科手术,其作为一种全新的手术工具,具有操作精细、创伤小、术后恢复快等优点,已逐步应用于各微创外科领域。随着

心脏外科手术技术的发展、外科医师手术经验的不断丰富,大部分心脏外科手术已基本趋于成熟,而患者对于微创及术后美观的要求越来越高,微创心脏外科已经成为各大心脏中心研究的热点,从小切口心脏手术到传统腔镜心脏手术,再到现在的机器人辅助下心脏手术,正在不断努力以取得更完美的治疗效果。目前针对先天性心脏病(简称先心病)的外科治疗,经历了从传统正中开胸矫治手术到胸腔镜辅助小切口下矫治术,越来越趋向于微创,现已逐渐应用机器人手术系统进行矫治。因目前机器人手术系统不适宜于婴幼儿,该文将机器人辅助大龄儿及成年人先心病矫治术做一简要综述。

1 机器人手术系统的发展及先心病的治疗进展

1.1 机器人手术系统的发展 机器人外科手术系统的发展经历了三代手术系统的变革:第一代机器人外科手术系统为“伊索”(AESOP)^[1]机器人系统,由美国 Computer Motion 公司在 1994 年开发并研制成功。第二代机器人外科手术系统为“宙斯”(ZEUS)机器人系统,是在第一代机器人系统的基础上于 1998 年改进研发,其由术者操作台、3 只机械

2015-04-24 接收

基金项目:安徽省高校省级自然科学基金项目(编号: KJ2010A161)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院心脏外科,合肥 230022

作者简介:张海洋,男,硕士研究生;

葛建军,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: aygejianjun@163.com

- [12] Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, et al. Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(4): 1084-96.
- [13] Xiao T, Guan X, Nie L, et al. Rapamycin promotes podocyte autophagy and ameliorates renal injury in diabetic mice [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 394(1-2): 145-54.
- [14] Zeng C, Fan Y, Wu J, et al. Podocyte autophagic activity plays a protective role in renal injury and delays the progression of podocytopathies [J]. *J Pathol*, 2014, 234(2): 203-13.
- [15] Dunlop E A, Tee A R. mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36C: 121-9.
- [16] Jung C H, Ro S H, Cao J, et al. mTOR regulation of autophagy [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(7): 1287-95.
- [17] Laplante M, Sabatini D M. mTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(2): 274-93.
- [18] Vollenbroeker B, George B, Wolfgart M, et al. mTOR regulates expression of slit diaphragm proteins and cytoskeleton structure in podocytes [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(2): F418-26.

- [19] Russell R C, Tian Y, Yuan H, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7): 741-50.
- [20] Don A S, Tsang C K, Kazdoba T M, et al. Targeting mTOR as a novel therapeutic strategy for traumatic CNS injuries [J]. *Drug Discov Today*, 2012, 17(15-16): 861-8.
- [21] Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, et al. Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex [J]. *J Cell Biol* 2000, 150(6): 1507-13.
- [22] Gödel M, Hartleben B, Herbach N, et al. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2197-209.
- [23] Inoki K, Mori H, Wang J, et al. mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2181-96.
- [24] Inoki K. Role of TSC-mTOR pathway in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 82 Suppl 1: S59-62.
- [25] Inoki K, Huber T B. Mammalian target of rapamycin signaling in the podocyte [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2012, 21(3): 251-7.