

肝细胞凋亡研究新进展

唐 丹 综述,周晓梅 审校(四川电力医院内科,成都 610021)

【关键词】 肝细胞; 凋亡; 肿瘤细胞相关凋亡诱导配体

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.24.042 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)24-3019-03

肝细胞凋亡是多种肝脏疾病的共同病理表现,肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(tumor necrosis factor related apoptosis induced ligand, TRAIL)是近年来发现的肿瘤坏死因子(TNF)家族新成员,能快速诱导不同种类的转化细胞、肿瘤细胞和病毒感染细胞凋亡,并且在多种肝脏疾病中参与诱导肝细胞凋亡。作者就 TRAIL/死亡受体途径与肝脏损伤的相关性进行综述。

1 TRAIL/死亡受体途径

TRAIL 又称凋亡素 2 配体(apo2 ligand, Apo2L),属 II 型跨膜蛋白,由 Wiley 等^[1]在 1995 年从表达序列标签库(expressed sequenced tag)中发现、克隆并命名。其氨基酸序列具有 TNF 超家族的结构特征。TRAIL 最重要的生物学特点是选择性细胞毒作用^[2],即能够诱导肿瘤细胞、病毒感染细胞或转化细胞发生凋亡,但对绝大多数正常细胞无此作用。TRAIL 表达广泛,如人外周血淋巴细胞、单核细胞、肺、脾脏、前列腺、卵巢、小肠、结肠和胎盘等均有表达,但脑、肝和睾丸中无表达。TRAIL 对正常生理状态下的机体组织没有毒性,病理状态下被激活参与机体的免疫反应,被认为是机体一个典型的免疫监视分子。TRAIL 另一个重要特征是诱导凋亡具有种属特异性,重组人 TRAIL 蛋白能够诱导人类肝细胞大量凋亡,而对小鼠和非人类灵长目动物正常组织及器官无明显毒性作用。

TRAIL 通过特异性地与靶细胞表面的受体结合发挥作用。TRAIL 组织学分布的广泛性和选择性细胞毒作用,暗示其诱导细胞凋亡是通过严格的受体表达来调控^[3-4]。目前已发现 TRAIL 的受体有 5 种:2 种死亡受体 DR4 和 DR5,2 种诱骗受体 DcR1、DcR2 及可溶性受体骨保护素(Osteoprotegerin, OPG)^[5]。DR4 和 DR5 含有细胞质死亡区域(Death domain, DD)通过 Caspase 依赖的信号途径凋亡。DcR1 和 DcR2 细胞内缺乏功能性死亡域,与 TRAIL 结合后不介导凋亡,故又称为诱骗受体,其过度表达能够阻止 TRAIL 诱导细胞凋亡。以上 4 个受体的胞外区域有高度同源性。第 5 种受体是 OPG,作为诱骗受体也能够阻止 TRAIL 诱导的凋亡。受体的正常表达与否,是 TRAIL 诱导凋亡的关键调节因素。死亡受体 DR4、DR5 通过其胞外区与 TRAIL 结合并活化后,其细胞内的死亡结构域相互聚集,并进一步募集接头蛋白。接头蛋白接收到死亡受体传递的凋亡信号后,引起细胞内 Caspase 的前体(即 Procaspase)在其末端的局部募集和串联结合,从而形成“TRAIL-DR4、DR5-接头蛋白-Procaspase 分子”大分子复合体,即凋亡酶体(Apotosome)。而后分子中的 Procaspase 通过自身水解而成为有活性的 Caspase,并进一步激活 Caspase 级联反应,启动凋亡。

2 TRAIL/死亡受体途径与肝细胞凋亡

细胞凋亡以 DNA 发生特异性降解,形态上以出现核固缩、胞膜发泡和凋亡小体为特征。以往研究显示 TRAIL/死亡

受体途径参与多种肝脏损伤过程,下面着重介绍 TRAIL 在各种肝脏病理损伤中的作用。

2.1 TRAIL 与病毒性肝炎 TRAIL 及其死亡受体可以特异性地杀伤病毒感染的肝细胞,而体内未感染病毒的肝细胞仍对 TRAIL 诱导的凋亡耐受。Mundt 等^[6-7]利用病毒性肝炎的小鼠模型和肝炎患者的病理标本发现,慢性丙型肝炎患者的肝脏 TRAIL 表达增高,而急性肝炎病毒感染使肝细胞 DR5 表达上调。病毒感染后肝脏中 TRAIL 的高表达不依赖于淋巴细胞或自然杀伤(NK)细胞,提示 TRAIL 可能是机体通过肝细胞旁分泌的方式对抗病毒感染。Harry 等^[8]研究提示,人肝细胞感染乙型肝炎病毒(HBV)后,细胞内 HBV 复制水平增加,TRAIL 诱导凋亡作用随之增强,这种作用部分依赖于死亡受体表达的上调。另有研究者发现 HBV 转基因鼠的肝炎和肝细胞死亡可以被一种可溶性 TRAIL 受体通过拮抗 TRAIL 的功能而抑制^[9-10]。sDR5 能够通过阻断 TRAIL 诱导 HBV 感染的肝细胞凋亡,从而缓解肝脏损伤^[11]。肝炎病毒感染后组织 TRAIL 及其受体表达增高,可溶性 TRAIL 受体对肝脏损伤有拮抗作用,说明 TRAIL/死亡受体途径在病毒性肝炎造成的肝细胞凋亡中发挥着重要作用。Bax 蛋白和 HBX 蛋白在 TRAIL 诱导的凋亡中有重要作用。在肝癌细胞转染 HBV 或 HBX 蛋白能明显提高细胞对 TRAIL 诱导凋亡的敏感性,这与 Bax 蛋白的表达明显上调相关。应用 RNA 干扰技术敲除 Bax,可以阻断 HBV 诱导的肝炎和肝细胞凋亡^[9]。HBX 能够以剂量依赖的形式增加 HepG2 细胞的 TRAIL 表达和 mRNA 转录。HBX 转染的 HepG2 细胞通过 TRAIL 介导的形式杀伤原代人肝细胞。

总之,HBV 感染机体后,激活机体的免疫监视功能,众多免疫分子参与清除 HBV 感染细胞。TRAIL 对于 HBV 感染来说,一方面 HBV 激活 TRAIL 的表达,TRAIL 作为机体的一个有效的免疫监视分子,及时清除突变细胞和转化细胞;另一方面,TRAIL 在杀伤靶细胞的同时也有可能进一步加剧肝脏的损伤。

2.2 TRAIL 与酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD) 给大鼠长期喂饲乙醇,肝细胞凋亡比例会明显增加,且主要集中在肝小叶中央静脉末端的周围,这些病变在终止乙醇给予后可逆。临床各期的酒精性肝病患者活组织检查标本均发现细胞凋亡^[12]。既往研究显示,ALD 引起的肝细胞凋亡与可溶性 TNF- α 及细胞毒性 T 淋巴细胞的膜性 TNF- β 有关,它通过与 TNF 受体 1、2 结合后诱导细胞凋亡。另外,酒精性肝炎患者的肝脏 Fas 受体表达阳性,且肝细胞 FasL 表达增强^[13]。而细胞毒性 T 淋巴细胞也可以通过 Fas 受体-配体相互作用,促进肝细胞凋亡^[14]。近期研究显示,TRAIL/死亡受体途径也参与了 ALD 引起的肝脏病理损伤。Mundt 等^[6]研究提示,摄入乙醇后鼠肝 TRAIL 表达上调且出现脂肪变性,这个过程可以被 TRAIL 的拮抗剂所阻断。TRAIL 引起的凋亡和脂肪变性可

能是病毒感染和摄入乙醇后单独调节的结果。TRAIL 是摄入乙醇后肝脏脂肪变性和凋亡的新调节因子。

2.3 TRAIL 与胆源性肝损伤 胆道梗阻引起肝细胞分泌及胆汁排泄障碍,肝细胞内外胆汁浓度升高。体外实验表现,胆红素与胆汁酸可使鼠肝细胞发生凋亡,且呈浓度依赖与时间依赖效应^[15]。尽管已明确 Fas/FasL 在胆酸的细胞毒性作用中起重要作用,研究显示其他死亡受体途径也参与其中。Hajime 等^[15]应用 Fas 缺失细胞 HuH-7 发现胆酸诱导的细胞凋亡呈时间和浓度依赖。通过转染显性负相 Fas 相关死亡域蛋白可以缓解细胞凋亡和线粒体细胞色素 C 的释放。RT-PCR 证实,胆酸刺激使肝细胞表达 TNFR1、DR5 和 TRAIL,但不表达 TNF- α 。胆酸刺激引起 DR5 在细胞内聚集,通过上调 DR5 表达致敏肝细胞发生 TRAIL 诱导的凋亡。DR5 mRNA 和蛋白表达上调 10 倍,而 DR4 没有变化。此过程主要通过细胞内 JNK 信号途径调节^[16],JNK 抑制剂 SP600125 可以阻断胆酸诱导的 DR5 mRNA 和蛋白的上调表达。

2.4 TRAIL 与肝脏肿瘤 TRAIL/死亡受体途径是目前肿瘤学领域的研究热点。一方面,TRAIL 介导的凋亡直接通过激活级联反应与基因无关;另一方面,FasL 与 TNF 的临床应用因其严重不良反应而受到限制,而 TRAIL 具有选择性细胞毒作用,对大多正常细胞无损伤,利用 TRAIL 诱导恶变细胞凋亡治疗肿瘤的报道越来越多。何松青等^[17]采用原位杂交法检测了 60 例肝癌组织和 2 种肝癌细胞株的 TRAIL 表达,发现肝癌组织中死亡受体的表达量显著强于正常肝组织,两种肝癌细胞株中检测到 DR5、DR4、DcR2 的表达,但 DcR1 表达缺失。Walczak 等^[18]发现,将 TRAIL 注入肿瘤小鼠体内可抑制肿瘤生长而无任何明显不良反应。Ashkenazi 等^[19]将 TRAIL 注入猴体内亦发现同样的现象,且发现 TRAIL 与化疗药物有协同抗肿瘤作用。体外实验同样显示,许多化疗药物可增强 TRAIL 抗肿瘤的作用,对 TRAIL 不敏感的肿瘤细胞株在化疗药物作用下可变得对 TRAIL 敏感^[20-21]。TRAIL 选择性杀伤靶细胞的特性使其在肿瘤治疗方面有着诱人的前景。

2.5 TRAIL 与肝脏缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI) HIRI 见于多种临床病理和手术过程,是多细胞参与、多介质共同作用的、复杂的病理过程。Borghi 等^[22]观察了 16 例患者原位肝移植术后细胞凋亡情况,整个切片肝细胞凋亡指数为 18.7%,肝被膜下区为 30.4%,小叶中央区为 14.5%,门静脉周围区为 10.3%。HIRI 是肝细胞凋亡的原因^[23]。国外有学者报道,在人同种异体肝移植短暂缺血再灌注后的凋亡定量分析中,有约 20% 的肝细胞发生凋亡,提示凋亡是早期移植损伤的表现,细胞凋亡与 HIRI 密切相关。Cao 等^[24]利用健康人肝细胞株 HL-7702 建立体外缺氧/再给氧的细胞模型,单纯模拟 HIRI 过程。研究发现,缺氧处理后再给氧,各时间点 (0~20 h) DR5 mRNA 和蛋白表达明显上调,再给氧 2 h 达峰值。缺氧可明显提高外源性 TRAIL 活性蛋白对肝细胞的毒性。缺氧后给予 TRAIL,肝细胞凋亡率较未缺氧组明显增加。实验结果提示 HIRI 通过 TRAIL/死亡受体途径引起肝细胞凋亡。

3 结 论

细胞凋亡涉及许多不同的介导因子,如 Fas、TNF- α 、TNF- β 和 Bcl-2 家族在许多不同的肝损伤中均可发挥作用,而 TRAIL/死亡受体途径参与多种肝脏病理损伤。深入研究 TRAIL/死亡受体途径在肝损伤中的作用机制具有重大的理论和实际意义。

参考文献

- [1] Wiley SB, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induce apoptosis[J]. *Immunity*, 1995, 3(8): 673-682.
- [2] Griffith TS, Lynch DH. TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms[J]. *Curr Opin Immunol*, 1998, 10(5): 559-563.
- [3] Marsters SA, Pitti RA, Sheridan JP, et al. Control of apoptosis signaling by Apo-2 ligand[J]. *Recent Prog Horm Res*, 1999, 54(3): 225-234.
- [4] Golstein P. Cell death: TRAIL and its receptors[J]. *Curr Biol*, 1997, 7(12): R750-753.
- [5] Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptor[J]. *Science*, 1997, 277(10): 818-821.
- [6] Mundt B, Wirth T, Zender L, et al. Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) induces hepatic steatosis in viral hepatitis and after alcohol intake[J]. *Gut*, 2005, 54(10): 1590-1596.
- [7] Mundt B, Florian K, Zender L, et al. Involvement of TRAIL and its receptors in viral hepatitis[J]. *FASEB J*, 2003, 17(2): 94-96.
- [8] Harry LA, Janssen L, Hajime H, et al. Hepatitis B virus enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) cytotoxicity by increasing TRAIL-R1/death receptor 4 expression[J]. *J Hepato*, 2003, 39(5): 414-420.
- [9] Liang XH, Liu YG, Zhang Q, et al. Hepatitis B virus sensitizes hepatocytes to TRAIL-induced apoptosis through bax[J]. *J Immunol*, 2007, 178(6): 503-510.
- [10] Liu YG, Liu SX, Liang XH, et al. Blockade of TRAIL pathway ameliorates HBV-induced hepatocyte apoptosis in an acute hepatitis model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352(2): 329-334.
- [11] Yang YD, Zheng L, Lv GC, et al. Hepatocytes treated with HBV X protein as cytotoxic effectors kill primary hepatocytes by TNF-alpha-related apoptosis-induced ligand-mediated mechanism[J]. *Intervirology*, 2007, 50(2): 323-327.
- [12] Nanji AA. Apoptosis and alcoholic liver disease[J]. *Semin Liver Dis*, 1998, 18(2): 187-190.
- [13] Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, et al. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice[J]. *Nature*, 1993, 364(6): 806-809.
- [14] Ando K, Guidotti LG, Wirth S, et al. Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes are directly cytopathic for their target cells in vivo[J]. *J Immunol*, 1994, 152(16): 3245-3253.
- [15] Hajime H, Steven F, Bronk H, et al. The bile acid glycochenodeoxycholate induces TRAIL-receptor 2/DR5 expression and apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2005, 276(42): 38610-38618.
- [16] Hajime H, Annette G, Ali C, et al. Bile acids up-regulate death receptor 5/TRAIL-receptor 2 expression via a c-Jun

- N-terminal kinase-dependent pathway involving Sp1[J]. J Biol Chem, 2009, 279(1): 51-60.
- [17] 何松青, 陈孝平, 赵永忠, 等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体受体对肝细胞肝癌的抑制作用[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(8): 708-710.
- [18] Walczak H, Miller RE, Ariail K, et al. Tumorcidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo[J]. Nat Med, 1999, 5(2): 157-163.
- [19] Ashkenazi A, Pai RC, Fang S, et al. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand[J]. J Clin Invest, 1999, 104(2): 155-162.
- [20] Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy[J]. Apoptosis, 2002, 7(5): 449-459.
- [21] Naka T, Sugamura K, Hylan der BL, et al. Effects of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand alone and in combination with chemotherapeutic agents on patients colon tumors grown in SCID mice[J]. Cancer Res, 2002, 62(20): 5800-5806.
- [22] Borghi SG, Scoazee JY, Durand F, et al. Apoptosis after ischemia reperfusion in human liver transplant[J]. Liver Transpl Surg, 1997, 3(4): 407-415.
- [23] Rudiger HA, Graf R, Clavien PA. Liver ischemia: apoptosis as a central mechanism of injury[J]. J Invest Surg, 2003, 16(3): 149-159.
- [24] Cao L, Li Y, Cheng F, et al. Hypoxia/reoxygenation up-regulated the expression of death receptor 5 and enhanced apoptosis in human hepatocyte line[J]. Transplant Proc, 2006, 38(15): 2207-2209.

(收稿日期: 2011-09-23)

剖宫产麻醉方式及应用

郑 隽, 张兴安, 邵伟栋 综述, 徐 波 审校(广州军区总医院全军临床麻醉中心, 广州 510010)

【关键词】 剖宫产; 麻醉方式; 椎管内

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2011. 24. 043 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)24-3021-03

世界卫生组织(WHO)将剖宫产比率的警戒线设置为 15%, 但是我国的大多数医院剖宫产比率高达 40%~60%, 有些医院甚至超过 70%, 剖宫产成了一项被产妇广泛选择的产科手术^[1]。随着剖宫产术式的不断改进, 其对麻醉的要求以及方式也在发生着变化, 作者在多年的剖宫产麻醉实践基础之上, 结合近年各类临床和实验研究成果, 对剖宫产麻醉方式及应用进行综述。

1 妊娠妇女的生理变化对麻醉的影响

1.1 循环系统变化 循环系统的改变是从妊娠早期就开始, 一直持续到妊娠的中晚期。心脏每搏输出量增加 25%, 心率平均增加 25%, 使心脏排血量增加 50%^[2], 产后 2~6 周恢复正常。妊娠 20 周后, 变大的子宫对腹主动脉及下腔静脉产生压迫, 尤其在仰卧时更为突出。如此可致静脉回流减少, 心排血量下降, 子宫胎盘血流减少, 极易发生仰卧位低血压综合征。这就要求麻醉医生注意在实施麻醉操作和麻醉管理的过程中合理安置患者的体位。此外, 下腔静脉受压促使脊椎静脉丛血流增加, 静脉丛扩张导致硬膜外间隙和蛛网膜下腔容积变小, 因而较少的局部麻醉(局麻)药即可得到较广泛的阻滞范围, 但同时增加了穿刺出血和血肿的发生率。

1.2 呼吸系统变化 妊娠期由于上呼吸道黏膜增厚, 毛细血管轻度充血、扩张、水肿, 以及咽喉气管水肿, 增加了气管插管难度和口鼻黏膜损伤的风险^[3]。由于子宫上移, 膈肌受限, 孕妇的呼吸模式变为以腹式呼吸为主, 到妊娠末期, 其腹式呼吸也受限, 代偿能力极差, 因此, 麻醉期间应强调吸氧并加强呼吸管理, 椎管内麻醉时应防止平面过高。妊娠期间孕妇的基础代谢和耗氧量均明显增加, 孕妇在气管插管呼吸停止期间易出现低氧血症^[4]。

1.3 消化系统变化 妊娠期孕妇受大量激素的影响, 齿龈肿胀充血, 口腔酸度增加, 再加上钙质的流失易致齿龈出血和牙齿松动。黄体激素的增加导致胃肠平滑肌张力降低, 食管括约肌松弛, 同时子宫颈部不断上升, 胃内酸性内容物逆流至食管

下段产生胃烧灼感。胃液中游离盐酸及胃蛋白酶分泌减少, 胃排空时间延长, 特别在分娩期间易出现上腹饱胀感。以上消化系统生理变化结果显示, 孕妇麻醉期间应考虑到其呕吐、反流以及误吸的危险性增加。

1.4 脊柱和椎管的变化 孕妇为了维持体位的平衡, 腰椎会发生代偿性向前突出, 硬膜外腔变窄, 给椎管内麻醉穿刺带来一定的困难。当椎管内麻醉时, 单位容量的局麻药扩散的节段较多, 影响调节预定的麻醉平面。由于腹内压的增高, 硬膜外静脉扩张, 从而使硬膜外间隙容积减小, 置入硬膜外导管时, 血性回流更为常见, 相对更易发生局麻药毒性反应。因此, 孕妇的麻醉用药量应较常人减少。

2 剖宫产术的不同麻醉方式

2.1 硬膜外间隙阻滞(EA) EA 又名硬膜外麻醉, 其穿刺点多选择在 L_{1~2} 或 L_{2~3} 椎间隙, 向头置管 3~4 cm, 麻醉平面控制在 T₆ 以下, 常用的硬膜外局麻药物有布比卡因、利多卡因和丁卡因。近年来, 新型酰胺类局麻药罗哌卡因用于剖宫产麻醉获得了良好的临床效果。EA 的优点是操作简单, 并发症少, 效果确切, 对母婴不良反应小。EA 为节段性阻滞, 麻醉药自注药点可向两端扩散 4~5 对脊神经^[5], 由于阻滞区的血管扩张, 动静脉压力下降, 可减轻心脏前后负荷, 同时增加脐血流而不增加其血管阻力, 对胎儿有利^[6]。但 EA 有时不能完全消除盆腔深部的牵拉, 产妇应激反应较大, 不利于母体健康, 同时 EA 阻滞平面出现较慢, 阻滞不全发生率较高, 甚至达 25% 以上^[7]。若出现胎儿宫内窘迫, 手术医生为了快速娩出胎儿, 在阻滞还未完善时即开始手术, 给产妇带来一定痛苦, 也给手术医生造成一定的困难。

2.2 蛛网膜下腔阻滞 蛛网膜下腔阻滞简称腰麻, 穿刺点常选择 L_{3~4} 或 L_{2~3} 椎间隙, 麻醉平面控制在 T₈ 以下。腰麻药物选择丁卡因或布比卡因。腰麻用于剖宫产在国内外较普遍, 其优点在于操作简便、用药剂量小、麻醉作用迅速、镇痛肌松效果较满意, 但麻醉时间受限, 术后无法连接镇痛泵, 并发症相对较