分 类 号：R56　　学校代码：10062
密　　级：　　学　　号：2012601124
学位类别： 科学学位□　　专业学位☑　　学科门类：医学

天津醫科大學
TIANJIN MEDICAL UNIVERSITY

博 士 学 位 论 文

DOCTORAL DISSERTATION

论文题目：间歇低氧对肝脏损伤机制及自噬在肝脏中作用机制的探讨

T I T L E　Investigation of the molecular mechanismo of IH induced hepatic injure and the effect of autophagy in Liver

一级学科：临床医学

二级学科：内科学

呼吸系病

论文作者：邵红霞

指导教师：吴琦 教授

导师组成员：孙昕 主任医师

陈怀永 研究员

天 津 医 科 大 学 研 究 生 院

二〇一六年五月

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

学位论文原创性声明

本人郑重声明：所呈交的论文是我个人在导师指导下独立进行研究工作取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容和致谢的地方外，论文中不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果，与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

学位论文作者签名：[signature] 日期：2016年5月31日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解天津医科大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，并采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编以供查阅和借阅。同意学校向国家有关部门或机构送交论文，并编入有关数据库。

保密 □，在 _____年解密后适用本授权书。

本论文属于

不保密 ☑ 。

（请在相对应的方框内打“√”）

学位论文作者签名：[signature] 日期：2016年5月31日

导 师 签 名：[signature] 日期：2016年5月31日

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

中文摘要

目的：阻塞性睡眠呼吸暂停（Obstructive sleep apnea，OSA）是常见的呼吸系统疾病，据统计有超过 10%的人群罹患此病。OSA 对于身体的严重危害及致死率增加，主要是因为 OSA 常合并糖尿病，代谢综合征，心血管系统疾病等。目前很多证据显示，由于 OSA 患者发生了气体交换障碍（反复低血氧和高碳酸血症）的病生理改变，即慢性间歇低氧（chronic intermittent hypoxia，CIH），导致前炎症因子产物增多，血管内皮功能紊乱，氧化应激，代谢调节异常和胰岛素抵抗等。因为肝脏在人体是十分重要的代谢器官，肝细胞对各种内源性和外源性刺激如病毒感染、炎症、营养等非常敏感，现有很多报道 OSA 与肝脏的非酒精性脂肪性肝病（nonalcoholic fatty liver disease，NAFLD）有关。本研究旨在通过间歇低氧动物模型探讨间歇低氧引起的肝脏损害，对肝脏药物代谢酶细胞色素酶 P450（Cytochrome P450，CYPs）的影响及作用机制，从自噬角度对间歇低氧的作用做了进一步探讨。我们的实验证实糖皮质激素受体（glucocorticoid receptor，GR）对大鼠肝脏细胞色素酶 P450（Cyps）的表达有重要的调控作用，并且对自噬有一定影响，所以我们又通过人的正常肝细胞 LO2 细胞初步探讨糖皮质激素在人肝脏细胞 CYPs 代谢的影响及自噬中的作用。

方法：

1.建立间歇低氧（intermittent hypoxia，IH）大鼠模型，将 30 只大鼠采用随机数字表法随机分为 2 组（按照每组 15 只分组）：IH 组和对照组。

2.大鼠肝脏组织进行固定、包埋、病理切片，然后进行苏木素-伊红(HE)染色，观察肝组织形态学改变。

3.通过实时定量 PCR 方法测定炎症因子、Cyps、NF-κB、核受体的相对基因表达量。

4.使用实时定量 PCR 法分析肝脏自噬相关蛋白的基因表达。

5.将人正常肝细胞 LO2 肝细胞进行常规培养，然后传代，将传代细胞按顺序分别接种于 6 孔板，根据加入药物不同，分为对照组，糖皮质激素（地塞米松，DEX）组和糖皮质激素+糖皮质激素受体拮抗剂（DEX+R）组；对照组：正常细胞培养；DEX 组：加入地塞米松进行培养；DEX+R 组：在 DEX 组基础上加用糖皮质激素受体拮抗剂。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

6.通过倒置显微镜观察人肝细胞 LO2 细胞形态的改变及生长情况变化并进行拍照。

7.通过实时定量 PCR 方法测定肝细胞 LO2 细胞 Cyps 的相对基因表达量。

8.使用实时定量 PCR 法分析测定肝细胞 LO2 细胞自噬相关蛋白的基因表达。

结果：

1.对照组和间歇低氧组大鼠肝组织病理形态学改变：对照组：肝小叶结构完整，窦状隙及汇管区未见明显增宽及结构紊乱，肝细胞胞膜完整，胞质丰富，胞核形态正常，与正常肝组织无差异；间歇低氧组：肝小叶结构完整，窦状隙呈轻度增宽，肝细胞结构完整，汇管区可见少许炎细胞浸润，以淋巴细胞为主，少许肝细胞胞质稀疏。

2.肝组织炎症介质 mRNA 相对表达量的改变：IH 组 IL-1β、IL-6、TNFα mRNA 相对表达量较对照组升高。

3.肝组织 NF-κB mRNA 相对表达量的改变 :IH 组 NF-κB mRNA 相对表达量较对照组显著升高。

4.核受体 mRNA 相对表达量的改变：IH 组 PXR、GR、CAR mRNA 相对表达量较对照组下调。

5.细胞色素氧化酶 P450 （Cyps）mRNA 相对表达量的改变：IH 组 Cyp1A2、Cyp2D4、Cyp3A2 mRNA 相对表达量较对照组下降有统计学差异；Cyp2C9、Cyp2C19 mRNA 相对表达量与对照组相比无明显差异。

6.细胞自噬相关基因（Atg）相对表达量的改变：IH 组与对照组相比，AMPK，mTOR，Beclin1，Atg5，Atg12，Atg13，ULK1 均有相应改变但无统计学意义，LC3 与 WIPI 的变化有统计学意义。

7.肝 LO2 细胞生长情况：地塞米松组 LO2 细胞生长变形，呈梭形生长，而加入糖皮质激素受体拮抗剂组，LO2 细胞生长与对照组相同，为正常细胞形态。

8.肝 LO2 细胞 Cyps 表达：通过荧光实时定量 PCR 详细阐述了各组人细胞色素酶 P450（hCYP450）中 hCYP1A2、hCYP2C9、hCYP2C19、hCYP2D6、hCYP3A4 mRNA 在人肝脏 LO2 细胞中的相对表达量。与对照组相比，Dex 组人肝脏 LO2 细胞的 hCYP1A2、hCYP2C19、hCYP3A4 mRNA 表达量上调，相应的，Dex+R 组人肝脏 LO2 细胞的上述基因表达下调，且有统计学差异($p < 0.05$)；而 Dex 组人肝脏 LO2 细胞的 hCYP2C9 基因表达量较对照组为下降趋势，hCYP2D6 基因表达量较对照组无显著变化

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

9.肝 LO2 细胞自噬相关基因的表达：通过荧光实时定量 PCR 详细阐述了各组细胞的自噬相关基因的相对表达量。测定结果发现，与对照组相比，除 Dex 组人肝脏 LO2 细胞的 Beclin1 mRNA 表达量下调 ($p < 0.05$)外，余细胞自噬相关的基因及参与自噬过程的自噬相关蛋白的基因表达量较对照组均无显著变化。

结论：

1. 间歇低氧可以引起肝脏结构改变，促进炎性因子释放，并通过 NF-κB-核受体通路来影响细胞色素酶 Cyps 的表达；

2. 间歇低氧可以通过糖皮质激素受体通路诱导肝脏自噬，保护肝脏避免凋亡发生；

3. 糖皮质激素可以影响肝细胞生长，并使细胞色素 Cyps 表达受影响；但是从实验数据来看，对肝细胞自噬发生没有诱导作用。

关键词：间歇低氧　炎症因子　CYP　自噬　LO2 细胞　核受体

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Abstract

Objective： Obstructive sleep apnea (OSA) is a common sleep disorder in which complete or partial airway obstruction, caused by pharyngeal collapse during sleep, determines loud snoring or choking, frequent awakenings, disrupted sleep, and excessive daytime sleepiness. OSA affects over 4% of the general population. The growing clinical relevance of OSA is due to its emerging association with diabetes mellitus, metabolic syndrome, and cardiovascular disease (CVD), independent of other traditional cardiometabolic risk factors and obesity. A lot of evidence suggests that the pathophysiological alteration in gas exchange (repetitive hypoxemic and hyper-capnic events), called chronic intermittent hypoxia (CIH), can lead to increased proinflammatory cytokine production, endothelial dysfunction, oxidative stress, metabolic dysregulation, and insulin resistance. Experimental evidence suggests that CIH may trigger liver injury, inflammation, and fibrogenesis, and, interestingly, OSAS is also believed to be one of the elements promoting the evolution of NAFLD from steatosis tononalcoholic steatohepatitis (NASH). In this study we establish intermittent hypoxia animal model, and aims to observe the structure and the pathological changes of liver tissue, preliminarily explore the inflammation response induced by intermittent hypoxia in the process of changes of hepatic cytochrome P450 enzyme and its regulating mechanism. Further， we study the effect of glococorticoid on expression of Cyp and regulation in autophagy by human LO2 cells.

Method：

1. Establish intermittent hypoxia animal model, 30 rats were randomly divided in to intermittent hypoxia group and control group with the random number table (each group has 15 rats).
2. The morphology manifestations of liver tissues were evaluated.
3. The relative gene expression of inflammation factors, Cyps, NF-kappa B, nuclear receptors was evaluated through real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay.
4. The relative gene expression of autophagy associated gene was evaluated.
5. LO2 cells were maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM l-glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 μg/ml streptomycin. In the experiments as indicated, Dex was added to the culture medium at 10 nM and

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

RU486 at 10 μM.

6. The morphology manifestations of LO2 cells were evaluated.

7. The relative gene expression of Cyps in LO2 cells were evaluated through real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) assay.

8. The relative gene expression of autophagy associated gene in LO2 cells was evaluated.

Result:

1. Examination of liver tissues by H&E staining showed inflammatory infiltrates in rats with IH exposure as compared to control group.

2. Message RNA expression of IL-1β、IL-6、TNFα mRNA was greater in livers from IH group than those from control group.

3. Message RNA expression of NF-kappa B was higher in livers from IH group than those from control group.

4.The hepatic mRNA expression of PXR、CAR and GR was significantly reduced in IH group as compared to control group.

5. The hepatic mRNA expression level of Cyps decreased in IH group ;but Cyp1A2、Cyp2D4、Cyp3A2 mRNA was significantly reduce in IH group, in contrast, the change of Cyp2C9、Cyp2C19 mRNA has non-significantly statistics.

6. The expression of mTOR, a blocker of autophagy, was decreased but not significantly in IH group as compared to control group. However, the expression of AMP-activated protein kinase (Ampk), a negative regulator of mTOR pathway, was elevated when rats were exposed to IH. And the expression of LC3 and WIPI, a positive regulator of mTOR pathway, was decreased in IH group as compared to control group.

7. The morphology of LO2 cells treated by DEX is abnormal compared with control group and DEX+antagonist group.

8. The mRNA expression level of hCYP1A2、hCYP2C19、hCYP3A4 mRNA sianificantly decreased in LO2 cells treated by DEX compared with control group, reversed by DEX antagonist; the mRNA expression level of hCYP2C9 was decreased with DEX treated and hCYP2D6 was non-significantly in the three groups.

9. The expression of autophagy associated gene almost has non-significantly except Beclin1.

Conclution:

1. Intermittent hypoxia exposed can induce change of liver structure, promote

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

the inflammatory cytokines secretion, and regulate the expression of Cyps.

2. IH induced autophagy of hepatocytes by glucocorticoid receptor pathway, consequencely avoiding apoptosis of hepatocytes.
3. Glucocorticords influenced the morphology of human LO2 cells and regulate the expression of Cyps, but no evidence shows the inclined to induce autophagy.

Keywords：intermittent hypoxia inflammatory cytokines LO2 cells CYP autophy nuclear receptor

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

目录

中文摘要 I
Abstract IV
缩略语/符号说明 IX
前言 1
研究现状、成果 1
研究目的、方法 3
一、间歇低氧对大鼠肝脏损害及药物代谢酶影响 6
1.1 材料和方法 6
1.1.1 实验动物 6
1.1.2 实验设备和材料 6
1.1.3 实验方法 9
1.1.4 统计分析 13
1.2 结果 13
1.2.1 实验大鼠肝组织病理学形态观察 13
1.2.2 肝组织炎症介质 mRNA 定量 PCR 结果 14
1.2.3 肝组织 Cyp450 mRNA 相对表达量结果 15
1.2.4 肝组织中 NF-κB mRNA 相对表达量结果 16
1.2.5 肝组织中核受体 mRNA 相对表达量结果 16
1.3 讨论 17
1.3.1 阻塞性睡眠呼吸暂停与器官损害： 17
1.3.2 间歇低氧引起肝脏的损害： 20
1.3.3 NF-κB-核受体通路在肝脏中的作用 22
1.4 小结 26
二、间歇低氧对大鼠肝脏自噬的影响 27
2.1 材料和方法 27
2.1.1 实验动物 27
2.1.2 实验动物分组 27
2.1.3 间歇低氧大鼠模型建立 28
2.1.4 总 RNA 提取及实时定量 PCR 28
2.1.5 统计分析 30
2.2 结果 30
2.3 讨论 31
2.3.1 自噬的发生及信号转导 31
2.3.2 自噬相关蛋白在自噬中的作用 37
2.3.3 间歇低氧与细胞自噬 40
2.4 小结 43
三、糖皮质激素在肝细胞自噬中的作用 44
3.1 材料和方法 44

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.1.1 实验材料 44
3.1.2 实验试剂及材料 44
3.1.3 主要实验仪器及耗材 45
3.1.4 细胞培养及处理 46
3.1.5 人肝脏 LO2 细胞总 RNA 提取及 *Qrt-PCR* 47
3.1.6 统计分析 50
3.2 实验结果 51
3.2.1 肝正常细胞 LO2 细胞形态及生长情况 51
3.2.2 人肝脏 LO2 细胞细胞色素氧化酶 P450 的表达 52
3.2.3 人肝脏 LO2 细胞自噬相关基因表达结果 52
3.3 讨论 53
3.3.1 自噬在肝脏中的作用 53
3.3.2 自噬介导的肝脏代谢 55
3.3.3 糖皮质激素在自噬中的作用 58
全文结论 61
论文创新点 62
参考文献 63
发表论文和参加科研情况说明 72
附录 73
综述 74
综述参考文献 83
致谢 94
个人简历 96

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

缩略语/符号说明

缩写	英文全称	中文全称
OSA	Obstructive sleep apnea	阻塞性睡眠呼吸暂停
IH	Intermittent hypoxia	间歇低氧
ROS	Reactive Oxygen Species	活性氧
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease	非酒精性脂肪性肝病
HE	Hematoxylin and eosin (H&E) Staining	苏木精-伊红染色
NF-κB	Nuclear Factor-κB	核因子 kappa B
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链反应
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
Qrt-PCR	quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction	实时定量聚合酶链反应
RT-PCR	Reverse Transcription-PCR	逆转录聚合酶链反应
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α	肿瘤坏死因子-α
CYP450	cytochrome P450	细胞色素氧化酶 P450
IL-1β	interleukin-1 β	白介素-1β
IL-6	interleukin-6	白介素-6
PXR	Pregnane X receptor	孕烷 X 受体
CAR	Constitutive androstane receptor	雄甾烷受体
GR	glucocorticoid receptor	糖皮质激素受体
Atg	Autophagy-Related Protein	自噬相关蛋白
mTOR	mammals target of rapamycin	哺乳动物雷帕霉素靶位蛋白
AMPK	AMP-activated protein kinase	腺苷酸活化蛋白激酶
DMEs	Drugs-assosiated Metabolism enzymes	药物代谢酶
HIF1-α	hypoxia-inducible factor1-α	低氧诱导因子 1-α
CNV	Copy number variation	拷贝数变异
IκB	inhibitor of NF-κB	核因子 κB 抑制剂
IKK	IκB kinase	IκB 激酶

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

缩写	英文全称	中文全称
Kinase	enzyme that transfers phosphate groups from high-energy donor molecules, such as ATP, to specific substrates	激酶
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3	微管相关蛋白 1 轻链 3
PRAS40	Proline-rich Akt substrate 40 kDa	脯氨酸 Akt 底物 40 kDa
Raptor	regulatory-associated protein of mTOR	mTOR 调控相关蛋白
PI3Kinase	PI3Kinase	第 III 类磷脂酰肌醇激酶
UVRAG	UV irradiation resistance-associated gene	紫外线抵抗相关基因
TGN	trans-Golgi network	反面高尔基体
BCL-2	B-cell lymphoma 2	B 细胞淋巴瘤-2
BAX	BCL2-Associated X	BCL-2 同源的水溶性相关蛋白
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization	线粒体外模通透性
ACD	autophagic cell death	自噬性细胞死亡
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion	药物在体内的吸收、分布、代谢及清除
HNF4α	Hepatocyte nuclear factor 4 alpha	肝核因子 4α
VDR	vitamin D receptor	维生素 D 受体
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor	过氧物酶增殖体激动受体
LXR	liver X receptor	肝脏 X 受体
SNP	Single nucleotide polymorphisms	单核苷酸多态性
SDB	sleep-disordered breathing	睡眠障碍性呼吸

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

前言

研究现状、成果

阻塞性睡眠呼吸暂停（Obstructive sleep apnea，OSA）是常见的呼吸系统疾病，指睡眠过程中反复出现上呼吸道塌陷导致睡眠紊乱和慢性间歇低氧。据统计，OSA 在男性中发病率约为 17.6%，在女性中约为 7.5%，但是在肥胖人群中超过 30-50%罹患 OSA[1]。OSA 的临床症状通常表现为白天嗜睡，疲劳，打鼾，睡眠中呼吸暂停，窒息等。疾病初期，OSA 的临床症状较轻，在日常生活中常常被忽视，不被认为是疾病。随着症状加重，可能数年后才能诊断 OSA，但此时已引起不可逆的身体损害[2]。OSA 最常见的是心血管系统损害，如冠心病，肺动脉高压，心律失常等，故 OSA 患者的死亡率大大增加[3]。

OSA 在肥胖患者中发病率较高，随着物质生活丰富，肥胖人群增多，OSA 的患病率也随之增加。同时，OSA 患者通常合并代谢紊乱，包括内脏脂肪堆积、高血压、高血脂和胰岛素抵抗等，所以 OSA 的代谢紊乱很难排除与肥胖有关[4]。但是，最近很多研究显示，OSA 引起的代谢紊乱，与夜间低氧有关，而不是依赖于肥胖[3, 5, 6]。如通过鼠的间歇低氧模型模仿 OSA 患者的低氧状态，结果发现低氧可以导致胰岛素抵抗，糖耐量异常，脂代谢紊乱等。对健康非肥胖人群进行低氧试验，同样可以出现胰岛素抵抗；同时发现，OSA 患者通过持续气道正压通气（Continuous Positive Airway Pressure，CPAP）可以改善胰岛素抵抗和血脂紊乱的状况。OSA 导致的间歇低氧（Intermittent Hypoxia，IH）是引起代谢紊乱的主要原因，其机制也在很多文章中探讨过[7]。在 OSA 患者中，反复的低氧—复氧与缺血再灌注过程相似，可以产生活性氧（Reactive Oxygen Species，ROS），引起血管损伤[8]。ROS 相关的转录因子可以导致炎症因子和血管收缩因子过表达，从而进一步损伤血管内皮，降低血管舒张介质，促使脂代谢紊乱，致动脉粥样硬化，高血压，心血管意外等[8, 9]。实验证实，给予实验动物中等程度的间歇低氧（SaO_2 最低水平在 90% 左右）即可引起氧化应激及血脂水平改变。

OSA 低氧导致的机体损害常见于脑，心血管方面及代谢紊乱。最近的研究报道很多 OSA 患者合并肝酶异常和脂肪肝[10, 11]。非酒精性脂肪性肝病（Non

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Alcoholic Fatty Liver Disease，NAFLD）被认为是与代谢综合症相关（胰岛素抵抗）的肝脏损害，可以表现为脂肪肝，非酒精性脂肪性肝炎（Nonalcoholic steatohepatitis，NASH），肝硬化，甚至肝癌。流行病学调查发现，OSA 合并非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）的人群越来越多，并且，临床研究发现 OSA 较正常人转氨酶水平升高约 20-50%。越来越多的证据表明，OSA 与 NAFLD 是具有相关性的疾病，因为两者有共同的发生机制：如胰岛素抵抗和内脏脂肪堆积，所以两者的关系被更多的认为是“共同受害者”而不是因果关系。但是，在一些非肥胖 OSA 中，慢性间歇低氧同样可以导致脂肪肝和炎症反应，这表明 OSA 是引起 NAFLD 的原因[12]。

OSA 引起肝损害的机制可能与过氧硝酸盐形成，谷胱甘肽过度消耗和肝细胞凋亡有关。在 OSA 患者中，炎症因子，如白介素（Interlukin，IL），肿瘤坏死因子（Tumor necrosis Factor，TNF）-α，NF-κB，可以全身性激活。NF-κB 是主要的炎症调节因子，它可以被 IKK-b 抑制，但它激活时可以导致肿瘤坏死因子 TNF-α、IL-1、IL-6 和诱导性一氧化氮酶（iNOS）表达增加[13]。同样，这些炎症因子常常可以被低氧诱导因子（Hypoxia-inducible Factor，HIF）-1α 激活，而 HIF-1α 的另一作用是诱导凋亡。有研究显示，小鼠肝脏与肺在低氧状态下组织中 HIF-1α 表达水平升高[14]。同样，在非酒精性脂肪性肝炎（NASH）患者中，很多前炎症因子如，TNF-α 和 IL-6 的水平均会升高，但是这些患者却无明显感染的迹象[15]。

近些年来，关于自噬的研究很多，尤其自噬可以抑制炎症反应已被大家认可。自噬是机体内高度保守的程序，由四个步骤组成：起始、延伸、自噬体形成、自噬体与溶酶体融合然后降解。这些过程需要自噬相关基因（autophagy related genes，Atgs）参与。至今，已发现 30 种 ATgs，其功能及调控已被充分评估。肝脏的很多生理和病理过程需要自噬参与。如：清除错误折叠的蛋白，平衡肝细胞的营养和能量代谢，调节选择性细胞器降解，调节脂质和酒精代谢和抵抗肝炎病毒感染等。在各种原因（病毒性肝炎，酒精性肝炎，脂肪肝等）引起的肝细胞癌过程中，自噬在疾病过程中及肝癌本身均起到了重要作用[16]。

很多研究已显示低氧诱导的细胞死亡在各种生理过程中具有重要作用，包括细胞增殖，缺血缺氧性疾病，器官移植，血管生成，肿瘤侵袭和转移等等。同时很多研究阐述了自噬在生理学上所具备的重要的细胞功能，包括蛋白降解，细胞器转化，低氧状态适应，延长寿命，细胞发育，细胞分化和抗老化作用[17]。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

最近，很多关于器官组织低氧与自噬相互关系的研究，如血管内皮损伤，肿瘤，炎症等[18]。我们的实验通过鼠间歇低氧模型模拟人的 OSA 低氧，从肝脏病理结构及检验指标方面研究肝损伤情况，并深入探讨自噬在低氧引起肝脏损伤中的作用。

研究目的、方法

本研究旨在通过大鼠间歇低氧模型模拟 OSA 引起的间歇低氧，制造大鼠 OSA 模型观察脏肝的结构及病理改变，初步探索 OSA 的炎症反应过程中肝细胞色素 P450（Cyps）的变化及调控机制，并通过人正常肝细胞 LO2 细胞株在糖皮质激素及糖皮质激素受体拮抗剂处理情况下，观察人肝细胞 LO2 细胞形态变化，细胞色素 P450（hCYPs）变化，及自噬相关基因的改变，初步探讨糖皮质激素在人肝细胞 LO2 细胞的作用情况。我们整个研究主要分为以下三部分进行：

第一部分：通过间歇低氧暴露法，建立阻塞性睡眠呼吸暂停综合症（Obstructive sleep apnea syndrome，OSA）大鼠间歇低氧模型，采用随机数字表的方法将 30 只 Wistar 成年雄性大鼠随机分为 2 组（每组 15 只）：间歇低氧组和空白对照组。每只大鼠取肝右叶相同部位组织（0.5 cm×0.5 cm），行 HE 染色，HE 染色用于评估肝脏病理损害程度；取肝组织，通过实时定量 PCR 方法测定炎症因子、Cyps、NF-κB、核受体的相对基因表达量。探讨间歇低氧引起的肝形态学改变，炎症因子表达、对药物代谢酶影响，并探讨了 NF-κB-核受体通路在炎症因子表达及 Cyps 之间的作用。

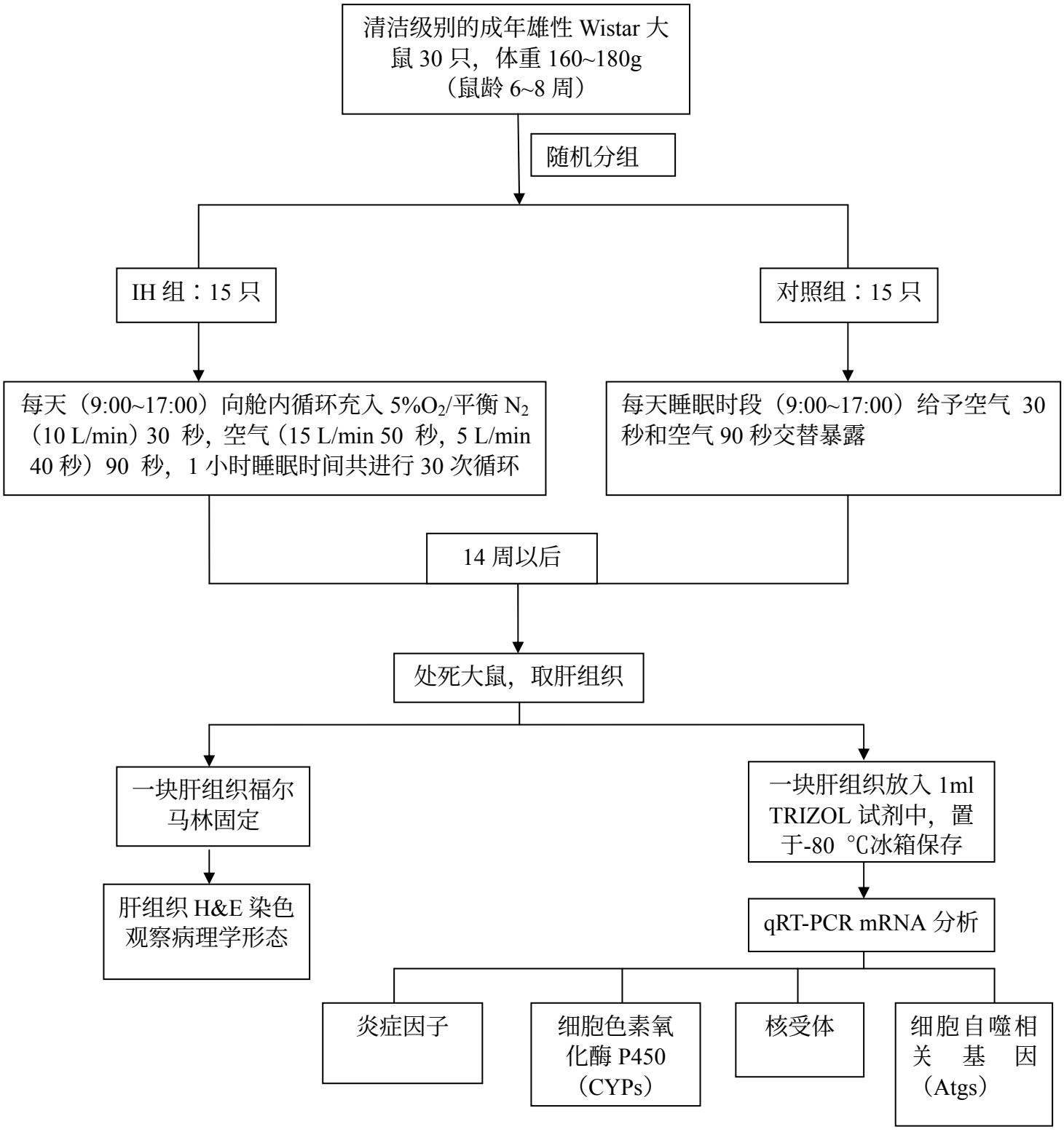
第二部分：采用间歇低氧暴露法处理大鼠，取间歇低氧模型及正常对照组的肝组织，通过 PCR 测定自噬相关蛋白基因：AMPK、mTOR、Beclin1、Atg5、Atg12、Atg13、LC3、WIP1 和 ULK1 的表达，探讨间歇低氧对肝脏自噬的影响。

第三部分：将人肝细胞 LO2 细胞株，分别予地塞米松和地塞米松+糖皮质激素受体拮抗剂处理；通过 HE 染色观察地塞米松组与地塞米松+糖皮质激素受体拮抗剂组 LO2 细胞形态及生长情况与正常细胞变化的比较；通过 PCR 方法，测定 hCYPs 水平，并测定自噬相关蛋白 mTOR、Beclin1、Atg5、Atg12、Atg13、LC3、WIP1 和 ULK1 的表达；探讨糖皮质激素对于肝 LO2 细胞形态及自噬影响作用。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

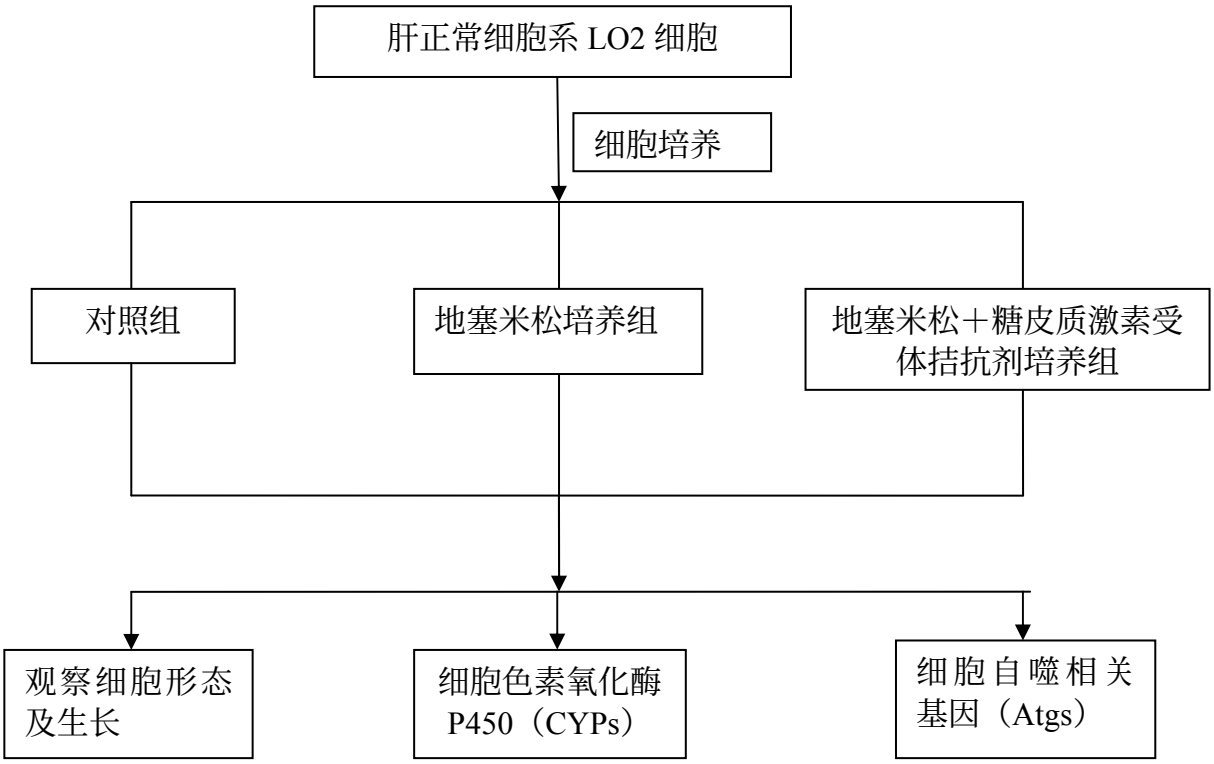
技术路线

一、动物实验技术路线



?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二、细胞实验技术路线



?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

一、间歇低氧对大鼠肝脏损害及药物代谢酶影响

OSA 是常见的呼吸系统疾病，常常与心血管系统疾病相关，并增加其发病率和死亡率，包括：高血压，缺血性心脏病，慢性心力衰竭，心律失常和中风。OSA 的特点是间歇低氧导致的周期性供氧不足，高碳酸血症，睡眠紊乱，交感神经兴奋，从而导致身体损害。间歇低氧类似于组织缺血-再灌注损伤状态，所以，间歇低氧可以导致高水平的活性氧自由基（reactive oxygen species，ROS）产生，从而促进心血管等炎症反应和损害。

本研究通过间歇低氧大鼠模型，模拟 OSA 间歇低氧状态，来研究间歇低氧对于肝脏的损害，炎症因子释放及药物代谢酶的影响。

1.1 材料和方法

1.1.1 实验动物

大鼠：清洁级别的成年雄性 Wistar 大鼠 30 只，体重 160~180g（鼠龄 6-8 周）；

来源：实验动物由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供（合格证编号 SCXK 津 2010-0002）；

饲养条件：清洁级实验室，室内温度维持在 18~22℃，室内湿度 40%~70%，保持室内空气流通，保证室内环境安静，确保大鼠在安静环境中饲养，大鼠自由进食标准颗粒饲料，自由饮水，保持昼夜节律性。

1.1.2 实验设备和材料

1.1.2.1 实验设备

1.1.2.1.1 低氧暴露装置

IH 气体环境由暴露容器、程控系统、气源系统、氧浓度监测系统四部分组成（图 1.1）。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

暴露容器：采用自行研制有机玻璃动物饲养箱。该容器容量约 5.5 L （23 cm×20 cm×12 cm = 5520 cm3 ≈ 5.5 L），氧浓度监测器等设备占据约 0.5 L。气体流速为 5 L/min。增加湿化系统和流速控制系统。气源气体可由三个气体入口经分子筛同时进入，对侧钻出 16 个气体出孔。这个容器可同时暴露 4~6 只 200 g 左右大鼠。动物词养箱内有温度监测的系统，能够监测暴露容器内的温度变化并能同时保证容器中的温度为大鼠生理的适宜温度。

程控系统：采用 Visual C 语言编制程序，由该控制程序的高级部分 A51 /C51 编译器编写下位机程序，控制间歇低氧/再氧合（IH/ROX）的循环次数或循环时间，由此可以预置任意模式的 IH/ROX 循环暴露设置，以间接控制 SLGPC 2W-040-10DC 24 V 3/8”标准电磁阀的通/断，继而控制气源系统气流的通/断。混合气源系统由 YQY-06 减压器减压至工作压力，由 QY 系列流量表控制流速，由电磁阀控制通/断，从而在暴露容器（暴露舱）中产生相应的 IH/ROX 暴露条件。

气源系统：氮气源由医用瓶装工业纯氮(纯度为 99.99%)，由减压器减至工作压力供给。压缩空气由全无油润滑空气压缩机将空气压缩至一定压力后再经减压闽减至工作压力并由空气净化器净化后供给。气源减至工作压力并净化后由流量表控制流速,由电磁阀控制流量表通/断，从而在暴露容器中产生相应的间歇低氧暴露条件。暴露时以低氧气流（例如 5%O_2，余为平衡 N_2）洗脱暴露舱中的气体，继而维持低氧状态一段时间（即 IH 时段），再以正常氧（21% O_2）气流洗脱低氧气体，而后再维持一段时间（即 ROX 时段），周而复始从而形成 IH/ROX 循环。

氧浓度监测：采用气体 O_2 浓度监测器、气体 CO_2 浓度监测器来采样监测舱体中的 O_2 及 CO_2 的浓度（容量百分比，V%）。

1.1.2.1.2 其他实验设备和仪器

主要设备和仪器	主要厂家
全无油润滑空气压缩机	鞍山佳诚空压机有限公司
医用氧浓度检测仪 型号 CY-12C	建德市梅城屯化分析仪器厂
空气净化器 型号 FS-10	浙江温岭市泽国空压机有限公司

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

动物饲养箱	天津医科大学总医院冯靖研究制造
血气分析仪	瑞士 AVL OMNI 血气自动分析仪
纯氮 纯度>99.99%	天津六方气体高科技有限公司
光学显微镜及成像系统	日本 Olympus BX53
A51/C51 编译器	美国微软公司
Visual C 语言编制程序	
O2 浓度监测器，CO2 浓度监测器	瑞士夏美顿公司
RM2135 切片机	德国 Leica 公司
HI1210 展台	德国 Kica 公司
电热干烤箱	重庆银河实验仪器有限公司
普通显微镜	日本 OLYMPUS 公司
倒置显微镜	日本 OLYMPUS 公司
台式离心机	上海安亭科学仪器厂
电热恒温水槽	上海精宏实验设备有限公司
UV1601 紫外分光光度计	美国 BectonDickinson 公司

1.1.2.2 实验试剂

主要试剂	**主要厂家**
10%多聚甲醛	天津市海河医院病理科
糖原染色液	武汉金宏生物科技发展有限公司
反转录试剂盒	美国圣克鲁斯生物技术公司
3,3-二氨基联苯胺四盐酸	福州迈新生物技术开发有限公司

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Mayer’s HE 染色液	美国圣路易公司
75%酒精，95%酒精，无水乙醇	天津市化学试剂三厂
二甲苯	天津市化学试剂三厂
TritonX-100	北京索莱宝科技有限公司
碳酸氢钠	天津市化学试剂三厂
枸橼酸钠	天津市化学试剂三厂
高碘酸	天津市化学试剂三厂
柠檬酸液	天津市化学试剂三厂
PBS 粉剂	北京索莱宝科技有限公司
NF-κB p65 引物	福州迈新生物技术开发有限公司
GAPDH 引物	福州迈新生物技术开发有限公司
反转录试剂盒	美国 Fermentas 公司

1.1.3 实验方法

1.1.3.1 实验动物分组

30 只 Wistar 成年雄性大鼠，按照随机表法随机分为 2 组，每组 15 只，实验共进行 14 周；对照组：假间歇低氧组；每天在大鼠睡眠时段（9:00~17:00）给予空气 30 秒和空气 90 秒交替暴露；IH 组：间歇低氧组；每天在大鼠睡眠时段（9:00~17:00）给予 5%O_2/平衡 N_2 30 秒和空气 90 秒交替暴露。

1.1.3.2 间歇低氧大鼠模型建立

将大鼠置于间歇低氧暴露装置内，从第 1 周起在大鼠睡眠时段（9:00~17:00）向舱内循环充入氮气（5%O_2/平衡 N_2）和空气，每一循环持续 120 秒，其中 30 秒

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

充入氮气（10 L/min），90 秒充入空气（15 L/min 50 秒，5 L/min 40 秒），1 小时睡眠时间共进行 30 次循环。文献表明，大鼠发作性间歇低氧时，其最低动脉血氧分压约为 55~65 mmHg，而其最高潮气末二氧化碳为 63.6 ± 8.6 mmHg。我们预实验技术参数表明，当实验大鼠暴露于间歇低氧（5%O_2 30 秒/ Air 90 秒）时，其最低动脉血氧分压约为 53±5.5 mmHg，基本可以在大鼠身上模拟出 OSA 时 IH/ROX 的暴露情况。对照组大鼠置于同样装置内，但给予空气 30 秒和空气 90 秒交替暴露。其余饲养方式，间歇低氧组与对照组相同。

1.1.3.3 大鼠肝组织留取

实验第 14 周时，将实验大鼠先用戊巴比妥钠麻醉，然后颈椎脱臼法处死。打开腹腔，暴露肝脏，每组 15 只大鼠取肝右叶相同部位组织（0.5 cm×0.5 cm）两块，一块放入 10%福尔马林固定液中固定 2 小时。固定的肝组织经石蜡包埋连续切片，根据载玻片的不同将切片分为两类，一类用作常规 HE 染色，一类用于免疫组化，片子均在光镜下观察；另一块肝组织放入 1ml TRIZOL 试剂中，置于-80 ℃冰箱保存。

1.1.3.4 大鼠肝组织 HE 染色

在 10%中性缓冲福尔马林液中固定后, 将肝组织石蜡包埋后切成 5μm 厚度。然后将切片放于苏木素染液染色后在有 DP80 相机的 Olympus IX71 显微镜下照相。

（1）组织石蜡包埋、切片

组织块经过脱水、透明、浸蜡, 将石蜡旋转切片机连续切片, 切片厚度为 5μm, 所制的组织石蜡片由载玻片捞取后，置于 37℃温箱内过夜，后置于 4℃冰箱内备用。

（2）H E 切片制作

① 石蜡切片脱蜡；

② 苏木素染液染色 5-15 分钟；

③ 1%盐酸酒精分色 3 秒钟，自来水冲洗 3-5 分钟；

④ 显微镜下观察着色程度，适宜后，蒸馏水洗 1-2 次；

⑤ 0 .5%水溶性伊红染液染色 1-2 分钟；

⑥ 蒸馏水冲洗 1-2 次，常规脱水、透明、中性树胶封固。

1.1.3.5 总 RNA 提取及实时定量 PCR

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.1.3.5.1 RNA 分离纯化 *Qrt-PCR*

1) 取 100mg 肝组织加入 1 mL TRIZOL，冰浴条件下在研磨器中研磨；
2) 4℃，12000 g 离心 10 min，上清转入另一 Eppendorf 管，加入 0.2 mL 氯仿，震荡混匀，静置 10 min；
3) 12000g 离心 10 min，小心吸取上清，加入 0.5 mL 异丙醇，静置 10 min；
4) 4℃，12000g 离心 10 min，RNA 呈胶样沉淀；
5) 小心弃去上清，每管加入 1 mL 75%乙醇，旋涡洗涤；
6) 4℃，7500g 离心 10 min，弃上清，置 37℃孵箱干燥；
7) 加入 20μL DEPC 处理过的去离子水溶解；
8) 用紫外分光光度计测定 A260 与 A280 的吸光值，要求 A260/A280 比值在 1.8-2.0 之间，以保证提取的 RNA 纯度。

采用 SuperscriptⅡ反转录酶系统进行反转录, 20μL 体系中加入 2μg 总 RNA, 1μL oligodT，ddH2O 至 10μL，70℃温育 5 min，冰上冷却 5 min，加入 5×反应缓冲液 4μL，0.1mmol/L DTT 2 μL，10mmol/L dNTP 1 μL；反转录酶 1 μL，加 DEPC 处理水至 25 μL，混匀后 42℃温育 60 min，70℃ 15 min 终止反应。

1.1.3.5.2 cDNA 合成

采用 TIANScript RT 合成 cDNA,按照试剂盒提供的实验步骤以 oligo(dT)20 为引物，将总 RNA（<3μg）在 M-MLV 逆转录酶作用下，合成 cDNA，反应体系为 20μL。阴性对照组中不含有 M-MLV 逆转录酶，以观察标本中是否被基因组 DNA 所污染，以试剂盒所提供的 Hela 细胞 RNA 作为阳性对照组。

1.1.3.5.3 IL-1β，IL-6，TNF-α，NF-κB，PXR，CAR，GR，Cyps 实时定量 PCR。

以 SYBR Green 染料作为 PCR 定量基础。特定基因引物通过 http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest/网站提供的 Primer-Quest SM 软件设计基因引物（表 1），CFX96 Real-Time 系统完成 DNA 扩增。

PCR 反应体系为：

SYBR Green PCR master mix 5 μl

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Primers (10μM) 0.3 μl

cDNA 1 μl

Distill water 3.7μl

Total volume 10 μl

表 1. 反应引物序列表

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Gapdh	5'-ACTCCCATTCTTCCACCTTTG-3'	5'-AATATGGCTACAGCAACAGGG-3'
IL-1β	5'-TCCCTGAACTCAACTGTGAAATA-3'	5'-GGCTTGGAAGCAATCCTTAATC-3'
IL-6	5'-GAAGTTAGAGTCACAGAAGGAGTG-3'	5'-GTTTGCCGAGTAGACCTCATAG-3'
TNF-α	5'-ACCTTATCTACTCCCAGGTTCT-3'	5'-GGCTGACTTTCTCCTGGTATG-3'
NF-κB	5'-AGACATCCTTCCGCAAACTC-3'	5'-TAGGTCCATCCTGCCCATAA-3'
PXR	5'-GAAGATCATGGCTGTCCTCAC-3'	5'-CGTCCGTGCTGCTGAATAA-3'
CAR	5'-AGACCATGACCAGTGAAGAAG-3'	5'-AGTCAGGGCATGGAAATGATAG-3'
GR	5'-CAGCAGTGAAATGGGCAAAG-3'	5'-GGGCAAATGCCATGAGAAAC-3'
Cyp1A2	5'-GACAAGACCCTGAGTGAGAAG-3'	5'-GAGGATGGCTAAGAAGAGGAAG-3'
Cyp2D4	5'-CCTTTCAGCCCTAACACTCTAC-3'	5'-ATGAAGCGTGGGTCATTGT-3'
Cyp2C9	5'-CCCAAGGGCACAACCATATTA-3'	5'-TTTCTGGATGAAGGTGGCA-3'
Cyp2C19	5'-CCCAAGGGCACAACCATATTA-3'	5'-TTTGACCCTCGTCACTTTCTG-3'
Cyp3A2	5'-GGAAACCCGTCTGGATTCTAAG-3'	5'-GAAGTGTCTCATAAAGCCCTGT-3'

反应条件为 95℃预变性 2 min；95℃变性 25sec，60℃退火 25sec，70℃延伸 20sec，重复 40 个循环；以 95℃15sec，58℃ 15sec 及 95℃ 15sec 的变化绘制

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

离解曲线。每个样本用 Prism 7500 型实时定量 PCR 仪进行 PCR 反应 3 次。数据采用 ABI Prism 7500 SDS 软件包进行分析，确定每次反应的循环阈值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较样本中靶基因的相对表达量，根据得出的 Ct 值，仪器自动分析得出代表相对表达量的 RQ 值。

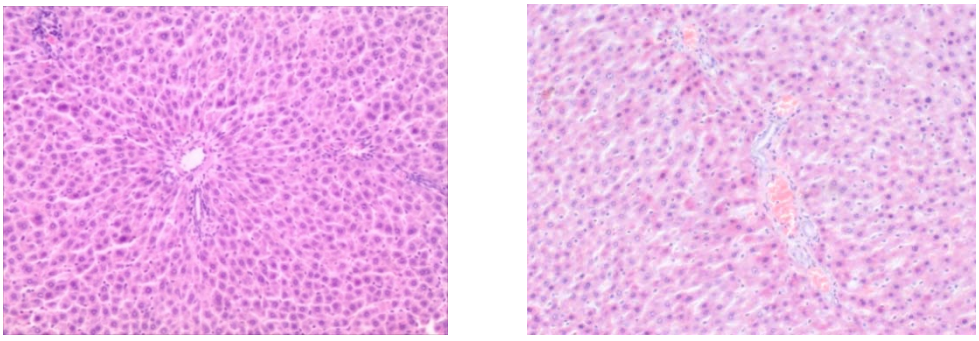
1.1.4 统计分析

实验数据以均数土标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS15.0 软件分析数据，两组间比较采用非配对 t-检验分析；$p < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

1.2 结果

1.2.1 实验大鼠肝组织病理学形态观察

将对照组大鼠及间歇低氧组大鼠肝脏组织经过 HE 染色后，在光镜下分别通过 100 倍及 400 倍观察，可以发现对照组肝组织细胞等与正常肝组织相同，而 IH 组肝组织受到了不同程度破坏，文献中关于间歇低氧引起病变以脂肪变性为主，而我们的肝组织变性以炎性细胞浸润为主（如图 1.2，图 1.3）。

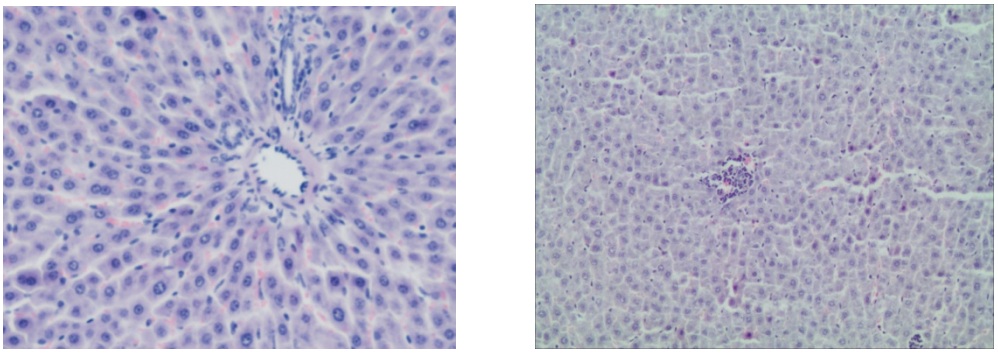


Control 组 ×100　　IH 组 ×100

图 1.2 对照组和间歇低氧组大鼠肝组织病理形态学改变（HE×100）

对照组：肝小叶结构完整，窦状隙及汇管区未见明显增宽及结构紊乱；间歇低氧组：肝小叶结构完整，窦状隙呈轻度增宽，少许肝细胞胞质稀疏，未见肝细胞变性现象，肝细胞结构完整。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



Control 组 ×400　　IH 组 ×400

图 1.3 对照组和间歇低氧组大鼠肝组织病理形态学改变（HE×400）

对照组：肝细胞胞膜完整，胞质丰富，胞核形态正常；间歇低氧组：肝细胞结构完整，汇管区可见少许炎细胞浸润，以淋巴细胞为主，少许肝细胞胞质稀疏。

1.2.2 肝组织炎症介质 mRNA 定量 PCR 结果

我们的通过实时定量 PCR 详细阐述了大鼠肝组织中炎症介质 mRNA 的相对表达量。我们实验所测的炎症因子 IL-1β、IL-6、TNFα 主要由单核-巨噬细胞、淋巴细胞、内皮细胞等在细胞应激等情况下下分泌，从肝组织病理学改变我们已经知道肝脏有较多炎性细胞浸润，并且以淋巴细胞为主。实验数据显示，间歇低氧暴露的大鼠肝组织 IL-1βmRNA 表达较对照组明显升高，与对照组相比，具有统计学差异（$p < 0.05$），同时我们检测的 IL-6 和 TNFα mRNA 表达与 IL-1β 变化一致（如图 1.4）

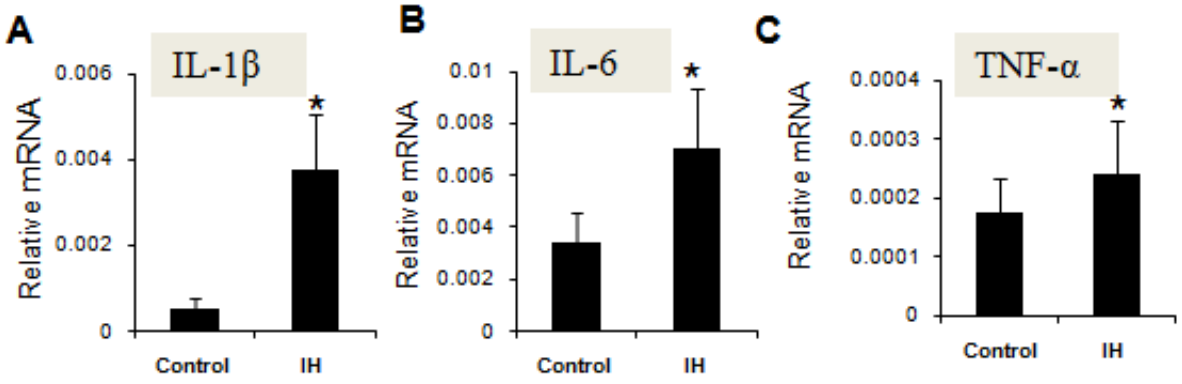


图 1.4 肝组织中炎症介质 mRNA 表达结果

注：* 表示与对照组比较有统计学差异（p ＜0.05）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.3 肝组织 Cyp450 mRNA 相对表达量结果

从上面的实验中我们得知，间歇低氧可以引起大鼠肝脏组织改变及炎症反应。药物代谢是肝脏在体内重要作用之一，药物代谢酶主要分为两种，I 相代谢酶主要指细胞色素 P450（cytochrome P450，CYP）；II 相代谢酶主要包括葡萄糖醛转移酶、谷胱甘肽-S-转移酶，磺基转移酶和乙酰基转移酶等。我们的实验通过大鼠 Cyps 的检测来观察间歇低氧是否影响肝脏药物代谢。细胞色素 P450（CYPs）基因变异较大，与药物代谢最密切的是 CYP1，CYP2 和 CYP3 三个家族，我们通过实时定量 PCR 详细阐述了 CYPs 中 Cyp1A2、Cyp2C9、Cyp2C19、Cyp2D4、Cyp3A2 mRNA 在肝组织中的相对表达量。与对照组相比，间歇低氧组 Cyp1A2、Cyp2D4、Cyp3A2 mRNA 表达量下调，且有统计学差异($p < 0.05$)（图 1.5 A，D，E）；而 Cyp2C9、Cyp2C19 表达量间歇低氧组较对照组下降明显，但是无统计学差异($p > 0.05$)（图 1.5 B，C）。

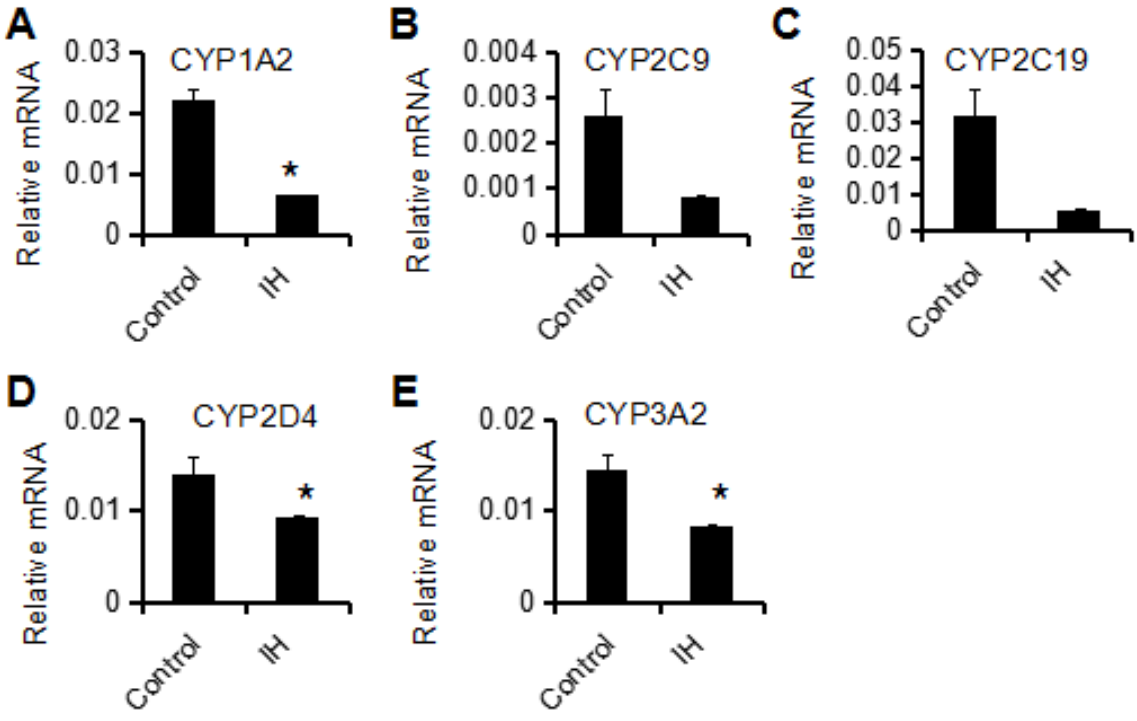


图 1.5 肝组织中 CYPs mRNA 表达结果

注：* 表示与对照组比较有统计学差异（$p < 0.05$）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2.4 肝组织中 NF-κB　mRNA 相对表达量结果

间歇低氧引起大鼠肝脏炎症因子表达增加, 药物代谢酶细胞色素 P450 改变, 这两者中的联系我们猜测可能否与 NF-κB 信号转导有关。NF-κB 是核转录因子的一种, 可以与免疫球蛋白 κB 轻链结合, 主要在炎症情况下由免疫细胞所分泌。NF-κB 相关的炎症信号转导途径在炎症的发生发展中有着极其重要的作用。前炎症因子，IL、TNFα 等可以促进 NF-κB 分泌，我们的实验通过实时定量 PCR 测定肝组织中 NF-κB 的的相对表达量，（如图 1.6）数据显示 IH 组 NF-κB 的表达量较对照组明显升高，且有统计学差异（p ＜0.05）。而值得我们注意的是，NF-κB 可以正反馈调节炎症因子-NF-κB 通路，促进炎症因子释放。NF-κB 另一方面的重要作用是激活核受体。

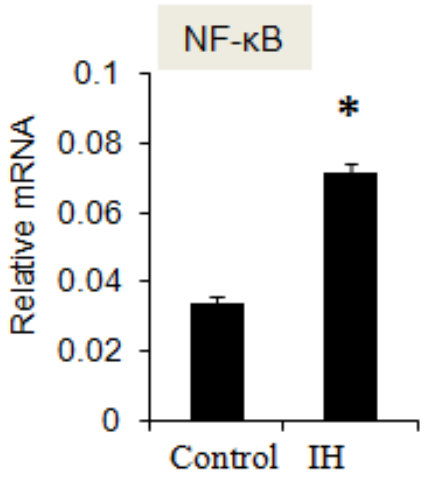


图 1.6 肝组织中 NF-κB　mRNA 表达结果

注：* 表示与对照组比较有统计学差异（p ＜0.05)

1.2.5 肝组织中核受体 mRNA 相对表达量结果

核受体是一个转录因子超家族，目前已知 CYPs 的表达主要受孕烷受体（PXR），组成型雄甾烷受体（CAR）的影响，炎症因子 IL 及 TNF-α—NF-κB 通路可以抑制核受体。我们通过实时定量 PCR 详细阐述了肝组织中核受体 mRNA 的相对表达量。图 1.7 A、B 所示，与对照组相比，间歇低氧组 PXR、CAR mRNA 表达量较对照组下调，具有统计学意义(p < 0.05)，证实了炎症因子通过

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

核受体途径抑制了大鼠 Cyps 的表达。 我们的实验还检测到糖皮质激素受体（GR）mRNA 在低氧暴露下，表达量下调（图 1.7 C），具有统计学意义($p < 0.05$)。

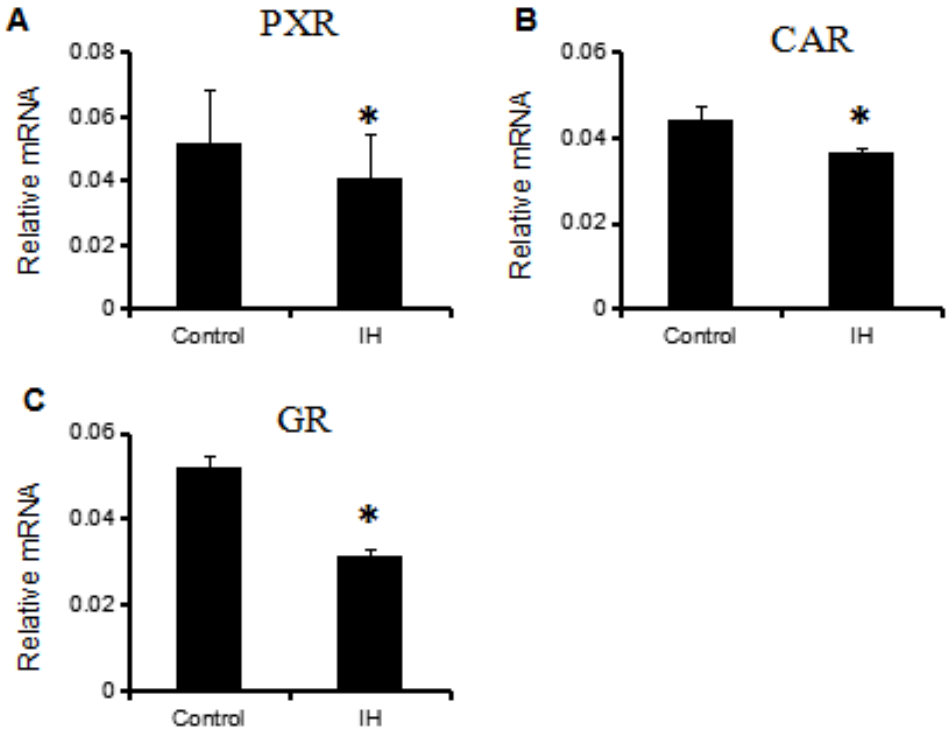


图 1.7 肝组织中核受体 mRNA 表达结果

注：* 表示与对照组比较有统计学差异（p ＜0.05)

1.3 讨论

1.3.1 阻塞性睡眠呼吸暂停与器官损害：

阻塞性睡眠呼吸暂停（Obstructive sleep apnea，OSA）是常见的呼吸系统疾病，在美国发病率约为 7%-17%，这意味着约 2 千万美国人患病[5]。由于夜间睡眠质量差，使患者白天易疲劳及嗜睡，不仅影响正常工作学习，使司机、高空作业等职业具有较大潜在风险[19]。OSA 常常会合并心脑血管等并发症，同时也是 OSA 患者常见的死亡原因。OSA 是以反复发作呼吸暂停，循环性间歇低氧，反复的胸内压降低，睡眠觉醒紊乱为特点[20]。虽然反复觉醒和胸内压改变是交感神经兴奋的原因，但是间歇低氧是引起器官损害和死亡的重要原因。

在器官损害方面，心血管系统损害在 OSA 患者中最常见。尽管，很多心血

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

管发病的危险因素（性别，年龄，肥胖，高血压，糖耐量异常）在 OSA 患者中均存在，但是 OSA 已成为心血管疾病的独立危险因素。在 30 年前，高血压与 OSA 的关系就被人们所关注[21]。Wisconsin 睡眠队列研究通过 4 年随访发现了发现了睡眠暂停严重程度与高血压发生的剂量—效应关系[22]。另一个前瞻性的队列研究同样证实了 OSA 与高血压的剂量关系，同时发现连续的的持续气道正压通气治疗（CPAP）可以改善高血压状况[23]。心律失常尤其房颤发生显著，其他如室性心动过速，室颤，窦性停搏，房室传导阻滞，复杂的室性逸搏，室上性心动过速，心动过缓均可发生于 OSA 患者中。流行病学调查发现，心房颤动在睡眠障碍性呼吸（sleep-disordered breathing，SDB）患者中发生率要比常人高 4-5 倍[23]。同样研究显示，通过持续气道正压通气治疗（CPAP）可以降低心律失常发生率，并且有报道称，持续气道正压通气治疗治疗可以使心律失常患者在不服用抗心律失常药情况下，生存率提高[24]。在 1998 年，Javaheri 发现充血性心力衰竭（左室射血分数＜45%）的患者中有约一般患者存在睡眠性呼吸障碍[25]。OSA 可以引起充血性心力衰竭，而充血性心力衰竭可以使 OSA 恶化。肺动脉高压是另一种与 OSA 密切相关的心血管疾病。持续气道正压通气治疗（CPAP）可以改善充血性心力衰竭患者预后，并且对于肺动脉高压患者有助于降低肺动脉压力[26]。对于 SDB 患者合并心血管系统损害认识及研究非常重要，不仅因为心血管疾病引起的社会经济负担，更因为有效的 OSA 治疗对于降低心血管系统风险非常重要。除了常见的高血压，心律失常，充血性心力衰竭和肺动脉高压，冠状动脉性心脏病的发生亦可能跟 OSA 相关[27]。重要的是，持续气道正压通气治疗治疗可以降低严重 OSA 患者的心血管疾病风险[28]。

OSA 引起神经系统损害主要是中风[29]。上面我们提到的与 OSA 相关的心房颤动，心衰和高血压均可导致中风。但是睡眠与心脏健康研究通过横断面调查发现 OSA 是引起中风的独立因素，且对于曾发生过脑血管事件的患者，中风再发的发生率较未发生患者更高[30]。OSA 可引起不同程度的神经认知损害。交通事故和工作率降低在 OSA 合并神经认知损害的患者中常常出现。一些研究评估 OSA 患者的神经认知发现，在总结归纳、注意力、警觉性、学习和记忆方面均有影响[31]。通过治疗 OSA 可以改善 OSA 患者的动脉硬化程度，降低中风的发生率，睡眠的改善可以提高工作效率，减少交通事故发生[32]。

OSA 对代谢有负面调节作用，尤其中—重度 OSA 影响尤为明显。OSA 对代谢的影响主要是糖耐量和脂质代谢异常。下丘脑-垂体-肾上腺素轴，异常的交

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

感神经兴奋，炎症反应和氧化应激作用是 OSA 引起糖代谢紊乱的主要媒介[33]。胰岛素抵抗的发生在 OSA 患者中非常普遍，通过对 OSA 患者进行 CPAP 治疗，可显著改善胰岛素抵抗情况。OSA 引起血脂异常表现在高密度脂蛋白异常，总胆固醇、低密度脂蛋白和甘油三酯水平升高。具体机制目前不明，目前很多数据显示，OSA 可以降低脂蛋白清除，增加脂肪分解，增强肝脂输出水平[11]。

OSA 所引起的器官损害已被人们所认识并重视，除了上述损害，OSA 对于肝脏系统的损害也在逐渐被关注。有很多研究证实，OSA 引起的间歇低氧可以引起慢性肝损害。2003 年，Chin 等人发现三分之一的 OSA 患者转氨酶升高[34]。2005 年, Tanne 等人报道严重的 OSA 是不依赖于肥胖引起脂肪肝的危险因素[35]。2007 年，Savransky 等人证实慢性间歇低氧引起的血脂紊乱可以促使单纯脂肪肝进展为脂肪性肝炎[36]。

从临床研究发现，通过持续气道正压通气等改善通气及低氧情况的治疗，随着 OSA 症状的改善，器官损害也有所好转，所以越来越多的人认为间歇低氧是引起各种器官损害的元凶，而非单一合并症对其他疾病影响。OSA 所存在的间歇低氧引起的氧化应激损害了线粒体功能，主要通过激活低氧诱导因子（HIF），一方面 HIF-1 激活，进一步激活 NADPH 氧化酶，另一方面，HIF-2 激活降低了抗氧化剂的水平，从而使活性氧（Reactive Oxygen Species ，ROS）和活性氮（Reactive Nitrogen Species，RNS）的水平升高。HIF-1 的活化可以使血管内皮生长因子（Vascular Endothelial Growth Factor，VEGF）表达和血管生成增强，促使肿瘤生长。间歇低氧还可以使颈动脉窦介导的交感神经兴奋引起血压升高；同时血管内皮粘附因子表达增加和 TNF-α，IL-6，CRP 等炎症因子水平升高，进一步促进 NF-κB 的活化，引起全身和血管炎症反应[37]。间歇低氧还可以导致 I 型血管紧张素 II 受体活化，醛固酮水平升高，内皮素 1 水平升高，eNOS 水平降低，这些变化使血管收缩和血压升高。所以，OSA 可以导致氧化应激，系统和血管炎症反应，血管收缩和血压升高从而引起多器官功能损害[38]。

综上所述， OSA 所导致的直接间歇低氧是引起器官损害的主要原因。我们的实验是通过大鼠间歇低氧模型模拟睡眠呼吸暂停综合症的低氧状态，来分析间歇低氧对肝脏的损害，包括炎症因子表达，药物代谢酶 Cys 的影响和机制。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.2 间歇低氧引起肝脏的损害：

我们通过间歇低氧大鼠病理发现肝细胞结构完整，窦状隙呈轻度增宽，汇管区可见少许炎细胞浸润，淋巴细胞为主，少许肝细胞质稀疏，而对照组病理显示正常肝组织，未见上述表现。Shu-zhi Feng 等人通过对血脂紊乱的小鼠间歇低氧模型观察：在高脂饮食同时联合间歇低氧 3 周，可以从小鼠肝脏观察到脂肪变性；在 6 周，可以观察到脂肪性肝炎的表现：如肝细胞水肿，炎症细胞浸润，肝小叶局灶性坏死等；9 周后，肝组织损伤更为严重，如：弥漫性脂肪变性，明显的细胞水肿，炎细胞浸润，局灶性凋亡，门静脉和肝窦周围纤维化；对照组小鼠仅以单纯的高脂饮食喂养，9 周后脂肪性肝炎程度比合并间歇低氧组要轻微[39]。文献及我们的试验均证实：间歇低氧可以引起肝脏组织的损害。与文献报道相比，我们的实验中未见脂肪性肝炎等表现，肝细胞结构完整，仅表现出窦间隙增宽，炎细胞浸润及肝细胞质稀疏，这可能与暴露时间及间歇低氧的氧浓度有关。

炎症反应是间歇低氧引起器官损害最常见表现。因为在全身氧化应激的情况下，免疫细胞被激活，然后活性氧自由基（ROS）产生引起炎症反应。肿瘤坏死因子-α（TNF-α）及白介素（如 IL-1，IL-4，IL-6，IL-8，IL-10）是 T 细胞及单核细胞分泌的炎症因子，这已在众多炎症反应中被发现。证据表明，OSA 的在炎症因子调节方面最直接作用是 TNF-α 产生。很多研究阐述了 OSA 患者 TNF-α 水平升高，在经过持续气道正压通气治疗后，TNF-α 水平有所下降[40]。IL 等炎症因子的表现与 TNF-α 相似。我们在间歇低氧大鼠模型的肝组织中检测到了前炎症因子：TNF-α，IL-1β，IL-6，且水平较对照组高。有很多研究报道指出 IL-6 与非酒精性脂肪性肝炎（NASH）有重要关系[14, 15]。众所周知，IL-6 很多炎症条件下可以产生。但是，IL-6 不仅因炎症反应产生还有抗炎作用，另外，还有调节代谢，再生和神经系统等作用。在 NASH 中，TNF-α 水平成倍升高，然而在很多炎症反应、感染和肿瘤中也可以发现其升高，说明 TNF-α 是炎症反应重要的标记物。总之，我们在间歇低氧大鼠模型的肝组织中发现多种炎症因子水平升高，充分说明间歇低氧引起肝脏炎症反应。

药物代谢作用是肝脏的主要生理作用之一，而低氧可以影响药物代谢。给兔子应用茶碱，予 24 小时中度低氧（PaO2 34mmHg），检测发现茶碱的清除率下降。同样，低氧情况下，茶碱的代谢率在小鼠肝细胞和大鼠肝脏中的代谢率均

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

下降。与此观点相反，Du Souich 等人通过临床研究发现低氧不影响茶碱代谢率。Streit 等人也发现急性低氧对茶碱代谢无影响。因为间歇低氧与急性低氧或慢性低氧是不同的病生理机制，对于药物代谢可能有不同的特殊机制[41]。

药物在肝脏的代谢主要依靠药物代谢酶（drug metablic enzymes，DMEs），I 相药物代谢酶细胞色素 P450（Cytochrome P450，CYPs）是肝脏药物代谢酶的重要组成部分，在药物代谢方面起到了重要作用。细胞色素 P450（CYPs）基因变异较大，与药物代谢最密切的是 CYP1，CYP2 和 CYP3 三个家族，90%的药物依靠这三个家族代谢[42]。肝脏受损时（营养缺乏，缺血，感染等），CYPs 表达受到影响从而影响对药物的代谢，使药物失效或毒副作用增加。在体外 48 小时的低氧环境暴露后，人肝癌衍生的 HepG2 细胞的 CYP2J2 表达下调，但是血管平滑肌细胞的 CYP2C9 表达上调[43]。中度低氧暴露 24 小时, 兔肝细胞中 CYP1A1 和 1A2 蛋白减少，CYP3A6 蛋白增加。这些结果说明，低氧对于不同的 CYP 异构体在不同细胞中有不同作用。我们的实验检测了 CYP1A2，CYP2C9，CYP2C19, CYP2D4 和 CYP3A2 的水平, 结果显示, CYP1A2, CYP2D4 和 CYP3A2 间歇低氧组与对照组有统计学差异，而 CYP2C9 和 CYP2C19 无统计学差异，但是从图中可以看出间歇低氧组的 CYP 表达呈降低趋势。

肝脏疾病影响药物代谢，主要是引起肝脏损伤导致 CYP 活性降低。CYP 活性的抑制可能与严重肝脏疾病有关。中度肝功能紊乱（Child A 分级）轻度抑制 CYP1A2 介导的药物清楚率, 严重肝功能紊乱（Child C 分级）显著抑制 CYP1A2 介导的药物清除率。急性缺氧可能引起重度肝损害，慢性持续低氧可以导致肝损伤，这些从组织学上都可以表现为不同程度的中心小叶型肝细胞凋亡。我们的实验病理已证实，慢性间歇低氧可以引起肝损伤，炎症因子表达增加。同时，CYP 表达水平降低，可以影响药物代谢。有观察显示，间歇低氧给予对乙酰氨基酚（200mg/Kg）可以导致肝坏死和肝细胞凋亡[44]。间歇低氧时联合异烟肼和利福平治疗可以导致肝细胞超微结构破坏[45]。这些证据提示我们, OSA 下调 CYP 水平，联合应用肝毒性药物可能加重肝损害。

各种炎症因子刺激, 如细菌感染或肺感染引起的炎症反应可以下调细胞色素 P450 基因的表达，这被很多实验所描述[46]，我们通过间歇低氧模型引起的肝脏损害，在发现炎症因子表达增加的同时，发现多种 CYP 表达降低。从我们的实验中，间歇低氧对于肝脏损害已经明确，虽然 CYP 表达趋势均表现为下调，却不是均有临床意义，这可能与众多 CYP 类型所受调控路径不同有关。所以对炎

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

症因子与 CYP 表达之间的通路，我们在本实验中也做了初步研究。

1.3.3 NF-κB-核受体通路在肝脏中的作用

真核细胞转录因子核因子（nuclear factor，NF）-κB 是炎症反应重要的调节因子，可以在所有类型细胞表达。NF-κB 激活有经典的 Toll 样受体途径和非经典（旁路）途径两种方式，非经典途径在 B 细胞的激活中有非常重要的作用。NF-κB 是 Rel 蛋白家族成员，以同二聚体和异二聚体多种形式存在，包括 RelA（P65），P50 和前体 P105（NF-κB1），和 RelB，cRel，P52 和前体 p100（NF-κB2）。非活化的 NF-κB 二聚体贮存于胞质中，NF-κB 的抑制子 IkB 家族成员可以与 NF-κB 结合并掩盖核定位信号。当 IkB 激酶-IKKα 和 IKKβ 磷酸化以后，IkB 蛋白体发生降解[47]。在经典途径中，前炎症因子如 TNF-α 或致癌基因促进激酶信号级联反应，导致 IkB 磷酸化和泛素化街道的蛋白体降解，最终，NF-κB 释放进入细胞核。在旁路途径，活化的 IKKα 使 NF-κB 前体（p100/RelB）磷酸化，前蛋白体使这些前体变成激活的 p52/RelB 异质二聚体。然后，活化的 NF-κB 二聚体作用于免疫应答相关的基因表达，增殖，凋亡和通过与目标 DNA 序列结合使某个病毒基因表达。NF-κB 参与炎症初始及进程反应中。尤其 OSA 引起的心血管和脂肪组织的炎症与内皮细胞，脂肪组织巨噬细胞，脂肪细胞中 NF-κB 活性增强有关；更进一步，NF-κB 在人和动物肝细胞和肝星形细胞的活化与肝胰岛素抵抗，肝细胞凋亡，非酒精性肝病和肝细胞癌发展有关[48]。目前，已经发现 OSA 在低氧条件下，不依靠 HIF 系统性激活 NF-κB 的病生理新机制[13]。在低氧条件下，内质网释放钙离子，激活钙依赖的 IKK 激酶转化生长因子 β 活化激酶（transforming growth factor β activated kinase，TAK）-1；TAK-1 磷酸化 1kBa，然后促使 RelA 亚单位释放，NF-κB 激活、转运至细胞核。低氧可以抑制特殊的相扑蛋白酶（specific sumo proteases ，Senps）导致 IKBα 的 sumo-2/3 链增加，这样可以使 IKBa 和活化的 NF-κB 释放 RelA。另外，NF-κB 途径与可诱导 NO 合成酶（iNOS），环氧化酶-（COX-）-2，和金属蛋白 9 产生引起的氧化应激和活性氧（ROS）有关。通过细胞培养观察，ROS 从低氧的肝细胞中释放，通过 IkB-α 磷酸化和 NF-κB 信号激活可以直接激活肝星形细胞。间歇低氧诱导产生的 NF-κB 可以上调多种炎症因子和趋化因子，包括 IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8,I-10, IL-13, IL-15, IL-18, TNF-α, TNF-β, IFN-α, IFN-β,和巨噬细胞抑制蛋白

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1b[49]。

TNF-α 的浓度与 OSA 的严重程度有关[8]。TNF-α 对于睡眠有调节作用。除外了肥胖因素，OSA 患者的 TNF-α 水平比正常人群要高，经过 CPAP 治疗后 TNF-α 水平降低。进一步说，OSA 患者的 TNF-α 分泌戒律改变，夜间的峰分泌被异常的日间峰分泌所替代。在夜间低氧时，脂肪细胞和单核细胞通过 NF-κB 途径分泌 IL-6[50]。IL-6 在肝脏刺激 CRP 产生，并且参与了睡眠紊乱的炎症过程。OSA 患者的 IL-6 水平与健康对照组相比升高，但是 IL-6 的生理节律与 TNF-α 的节律改变不一致。TNF-α 和 IL-1 水平不仅在 OSA 患者中升高，还与胰岛素抵抗，代谢综合征和肥胖有关。

CYP 在外源性和内生性复合物引起的代谢中有重要作用。在小鼠中，有 102 个功能性 CYP 基因和 88 个假性基因，在人类有 57 个功能性基因和 58 个假性基因。有 3 个 P450 基因家族，分别是 CYP1-3，用来在肝脏编码并表达 P450 酶来代谢外源性复合物如药物，化学物，其他外源性和内源性脂质底物结合[51]。P450 基因有多种路径和多水平调控：有特异性组织表达，通过内源性激素和细胞因子表达，对不同外源性化学结构的应答。大多数 CYP 激活通过相似途径，即受体转录因子配体激活途径，受体转录因子包括：孕烷 X 受体（Pregnane X Receptor）PXR，雄甾烷受体(constitutive androstane receptor, CAR) 等，可以增加 CYP 转录。

在炎症和感染时，肝脏对于药物和外源性物质代谢能力下降已经被很多体外实验，动物和临床实验所证实，其分子学机制尚未完全明确。但是人们已经认识到细胞因子在这一过程中起到了重要作用。具体来说，不同的细胞因子通过不同机制来下调肝脏 CYPs。TNF-α 通过氧化还原调节 NF-1 来降低 CYP1A1。IL-2 可能通过诱导前癌症基因 c-myc 来下调 CYP2C11 和 CYP3A2 表达，IL-1 通过与 NF-κB 结合来降低启动子结合位点的亲和性抑制 CYP2C11 转录，IL-6 通过诱导 C/EBPβ-LIP 表达，竞争性结合 C/EBP 活化因子如 C/EBPa 来抑制 CYP3A4 表达[52]。另一方面，核受体也可以参与 CYP 抑制性表达，因为研究发现 IL-6 可以抑制 PXR 和 CAR 的表达。

炎症因子和药物代谢之间存在负相关，这已被大家所认同。关于其分子机制，Teng 和 Piquette-Miller 研究显示用 IL-6 刺激野生型小鼠导致 PXR 蛋白和 mRNA 显著降低，它的靶基因 Mrp2，Bsep 和 Cyp3a11 mRNA 表达下降。这一现象在 PXR-/-的小鼠接受同样处理时没有出现，说明 Cyp 的降低由 PXR 介导。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

最近的研究发现,肝细胞炎症反应激活调整了与配体结合的 PXR 泛素化结构[53]。研究显示，泛素化的 PXR 含有 SUMO3 链，可以反馈抑制肝细胞的免疫反应。相反的，人应用利福平治疗疾病时激活 PXR，导致 PXR 靶基因表达增加。Zhou 等人在体内和体外试验通过利福平激活 PXR 可以减弱 NF-κB 蛋白，NF-κB 蛋白对于促进免疫和炎症反应十分重要[54]。这充分说明 NF-κB 与 PXR 之间的相互抑制作用，NF-κB 的激活可以抑制 PXR，抑制 NF-κB 可以增强 PXR 活性。PXR-/-小鼠的小肠炎症反应增强和 NF-κB 靶基因表达增加。所以，炎症反应通过 NF-κB 通路抑制 PXR 活性从而降低药物代谢率[55]。

糖皮质激素受体（glucocorticoid receptor，GR）作为一个重要的抗炎症因子，与前炎症因子 NF-κB 之间有相互干扰作用，可以相互抵消在免疫和炎症反应中的作用。糖皮质激素，通过 GR，可以通过抑制炎症因子转录，抑制趋化因子和细胞因子受体来抑制免疫反应[56]。另一方面，活化的 NF-κB 可以通过抑制 GR 来抑制很多炎症因子和趋化因子。有人通过脓毒症模型来研究 IL-1β 与 CYP 激活和表达关系，IL-1β 可以降低 CAR 表达，降低胆红素在肝细胞的清除率[57]。通过瞬时转染发现 CAR 启动子结构与荧光素酶报告基因结合，说明 CAR 的抑制是在基因转录水平发生的。更进一步研究发现，IL-1β 通过抑制 GR 的活性来降低 CAR 表达，其中 NF-κB 起到了重要作用，NF-κB p65 干扰 CAR 启动基因远端的糖皮质激素效应元件的增强子功能[48]。有研究显示，IL-1β，p65RelA 的过表达可以下调 GR 诱导的 CAR 表达，而这些抑制作用可以被能抑制 NF-κB 活性的药物 Pyrrolidine Dithiocarbamate 阻断，或在 NF-κB 抑制子（SRIkBα）过表达时降低[58]。

我们的研究发现间歇低氧小鼠，肝细胞的 IL-1β， IL-6 和 TNF-α 表达升高，NF-κB 表达也同样增加，这说明炎症因子诱导了 NF-κB 表达的升高。同时在对核受体 mRNA 表达结果研究发现间歇低氧组 PXR、CAR、和 GR 的表达均下降，从而验证了，IL-1β， IL-6 和 TNF-α 和 NF-κB 上调可以抑制核受体因子表达。而核受体因子是影响 CYP 转录的重要调节因子,所以会出现 CYP1A2、CYP2D4、CYP3A2 表达显著下降。但是我们实验中,发现间歇低氧组 CYP2C9 和 CYP2C19 表达有下降趋势，却没有统计学意义。这可能是因为，CYPs 本身基因表达种类繁多，其调节除了受核因子调控外，还有很多调控通路，CYP2C9 和 CYP2C19 可能炎症因子-NF-κB-核受体通路存在一定关系，但不是完全靠此通路调节，具体机制有待进一步研究。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

我们通过本实验发现了间歇低氧对于大鼠肝脏的损害：炎症因子表达增加，CYPs 表达下降，并初步探讨间歇低氧引起 CYP 表达下降的机制。众所周知，间歇低氧与自噬之间有密不可分的关系，在间歇低氧引起的肝脏损害中，自噬是否起到了相关作用，我们在下一部分的研究中进一步探讨。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.4 小结

1.模拟 OSA 的间歇低氧大鼠模型发现肝组织窦状间隙增宽，汇管区可见少许炎细胞浸润，以淋巴细胞为主，少许肝细胞胞质稀疏；
2.肝组织炎症介质 mRNA 定量 PCR 结果显示炎症因子在 IH 组表达升高，并且发现，间歇低氧可以引起 Cyps 表达下降；
3.NF-κB-核受体通路在间歇低氧引起的肝脏 Cyps 表达下降过程中有重要意义，间歇低氧引起的炎症反应通过 NF-κB-核受体通路下调 Cyps 表达。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二、间歇低氧对大鼠肝脏自噬的影响

自噬是真核生物细胞中存在的一个高度保守有序的细胞活动过程，包括：起始，延伸，自噬体形成和自噬体融合降解四个阶段。自噬在细胞生长发育的过程中有重要地位，尤其在饥饿或应激情况下，自噬对于细胞的保护作用尤为重要。自噬涉及 30 多种自噬相关基因（蛋白），调控机制复杂。目前很多关于自噬的研究，尤其在肿瘤学方面，肿瘤的低氧环境也可以引起自噬发生。我们在前文第一部分对间歇低氧引起的肝损害进行了探讨，此部分我们初步探讨间歇低氧在肝脏自噬方面的影响。

2.1 材料和方法

2.1.1 实验动物

大鼠：清洁级别的成年雄性 Wistar 大鼠 30 只，体重 160~180g（鼠龄 6-8 周）；

来源：实验动物由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心提供（合格证编号 SCXK 津 2010-0002）；

饲养条件：清洁级实验室维持温度 18~22℃，湿度 40%~70%，保持空气流通，安静环境中饲养，大鼠自由进食标准颗粒饲料，自由饮水，保持昼夜节律性。

2.1.2 实验动物分组

30 只 Wistar 成年雄性大鼠，随机分为 2 组，每组 15 只，实验进行共 14 周；对照组：假间歇低氧组；每天在大鼠睡眠时段（9:00~17:00）给予空气 30 秒和空气 90 秒交替暴露；IH 组：间歇低氧组；每天在大鼠睡眠时段（9:00~17:00）给予 5%O_2/平衡 N_2 30 秒和空气 90 秒交替暴露。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.1.3 间歇低氧大鼠模型建立

将大鼠置于间歇低氧暴露装置内，从第 1 周起在睡眠时段（9:00~17:00）向舱内循环充入氮气和空气（5%O_2/平衡 N_2），每一循环 120 秒，即 30 秒充入氮气（10 L/min），90 秒充入空气（15 L/min 50 秒，5 L/min 40 秒），1 小时睡眠时间共进行 30 次循环。文献表明，大鼠发作性间歇低氧时，其最低动脉血氧分压约为 55~65 mmHg，而其最高潮气末二氧化碳为 63.6 ± 8.6 mmHg。我们预实验技术参数表明，当实验大鼠暴露于间歇低氧（5%O_2 30 秒/ Air 90 秒）时，其最低动脉血氧分压约为 53±5.5 mmHg，基本可以在大鼠身上模拟出 OSA 时 IH/ROX 的暴露情况。对照组大鼠置于同样装置内，但给予空气 30 秒和空气 90 秒交替暴露。其余饲养方式，间歇低氧组与对照组相同。

2.1.4 总 RNA 提取及实时定量 PCR

2.1.4.1 RNA 分离纯化 *Qrt-PCR*

（1）取 100mg 肝组织加入 1 mL TRIZOL，冰浴条件下研磨器中研磨；

4℃，12000 g 离心 10 min，上清转入另一 Eppendorf 管，加入 0.2 mL 氯仿，震荡混匀，静置 10 min；

（2）12000g 离心 10 min，小心吸取上清，加入 0.5 mL 异丙醇，静置 10 min；

（3）4℃，12000g 离心 10 min，RNA 呈胶样沉淀；

（4）小心弃上清，每管加入 1 mL 75%乙醇，旋涡洗涤；

（5）4℃，7500g 离心 10 min，弃上清，置 37℃孵箱干燥；

（6）加入 20μL DEPC 处理过的去离子水溶解；

（7）用紫外分光光度计测定 A260 与 A280 的吸光值，要求 A260/A280 比值在 1.8-2.0 之间，以保证提取的 RNA 纯度。

采用 SuperscriptⅡ反转录酶系统进行反转录, 20μL 体系中加入 2μg 总 RNA，1μL oligodT，ddH2O 至 10μL，70℃温育 5 min，冰上冷却 5 min，加入 5×反应缓冲液 4μL，0.1mmol/L DTT 2 μL，10mmol/L dNTP 1 μL；反转录酶 1 μL，加 DEPC 处理水至 25 μL ，混匀后 42℃温育 60 min，70℃ 15 min 终止反应。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.1.4.2　cDNA 合成

采用 TIANScript RT 合成 cDNA,按照试剂盒提供的实验步骤以 oligo(dT)20 为引物，将总 RNA（<3μg）在 M-MLV 逆转录酶作用下，合成 cDNA，反应体系为 20μL。阴性对照组中不含有 M-MLV 逆转录酶，以观察标本中是否被基因组 DNA 所污染，以试剂盒所提供的 Hela 细胞 RNA 作为阳性对照组。

2.1.4.3　实时定量 PCR

以 SYBR Green 染料作为 PCR 定量基础。特定基因引物通过 http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest/网站提供的 Primer-Quest SM 软件设计基因引物（表 2），CFX96 Real-Time 系统完成 DNA 扩增。

PCR 反应体系为：

SYBR Green PCR master mix 5 μl

Primers (10μM)　0.3 μl

cDNA　1 μl

Distill water　3.7μl

Total volume　10 μl

表 2. 1 反应引物序列表

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
Gapdh	5'-ACTCCCATTCTTCCACCTTTG-3'	5'-AATATGGCTACAGCAACAGGG-3'
Ampk	5'-GCTGACTTCGGACTCTCTAATATG-3'	5'-CATACAGCCTTCCTGAGATGAC-3'
Wip1	5'-GTCTGGAGTGAATCGTGTAGTT-3'	5'-CTACGGCCAAGAAAGGAATCT-3'
Atg5	5'-TCCAACGTGCTTTACTCTCTATC-3'	5'-TGTCAGTTACCAGCGTCAAATA-3'
Atg12	5'-TGAAGGCTGTAGGAGACACT-3'	5'-GCCAGCAGTCTGAGGAATTT-3'
Uik1	5'-GCAGTTGCTTCTGGCTCTAT-3'	5'-GGGTGCTGGCATCTAAGAAA-3'
Lc3	5'-CAGATGAAGACACCCTGATTGA-3'	5'-TCCAGACGTTTCAGAGCTAATG-3'

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

反应条件为 95℃预变性 2 min；95℃变性 25sec，60℃退火 25sec, 70℃延伸 20sec，重复 40 个循环；以 95℃15sec，58℃ 15sec 及 95℃ 15sec 的变化绘制离解曲线。每个样本用 Prism 7500 型实时定量 PCR 仪进行 PCR 反应 3 次。数据采用 ABI Prism 7500 SDS 软件包进行分析，确定每次反应的循环阈值。采用 2−ΔΔCt 法比较样本中靶基因的相对表达量，根据得出的 Ct 值，仪器自动分析得出代表相对表达量的 RQ 值。

2.1.5 统计分析

实验数据以均数土标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS15.0 软件分析数据，两组间比较采用非配对 t-检验分析；$p < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2.2 结果

肝组织细胞自噬通路相关基因 mRNA 相对表达量

AMPK 是 AMP 依赖的蛋白激酶，在低氧或缺血情况下可以被激活。自噬起始阶段，AMPK 可以抑制 mTOR 活性，使 ULK1 上调，下面顺序上调 Atg13，Beclin1 等自噬相关蛋白，从而自噬发生。然后，WIPI 聚集，自噬成核现象起始。Atg5，Atg12 和 LC3 促使自噬体延伸。我们的实验通过间歇低氧来处理大鼠，观察大鼠肝细胞自噬情况。如图 2.1，应用 *Qrt-PCR* 技术测定间歇低氧处理的大鼠肝组织中 AMPK 水平升高，相应的 mTOR 降低，ULK1 和 Beclin1 水平升高，但均无统计学意义（$p > 0.05$），而实验中 Atg13 无明显变化（$p > 0.05$）；间歇低氧组，与自噬体成核相关的 WIpI 表达下调（$p < 0.05$）；间歇低氧组组与对照组相比， Atg5 表达无明显变化，Atg12 表达升高，但无意义（$p > 0.05$），但是 WIpI 表达下调 LC3 的表达升高，且有统计学意义（$p < 0.05$）。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

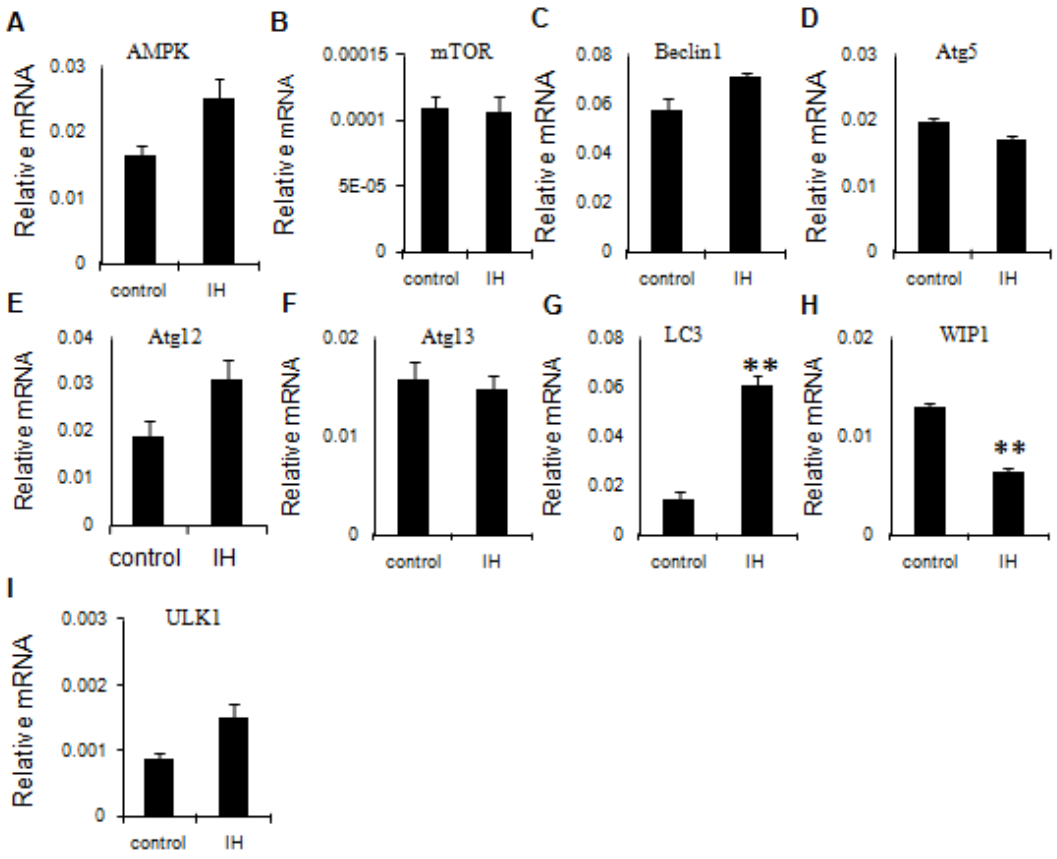


图 2.1 肝组织细胞自噬通路相关基因 mRNA 的表达

注* $p < 0.05$ 具有统计学意义

2.3 讨论

2.3.1 自噬的发生及信号转导

到目前为止，有三种类型的自噬被人们所熟知，分别是：巨自噬，微自噬和伴侣介导的自噬[59]；自噬由自噬相关基因（autophagy-related genes，ATGs)）和相关酶介导[60]。巨自噬也是我们文献研究中常常提到的自噬，是典型的自噬途径，有高度保守的过程来降解细胞内蛋白聚合物和损害的细胞器来维持细胞稳态。为了自消化这些蛋白和细胞器，细胞经历一个类似于成核现象的过程，通过重新形成脂质为基础双层膜结构的吞噬泡，这一过程十分复杂，需要活化的多蛋白复合体，包括：Atg6（Beclin-1），III 型磷酸肌醇-3 激酶（Vps34），紫

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

外线照射抵抗相关基因（UVRAG），B 细胞 CLL/淋巴瘤 2（Bal-2），Bax 作用因子 1（Bif-1），和其他参与者，如 Beclin-1 相关自噬 1 激活分子（AMBRA1），液泡膜脂蛋白 1（VMP-1），病毒蛋白感染细胞蛋白 34（ICP34）Bcl-2 病毒形式，这些物质相互协调完成吞噬泡形成过程。自噬泡延伸过程最初涉及两个泛素化样反应，然后自噬体成熟，封装与不同的内小体融合，运输到自噬体，进一步与溶酶体融合。这些融合过程需要很多可溶的 NSF 附着蛋白受体（SNARE）样蛋白装配来帮助形成成熟的溶酶自噬体使物质降解和再循环实现[61]。自噬的基本作用是维持细胞基本生存及对环境应激的细胞保护作用，如中毒刺激，伽马辐射，化疗和饥饿。自噬在发育的过程也十分重要，通过为细胞提供能量和生物合成作用，可以维持正常的代谢。在饥饿引起的传统途径中，自噬小体形成受 Beclin-1，PI3K 和泛素样连接反应诱导。相反，在非传统途径中，自噬不需要整套的 ATG 蛋白来形成自噬体。典型的是，不依赖于 Beclin-1 的自噬依靠 Unc-51 样激酶 1/2（Ulk1）复合体激活来诱导自噬，通过 LC3 促进吞噬泡形成[62]。最近，损伤诱导的自噬和线粒体自噬被认为是非经典途径，因为他们不依靠 PI3K/Beclin-1[63]。自噬的另一个保护作用是，可以帮助抵抗病原体，在免疫应答中帮助 T 细胞塑形。

在真菌中，自噬的经典途径涉及约 30 个 ATG 基因和他们的哺乳类同源基因，实验发现，在哺乳动物肝细胞中诱导自噬涉及另外 8 个 ATG 基因来调节自噬体形成和降解过程。这些研究阐述了营养水平、能量状态，激素作为自噬关键调节因子的重要性。另外环境因素，低氧、热应激、活性氧（ROS）聚集都可以诱导自噬。内质网（ER）是强力及精细调节蛋白折叠，保证蛋白真实性，参与各种细胞过程的细胞器。如果 ER 的微环境破坏，未折叠的蛋白应答会通过真核转录因子 2-α 激酶 3（EIF2AK3）和活化转录因子 6（ATF6）途径改善错误折叠蛋白的聚集来激活自噬。所以，ER 应激是一个潜在的自噬诱导因子。通常，自噬与长寿，疾病预防，生长和哺乳动物发育等方面有关。

在各种调节自噬的途径中，一个涉及一种丝氨酸-酪氨酸蛋白激酶—哺乳动物雷帕霉素靶蛋白（mTOR）的自噬信号转导途径是非常重要的。因为作为能量感觉机制和应激反应的一部分，mTOR 激酶是自噬的重要抑制子和细胞生长增值的控制器。mTORC1 和 mTORC2 是两种 mTOR 复合体，位置和作用不同，但是都可以被营养缺乏，应激，生长因子信号减少诱导[64]。在正常情况下，mTOR

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

途径抑制自噬，但是在丰富的营养下，可以调节代谢压力信号来促使细胞成长[65]。mTOR 上游是 I 型 PI3K 可以接受内源性和外源性信号（胰岛素、生长因子、氨基酸等），便于通过 3-磷酸肌醇激酶依赖激酶 1（PDK1）磷酸化蛋白激酶 B（Akt）。在营养丰富条件下，磷酸化的 Akt 通过促进下游 Ulk1 复合体活化和干扰 Ulk1 与 AMP 活化蛋白激酶（AMPK）复合体相互作用从而激活 mTOR 复合体来抑制自噬。典型的是，mTORC2 通过磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Akt/PKB 的丝氨酸残基 S473，这导致 PDK1 激活 Akt。在低能量状态，重要的能量感受器异源三聚体酶 AMPK 打开, 通过直接抑制 MTORC1 活性或通过 Ulk1 磷酸化有效的诱导自噬，接下来磷酸化 Atg13 和 RB1CC1/FIP200 来激活成核阶段[66]。Bcl-2 家族蛋白通过干扰 Beclin-1 和 PI3K 复合体抑制自噬，从而抑制早期的自噬体形成。成核阶段是一系列过程, 依赖于 PtdIns3K 复合体完成, PtdIns3K 复合体将磷脂酰肌醇（PI）磷酸化为三磷酸磷脂酰肌醇（PI3P），后者征集蛋白复合体和脂肪来扩展自噬体膜。PtdIns3K 复合体含有两个核心相互作用的部分 PIK3C3/VPS34 和 Becin-1，根据复合体中不同的辅助蛋白成分具有不同功能。UVRAG/Bif1 和 ATG14 在 Beclin-1 复合体中被发现是相互排斥的。此外, ULK1/2 和 Vps34 复合体募集两个泛素样蛋白结合系统以便完成自噬体膜的生长延伸, 即 Atg5-Atg12-Atg16 和 LC3 磷脂酰乙醇胺（PE）系统[67]。Atg12 最初激活通过与 Atg7（E1 样酶）在 ATP 基础上的反应，然后通过 Atg10 与 Atg5 结合。然后 Atg16 与 Atg12-Atg5 复合体共价结合，形成 Atg12-Atg5-Atg16L1 三聚物复合体来形成膜。当延伸完成，复合物原件从自噬体游离回到细胞质。哺乳动物同源的酵母菌蛋白 ATG8(MAP1LC3)是第二结合路径的修饰靶目标。Atg4B 切开前体 LC3 的 C 末端 22 残基，产生细胞质 LC3-I 然后通过 E2 样酶——Atg7 和 Atg3 与 PE 结合。LC3 的酯化形式（LC3II）在适配器 p62/SQSTM1 的帮助下选择性与自噬体膜合并形成膜的一部分, 这一过程是通过 p62/SQSTM1C 末端泛素样结合区域和 LC3 相互作用区域（LIR）[68]。死骨片 1（SQSTM1）是脚手架蛋白, 它的构成表达和翻转需要自噬诱导的选择性降解。与溶酶体融合导致靶目标蛋白降解同时伴随与自噬体内膜相关的 LC3-II（位于外膜的 LC3-II 已解离）作为大分子再回收利用。信号的微调对于自噬功能的保守性十分重要，因为以上提及的任何一个降解阶段都可以导致过多或过少的自噬，这与各种类型的疾病相关，甚至包括肿瘤[69]。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

自噬是把双刃剑，在某些环境线过度的自噬是有害的，可以导致凋亡或细胞死亡[70]。因此，区分细胞保护性自噬和在某些自噬情况下可能导致细胞死亡十分重要。

mTOR 在自噬的发生及信号转导过程中起到了重要的核心作用，mTOR 有两种不同的信号复合体：mTOR 复合体 1（mTORC1）和 mTOR 复合体 2（mTORC2），分别结合了多种伴侣蛋白。mLST8，DEPTOR 和 Tti1/Tel2 复合体在 mTORC1 和 mTORC2 中均存在；而 PRPTOR 和 PRAS40 特异性存在于 mTORC1 中，同时，RICTOR，mSin1 和 PROCTOR1/2 特异性存在于 mTORC2。这两个激酶复合体结合特异性底物，所以可以诱导不同的下游信号转导来调节细胞功能。

mTORC1 具有“建设作用“可以促进可以促进细胞的合成代谢，为细胞生长增殖提供必要的物质。mTORC1 整合各种刺激和信号网络来刺激蛋白，脂类和核酸的合成，阻止分解代谢过程，如在翻译后或转录水平的自噬[71]。结节性硬化（TSC）肿瘤抑制复合体（TSC1/ TSC2）是重要的 mTORC1 上游负调节因子。错构瘤蛋白和薯球蛋白（分别编码 TSC1 和 TSC2）遗传突变导致肿瘤在各组织中发展，如血管纤维瘤，血管平滑肌脂肪瘤，淋巴管平滑肌瘤瘤病，肾细胞癌。TSC1 或 TSC2 缺失突变导致了基本的 mTORC1 激活，从而使生长失控导致 TSC 疾病[72]。这一发现为应用 mTORC1 抑制子来治疗 TSC 和相关疾病，如癌症，有了科学基础[73]。

已经确定的 mTORC1 上游调节因子是生长因子/PI3K/AKT 信号转导途径[71]。生长因子如胰岛素和 IGF 激活相同的受体（受体酪氨酸激酶，PTKs），然后激活 PI3K/AKT 信号轴。活化的 AKT 直接被磷酸化从而抑制 TSC1/2，TSC1/2 是一种 GTP 酶活化蛋白激（GAP）与 Ras 同源富含 Rheb（GTP 酶）。AKT 依赖的磷酸化导致 TSC1/2 从溶酶体解离，在 Rheb 位点促进 Rheb 激活。因为 GTP 结合 Rheb 是潜在的 mTORC1 激活子，通过 ATK 依赖的磷酸化抑制 TSC1/2 来活化 mTORC1。另外，AKT 直接磷酸化和抑制 PRAS40，这是一个 mTORC1 的组件负调节复合激酶活性，导致了 mTORC1 的激活。更进一步说，激活 RTK 也可以刺激 Ras/Erk/p90 核小体 S6 激酶 1（RSK1）信号轴，可以直接林散花 TSC2 来激活 GAP 活性。相反的是，细胞压力，如细胞

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

低能量水平或低氧激活 TSC1/2 来抑制 mTORC1 活性。AMPK 是一个细胞能量水平的感受器，在 AMP/ATP 比例增高时激活。AMPK 可以磷酸化 TSC2 并推测可以增加 TSC1/2GAP 活性。更深一步，AMPK 直接磷酸化 RAPTOR，通过变构抑制来降低 mTORC1 活性[74]。这些研究显示了 AMPK 在细胞能量水平与 mTORC1 调节之间的重要作用。细胞低氧通过上调 DNA 损伤应答元件 1（REDD1）来抑制 mTORC1，具体 REDD1 调节 TSC2 活性来抑制 mTORC1。最新的研究说明 TSC1/2 肿瘤抑制因子在接收多种信号后作为重要的信号转导因子来控制 mTORC1 活性和细胞生长。

作为蛋白合成的必须成分，氨基酸也是重要的 mTORC1 调节因子。一组通过 shRNA 库遗传筛选小 GTP 酶和通过免疫亲和提纯合成分析 mTORC1 相关反应蛋白鉴别出 Rag 蛋白（RagA/B/C），Ras 样小 GTP 酶家族成员，是重要的介导氨基酸诱导 mTORC1 激活的因子。当在小细胞表达时，RagA 和 RagB 都是功能残基具有有高度同源的氨基酸，RagC 和 RagD 是同源的功能残基。RagA 或 RagB 与 RagC 或 RagD 形成异质二聚体，这个二聚体通过溶酶体蛋白复合体调制器与溶酶体相连。当氨基酸呈现时，Rag GTP 酶被激活并募集 mTORC1 到溶酶体表面，然后激活激酶复合体。值得注意的是，只有 GTP 结合形式的 Rheb 可以激活 mTORC1。Rag 当 RagA/B 和 RagC/D 分别与 GTP 和 GDP 结合时，GTP 酶与 RAPTOR 结合。氨基酸调节 Rag 鸟苷酸核嘌呤结合，从而可以控制 Rag GTP 酶和 mTORC1 之间的反应。另外，研究显示，胰岛素/ATK 信号轴调节溶酶体 TSC1/2 的定位点，从而说明溶酶体是 mTORC1 激活的信号中枢[75]。最近有研究显示，其他的亚细胞成分，如应激颗粒和过氧化物酶体在氧化应激应答时对于调节 mTORC1 信号转导起到了重要作用，但是这些亚细胞成分和溶酶体 mTORC1 活化之间的相互作用没有完全阐述清楚[76]。

mTORC2 调节机制中，其上游作用因子大部分尚不明确，目前仅知道上游激活子是生长因子/PI3K 信号轴。有研究假设 PI3K 信号通过促进激酶复合物和核小体的关系来激活 mTORC2。然后，关于核小体与 mTORC2 之间的联系及作用机制还没有被发现。一系列的 AGC 家庭成员激酶（PKA，PKG，和 PKC）被 mTORC2 磷酸化，调节细胞生存，代谢和细胞骨架组成[77]。mTOR2 磷酸化 AGC 家族成员激酶的转换修饰基及疏水基，分别使这些激酶稳定和

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

活化。值得注意的是，ATK 的疏水基是 mTORC2 的特征性底物，它的磷酸化对于增强 AKT 活性非常重要[64]。所以，从 mTORC2 到 mTORC1 AKT 介导正向串联作用，因为上文我们已探讨了 AKT 是 mTORC1 的上游刺激因子。

通过下调 RTK/PI3K 信号途径，产生多种从 mTORC1 到 mTORC2 的负反馈路径。核小体蛋白 S6 激酶 1（S6K1），mTORC1 下游效应器，负调节胰岛素受体底物 1（IRS1），IRS1 是 RTK/PI3K 信号转导的正性调节子。进一步说，mTORC1 通过磷酸化 IRS1 和生长因子结合蛋白 10（GRB10）直接抑制 PTK/PI3K 信号途径。所以，mTORC1 和 mTORC2 信号途径微调是为了应答细胞代谢和环境的能量改变。

我们知道，自噬在细胞营养缺乏或应激应答时是重要的提供能量和分子组份的过程。曾有研究发现，氨基酸夺获在培养的哺乳动物细胞和鼠肝脏中是自噬的重要诱导原因。遗传和药物抑制 mTORC1 可以诱导自噬最早在酵母菌中被发现，最近 mTORC1 在哺乳动物细胞中的自噬调节已被广泛关注。mTORC1 抑制自噬起始 UNC-5 样自噬激活激酶（ULK）复合体，是通过磷酸化自噬相关基因 13（ATG13）和 ULK1/2 来实现的。ULK1/2 磷酸化 ATG13 和 FIP200，这是 ULK1/2 激酶复合体重要的亚基[62]。在酵母菌中，TORC1 抑制自噬起始激酶 ATG1（哺乳动物中在 ULK1/2 同源），通过磷酸化 ATG13 和扰乱 ATG1 和 ATG13 之间的相互作用。在哺乳动物细胞，mTORC1 磷酸化 ULK1 的 Ser758（小鼠是 Ser757），阻止 AMPK 磷酸化 ULK1 的反应[78]。因此，由 ULK 调控的自噬的起始，在面对细胞营养和能量水平改变时，mTORC1 和 AMPK 具有相反的作用。另外，关于 mTORC1 对 ULK1 的调控，有文献提出 mTORC1 通过抑制自噬/Beclin1 调节因子 1（AMBRA1）的磷酸化来抑制 ULK1 的稳定性。更进一步说，AMPK 和 mTORC1 也可以调节 VPS34 复合体，它是 III 型 PI3K 在自噬体形成过程中有重要作用[75]。VPS34 形成多种复合体在自噬诱导和囊泡运输过程中有重要作用。ATG14L 相关的 VPS34 复合体参与自噬调节过程起到了特别作用。面对营养应激雅力士，AMPK 通过磷酸化 Beclin1 来激活前自噬 VPS34 复合体，同时通过磷酸化 VPS 的 Thr163/Ser165 基团来抑制非自噬 VPS34 复合体[79]。相反的，mTORC 磷酸化 VPS34 复合体的 ATG14L，抑制 VPS34 脂肪酶活性，提供了 mTORC1 抑制自噬的另一机制。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mTORC1 也可以通过调节转录因子 EB（TFEB）的位点在转录水平调节自噬，TFEB 是溶酶体和自噬基因主要转录调节因子。TFEB 的转录激活通过营养和磷酸化依赖的细胞质到细胞核之间的穿梭运动来调节。尽管，其他激酶可以磷酸化 TFEB，但是 mTORC1 直接磷酸化 TFEB 的 Ser142 或 Ser211，这些磷酸化导致了胞浆内 TEFB 被隔离。氨基酸作为重要的转运子，Rag GTP 酶可以结合并将 TFEB 在溶酶体内隔绝，从而抑制 TFEB 活性。所以，TFEB 可以被组成性激活，无论在 RagA 和 RagB 缺失的细胞中营养成分的有效性。总之，mTORC1 不仅调节合成代谢还调节分解代谢来满足细胞生长的需求。在生长的细胞中，高 mTORC1 活性促进生物分子合成同时抑制了自噬。mTORC1 高度调节自噬，抑制自噬活性，主要是通过磷酸化性抑制 ULK1/2 和 VPS34 复合体，阻止溶酶体和自噬基因通过 TFEB 磷酸化的全面性表达[72]。

自噬流表示所有的自噬分子事件，从自噬诱导和自噬体形成到自噬体降解再形成溶酶体。有趣的是，尽管 mTORC1 在自噬的起始是非激活的，但是激酶复合体在自噬终末阶段自噬体产物讲解供能时被激活。这一激活过程需要功能性溶酶体再形成，暗示了 mTORC1 在自噬流完成过程中的重要作用。

根据上述所讨论的内容，尚不能完全解释 mTORC2 活性的调节。然而，推测胰岛素/PI3K 信号激活 mTORC2，通过促进 mTORC2 与溶酶体的反应，随后，mTORC2 在翻译过程中，磷酸化 AKT 的翻转位点 Thr450。另外，mTORC2 磷酸化 AKT 的疏水基位点，Ser473，可以导致 AKT/mTORC1 信号轴激活。所以，mTORC2 可以通过激活 mTORC1 间接抑制自噬过程。mTORC2 是否可直接调节自噬过程尚待进一步研究。

2.3.2 自噬相关蛋白在自噬中的作用

ATG9/Atg9 是唯一一个与细胞膜整合的 ATG 蛋白，对于自噬体形成十分重要。ATG9 有与 GFP-LC3 部分区域化的作用。可能 ATG9/Atg9 最独特的特征是一多样的分散的小点形式存在，而多数 Atg 蛋白最初发现在细胞液中以单独斑点会弥漫分布存在。酵母菌的 Atg9 可能在吞噬泡聚集点（PAS）和外周贮存池之间循环；外周贮存池与微管聚集系统有关，是自噬泡的前体。顺行前进至 PAS 需要 Atg11，Atg23，Atg27 和肌动蛋白。逆行运动需要 Atg1-Atg13，Atg2-Atg18 和 PtdIns3K 复合体 I。如果发生基因突变，如 atg1Δ，

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Atg9 可以在 PAS 之外聚集，这一现象形成是在敲除 ATG1（TAKA）基因之后 Atg9 转运的基础。简单地说，这是一个异位显性分析，双重突变株建立（atg1Δ 突变是其中之一）来表达 Atg9-GFP。如果第二个突变基因编码 Atg9 顺行前进必须蛋白，双重突变可以观察到多样的 Atg9-GFP 斑点。相反，若果蛋白与 Atg1 行动一致或在 Atg1 之后行动，所有的 ATG9-GFP 可以被限制在 PAS 之内。检测 ATG9 的位置已被广泛应于用高级真核生物，但是，在酵母菌中观察到，这个蛋白循环时在 Atg1/ULK1 依赖方面表现出相同的形式，这说明这个蛋白可能具有指示 ULK1 和 ATG13 的功能[80]。

ATG5，ATG12 和 ATG16L1，与自噬泡相关，可以被荧光或免疫荧光检测到。控制自噬上调之后，内源性 ATG5，ATG12 和 ATG16L1 斑点形成。在生理条件下，这些内源性蛋白主要弥漫分布于细胞质内。在自噬被诱导时，如饥饿，含有点状 ATG5，ATG12 和 ATG16L1 的细胞比例显著升高[67]。深层次说，抑制自噬形成组织了饥饿诱导的斑点形成，这一分析在哺乳动物中得到强有力支持。

ATG12-ATG5 共轭体在很多研究中被用于评估自噬情况。在拟南芥和很多哺乳动物细胞中，所有的 ATG5 和 ATG12 蛋白都以共轭形式存在，且表达水平没有很大改变即使在短暂饥饿状态下。所以，监测 ATG12-ATG5 共轭体对于观察自噬的发生情况不是一个很好的方法。但值得注意的是，很多细胞系可以检测到游离的 ATG5，这表示，大量的游离 ATG5 是某些细胞系所依赖的。有些数据显示，ATG12-ATG5 共轭体的总数量在长期饥饿时可以升高，这一现象在肝细胞鼠和人的成纤维细胞中被发现[60]。

ATG14 酵母菌的 Atg14 是 Vps34 复合体 I 自噬特异性亚基，在人类已经发现与其同源的是 ATG14 （ATG14/BARKOR）。ATG14 最初位于自噬泡中。蛋白的 C 末端片段是 BATS 区域（BARKOR/ATG14），这是自噬体靶序列，它可以指挥 GFP 和 BECN1 以嵌合蛋白的方式与自噬体相接。目前，已有抗体可以检测内源性 ATG14 是否存在。ATG14-GFP 或 BAST-GFP 可以被免疫荧光显微镜或 TEM 检测到，并作为自噬的标记物被应用。然而，ATG14 不仅仅存在于自噬泡，还可以存在于成熟的自噬体和 ER 上。因此，ATG 的检测既可以用于自噬泡，也可用于自噬体的标记物。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ATG16L1 作为自噬的供体且存在于自噬过程的早期阶段，用于监测细胞膜运动；ATG16L1 位于自噬泡，但是不完全存在于自噬体。ATG16L1 可以被免疫 TEM，带有标记的 ATG16L1 免疫染色来检测到，或通过 GFP 与 ATG16L1 来检测 ATG16L1 水平。

Atg18/WIPI 家族：酵母菌的 Atg18 和 Atg21 与人的 WIPI 同源，与巨细胞自噬相关并参与自噬相关的所有过程。这些蛋白可以结合磷脂酰肌醇三磷酸（PtdIns3P），可以存在于自噬泡，自噬体和 PtdIns（3,5）P2 中。人 WIPI1 和 WIPI2 在 III 型磷脂酰肌醇三磷酸激酶（PtdIns3KC3）复合体 I（PIK3C3，BECN1，PIK3R4/VPS15，ATG14）功能下游，在 ATG12 和 LC3 繁素样结合体系统的上游。在自噬途径的起始阶段，WIPI1 和 WIPI2 结合 PtdIns3P 并聚集于特定膜结构，如参与溶酶体形成的内质网膜。在荧光显微镜定量基础上，特异的 WIPI 蛋白定位被用来分析和监测人细胞的自噬发生情况。间接荧光显微镜和 EM 检测内源性 WIPI1 或 WIPI2，临时或稳定的 GEP 与 WIPI1 或 WIPI2 融合后复合体表达，都可以用来检测细胞中自噬体膜上 WIPI 斑点的分布从而观察基础自噬情况。当周围环境可以使自噬活性升高时，如营养缺失或雷帕霉素干预，细胞膜上 WIPI 斑点比对照时增多可以反映出自噬被诱导[81]。相反，当环境中有降低自噬活性的因素时，如抑制剂干预，WIPI 斑点阳性细胞数量减少说明自噬被抑制。WIPI 斑点的诱导形成和抑制形成与 LC3-II 的蛋白水平和 GFP-LC3 斑点形成有密切关系。所以，WIPI 斑点分析可以通过检测 LC3 来替代。WIPI1 和 WIPI2 斑点荧光自动成像分析提供了一个有效可信的方式来联合检测 WIPI 蛋白与其他分子结合。需要注意的是，WIPI2 有两种异构体，WIPI2B 和 WIPI2D，在线虫中，WIPI14（EPG-6）是参与自噬的 WIPI 的同源基因。所以，这些蛋白，包括不典型的 WDR45L/WIPI3，提供了另一种的监测自噬泡和自噬体的形式。

Beclin1 基因也称 BECN1 基因,是酵母 Atg6 的同源基因,也是哺乳动物参与自噬的特异性基因。BECN1/Atg6 和 PIK3C3/VPS34 是自噬发生过程中必需元素，发布自噬发生的指令，很多研究者通过 BECN1 来监控自噬。BECN1 可以与抗凋亡蛋白 BCL2 结合并被抑制[82]。当 BECN1 被前凋亡蛋白 BH3 的 DAPK 区域磷酸化时，或 BLC2 被 MAPK8/JNK1 磷酸化时，BECN1 从 BCL2 上释放诱导自噬发生。非常需要重视的是，自噬的某些形式可以被不依赖于

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

BECN1 的方式诱导，并且不被 PtdIns3K 抑制子抑制。在很多细胞中，细胞凋亡蛋白酶介导的 BECN1 裂解可以使 BECN1 诱导的自噬失活, 并且增强凋亡，这说明，自噬与凋亡的关系十分复杂[83]。

尽管 BECN1 大部分位于转运高尔基体网络系统附近，但是 ER 和线粒体中也被发现。另外，BECN1 和 PIK3C3 可以以多种复合体形式出现，所以，监测 BECN1 定位时需要注意这些。通过各种刺激 BECN1 和 PIK3C3 阳性大颗粒聚集而诱导的自噬在高尔基复合体区域可以被免疫荧光检测到。因此，荧光显微镜或 TEM 检测 BECN1-GFP 斑点的方法是自噬诱导的另一个标志；然而，BECN1 与 GFP 嵌合后，GFP 部分会干扰 BECN1 的正确定位。当不依赖于 BECN1 的自噬途径参与进来时，除了细胞正常表达的 BECN1 外，大颗粒聚集体没有形成。

2.3.3 间歇低氧与细胞自噬

低氧诱导的细胞死亡在临床十分常见，并且参与到各种生理过程中，如细胞增殖，缺氧缺血性疾病，器官移植，抗血管生成，肿瘤生长及转移[84]。自噬在细胞的生理学功能方面具有重要作用，包括老化的蛋白降解，细胞器更新，适应营养缺乏状态，延长生命周期，细胞发育，细胞分化和抗衰老作用[85]。所以，自噬可以保护细胞活性或者说是避免细胞死亡的自我保护过程。

有研究通过血管内皮低氧状态来观察细胞自噬情况，很多方法用来确定自噬是否发生，包括荧光 LC3-GFP 斑点测定，电镜显微成像和自噬相关分子 mRNA 和蛋白水平表达。内皮细胞低氧暴露后，可以观察到自噬泡及自噬体数量在细胞质中明显增高，这表明增强自噬形成，在应用雷帕霉素对照实验组中，可以观察到同样现象。更进一步，低氧或应用雷帕霉素治疗后检测自噬相关分子表达来观察自噬发生情况。可以发现通过低氧或雷帕霉素处理过的实验组，LC3-II，Becin1，Atg5 和 Atg7 的 mRNA 及蛋白表达水平升高。所以体外实验证实低氧可以诱导自噬发生[86]。

间歇低氧对于细胞和组织来说是类似于缺血再灌注的病理过程。在很多体内或体外关于肝细胞缺血再灌注实验中，观察自噬的作用[87]。哺乳动物 Beclin1 与酵母菌 Atg6 同源，在自噬中有重要作用。自噬蛋白 Beclin1 表达增加，发生于营养剥夺，药物诱导，体外小鼠肝细胞缺氧-复氧，体内大鼠肝脏

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

缺血再灌注时，可以保护肝细胞避免发生细胞死亡降低肝缺血再灌注损伤。在肝脏缺血再灌注时，肝脏星形细胞，中性粒细胞，和血小板被活化[88]。这些细胞活化可以导致 ROS 释放和炎症级联反应发生，包括很多炎症因子释放，如 TNFα，IL-2，IL-6，IL-1 和高机动性编组框 1（HMGB1）蛋白。HMGB1 是 DNA 结合蛋白，可以通过肝脏非实质细胞（肝星形细胞和内皮细胞）和中性粒细胞主动分泌，或由凋亡的肝脏细胞被动分泌，从而诱导炎症因子信号级联反应发生[87]。HMGB1 是一个警告信号蛋白，在肝脏缺血再灌注情况下起始炎症反应。在正常的大鼠肝脏中，HMGB1 主要表达于肝细胞的细胞核中，可以增加 Beclin1 表达，可以介到肝脏缺血再灌注引起的 MAPK 激活，进一步诱导自噬发生[89, 90]。同时还发现，肝脏的缺血再灌注不仅可以使 Beclin1 升高，还可以使 Atg8/微管相关蛋白 1 轻链 3(MAP1LC3)表达增加；LC3 也参与自噬的形成和扩增。

LC3 的形成和降解过程，从非共价形式的 LC3-I 到共价形式的 LC-II，仍然与自噬溶酶体相关，表明自噬发生时 LC3 的增加。给予大鼠 60 分钟缺血过程，可以导致肝脏 LC3-II 表达增加。LC3-II 与自噬体膜相关，允许自噬泡闭合，同时 Atg5 表达增加，然后与 Atg12 和 Atg16 形成蛋白复合体，导致自噬体形成最后在再灌注时增强自噬。

从肝脏缺血-再灌注实验中，可以观察到自噬的发生，并且推测自噬保护肝脏避免发生细胞凋亡。我们的间歇低氧过程是缺氧-再氧合过程，引起损害与缺血-再灌注类似。我们的实验通过 PCR 定量检测了 AMPK，mTOT，Beclin1，Atg5，Atg12，Atg13，LC3，WIPI 和 ULK1 的 mRNA 相对表达水平。从上面讨论中，我们知道这些蛋白在自噬的激活和发生过程中起到了重要作用。AMPK 表达升高可以激活自噬，使 mTOR，Beclin，Atg5，Atg12，Atg13,ULK1 等表达上调，但是我们的数据显示，间歇低氧组 AMPK，mTOR，Beclin1，Atg12，ULK1 虽有升高趋势，但没有统计学意义，而 Atg5 和 Atg13 还稍有下降。LC3 表达升高和 WIPI 表达下降，且有统计学意义，因为 LC3-II 是自噬体膜上的重要成分，从这个指标我们可以确定间歇低氧确实引起了自噬的发生。但是，我们需要注意的是，自噬与凋亡是关系复杂的细胞代谢过程。细胞自噬可通过选择性减少胞内促凋亡蛋白来降低细胞死亡，但是当刺激强度或刺激持续时间超过细胞代偿机制的保护作用后，则会启动细胞死亡

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

程序。细胞凋亡的发生常常伴随着高水平的细胞凋亡蛋白激活。这可导致许多蛋白质的清除，加剧凋亡的进程。凋亡相关蛋白能够消化一些关键的自噬相关蛋白，导致细胞自噬被抑制。被消解的自噬相关蛋白主要有 ATG3 和 Beclin1, 它们的降解导致了对自噬激活功能的锐减。而且, 自噬蛋白 AMBRA1（BECN1 介导的自噬激活分子）不可逆转的被活化的凋亡蛋白酶和钙激活酶联合作用下降解，当然，细胞会表达一种缺失凋亡蛋白酶 3 切割位点的 AMBRA1 突变型以抵抗凋亡的发生。

凋亡蛋白导致的自噬相关蛋白降解加速细胞死亡，同时，自噬相关蛋白降解片段还可获得促凋亡功能[91]。被 caspase 3、caspase 6、caspase 9 降解的 Beclin1 可形成末端含羧基的片段，作为 BH3 结合域的下游片段定位于细胞线粒体并可渗透孤立的线粒体膜引起细胞色素 c 的释放。同样，ATG4D 被 caspase 3 降解后也可与 BH3 结合域结合获得促凋亡功能。由钙蛋白酶介导的 ATG5 的降解导致了一种氨基末端片段的形成，并易位至线粒体诱导细胞凋亡[92]。所以，我们的实验中，间歇低氧组可能由于细胞损伤过大或大鼠宰杀过程中加重肝脏损害出现了凋亡，从而使某些自噬蛋白受到抑制。

关于，间歇低氧在大鼠肝脏中的自噬我们已初步探讨，虽然确定间歇低氧引起了肝脏自噬，但是很多检测指标尚不够理想，而且是否有其他机制参与其中尚不可知。所以，在此方面还需更多的实验来进行研究。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4 小结

1.间歇低氧可以通过 AMPK 途径抑制 mTOR 及下游基因来激活自噬；
2.自噬与凋亡之间作用复杂，还需要进一步探讨其中机制。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

三、糖皮质激素在肝细胞自噬中的作用

众所周知，糖皮质激素具有免疫调节作用，是强有力的免疫抑制剂。有研究显示，糖皮质激素通过诱导凋亡来抑制哺乳动物 T 细胞的活性。在我们在间歇低氧大鼠模型的研究中，在研究炎症因子调节细胞色素氧化酶 P450 时，发现了糖皮质激素受体在炎症中的重要作用。因为炎症与自噬密切相关，而第一部分实验中，我们发现糖皮质激素受体参与肝脏药物代谢酶分泌。所以我们通过糖皮质激素对人肝脏 LO2 细胞进行干预，观察糖皮质激素对人肝脏 LO2 细胞生长的作用及对细胞色素氧化酶 P450 的作用，并且通过自噬相关蛋白的测定，探讨糖皮质激素受体在人肝脏 LO2 细胞自噬中的作用。

3.1 材料和方法

3.1.1 实验材料

人肝脏正常细胞 LO2 细胞株：来源：实验用人肝正常细胞 LO2 细胞株由南开大学医学院刘成虎老师提供。

3.1.2 实验试剂及材料

（1）地塞米松，购自中国大连美仑生物；
（2）糖皮质激素受体拮抗剂 RU486，购自上海博升生物科技有限公司；
（3）DMEM 培养基，购自 Gibco 公司；
（4） FBS，购自 Gibco 公司；
（5）PBS (10X)，购自 Gibco 公司；
（6）TRIzol LS reagent ，购自 Invitrogen 公司；
（7）胰酶-EDTA，购自 Hyclone 公司；
（8）DEPC 处理水(DNase/RNase-free ddH2O)，购自 solarbio 公司；
（9）0.9%氯化钠注射液 (0.9% NaCl)，购自上海生工公司；
（10）75%乙醇，购自上海生工公司；
（11）弹性蛋白酶（Elastase），购自 Worthington Biochemical Corporation 公司；

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（12）HBSS （Hank's Balanced Salt Solution 即 Hank's 平衡盐溶液），购自 Sigma 公司；

（13）Hepas 缓冲液，购自 Sigma 公司；

（14）Penicillin-streptomycin（青链霉素），购自 Gibco 公司；

（15）1640 培养基，购自 Gibco 公司；

3.1.3 主要实验仪器及耗材

（1）显微镜，购自 Olympus 公司，型号为 CX31（OLYP）；

（2）倒置相差显微镜，购自 Olympus 公司，型号为 CKX31（OLYP）；

（3）倒置荧光显微镜，购自 Olympus 公司，型号为 IX73（OLYP）；

（4）镜超纯水机，购自法国 Millpore 公司，型号为 Mili-Q；

（5）移动式高压蒸汽灭菌，购自日本三洋公司，型号为 MLS-3750；

（6）白象手术器械清洗机，购自北京白象科技有限公司，型号为 QPQ350；

（7）超声波清洗机，购自美国必能信公司，型号为 B8510E-DTH；

（8）超低温冰箱（-80℃），购自 ThermoFisher 公司，型号为 Forma 902；

（9）低温冰箱（-25℃），购自 ThermoFisher 公司，型号为 PLF276；

（10）微量离心机，购自 ThermoFisher 公司，型号为 Legend Micro 17R；

（11）药品保存箱，购自 ThermoFisher 公司，型号为 PLR386；

（12）液氮罐，购自美国 MVE 公司，型号为 CryoSystem 4000；

（13）二氧化碳培养箱，购自美国 NUAIRE 公司，型号为 NU-5810E；

（14）生物安全柜，购自美国 NUAIRE 公司，型号为 NU-437-600；

（15）台式高速冷冻离心机，购自 ThermoFisher 公司，型号为 Sorvall ST16R；

（16）制冰机，购自常熟雪科公司，型号为 JMS-70；

（17）恒温水浴，购自美国精骐公司，型号为 SY-1230；

（18）洁净工作台，购自苏州安泰净化公司，型号为 SW-CJ；

（19）电动吸液器，购自梅特勒公司，型号为 PX-100；

（20）化学发光分析系统，购自上海天能公司，型号为 Tanon 5200 Multi；

（21）移液器，购自梅特勒公司，型号为 SL-XLS 系列；

（22）气管导管，购自 optiva 公司；

（23）细胞培养板，购自 NUNC 公司；

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.1.4 细胞培养及处理

3.1.4.1 细胞培养方法

（1）将人肝脏 LO2 细胞用无菌的 PBS 清洗 3 遍，加入 5ml-10ml 的 0.05%的胰蛋白酶-0.02% EDTA 消化液，轻轻摇晃细胞培养皿，使消化液充分浸润到整个培养皿底面的所有细胞，放到细胞培养箱中孵育 5 至 10 分钟；

（2）在显微镜下观察细胞形态，消化好的细胞会收缩变成圆形，用手轻轻摇晃细胞培养皿、同时将它从培养皿底拍打下来；

（3）向培养皿中加入 5ml-10ml 生长培养基，中止胰蛋白酶的消化作用，用移液枪在培养皿底部反复、轻轻地吹打，将其分散成为单个的细胞，然后将全部细胞悬液转移至 50ml 的离心管中；

（4）将离心管 600rpm 离心 5 分钟后倒掉上清，再次加入人 LO2 细胞的生长培养基重悬细胞；

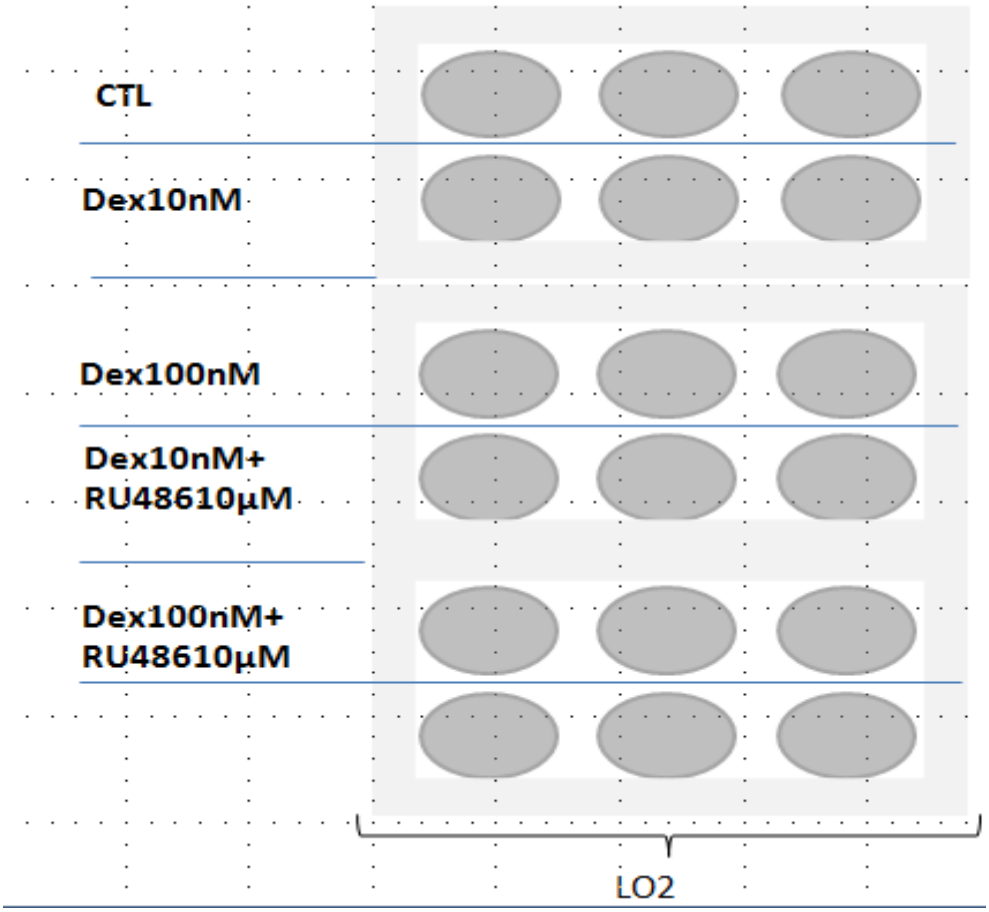
（5）用血球细胞计数板进行细胞计数，调整小鼠肺成纤维细胞的密度到 2x104/cm2，将其接种到新的培养皿中，放置到 37℃、5% CO2 的细胞培养箱中继续进行培养。

3.1.4.2 人肝脏 LO2 细胞实验处理

（1） 将人肝脏 LO2 细胞培养传代到 6 孔板中 ；

（2） 待细胞汇合 80% 分组予（control-dex10nM-dex10nM+RU48610μm）处理（10nM=0.004ug/ml），如图示：

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



（3） 给药 24 小时后相差显微镜下观察细胞形态改变；

（4） 提取细胞总 RNA-反转-qPCR 测定自噬相关基因及细胞色素酶 P450 的表达变化。

3.1.5 人肝脏 LO2 细胞总 RNA 提取及 *Qrt-PCR*

3.1.5.1 人肝脏 LO2 细胞 RNA 的提取

（1） 将各组肝脏 LO2 细胞收集至 5ml 无酶 EP 管中，加入 1mltrizol (一种 RNA 提取试剂，快速提取 RNA)中；

（2） 4℃下将人肝脏 LO2 细胞解冻，12000rpm，4℃离心 10min；

（3） 取上清，弃去沉淀，加入另外一个 EP 管中；

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（4） 加入 200ul 氯仿，充分混匀，震荡，后静置 3min；

（5） 10000rpm，4℃离心 15min；

（6） 离心后分 3 层，中层为蛋白质，取上清 450-300umol，不要碰到中层；

（7） 加入等体积的异丙醇，充分混匀，室温下静置 10min；

（8） 12000rpm，4℃离心 10min；

（9） 弃去上清，下面放置手纸吸水，管子倒置；

（10） 加入 1ml 75%的乙醇，离心 7000rpm，5min；

（11） 弃去上清，下面放置手纸吸水，管子倒置，同步骤（9）；

（12） 加入 300ul 的 75%乙醇，7000rpm，离心 5min；

（13） 空气中放置 15min，再次吸干净；

（14） 加入 30ulRNADNA-freewater，震荡，55℃下 10min；

（15） 冰上测定浓度。

3.1.4.3 逆转录

（1）50ul 体系逆转录：

10*PCR buffer	5ul	n 个样品乘以 n 份
25mM Mgcl2	15ul	
25mM dNTP	1	
200U/nl SSⅢ（酶）	0.625	
200U/nl RRI(RNA 酶抑制剂)	0.5	
100uM Hexamers	1	
H2O	21.875	
RNA		

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（2）RT 程序：

25℃ 10min

48℃ 40min

95℃ 5min

4℃∞

3.1.4.4 *Qrt-PCR*

以 SYBR Green 染料作为 PCR 定量基础。特定基因引物通过 http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/PrimerQuest/网站提供的 Primer-Quest SM 软件设计基因引物（表 3），CFX96 Real-Time 系统完成 DNA 扩增。

PCR 反应体系为：

SYBR Green PCR master mix 5 μl

Primers (10μM)　0.3 μl

cDNA　1 μl

Distill water　3.7μl

Total volume　10 μl

表 3. 反应引物序列表

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
hGapdh	5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3'	5'-GAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3'
hmTOR	5'-GGGACTACAGGGAGAAGAAGAA-3'	5'-GCATCAGAGTCAAGTGGTCATAG-3'
hBeclin1	5'-CCCGTGGAATGGAATGAGATTA-3'	5'-CCGTAAGGAACAAGTCGGTATC-3'
hAtg5	5'-GGAATTGAGCCAATGTTGGAAA-3'	5'-GTTGGCTGTGGGATGATACTAA-3'
hAtg12	5'-CGTCTTCCGCTGCAGTTT-3'	5'-GGAAGGAGCAAAGGACTGATT-3'

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

hUik1	5'-GTGGGCAAGTTCGAGTTCT-3'	5'-GACTTGGCGAGGTTCTTCTT-3'
hLC3-II(MAP1LC3A)	5'-ACAGCATGGTGAGTGTGTC-3'	5'-GGGAGGCGTAGACCATATAGA-3'
hCYP1A2	5'-CAGGAGCACTATCAGGACTTT-3'	5'-CAATCTTCTCCTGTGGGATGAG-3'
hCYP2C9	5'-CCCAAGGGCACAACCATATTA-3'	5'-TGCCACCTTCATCCAGAAAG-3'
hCYP2C19	5'-CCCAAGGGCACAACCATATTA-3'	5'-CAGAAAGTGACGAGGGTCAAA-3'
hCYP2D6	5'-CATGGAGCTCTTCCTCTTCTTC-3'	5'-ACAGCACAAAGCTCATAGGG-3'
hCYP3A4	5'-GCTGAGGATGAAGAATGGAAGA-3'	5'-CTCCATACTGGGCAATGATAGG-3'

反应条件为 95℃预变性 2 min；95℃变性 25sec，60℃退火 25sec, 70℃延伸 20sec，重复 40 个循环；以 95℃15sec，58℃ 15sec 及 95℃ 15sec 的变化绘制离解曲线。每个样本用 Prism 7500 型实时定量 PCR 仪进行 PCR 反应 3 次。数据采用 ABI Prism 7500 SDS 软件包进行分析，确定每次反应的循环阈值。采用 2−ΔΔCt 法比较样本中靶基因的相对表达量，根据得出的 Ct 值，仪器自动分析得出代表相对表达量的 RQ 值。

3.1.6 统计分析

实验数据以均数土标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，采用 SPSS15.0 软件分析数据，各组间

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

采用单因素方差分析；$p < 0.05$ 差异具有统计学意义。

3.2 实验结果

3.2.1 肝正常细胞 LO2 细胞形态及生长情况

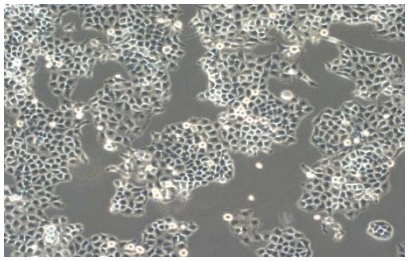


图 3.1 A. 对照组（正常人肝脏 LO2 细胞形态呈圆形，贴壁生长。）

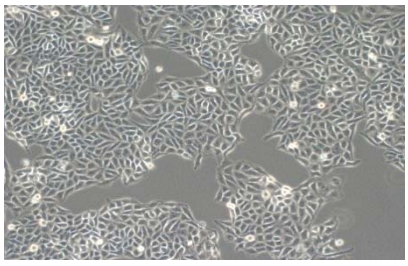


图 3.1 B. DEX 组（可见地塞米松处理 24h 后，细胞发生明显形态学变化，变长呈梭形。）

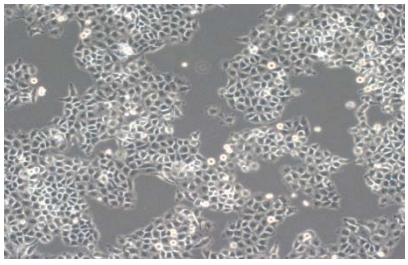


图 3.1 C. DEX+R 组（细胞形态基本由梭形逆转为圆形正常形态。）

给药 24 小时后相差显微镜下观察发现, 地塞米松可影响人肝脏 LO2 细胞的形态学改变。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3.2.2 人肝脏 LO2 细胞细胞色素氧化酶 P450 的表达

通过荧光实时定量 PCR 详细阐述了各组人细胞色素酶 P450（hCYP450）中 hCYP1A2、hCYP2C9、hCYP2C19、hCYP2D6、hCYP3A4 mRNA 在人肝脏 LO2 细胞中的相对表达量。与对照组相比，Dex 组人肝脏 LO2 细胞的 hCYP1A2、hCYP2C9、hCYP2C19、hCYP3A4 mRNA 表达量上调，相应的，Dex+R 组人肝脏 LO2 细胞的上述基因表达下调，且有统计学差异($p < 0.05$)（图 3.2 A，D，E）；而 Dex 组人肝脏 LO2 细胞的 hCYP2C9 基因表达量较对照组为下降趋势，hCYP2D6 基因表达量较对照组无显著变化（图 3.2 B，C）。

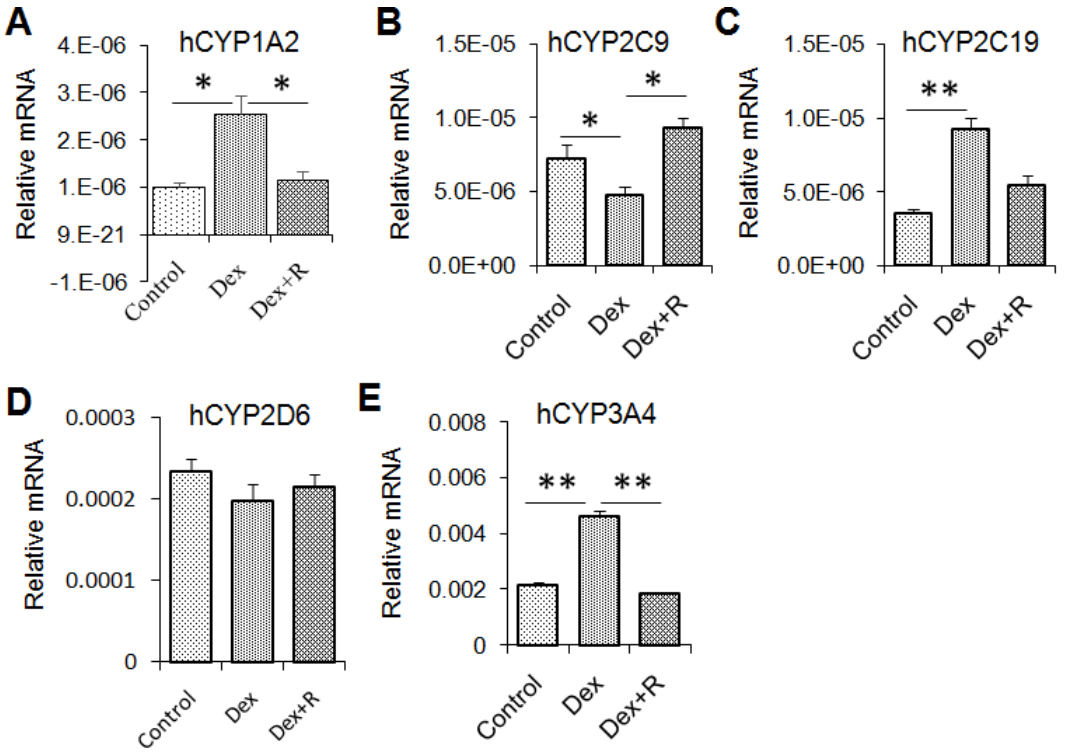


图 3.2 人肝脏 LO2 细胞细胞色素氧化酶 P450 的表达
注 * $p < 0.05$ 表示有统计学差异

3.2.3 人肝脏 LO2 细胞自噬相关基因表达结果

通过荧光实时定量 PCR 详细阐述了各组细胞的自噬相关基因的相对表达量。测定结果发现，与对照组相比，除 Dex 组人肝脏 LO2 细胞的 Beclin1 mRNA 表达量下调 ($p < 0.05$)外，余细胞自噬相关的基因及参与自噬过程的自噬相关蛋白的基因表达量较对照组均无显著变化（图 3.3 ）。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

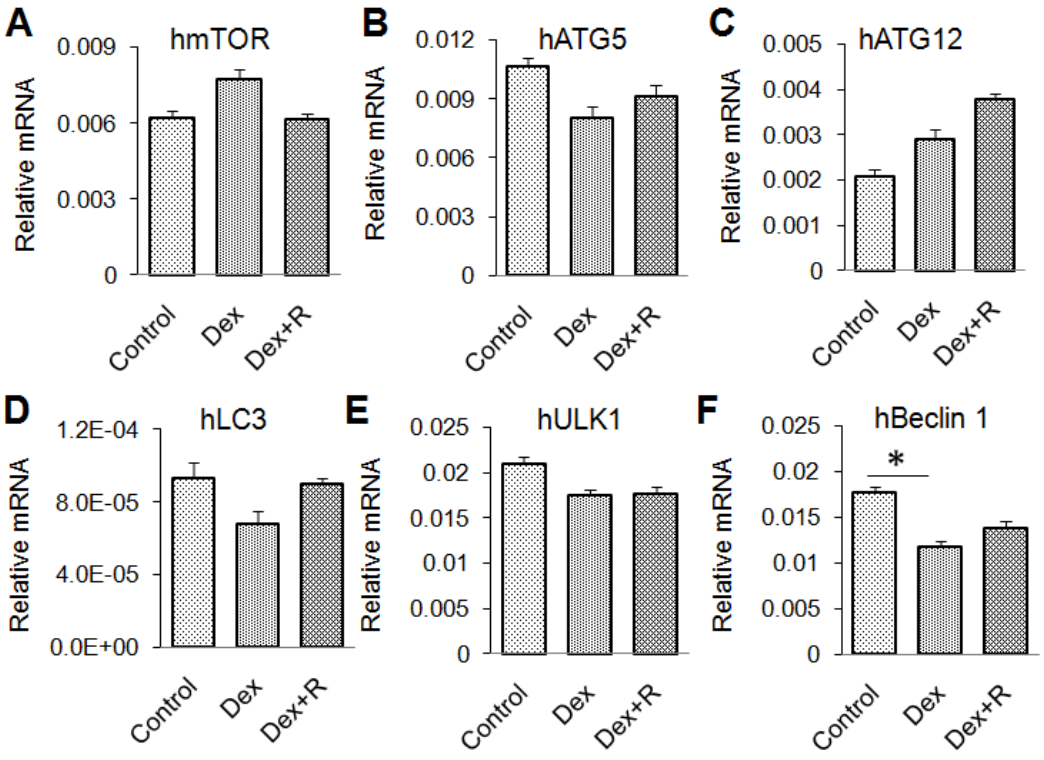


图 3.3 糖皮质激素作用下，自噬相关基因的表达

注 * p＜0.05，有统计学差异

3.3 讨论

3.3.1 自噬在肝脏中的作用

1940 年首次提出溶酶体途径与细胞内蛋白循环利用密切相关，随后发现其他细胞内成分的蛋白质通过溶酶体自噬过程被降解。最初细胞自噬被认为是无选择性地降解老化细胞内蛋白质和细胞器的通路[93]。最近发现，自噬也能够针对特定的细胞内成分进行选择性降解，如聚合蛋白、受损或多余的细胞器和脂质[94]。

自噬在肝脏中的基本作用是对饥饿的应答。在环境控制房间里的老鼠，停止喂食一天肝脏的自噬作用即为其基础水平。利用肝脏灌流系统计算得出：肝自噬功能基础水平为每小时降低肝脏总蛋白的 1.5%。饥饿时，蛋白质降解率增加至每小时降低总肝蛋白的 4.5%。啮齿类动物禁食 48 小时，自噬水平的增加可

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

致总肝蛋白的 40%被降解[95]。因此，肝细胞自噬功能的变化可能对肝脏生理学产生戏剧性的效果。肝细胞被认为比其他类型细胞的自噬水平较高是因为他们有更丰富的溶酶体和溶酶体酶，如 CTSL 即凋亡蛋白酶 L。较高的自噬水平是肝脏作为一个能方便检测自噬的调节和功能器官的另一个原因。

肝细胞自噬调控的早期研究显示，营养调控的自噬部分归因于氨基酸、胰岛素的抑制作用和胰高血糖素的刺激作用[17]。原代肝细胞的培养研究显示自噬可以被 3-甲基腺嘌呤抑制，这表示 III 型磷脂酰肌醇 3 激酶（PtdIns3K）是肝细胞自噬的调节子。氨基酸的抑制作用，表现为水平升高 2-4 倍，亮氨酸和谷氨酰胺是最有潜力自噬作用。胰高血糖素在肝细胞中发挥自噬作用的机制尚不明确，胰岛素信号自噬抑制作用是通过 mTOR 介导的。与胰岛素受体结合导致了 PI3K-AKT 活化并且使 TSC1-TSC2 复合体失活，然后激活 mTOR。在肝脏再灌注的研究中显示，G 蛋白 GNAI3/Gia3 通过胰岛素抑制自噬，而 Gai3 基因敲除的小鼠在胰岛素应答时不引起下游自噬发生[96]。

为了确定自噬在肝脏蛋白降解中的作用，研究通过肝脏特异性基因敲除小鼠模型，敲除自噬相关基因 Atg7。这些小鼠的肝脏显著增大，重量约占小鼠体重的 30%，细胞方面主要伴有显著的线粒体和过氧化物酶体改变，和多泛素化蛋白细胞内聚集。这些发现为自噬在处理损害和聚集蛋白，更新细胞器方面的必要作用提供了精确的依据。有趣的是，当肝脏特异性 ATG7 基因敲除的小鼠繁殖成为 SQSTM1/p62（可以被自噬降解的骨架蛋白）缺失小鼠时，多泛素化蛋白的聚集现象消失[97]。这些发现说明，SQSTM1 是直接损伤或聚集细胞质内蛋白进图自噬途径所必需的。

自噬对于饥饿的应答作用是在营养缺乏时，为肝细胞提供氨基酸作为能量代谢底物，维持肝细胞的生存状态起到了重要作用。有证据显示，饥饿诱导的自噬通过糖原氨基酸活化导致了肝脏葡萄糖生成。在肝脏特异 Atg7 基因缺失小鼠中，饥饿时血糖水平降低程度比对照组要多[98]。总的来说，这些研究证实了基本自噬在细胞内细胞器更新、老化细胞蛋白和损坏蛋白降解中有重要作用，并且应激条件下诱导自噬发生，可以为细胞生存提供氨基酸、葡萄糖来满足能量需求[99]。

线粒体自噬是肝细胞在饥饿情况下主要的供能底物来源。线粒体含有丰富的蛋白质和脂质，在培养的肝细胞发生营养缺乏时，有约 85%的自噬事件涉及到线粒体的选择性自噬，从而被称为线粒体自噬[59]。清除老化和损伤的线粒体

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

可以保护细胞抵抗线粒体去极化过程中释放凋亡蛋白，产生有毒的活性氧自由基（ROS）和无用的 ATP 水解[18]。线粒体自噬清除线粒体可以发生于营养丰富情况下细胞质重塑时和线粒体 DNA 老化时，包括 DNA 损坏或突变。所有的不恰当的和过度的线粒体自噬导致细胞损伤和死亡[100]。所以，线粒体自噬的平衡调节对于细胞稳态非常重要。

微管相关蛋白 1 轻链 3（LC3）参与自噬体形成，融合蛋白，绿色荧光蛋白-LC3（GFP-LC3）是自噬体形成的荧光标记。在营养充足条件下，大多数 LC3 分布于细胞质内，在出现自噬发生的条件时，GFP-LC3 整合进入一个小的前自噬泡结构并接近线粒体。当营养夺获时，这些前自噬泡结构成长为杯状的自噬泡，来包裹并隔绝特殊的线粒体进入自噬体小泡结构，这一结构成为线粒体自噬体。隔绝常常与线粒体裂解一同发生并且步调协调一致，从开始到完成大概需要 6-7 分钟。线粒体在被隔绝过程持续存在膜电位差，去极化仅在隔绝完成后发生。在隔绝发生以后，线粒体自噬体与溶酶体融合并且酸化。线粒体的内容物大概 10 分钟被消化分解。wortmannin 和 3 甲基腺嘌呤在药理学方面是 PI3K 和 PtdIns3K 的抑制剂，几乎可以完全隔离线粒体，这表示，营养缺失诱发的线粒体自噬涉及经典的 BECN1-PK3C3/VPS34 自噬途径[77]。

3.3.2 自噬介导的肝脏代谢

肝脏的另一个器官特异性功能使之必须依赖于自噬，是因为肝脏是机体内仅次于脂肪组织的第二大脂肪贮存库。肝细胞是主要的中性脂细胞贮存仓库，中性脂以甘油三酯（TGs）和胆固醇的形式存在于独立的细胞器中，被称为脂肪滴（LDs）。直到最近，这些脂肪贮存库被破坏被认为是特殊的细胞质酯酶作用。肝脏和脂肪组织的区别是，虽然他们都有相同的脂肪贮存作用，但是与脂肪组织相比，肝脏组织细胞质酯酶数量相对较少。因为如此，之前关于肝细胞在代谢需要时，如何快速动员贮存的脂肪组织来满足代谢需求困惑了很多年。脂肪可以被含有酸化脂肪酶的溶酶体降解，同时脂肪酶还可以降解外源性脂肪蛋白。事实是，自噬和脂肪分解同时发生完成，激素具有相似的功能，表明自噬可以同时降解内源性蛋白[17]。这些研究表明，自噬介导的内源性脂肪贮存库降解是通过脂肪自噬过程实现的。

脂肪自噬最早发现于体外肝细胞培养过程中通过药物或基因学抑制自噬

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

时。阻止自噬导致培养的肝细胞在面对脂肪代谢时出现甘油三酯和脂肪滴数量增加，体积增大。细胞内脂肪和脂肪低蛋白通过自噬体和溶酶体来转化已经被荧光显微镜和电镜所证实，并且当脂肪补充时脂肪运动通过自噬途径实现[101]。这些发现在小鼠特异性敲除 Atg7 基因的肝细胞中被证实。肝细胞自噬的缺失显著升高肝细胞内 TG 和胆固醇水平，这表明脂肪自噬抑制体内肝细胞脂肪聚集[102]。另外，作为调节细胞内脂肪贮存的机制，脂肪自噬通过提供来自甘油三酯降解的游离脂肪酸（FFAs）来控制细胞内能量稳态。游离脂肪酸驱动线粒体 β 氧化和细胞内 ATP 降解的速度。因此，脂肪自噬不仅调节被动性脂肪贮存的数量，还控制主动的细胞代谢和能量降解的比例。

脂肪滴在应答营养信号时如何选择自噬状态目前尚不清楚，但是可能与自噬泡膜蛋白和脂肪滴膜上蛋白发生蛋白-蛋白之间相互作用有关[103]。脂肪滴表明覆盖一层磷脂，很多蛋白被发现存在于上面。最近一些研究阐述了作为自噬体膜形成重要成分的自噬体蛋白 LC3 与脂肪滴有关。LC3 与脂肪滴的联系在自噬泡膜上未发现，说明 LC3 通过自噬途径识别脂肪滴的过程可能有另外的方式。其他可能性包括可溶性 NSF 附着的蛋白受体（SNAREs），它同时出现在脂肪滴融合和自噬体生物合成时[61]。当可以激活选择性自噬过程的细胞结构被发现时，可能预示着新的阻止肝细胞脂肪化的靶向治疗被发现。

通过提供游离脂肪酸作为脂肪蛋白输出的一部分，肝细胞的脂肪自噬可以作为调节这个身体代谢的机制。这可能预示着可能存在肝外调节来调整肝细胞脂肪自噬水平适应全身营养状态。很多研究已用来鉴别肝脏自噬和外源性代谢信号的关系。一个例子是应用甲状腺激素通过激素控制肝细胞的脂肪自噬。这是利用了甲状腺激素活性形式——3,3’5-三碘酪氨酸（T3）可以调节组织代谢的重要功能，T3 可以诱导肝脏线粒体的 β 氧化[104]。T3 诱导的自噬已在体外培养的肝细胞癌的肿瘤细胞和小鼠肝脏中被观察到。T3 增强肝细胞 β 氧化的功能是依靠自噬来实现，ATG5 基因敲除可以阻止此作用。T3 诱导的脂肪自噬可以增加游离脂肪酸向线粒体的运输从而提高了 β 氧化的速率。T3 诱导自噬的机制尚有待确定，但是，可能涉及 AMP 激活蛋白激酶，这一激酶在细胞应答细胞能量水平改变时调节线粒体自噬。T3 通过诱导脂肪自噬导致脂肪降解的作用可以揭示目前已知的代谢过程，但是在临床上不能解释甲状腺素水平和非酒精性脂肪性肝病的脂肪肝发展呈负相关的关系[104]。

另一个例子是在生理节律紊乱时，肝细胞的脂肪自噬对外部信号的应答。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

肝细胞的脂肪自噬被 ATG14 的改变所调控，但是，ATG14 受生理节律和转录因子 FOXO 家族调控[105]。另外还有很多肝细胞脂肪自噬途径被提出，如中枢神经系统调控，这是肝细胞脂肪代谢复杂的调节过程[94]。

自噬调节内源性脂肪代谢提供了一个细胞水平自噬调节肝脏生理和病理过程的全新机制。最主要且显著的影响可能是自噬水平可以调节过度的细胞脂肪聚集，无论酒精性或非酒精性脂肪肝引起的脂肪性肝病[16, 106]。然而，涉及到维持线粒体 β 氧化的脂肪自噬表现出广泛的功能，脂肪自噬无论在任何情况下通过脂肪代谢维持细胞能量稳态。脂肪自噬是一个重要的对抗细胞损伤的生存机制，自噬降低了肝细胞对凋亡的敏感性，尤其氧化应激导致的 β 氧化受损引起的 ATP 缺乏时。脂肪自噬是一个必要的维持 β 氧化水平来支持能量依赖的过程，比如在应对纤维化刺激时肝星形细胞激活情况下。这一发现强调了脂肪自噬的功能事实上存在于所有的细胞中，不仅限于脂肪贮存细胞，但是还需要更多的研究来证实脂肪自噬在肝脏的其他细胞中的作用。

自噬促进细胞生存。自噬在正常生理和病理条件下有促生存作用。在新生小鼠，自噬是内源性营养代谢所必须的，为能量依赖器官如心脏和膈肌提供能量来使新生小鼠适应并从外源性能量摄取营养，如母乳。对新生小鼠进行全身性自噬的抑制，导致了小鼠出生后很快死亡。在细胞水平，自噬在营养剥夺和生长因子缺乏时对于细胞生存起到了重要作用，这已在哺乳动物和酵母菌细胞中得到证实。

在细胞面对应激时，自噬对于维持细胞生存具有非常重要作用。在哺乳动物细胞中，自噬在代谢压力，缺血或低氧的情况下被激活。在这些情况下抑制自噬，可以导致细胞死亡。在某些肝损伤情况下，如酒精、药物（对乙酰氨基酚，APAP）、缺血再灌注损伤等，自噬有保护作用。所以，在这些情况下可以加强自噬功能。在某些情况下，细胞死亡中牵涉到自噬时，有利于抑制细胞的吞噬功能。细胞毒性化学物质，包括很多化疗药物，可以激活自噬，可能与药物引起的细胞损伤有关。例如, 多激酶抑制剂 sorafenib 对于进展期肝细胞癌（HCC）有良好的治疗作用。然而，肿瘤在治疗过程中面对 ER 应激和 mTOR 抑制发生应答时，可以导致保护性自噬，从而降低药物的活性。同时，抑制自噬可以增强 sorafenib 诱导的肿瘤细胞死亡和肿瘤生长抑制作用。

自噬促进细胞生存是通过它可以降解细胞内物质的基本功能。在营养或生长因子剥夺时，自噬可以降解并使细胞蛋白和糖原再循环，为 ATP 降解提供氨

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

基酸和葡萄糖。在病理条件下，自噬可以通过清除错误折叠的蛋白、聚集的脂肪或损伤的线粒体来促进细胞生存。内质网的压力、蛋白酶体被抑制或基因突变可产生错误折叠的蛋白，自噬清除这些蛋白以维持细胞的生命活力。在酒精性肝损害中，自噬可以清除脂肪滴和受损的线粒体来减少氧化应激和脂肪过氧化来保护肝细胞。因此，存在的自噬调节不仅可以发挥抑制肝细胞死亡的机制，从深层次来说可以避免肝脏损伤。

自噬可以介导细胞死亡。尽管自噬的主要作用是保护生存，但是在某些情况下，自噬促进细胞死亡。在哺乳动物细胞中，细胞死亡相关的自噬发生于压力条件下，如某些化学药物、射线、低氧或缺血的应答。在这些情况下，重要自噬基因缺失或干扰 RNA 介导的自噬基因敲除可以显著减少细胞死亡，同时这些基因如果过表达可以促进细胞死亡。仅通过自噬敲除可以保护细胞死亡还不足以说明自噬可以促进自噬，因为当细胞缺乏巨噬细胞自噬是可以减少细胞死亡，因为吞噬相关途径保护性上调 CMA。

自噬如何促进细胞死亡尚不完全明确。尽管很多假设说明过度的自我消化导致了维持细胞生存的重要分子和细胞器降解，但是死亡机制起始阶段与自噬一样都会涉及很多应激信号。细胞可能直接接受凋亡因子信号或进入坏死途径来促进细胞死亡。例如，在非肝细胞中，ATG5 已经被报道可以与 FADD（一个死亡结构）结合激活 CASP8 和下游凋亡蛋白。另一个例子是，ATG5 过表达导致自身裂解并转运至线粒体。然后他的裂解产物与 BCL2L1 结合并使其失活，导致细胞色素 C 释放和细胞死亡。最终，自噬因子 BECN1（哺乳动物 Beclin1 同源），其具有 BCL2 家族蛋白的保守区域 BH3 区域，余多重抗死亡 BCL2 家族成员，如 BCL2 和 BCL2L1 相互作用，导致共同抑制。在这些情况下，与自噬相关的经典凋亡途径和细胞死亡是被凋亡机制精确调控的。但是这些机制是否调控肝细胞死亡还有待研究。

3.3.3 糖皮质激素在自噬中的作用

糖皮质激素是人体正常分泌的激素，具有促进生长，抗炎，免疫抑制等作用，而自噬在细胞的生长发育过程占优重要地位，且通过前面实验讨论可知，自噬与炎症也密切相关，而且糖皮质激素受体还参与到大鼠肝脏自噬过程中。我们的实验通过糖皮质激素作用于人的肝正常细胞系 LO2 细胞，观察糖皮质激

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

素的作用。

有文献报道，给予 N1511 软骨细胞加入地塞米松进行培养，发现自噬活性增强[107]。通过免疫荧光电镜可以发现 GFP-LC3 在 Rapamycin（mTOR 抑制剂）或地塞米松处理过的细胞中表达显著增加，因为当抑制自噬发生的 mTOR 被抑制时，自噬才会被激活，所以在地塞米松处理的细胞发现同样的现象说明地塞米松可以诱导自噬发生[108]。同样，自噬相关分子在地塞米松处理的 N1511 细胞中均被检测并发现相应变化：不仅 LC3 表达增加，LC3-II/LC3-I 的比例也被发现升高；Beclin1 和 Atg5 表达较对照组升高[109]。体外试验表明，地塞米松可以诱导 N1511 细胞自噬[110]。

在骨细胞的代谢中，老化的细胞含有较多氧化产物，包括氧自由基（ROS），和抵抗氧化应激的谷胱甘肽（glutathione ，GSH）、硫氧化还原蛋白，和谷胱甘肽超氧化物酶，这些都可以把过氧化物转变为无害物质，并且骨细胞还可以表达长氧化物歧化酶和抗氧化酶[111]。同样的，糖皮质激素可以通过激活氧化途径来加速骨细胞新陈代谢过程。这一过程通常在体内实验时依靠肾上腺皮质水平升高而实现，体外进行糖皮质激素处理不能激活抗氧化途径。

糖皮质激素可以通过抑制 IP3 介导的钙离子信号来诱导自噬。SiRNA 介导的基因敲除或药物抑制 IP3Rs 激活自噬表现为 LC3 的聚集。很多实验已经证实，钙离子通道负性调节自噬发生。糖皮质激素通过抑制下游 Fyn 来抑制内质网的钙离子释放，然后组织 IP3R1 磷酸化，最终诱导自噬[108]。但是也有观点认为，钙离子的稳态对于糖皮质激素诱导自噬没有影响。但是，从细胞代谢角度来说，内质网和线粒体的关系密切。线粒体摄取细胞质内的钙离子进行三羧酸循环和电子传送从而产生 ATP。很多研究表明，基础水平的自噬对于细胞增殖分化有重要作用[112-114]。当钙离子缺失时，AMP 激酶激活，mTOR 活性受抑制诱导自噬发生[115]。所以，钙离子依赖的 AMP 激酶激活从而抑制 mTOR 活性是自噬过程中非常重要。

我们的实验证实对人肝脏正常细胞株 LO2 细胞进行了地塞米松处理，从细胞形态角度来看，地塞米松影响了 LO2 细胞生长，使细胞变形，而予糖皮质激素受体拮抗剂处理后，细胞形态恢复正常，这说明，糖皮质激素对于 LO2 细胞的生长有显著影响。

细胞色素 P450（CYP）是介导 I 相代谢反应的肝脏药物代谢酶，存在很多亚型，不同类型在不同物种甚至不同性别有不同的表达。这与生长激素在不同

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

性别分泌模式不同有关。糖皮质激素可以激活促丝裂原激酶的蛋白激酶（(mitogen activated protein kinase，MAPK)、磷脂酰激酶和蛋白激酶 C 信号传导通路，及信号转导和转录激活因子（signal transducer and activator of transcription，STAT）；同时糖皮质激素与糖皮质激素受体结合后，激活 JAK2 激酶，JAK2 可以将 STAT5b 磷酸化，使其与肝细胞核因子产生交互作用，影响靶基因转录。

由于肝脏细胞核因子（Hepatocyte nuclear factor，HNF）具有多种形式，不同肝细胞核因子参与基因转录产生不同 CYP 亚型。如肝细胞核因子 HNF4α 可以调控大鼠 CYP2C11、小鼠 Cyp2d9、Cyp4a12 的基因转录。对于不同性别来讲，肝细胞核因子具有性别优势, HNF6 和 HNF3β 可以激活雌性的 CYP2C12 基因启动子，抑制雄性 CYP2A2 基因启动子。我们的实验中发现 CPY 表达有所变化，这与激素可以影响 CYP 表达的观点相符，但是由于肝脏细胞核因子的参与，使 CYP 表达出现不一致现象。

糖皮质激素在人肝细胞 LO2 细胞自噬蛋白影响除 Beclin1 之外无显著差异，与我们在大鼠实验中观察到的不同。Beclin1 的结果显示，糖皮质激素组与对照组有统计学差异，而与加用糖皮质激素受体拮抗剂组无明显差异，可能是由于不同种系，糖皮质激素受体作用不同。另一方面需要考虑的是，Beclin1 作为自噬发生的起始蛋白，并且在凋亡中具有重要作用[111]，其变化是否说明已有凋亡发生于自噬之前，还需要进一步研究确认。

总之，糖皮质激素在体内作用复杂，且自噬的机制及作用目前尚处于研究阶段，还有很多不明确之处，我们还需通过更多的实验研究来。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

全文结论

1、肝细胞在体内的功能主要是代谢作用，药物代谢是肝脏功能之一，药物代谢主要依靠药物代谢酶细胞色素 P450（CYPs），我们证实炎症反应与 CYPs 下降正相关。间歇低氧情况下，炎症反应促使前炎症因子与肝脏星型细胞 Toll 样受体 4 结合。活化的肝脏星型细胞分泌炎症因子，活化 NF-κB，NF-κB 与糖皮质激素受体（GR）相互作用，抑制核受体 PXR 和 CAR 的转录。PXR 和 CAR 表达下降，导致了 CYPs 表达下调。综上，间歇低氧可以引起肝脏损伤，促使 CPYs 表达下降，所以临床上对于 OSA 患者在用药时需要注意肝脏功能，避免肝损害药物的应用。

2、间歇低氧暴露可以激活大鼠肝细胞中的 AMPK，使 AMPK 抑制 mTOR 活性，从而使 ULK1/ULK2 复合体磷酸化，ULK1 释放，在下游激活 Beclin1 等自噬相关蛋白，通过 Atg5-ATG12-ATG16L1 与自噬体膜 LC3 结合，促使自噬体形成。所以，间歇低氧可以诱导 AMPK 途径的肝细胞自噬。

3、我们给予人正常肝细胞 LO2 细胞地塞米松和地塞米松+拮抗剂处理，发现肝细胞生长受到地塞米松影响，并且地塞米松可以激活糖皮质激素受体（GR），上调 hCYP1A2，hCYP2C19,hCYP3A4，下调好 hCYP2C9，在应用糖皮质激素+拮抗剂处理后，hCYPs 出现相反变化，对于 hCYP2D6 无明显作用，这充分说明糖皮质激素受体信号通路对于 hCYPs 的表达具有不同的作用。我们人正常肝细胞 LO2 细胞实验中，检测自噬相关基因水平，发现糖皮质激素受体在人肝细胞自噬中无作用。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

论文创新点

1、 通过间歇低氧大鼠模型发现了间歇低氧对于大鼠肝脏炎症反应，并可以引起药物代谢酶细胞色素 P450 的下调。以此说明，阻塞性睡眠呼吸暂停可以引起肝脏组织损伤，在临床用药过程中要注意药物用量，监测肝功能变化，避免应用肝脏毒性药物。

2、间歇低氧暴露可以诱导大鼠肝脏细胞自噬发生，自噬对于细胞来讲是把双刃剑，可以在低氧情况下修复细胞损伤，为细胞提供能量和营养，又可以抑制凋亡发生，保护细胞减少细胞损伤；但是当自噬过强时，可以发生细胞凋亡或死亡。这对我们以后如何正确对待自噬，合理应用自噬特点诊疗疾病开创了新的思路。

3、糖皮质激素受体在人肝细胞 LO2 的调控中 CYPs 起到了不同的调控作用（部分上调，部分下调，部分无作用），但是在人肝细胞 LO2 的自噬中无作用。这为将来肝脏疾病的诊疗提供了新的思路。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

参考文献

[1] Peppard P E, Young T, BARNET J H, et al. Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults [J]. American journal of epidemiology, 2013, 177(9): 1006-14.
[2] Mirrakhimov A E, Polotsky V Y. Obstructive sleep apnea and non-alcoholic Fatty liver disease: is the liver another target? [J]. Frontiers in neurology, 2012, 3:149
[3] Wu J, Stefaniak J, Hafner C, et al. Intermittent Hypoxia Causes Inflammation and Injury to Human Adult Cardiac Myocytes [J]. Anesthesia and analgesia, 2016, 122(2): 373-80.
[4] Bonsignore M R, Borel A L, Machan E, et al. Sleep apnea and metabolic dysfunction [J]. European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society, 2013, 22(129): 353-64.
[5] Dewan N A, Nieto F J, Somers V K. Intermittent hypoxemia and OSA: implications for comorbidities [J]. Chest, 2015, 147(1): 266-74.
[6] Maeda H, NAGAI H, Takemura G, et al. Intermittent-hypoxia induced autophagy attenuates contractile dysfunction and myocardial injury in rat heart [J]. Biochimica et biophysica acta, 2013, 1832(8): 1159-66.
[7] Wu J, Lei Z, Yu J. Hypoxia induces autophagy in human vascular endothelial cells in a hypoxia-inducible factor 1dependent manner [J]. Molecular medicine reports, 2015, 11(4): 2677-82.
[8] Iturriaga R, Moya E A, DEL RIO R. Inflammation and oxidative stress during intermittent hypoxia: the impact on chemoreception [J]. Experimental physiology, 2015, 100(2): 149-55.
[9] Garvey J F, Taylor C T, Mcnicholas W T. Cardiovascular disease in obstructive sleep apnea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation [J]. The European respiratory journal, 2009, 33(5): 1195-205.
[10] Savransky V, Nanayakkara A, Vivero A, et al. Chronic intermittent hypoxia predisposes to liver injury [J]. Hepatology, 2007, 45(4): 1007-13.
[11] Petta S, Marrone O, Torres D, et al. Obstructive Sleep Apnea Is Associated with Liver Damage and Atherosclerosis in Patients with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease [J]. PloS one, 2015, 10(12): e0142210.
[12] Yu J H, Ahn J H, Yoo H J, et al. Obstructive sleep apnea with excessive daytime sleepiness is associated with non-alcoholic fatty liver disease regardless of visceral fat [J]. The Korean journal of internal medicine, 2015, 30(6): 846-55.
[13] Song D, Fang G, Mao S Z, et al. Chronic intermittent hypoxia induces atherosclerosis by NF-kappaB-dependent mechanisms [J]. Biochimica et biophysica acta, 2012, 1822(11): 1650-9.
[14] Paschetta E, Belct P, ALISI A, et al. OSAS-related inflammatory mechanisms of

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

liver injury in nonalcoholic fatty liver disease [J]. Mediators of inflammation, 2015, 2015(815721.
[15] Nobili V, Cutrera R, Liccardo D, et al. Obstructive sleep apnea syndrome affects liver histology and inflammatory cell activation in pediatric nonalcoholic fatty liver disease, regardless of obesity/insulin resistance [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2014, 189(1): 66-76.
[16] Czaja M J. Function of Autophagy in Nonalcoholic Fatty Liver Disease [J]. Digestive diseases and sciences, 2016,
[17] Madrigal-Matute J, Cuervo A M. Regulation of Liver Metabolism by Autophagy [J]. Gastroenterology, 2016, 150(2): 328-39.
[18] Swampillai A L, Salomoni P, Short S C. The role of autophagy in clinical practice [J]. Clinical oncology, 2012, 24(6): 387-95.
[19] Mcnicholas W T, Rodenstein D. Sleep apnea and driving risk: the need for regulation [J]. European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society, 2015, 24(138): 602-6.
[20] Mcnicholas W T. Chronic obstructive pulmonary disease and obstructive sleep apnea: overlaps in pathophysiology, systemic inflammation, and cardiovascular disease [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2009, 180(8): 692-700.
[21] Tilkian A G, Guilleminault C, Schroeder J S, et al. Hemodynamics in sleep-induced apnea. Studies during wakefulness and sleep [J]. Annals of internal medicine, 1976, 85(6): 714-9.
[22] Peppard P E, Young T, Palta M, et al. Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension [J]. The New England journal of medicine, 2000, 342(19): 1378-84.
[23] Marin J M, Agusti A, Villar I, et al. Association between treated and untreated obstructive sleep apnea and risk of hypertension [J]. Jama, 2012, 307(20): 2169-76.
[24] Fein A S, Shvilkin A, Shah D, et al. Treatment of obstructive sleep apnea reduces the risk of atrial fibrillation recurrence after catheter ablation [J]. Journal of the American College of Cardiology, 2013, 62(4): 300-5.
[25] Javaheri S. Sleep disorders in systolic heart failure: a prospective study of 100 male patients. The final report [J]. International journal of cardiology, 2006, 106(1): 21-8.
[26] Kaneko Y, Floras J S, Usui K, et al. Cardiovascular effects of continuous positive airway pressure in patients with heart failure and obstructive sleep apnea [J]. The New England journal of medicine, 2003, 348(13): 1233-41.
[27] Shahar E, Whitney C W, Redline S, et al. Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2001, 163(1): 19-25.
[28] Marin J M, Carrizo S J, Vicente E, et al. Long-term cardiovascular outcomes in

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

men with obstructive sleep apnea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study [J]. Lancet, 2005, 365(9464): 1046-53.
[29] Koehler U, Cassel W, Hildebrandt O, et al. Obstructive sleep apnea in neurological diseases: specially as a risk factor for stroke [J]. Der Nervenarzt, 2014, 85(1): 35-42.
[30] Redline S, Yenokyan G, Gottlieb D J, et al. Obstructive sleep apnea-hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2010, 182(2): 269-77.
[31] Lal C, Strange C, Bachman D. Neurocognitive impairment in obstructive sleep apnea [J]. Chest, 2012, 141(6): 1601-10.
[32] Bucks R S, Olaithe M, Eastwood P. Neurocognitive function in obstructive sleep apnea: a meta-review [J]. Respirology, 2013, 18(1): 61-70.
[33] Trzepizur W, Gaceb A, Arnaud C, et al. Vascular and hepatic impact of short-term intermittent hypoxia in a mouse model of metabolic syndrome [J]. PloS one, 2015, 10(5): e0124637.
[34] Chin K, Nakamura T, Takahashi K, et al. Effects of obstructive sleep apnea syndrome on serum aminotransferase levels in obese patients [J]. The American journal of medicine, 2003, 114(5): 370-6.
[35] Tanne F, Gagnadoux F, Chazouilleres O, et al. Chronic liver injury during obstructive sleep apnea [J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1290-6.
[36] Savransky V, Bevans S, Nanayakkara A, et al. Chronic intermittent hypoxia causes hepatitis in a mouse model of diet-induced fatty liver [J]. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology, 2007, 293(4): G871-7.
[37] Feng J, Chen B Y, Cui L Y, et al. Inflammation status of rabbit carotid artery model endothelium during intermittent hypoxia exposure and its relationship with leptin [J]. Sleep breathing, 2009, 13(3): 277-83.
[38] Gozal D, Kheirandish-Gozal L. Cardiovascular morbidity in obstructive sleep apnea: oxidative stress, inflammation, and much more [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2008, 177(4): 369-75.
[39] Feng S Z, Tian J L, Zhang Q, et al. An experimental research on chronic intermittent hypoxia leading to liver injury [J]. Sleep & breathing = Schlaf & Atmung, 2011, 15(3): 493-502.
[40] Verbraecken J, Mcnicholas W T. Respiratory mechanics and ventilatory control in overlap syndrome and obesity hypoventilation [J]. Respiratory research, 2013, 14:132.
[41] Dopp J M, Moran J J, Abel N J, et al. Influence of intermittent hypoxia on myocardial and hepatic P-glycoprotein expression in a rodent model [J]. Pharmacotherapy, 2009, 29(4): 365-72.
[42] 王凌, 蒋学华, 张玉琥. 临床药动学研究中药物代谢酶多态性问题与新药注

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

册[J], 中国医药工业杂志，2014,4: 312-318.
[43] Li J, Zhang Y L, Chen R, et al. Elevated Serum Liver Enzymes in Patients with Obstructive Sleep Apnea-hypopnea Syndrome [J]. Chinese medical journal, 2015, 128(22): 2983-7.
[44] Savransky V, Reinke C, Jun J, et al. Chronic intermittent hypoxia and acetaminophen induce synergistic liver injury in mice [J]. Experimental physiology, 2009, 94(2): 228-39.
[45] Rosa D P, Martinez D, Picada J N, et al. Hepatic oxidative stress in an animal model of sleep apnea: effects of different duration of exposure [J]. Comparative hepatology, 2011, 10(1): 1.
[46] Martinez-Outschoorn U E, Whitaker-Menezes D, Lin Z, et al. Cytokine production and inflammation drive autophagy in the tumor microenvironment [J]. Cell Cycle, 2014, 10(11): 1784-93.
[47] Da Rosa D P, Forgiarini L F, Baronio D, et al. Simulating sleep apnea by exposure to intermittent hypoxia induces inflammation in the lung and liver [J]. Mediators of inflammation, 2012, (26):879419.
[48] Pascussi J M, Vilarem M J. Inflammation and drug metabolism: NF-kappB and the CAR and PXR xeno-receptors [J]. Medecine sciences : M/S, 2008, 24(3): 301-5.
[49] Taylor C T, Kent B D, Crinion S J, et al. Human adipocytes are highly sensitive to intermittent hypoxia induced NF-kappaB activity and subsequent inflammatory gene expression [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 447(4): 660-5.
[50] Liu Y, Tipoe G L, Fung M L. Melatonin attenuates intermittent hypoxia-induced lipid peroxidation and local inflammation in rat adrenal medulla [J]. International journal of molecular sciences, 2014, 15(10): 18437-52.
[51] Rasmussen M K, Klausen C L, Ekstrand B. Regulation of cytochrome P450 mRNA expression in primary porcine hepatocytes by selected secondary plant metabolites from chicory (Cichorium intybus L.) [J]. Food chemistry, 2014, 146(255-63.
[52] Kojima K, Nagata K, Matsubara T, et al. Broad but distinct role of pregnane x receptor on the expression of individual cytochrome p450s in human hepatocytes [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2007, 22(4): 276-86.
[53] Ihunnah C A, Jiang M, Xie W. Nuclear receptor PXR, transcriptional circuits and metabolic relevance [J]. Biochimica et biophysica acta, 2011, 1812(8): 956-63.
[54] Ding X, Staudinger J L. Induction of drug metabolism by forskolin: the role of the pregnane X receptor and the protein kinase a signal transduction pathway [J]. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 2005, 312(2): 849-56.
[55] Cheng J, Shah Y M, Gonzalez F J. Pregnane X receptor as a target for treatment of inflammatory bowel disorders [J]. Trends in pharmacological sciences, 2012, 33(6): 323-30.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[56] Revollo J R, Cidlowski J A. Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009, 1179:167-78.
[57] Assenat E, Gerbal-Chaloin S, Larrey D, et al. Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance [J]. Hepatology, 2004, 40(4): 951-60.
[58] Wang S H, Liang C T, Liu Y W, et al. Crosstalk between activated forms of the aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor [J]. Toxicology, 2009, 262(2): 87-97.
[59] Lemasters J J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. Rejuvenation research, 2005, 8(1): 3-5.
[60] Shibutani S T, Saitoh T, Nowag H, et al. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system [J]. Nature immunology, 2015, 16(10): 1014-24.
[61] Bostrom P, Andersson L, Rutberg M, et al. SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity [J]. Nature cell biology, 2007, 9(11): 1286-93.
[62] Shang L, Chen S, Du F, et al. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(12): 4788-93.
[63] Noda N N, Fujioka Y. Atg1 family kinases in autophagy initiation [J]. Cellular and molecular life sciences : CMLS, 2015, 72(16): 3083-96.
[64] Kim Y C, Guan K L. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation [J]. The Journal of clinical investigation, 2015, 125(1): 25-32.
[65] Mcewan D G, Dikic I. The Three Musketeers of Autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation [J]. Trends in cell biology, 2011, 21(4): 195-201.
[66] Huang W W, Tsai S C, Peng S F, et al. Kaempferol induces autophagy through AMPK and AKT signaling molecules and causes G2/M arrest via downregulation of CDK1/cyclin B in SK-HEP-1 human hepatic cancer cells [J]. International journal of oncology, 2013, 42(6): 2069-77.
[67] Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, et al. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation [J]. The EMBO journal, 2012, 31(22): 4304-17.
[68] Pankiv S, Clausen T H, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. The Journal of biological chemistry, 2007, 282(33): 24131-45.
[69] Lee Y J, Jang B K. The Role of Autophagy in Hepatocellular Carcinoma [J]. International journal of molecular sciences, 2015, 16(11): 26629-43.
[70]RYTER S W, CHOI A M. Regulation of autophagy in oxygen-dependent cellular

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

stress [J]. Current pharmaceutical design, 2013, 19(15): 2747-56.
[71] Chen Y, Wei H, Liu F, et al. Hyperactivation of mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) promotes breast cancer progression through enhancing glucose starvation-induced autophagy and Akt signaling [J]. The Journal of biological chemistry, 2014, 289(2): 1164-73.
[72] Perl A. mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2015, 1346(1): 33-44.
[73] Mao Y Q, Fan X M. Autophagy: A new therapeutic target for liver fibrosis [J]. World journal of hepatology, 2015, 7(16): 1982-6.
[74] Jin Y, Bai Y, Ni H, et al. Activation of autophagy through calcium-dependent AMPK/mTOR and PKCtheta pathway causes activation of rat hepatic stellate cells under hypoxic stress [J]. FEBS letters, 2016, 590(5): 672-82.
[75] Maiese K. Targeting molecules to medicine with mTOR, autophagy, and neurodegenerative disorders [J]. British journal of clinical pharmacology, 2015, 15. doi: 10.1111/bcp.12804.
[76] Yang H, Peng Y F, Ni H M, et al. Basal Autophagy and Feedback Activation of Akt Are Associated with Resistance to Metformin-Induced Inhibition of Hepatic Tumor Cell Growth [J]. PloS one, 2015, 10(6): e0130953.
[77] De Luca A1, Maiello MR, D'Alessio A, et al . The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. [J]. Expert Opin Ther Targets. 2012 Apr;16 Suppl 2:S17-27.
[78] Kim J, Kundu M, Viollet B, et al. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. Nature cell biology, 2011, 13(2): 132-41.
[79] Maejima Y, Isobe M, Sadoshima J. Regulation of autophagy by beclin 1 in the heart [J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2015, Nov 9. pii: S0022-2828(15)30102-4.
[80] Liu X H, Lu J P, Zhang L, et al. Involvement of a Magnaporthe grisea serine/threonine kinase gene, MgATG1, in appressorium turgor and pathogenesis [J]. Eukaryotic cell, 2007, 6(6): 997-1005.
[81] Grimmel M, Backhaus C, Proikas-Cezanne T. WIPI-Mediated Autophagy and Longevity [J]. Cells, 2015, 4(2): 202-17.
[82] Lee J S, Kim Y J, Kim C L, et al. Differential induction of autophagy in caspase-3/7 down-regulating and Bcl-2 overexpressing recombinant CHO cells subjected to sodium butyrate treatment [J]. Journal of biotechnology, 2012, 161(1): 34-41.
[83] 赵善民, 林丽芳, 肖邦, 等. 低氧对裸鼹鼠皮肤成纤维细胞自噬水平及凋亡的影响. [J]. 实验动物与比较医学, 2014, 5:405-408.
[84] Hernandez-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

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

tissues [J]. Gastroenterology, 2012, 142(4): 938-46.
[85] Hidvegi T, Ewing M, Hale P, et al. An autophagy-enhancing drug promotes degradation of mutant alpha1-antitrypsin Z and reduces hepatic fibrosis [J]. Science, 2010, 329(5988): 229-32.
[86] Bizargity P, Schroppel B. Autophagy: basic principles and relevance to transplant immunity [J]. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons, 2014, 14(8): 1731-9.
[87] Thapalia BA, Zhou Z, Lin X. Autophagy, a process within reperfusion injury_ an update.pdf. [J]. Int J Clin Exp Pathol. 2014 ,1;7(12):8322-41.
[88] Deng J, Huang Q, Wang Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1alpha regulates autophagy to activate hepatic stellate cells [J]. Biochemical and biophysical research communications, 2014, 454(2): 328-34.
[89] Huang J-J, Li H-R, Huang Y, et al. Beclin 1 expression: A predictor of prognosis in patients with extranodal natural killer T-cell lymphoma, nasal type [J]. Autophagy, 2014, 6(6): 777-83.
[90] 戴霞红，赵树山，萧梅芳，等. LPS 诱导肝细胞 LO2 释放 HMGB1 蛋白的研究. [J]. 生命科学研究, 2011, 15(3):241-249.
[91] Fitzwalter BE, Thorburn A. Recent insights into cell death and autophagy [J]. The FEBS journal, 2015, ;282(22):4279-88.
[92] Yang L, Li P, Fu S, et al. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance [J]. Cell metabolism, 2010, 11(6): 467-78.
[93] Ueno T, Ezaki J, Kominami E. Metabolic contribution of hepatic autophagic proteolysis: old wine in new bottles [J]. Biochimica et biophysica acta, 2012, 1824(1): 51-8.
[94] Ravikumar B, Sarkar S, Davies J E, et al. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology [J]. Physiological reviews, 2010, 90(4): 1383-435.
[95] Mortimore G E, Hutson N J, Surmacz C A. Quantitative correlation between proteolysis and macro- and microautophagy in mouse hepatocytes during starvation and refeeding [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1983, 80(8): 2179-83.
[96] Gohla A, Klement K, Piekorz R P, et al. An obligatory requirement for the heterotrimeric G protein Gi3 in the antiautophagic action of insulin in the liver [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(8): 3003-8.
[97] Komatsu M, Waguri S, Koike M, et al. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice [J]. Cell, 2007, 131(6): 1149-63.
[98] Kawabata T, Yoshimori T. Beyond starvation: An update on the autophagic machinery and its functions [J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2015,

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[99] Ezaki J, Matsumoto N, Takeda-Ezaki M, et al. Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels [J]. Autophagy, 2011, 7(7): 727-36.
[100] Salas M, Tuchweber B, Kourounakis P, et al. Temperature-dependence of stress-induced hepatic autophagy [J]. Experientia, 1977, 33(5): 612-4.
[101] Martin S, Parton R G. Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle [J]. Nature reviews Molecular cell biology, 2006, 7(5): 373-8.
[102] Gao L, Lv G, Guo X, et al. Activation of autophagy protects against cholestasis-induced hepatic injury [J]. Cell bioscience, 2014, 4:47.
[103] Li J, Savransky V, Nanayakkara A, et al. Hyperlipidemia and lipid peroxidation are dependent on the severity of chronic intermittent hypoxia [J]. Journal of applied physiology, 2007, 102(2): 557-63.
[104] Sinha R A, You S H, Zhou J, et al. Thyroid hormone stimulates hepatic lipid catabolism via activation of autophagy [J]. The Journal of clinical investigation, 2012, 122(7): 2428-38.
[105] Xiong X, Tao R, Depinho R A, et al. The autophagy-related gene 14 (Atg14) is regulated by forkhead box O transcription factors and circadian rhythms and plays a critical role in hepatic autophagy and lipid metabolism [J]. The Journal of biological chemistry, 2012, 287(46): 39107-14.
[106] Czaja M J, Ding W X, Donohue T M, JR., et al. Functions of autophagy in normal and diseased liver [J]. Autophagy, 2013, 9(8): 1131-58.
[107] Zhao Y, Zuo Y, Huo H J, et al. Glucocorticoid induced autophagy in N1511 chondrocyte cells [J]. European review for medical and pharmacological sciences, 2014, 18(23): 3573-9.
[108] Singh P K, Singh S, Ganesh S. Activation of serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) underlies increased glycogen levels, mTOR activation, and autophagy defects in Lafora disease [J]. Molecular biology of the cell, 2013, (24): 3776-86.
[109] Srinivas V, Bohensky J, Shapiro I M. Autophagy: a new phase in the maturation of growth plate chondrocytes is regulated by HIF, mTOR and AMP kinase [J]. Cells, tissues, organs, 2009, 189(1-4): 88-92.
[110] Liu N, Wang W, Zhao Z, et al. Autophagy in human articular chondrocytes is cytoprotective following glucocorticoid stimulation [J]. Molecular medicine reports, 2014, 9(6): 2166-72.
[111] Bohensky J, Shapiro I M, Leshinsky S, et al. HIF-1 regulation of chondrocyte apoptosis: induction of the autophagic pathway [J]. Autophagy, 2007, 3(3): 207-14.
[112] Kania E, Pajak B, Orzechowski A. Calcium homeostasis and ER stress in control of autophagy in cancer cells [J]. BioMed research international, 2015, 2015:352794.
[113] Ureshino R P, Rocha K K, Lopes G S, et al. Calcium signaling alterations,

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

oxidative stress, and autophagy in aging [J]. Antioxidants & redox signaling, 2014, 21(1): 123-37.
[114] Yao Z, Klionsky D J. The symphony of autophagy and calcium signaling [J]. Autophagy, 2015, 11(7): 973-4.
[115] Xue Z, Guo Y, Fang Y. Moderate activation of autophagy regulates the intracellular calcium ion concentration and mitochondrial membrane potential in beta-amyloid-treated PC12 cells [J]. Neuroscience letters, 2016, 618(50-7).

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

发表论文和参加科研情况说明

在学期间发表论文情况：

[1] SHAO HX, WU J, WU Q, et al. Bronchial artery embolization for hemoptysis: a retrospective observational study of 344 patients [J]. Chinese medical journal, 2015, 128(1): 58-62. SCI 收录，IF:1.053

[2] 参与《呼吸与危重症医学热点问题评析》一书的编写工作

在学期间参加科研情况：

1、2014-2016，两种多维评估体系在 COPD 严重程度评估中应用的比较，编号 2014KY17，天津市卫生局科技基金，经费 2 万，第一承担人；

2、2013-2016，RhoA/ROK 通道参与呼吸重叠综合征肺高压形成作用及机制，编号 13JCYBJC22400，天津市应用基础与前沿技术研究计划（自然科学基金一般项目），经费 10 万，第七承担人；

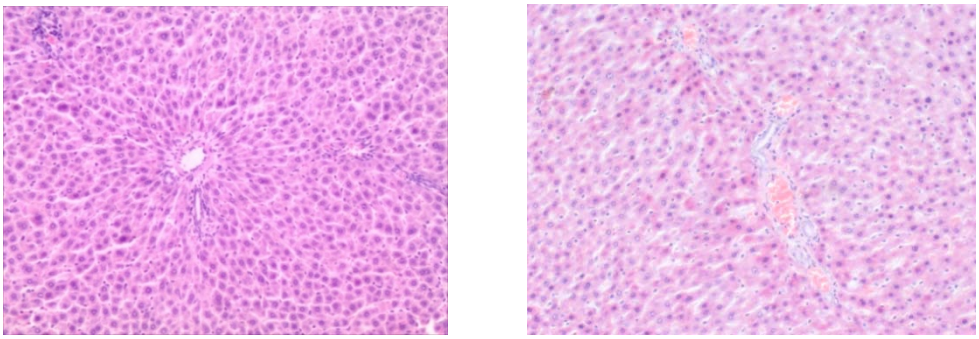
3、2014-2015，Noisy PSV（变应性压力支持通气）在 AECOPD 中短期应用的观察，编号：科研补贴 2014 ，天津市津南区科技计划项目，经费 10 万，第五承担任人；

4、2013-2016，家庭式 COPD 肺康复训练治疗方案及评价体系的建立与应用，编号 13ZCZDSY02000，天津市科技计划项目，经费 100 万，参与人。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

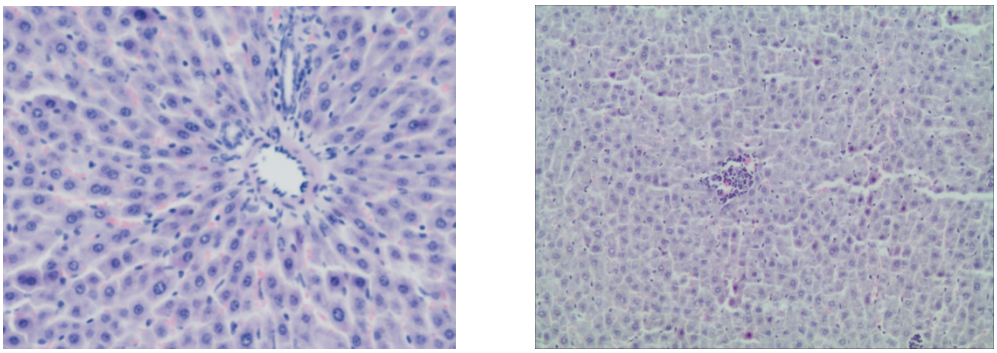
附录

彩图 1.1 IH 模型制备



Control 组 ×100　　IH 组 ×100

图 1.2 对照组和间歇低氧组大鼠肝组织病理形态学改变（HE×100）



Control 组 ×400　　IH 组 ×400

图 1.3 对照组和间歇低氧组大鼠肝组织病理形态学改变（HE×400）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

综述

低氧、炎症与自噬

地球上所有的生命依赖于氧气而存在，活细胞所有的生理和病理过程都以氧气为基础。低氧是以氧气缺乏为特征，即缺氧组织的氧合降低。在生理和病理条件下均可出现缺氧。生理性低氧的微环境可以在很多正常组织存在，如视网膜，神髓质，皮肤的表皮层和骨髓。在病理条件下，低氧更为常见，几乎所有炎症和肿瘤都与低氧并存。炎症反应对于宿主来说是一个保护的过程，但是这个过程要在时间和范围上有所限制，因为炎症反应过度或持续时间过长可能引起机体损害。事实上，组织和器官在高水平炎症介质下暴露使细胞面对高压的状态可能导致严重损伤。所以严重的炎症反应可以扰乱细胞的自身调节，但是自噬可以抑制炎症反应。自噬是真核细胞对老化细胞及细胞器进行降解代谢的过程[1]。自噬是细胞在应激状态下（物理，化学或代谢的）发生的快速反应过程从而维持细胞内的稳态[2]。自噬的过程是在细胞内通过隔离的膜将蛋白和细胞器包裹形成自噬体，然后与溶酶体融合，最终被细胞内的酶等物质降解[3]。自噬作用通过至少两个途径保护细胞不受过度的长时间炎症反应的损害：（1）通过间接清除损伤的细胞器（如线粒体等）或致病微生物来建立保护体系免受炎症刺激；（2）直接抑制促炎症因子复合物。通常情况下，控制自噬活性的调控网络可以接收到各种炎症介质的相关信号，根据炎症状态对验证过程进行适当调整。下面我们将详细介绍低氧，炎症与自噬之间千丝万缕的关系。

一、自噬在细胞中的作用

哺乳类动物具有三种自噬形式：（1）巨自噬指细胞器被双层或多层膜的囊泡吞噬形成自噬体，完整的自噬体通过微管被运输到溶酶体进行降解[4]；（2）微自噬是溶酶体通过溶酶体膜自陷直接吞噬细胞基质；（3）分子伴侣介导的自噬（chaperone-mediated autophagy ，CMA）过程是通过细胞质内的分子伴侣热休克蛋白 70（(heat shock cognate protein of 70 kDa，hsc70）识别包括五肽在内的蛋白质结构，然后形成分子伴侣复合体并运送到溶酶体表面，与溶酶体相关

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

膜蛋白 2A（lysosome associated membrane protein type 2A，LAMP2A）结合，并转运至溶酶体内[5]。巨自噬是自噬常见的形式，此文所涉及的自噬主要指第一种类型巨自噬。

自噬最初被认为是一个非选择性的巨大的降解过程，细胞在营养缺乏时期，吞噬部分细胞质并被利用。在近些年的研究发现，自噬具有选择性，并且在一定条件下发生，吞噬特异性底物，如：线粒体，内质网，脂肪滴，过氧化物酶体，核内体，溶酶体，分泌颗粒，核糖体，胞质内聚合物，炎性蛋白和入侵的病原体[6]。自噬破坏这些结构首先是泛素化。一些自噬受体，叫做 SLRs，是死骨片-1（Sequestosome 1,SQSTM1）样受体含有泛素结合区域（ubiquitin-binding domain，UBD）可以与自噬体结合。自噬受体家族包括 p62/SQSTM1，NBR1，NDP52,和视神经蛋白。底物也可以通过泛素依赖的方式运到自噬体，比如通过线粒体[6]。在很多案例中，自噬介导的线粒体降解依赖于位于线粒体外膜的多泛素化的蛋白和 PINK1 和 E3 连接酶帕金。在其他一些案例中，线粒体自噬可以依靠线粒体外膜蛋白（如，NIX）直接将线粒体与自噬溶酶体膜的 LIR 区域相连。最终，在神经元细胞可以看到一个选择性通道，线粒体内膜的心磷脂与外膜相连，可以直接被 LC3 识别[7,8]。

自噬主要分为六个步骤：启动，囊泡成核，延伸，膜伸长，闭合，成熟和降解。启动过程是形成一个单独的膜，膜可以来源于内质网，高尔基体，线粒体，细胞膜或核内体。启动时需要两个蛋白激酶复合体：（1）ULK1/2-ATG13-FIP200 复合体,它可以与自噬抑制器 TOR 复合体 1（mTORC1）偶联；（2）Beclin1-Vps34-Vps15-ATG14 复合体。后面的这个复合体通常可以被来自高尔基体的抗凋亡蛋白 Bcl2 蛋白或其他信号抑制[9]。自噬是一个动态的过程，激活高度依赖于翻译后的修饰，如磷酸化，乙酰化和泛素化[10]。mTORC1 复合体由 mTOR 激酶组成，是一个强大的细胞生长调节因子，可以整合多种细胞内和细胞外信号（生长因子，营养素，和细胞内能量状态）。在正常状态下，mTORC1 复合体与 ULK1/2-ATG13-FIP200 复合体和磷酸化的 ULK1/2 还有 ATG13 相连，从而抑制了 ULK1/2 激酶活性。在应激状态下，AMPK 通过特异位点磷酸化直接激活 ULK1/2，同时通过抑制 mTORC1 间接激活 ULK1/2[11]。ULK1/2-ATG13-FIP200 复合体 mTOR 依赖的特异位点去磷酸化释放 ULF1/2 活性，是复合体自身磷酸化并与 ATG101 蛋白通过 ATG13 依赖的方式相交互[12]。下一步，细胞膜上的 Beclin1-ATG14-Vps34-Vps15 复合体被招募激活，诱导初

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

期囊泡形成。囊泡成核的依靠细胞外自噬初始复合体(ULK1/2-ATG13-ATG101-FIP200 和 Beclin1-ATG14-Vps34-Vps15), Ras-样小G-蛋白 RalB 和他的感受器 EXo84 的动态聚集，EXo84 的作用是自噬机械化的激活平台[13]。自 ER 产生的吞噬泡有与 III 型 Beclin-1 相关的磷脂酰肌醇 3 激酶, Vps34 有关的标记为点, 富含 PI3P 结构。这可以募集 PI3P 结合蛋白, 如 DFCP1, Alfy，和 WIPI 家族蛋白。大量的 WIPI 家族：WIPI1，WIPI2 和 WIPI4 识别初级自噬体上的 ATG12-ATG5-ATG16L1 复合体的 PI3P 区域[14]。

吞噬泡膜的伸长依靠两个泛素样蛋白：ATG12 和 ATG8。与泛素化相似，ATG12 通过 ATG7（E1 样酶）蛋白和 ATG10（E2 样酶）与 ATG5（底物）相结合。然后，ATG5-ATG12 复合体与 ATG16L1 通过共价作用与吞噬泡相联系。第二个泛素化样反应涉及 ATG7（E1 样酶）蛋白和 ATG10（E2 样酶），这个反应要求 ATG8 家族（LC3，GABARAP，和 GATE-16）的泛素样分子与磷脂酰肌醇相结合。同时，ATG5-ATG12-ATG16L1 复合体从闭合的自噬体脱离，而酯化的 LC3——LC3-II 仍然与自噬体相连，直至与溶酶体融合[15]。ATG5-ATG12-ATG16L1 阳性/LC3 阴性的前自噬体结构通过 SNARE 介导的同型融合相联系，这使吞噬泡的膜结构增大，这是捕获 LC3 的先决条件，也是自噬体前体到自噬泡的过程[16]。尽管他的功能仍然不能全部了解，但是跨膜蛋白 ATG9 也是将膜整合运送到吞噬泡装配位点[17]。

自噬体闭合被认为是需要 LC3 结合的系统[18]。然而，这一步骤中突变细胞的缺陷是不允许精确的分子调控的。一旦吞噬泡边缘闭合，隔绝的基质将被降解，自噬体沿着微管移动到核周围，与核内体和溶酶体相互作用[19]。这些细胞器通过 SNARE 蛋白（VAMP3 和 VAMP7）和 Rab GTP 酶（至少 Rab7 和 Rab11）进行整合[20-22]。Beclin 蛋白在自噬的起始阶段十分重要，同时在自噬体成熟过程中间接调控 Rab7 蛋白活性[22]。自噬的最终阶段是释放由自噬溶酶体降解的细胞代谢物（氨基酸，糖和脂类）。这一过程需要通透酶，这是一种跨膜蛋白。在真菌，自噬体的氨基酸循环需要 3 中空泡氨基酸通透酶：Atg22，Avt3，和 Avt4[23]。有趣的是，mTOR，一个自噬的主要抑制因子，在自噬终点，氨基酸释放时被活化，并刺激溶酶体衍生的细胞膜从自噬溶酶体释放来形成心功能的溶酶体[24]。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

二、低氧刺激炎性因子产生参与自噬

低氧是常见的病生理过程，所有组织对低氧的适应需要有低氧诱导因子 1（IH-2）的参与。自噬对于低氧的刺激非常敏感。最近很多研究显示，细胞或组织低氧可以调节自噬过程，低氧导致的细胞损伤对于线粒体翻转具有重要作用。体外自噬激活，需要 Beclin 1 和一些促使细胞内 ROS 产物及 HIF-1α 稳定的物质。进一步说，HIF-1α 的下游靶目标，Bcl-2 家族成员 BNIP3（Bcl-2/腺病毒 EB19kDa-作用蛋白 3）参与调节由低氧诱导的自噬。在肿瘤细胞系，低氧引起自噬激活需要 BNIP3 参与。通过选择性的线粒体自噬可以在低氧过程中促使细胞存活。但是，遗传研究尚不能确定 BNIP3 的在低氧过程中是促使细胞存活还是死亡。

低氧诱导的自噬在抵抗肿瘤被免疫细胞杀死的过程中有重要作用。最近的数据显示低氧诱导的自噬分别通过 NK 细胞和 CTLs 调节固有免疫和适应性免疫。研究证实，低氧状态下的肺癌细胞可以通过自噬反应来躲避 CTL 介导的降解。降低自噬可以使肿瘤细胞对 CTL 介导的降解敏感性恢复。这与低氧下磷酸化的 STAT3 减少有关。在鼠黑色素瘤的模型中，自噬抑制剂羟氯喹联合酪氨酸酶相关蛋白 2 肽疫苗的治疗方案与单药治疗方案和不治疗组相比，在肿瘤生长速度方面显著降低。这说明，自噬的体内抑制可以增强酪氨酸相关蛋白 2 基础疫苗的抗肿瘤作用。

自噬的活性作用与 NK 细胞介导的抗肿瘤免疫应答有关。在低氧状态下，肿瘤细胞可以通过激活自噬而躲避 NK 细胞介导的免疫监督。在低氧细胞中，颗粒酶 B 可以根据自噬活性选择性降解, 从而抑制 NK 细胞介导的靶细胞凋亡。根据体外试验观察，自噬功能缺失的肿瘤，肿瘤体积缩小，推测与 NK 细胞增强肿瘤细胞死亡有关。

三、 调控自噬的炎症介质

固有免疫受体　　在分子水平，病原菌通过“模式识别受体”（ pattern recognition receptors，PRRs）被检测出，这些受体位于：细胞质膜（Toll 样受体, TLRs1,2,4,5,6）,内体膜（TLR3, TLR7, TLR8, TLR9）, 或细胞基质中（NLRs），视黄酸诱导基因样受体（RLRs），C 型凝集素样受体（CLRs）[25-28]。这些固有免疫受体识别保守的结构序列，这些序列在微生物上被称为“病原相关分子模式”（PAMPs），如细菌细胞壁上的脂多糖，鞭毛蛋白，和脂蛋白；细菌和病毒的核酸；真菌细胞壁上的酵母聚糖和甘露聚糖。他们也可以识别“危险相关分

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

子模式”（DAMPs），这些模式向宿主细胞发射危险信号。固有免疫受体和自噬之间存在有联系，PRRs 提示存在微生物，自噬通过溶酶体降解的方式进行细胞内清除。十分需要注意的是，PRRs 的指令实质上是从一个细胞类型传递到另一个细胞类型；所以，与饥饿引起自噬不同的是，PRRs 介导的自噬需要依赖于更多的细胞类型。另外，PRRs 的分布受细胞极性的影响。例如，在结肠，TLR5 仅暴露于肠细胞基地外侧，并且远离细胞顶端[29]。

筛查 PAMPs 在自噬中的作用显示各种 TLRs 原型，包括 TLR1，TLR3，TLR4, TLR5, TLR6 和 TLR7, 他们可以诱导老鼠和人类的巨噬细胞的自噬[30,31]。依赖 TLR9 诱导的自噬在由细菌 CpG 序列刺激的人类结肠上皮细胞中被报道[32]。侵入性病原体，如李斯特菌或金黄色葡萄球菌可以通过依赖 TLR2 的途径激活巨噬细胞自噬并使他们自己被清除[33,34]。有趣的是， 通过竞争性 TLR 激活的自噬可以清除侵入细胞内部的病原体[30]。

TLR 和自噬之间的复杂关系需要去研究，因为初始免疫受体激活后，很多下游信号效应器在忙碌。TLR4 刺激巨噬细胞引起的自噬有 Myd88 病毒 TRIF 的参与，这与之前的数据不符[31,35]。Delgado 等人阐述通过 TLR7 激活巨噬细胞 ssRNA 的自噬需要依赖 MyD88。从机制方面来说，由连接蛋白 TRIF 或 MYD88[30]介导支持的 TLR 信号和自噬关系，被发现与 Becil1 共沉淀，减少 Beclin1 与抑制蛋白 Beclin2 的结合从而自噬激活[31]。Myd88 与 mTOR 的物理联系通过激活主要的转录因子（IRT-5 和 IRF-7）来激活炎症因子和 I 型 IFN 基因[36]。另外，分枝杆菌感染和斑马鱼细胞胚胎诱导了 DRAM1 介导的 Myd88 和 NF-kB 依赖的选择性自噬途径[37]。

通过细菌肽聚糖原件激活 Nod 受体诱导自噬并导致杀菌能力增强和抗原呈递[38,39]。细胞质内 Nod1 和 Nod2 受体与自噬的分子作用已经被 D.Philpott 小组完美阐释。他们报道 ATG16L1 与 Nod 受体相互作用在细菌进入位点进行自噬机械募集，然后将细菌运输到自噬体进行降解[39]。“NOD 吞噬”需要其他吞噬相关蛋白，如 ATG5，ATG7，和受体反应丝氨酸-苏氨酸激酶 2（RIPK-2）[38]。通过 Nod 蛋白的自噬调节是进化上的保守，因为果蝇同源的 PGRPLE 也是通过肽聚糖片段识别，可以诱导李斯特菌引起的自噬[40]。通过其他 NLR 家族成员调节的自噬，涉及到炎症体的聚集[41-43]。AIM2 和 NLRP3 介导的炎性体活化促使小 G 蛋白 RalB 活化和自噬体形成[43]。通过与 Exo84 结合，RalB 诱导催化激活的 ULK1 和 Beclin1-Vps34 复合体聚集[13]。NLR 蛋白 Naip5 和 NLTC4 可

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

以识别鞭毛蛋白刺激自噬体翻转[41]。

相反，NLRs 负面的调节自噬。NLRC4 和 NLRP4 负面调节自噬的过程与 Beclin1 有关。另外，NLRP4 生理上与 C-VPS 复合体（VPS11，VPS16，VPS18，和 Rab7）结合来控制细胞膜紧缩和空泡融合，从而阻止成熟自噬体向自噬溶酶体转化[44]。

总的来说，PRRs，通过感觉细菌的微生物产物，病毒和真菌可以调节初始和成熟的多个步骤。

细胞因子 细胞因子通过与细胞膜上的特异受体结合来调节自噬。一般途径是，Th1 细胞因子（IL2，TNF-a，IFN-r）是自噬诱导因子，同时 Th2 细胞因子（IL4，IL5，IL6，IL10 和 IL13）和抗炎因子是自噬抑制因子。细胞因子被认为诱导自噬包含 IL1，IL2，IL6，TNF-a，TGF-β，和 IFN-r[45]。

通过细胞因子诱导的自噬在清除病原体方面有重要机制。结核杆菌和沙眼衣原体诱导自噬由 IFN-r 促进了降解的机制[46,47]。通过 IFN-r 诱导的自噬，涉及的免疫相关 GTP 酶如鼠 Irgml，人 IRGM，Irga6 和含有 65-kDa 鸟苷酸结合蛋白家族的细胞膜[46-49]。与鼠的 Irgml 基因不同，与此同源的人的 IRGM 不是作用于 IFN-r，而是直接感染上皮和巨噬细胞诱导自噬[49-51]。IRGM 单一核酸多态性（SNP）与抗结核杆菌感染相关，有些人携带这种变异的保护性基因[52]。在 Irgml/巨噬细胞一个依赖于 p38MAPK 替代 IFN-r 活化自噬的途径被报道[53]。在人类的肝细胞癌，IFN-r 通过 IRF-1 信号通路并且自噬活化与细胞死亡有关[54]。I 型 IFNs 的感应已经被多种癌细胞通路证实，并且涉及 JAK/STS 和 PI3K-mTOR 通路[55]。I 型 IFN 蛋白包括多种 IFN-a 亚型，IFN-β 和 IFN-w，他们有多种作用，如抗病毒，抗恶性肿瘤增生，和免疫调节作用。

促炎细胞因子和死亡配体，TNF-a，在多种细胞型中充当自噬诱导物，包括 T-淋巴母细胞白血病细胞，破骨细胞或尤文肉瘤细胞[56-58]。TNF-a 调节自噬依赖多种信号传导途径，包括 JNK 和 Erk 信号通路，主要通过活性氧（ROS）产生作用[59-62]。TNF-a 在自噬中的作用建立在结核杆菌的研究之上，因为有活性的结核菌相关抗 TNF-a 治疗（英利昔单抗，阿达姆单抗，妥珠单抗，和依那西普）被疑似，至少部分依靠抑制抗细菌自噬的过程[63,64]。

关于 IL6 在自噬中各种作用依赖于特定的组织。IL6 在骨髓细胞和鼠的胰腺肿瘤细胞可以加强自噬[65,66]。而 IL6 的过度表达在人的支气管上皮通过 Beciln1 和抗凋亡 Bcl2 蛋白 Mcl-1 的相互作用抑制自噬[67]。其他的细胞因子诱

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

导自噬包括 IL-1β，疑似是内源性的 mTOR 通路抑制因子[68]，通过多种信号通路（JNK，Smad 和 TAK1 通路）激活自噬[69,70]。

相反的，很多 Th2 和抗炎因子表现为自噬抑制作用。如 IL4 和 IL13 细胞因子，它们通过两方面抑制饥饿诱导的自噬：一是激活 PI3K/Akt 信号途径，二是阻碍 IFN-r 介导的信号转导同时激活转录因子 6（STAT6）依赖的途径[71]。抗炎症细胞因子 IL10 也被认为通过激活 PI3K/Akt 信号途径来抑制饥饿诱导的自噬[72]。

活性氧（ROS） 很多证据显示，ROS 是在营养剥夺时早期的自噬诱导因子。这表示抗氧化治疗可以部分或全部的逆转自噬过程[73]。在营养剥夺的情况下，减少还原性谷胱甘肽（GSH）得清除是强有力的抗氧化措施，通过位于细胞外的膜蛋白转运子 ABCC1MRp1 来实现[74]。这就导致了细胞内的氧化还原状态转化为氧化状态，这可能需要氧化氧化还原敏感蛋白，从而诱导了早期的自噬。线粒体是激活自噬 ROS 的提供者。我们假设，在营养剥夺时，线粒体主要产生过氧化物和过氧化氢，可以通过至少两条途径来激活自噬。一种分子机制是 :细胞上的能量传感器 AMPK（5’腺苷单磷酸活化的蛋白激酶）活化, AMPK 通过自身半胱氨酸谷胱甘肽化。谷胱甘肽化石氨胱氨酸的翻译后修饰，通常是细胞内 ROS 产生时出现的反应。AMPK 通过磷酸化 TSC2（结节性硬化综合症 2）来激活自噬,TSC2 是 mTORC1 的抑制因子，通过磷酸化激活 ULK1 成为 mTORC1 复合体的一部分[11,75,76]。另一个机制是 ROS 氧化半胱氨酸残基最近的催化位点，即半胱氨酸蛋白酶 ATG4，从而激活其蛋白水解酶活性，增强自噬[77,78]。

炎症相关转录因子 直至最近，转录调控的自噬才被逐渐认识，但是近些年来大量证据显示如网的转录因子参与到自噬的微调过程中。很多转录因子（TFs），在一系列的炎症反应中，被认为是核心自噬基因的转录调节子。TFs 的原型是核因子 kB（NF-kB）p65/RelA 家族成员，被证实可以上调 BECN1 和 SQSTM1 的转录[79,80]。其他可以调节自噬基因转录的炎症相关 TFs 包括：低氧诱导因子（HIF-1），JUN，信号转换器，转录活化因子（STAT）1 和 STAT3[81]。HIF-1 通过增强 BNIP3 和 BNIP3L 编码基因的转录来激活自噬[82]。这两个蛋白属于 BH3-onlyBcl2 家族蛋白, 可以激活自噬。C-JUN 被招募至 Beclin1 和 ATG8 基因启动子区域来应对神经胺处理从而增强基因转录[83,84]。STAT1 和 STAT3 在自噬调节中起负性作用，因为在自噬活化和很多 Atg 基因包括 Atg12 和

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Beclin1 转录增强时，这些 TFs 表达受损[85,86]。属于核受体家族的 TFs，如过氧化物酶增殖受体激活受体 α（PPARα），PPARr 和法尼醇 X 活化受体（FXR），他们的作用是配体激活 TFs, 调控炎症反应, 同时调节自噬[87,88]。PPARα 和 FXR 在自噬基因的转录过程中有相反作用，PPARα 激活可以上调自噬基因的表达，而 FXR 激活会下调。Copetti 和他的团队阐述了这两个核受体竞争性结合自噬基因启动子的相同位点[79]。炎症状态同时调节 EB 转录因子（TFEB）活化，他是一个主要的调节因子，可以把自噬和溶酶体基因排序[89]。因此，TFs 通过深层次调节，所以炎症通过自噬转录程序方面更进一步影响自噬。

四 自噬调节炎症反应

炎性活体调节　炎性体是细胞内的信号平台，是一种在感染，组织损伤或代谢失衡状态下的一种应急物质，对于促炎因子 IL-1β 和 IL-18 有较强水解活性[90]。这些多聚体蛋白复合体通常有三个个体：炎症传感器蛋白，是一种 NLR 形式可以被 PAMP 或 DAMP 检测到的模块，比如 NLRP3 和 NLRC4，或内源性 DNA（由线粒体释放）可检测到的模块，如 AIM2（黑色素瘤中缺失），适配器蛋白 ASC 和半胱天冬酶 1 可以催化前 IL1β 和前 IL18 的活化过程。炎性体激活可以引起凋亡，这是细胞死亡一个快速和促炎因子的形式[90]。

自噬作用对于炎症体是一个负调节。小鼠缺乏自噬必须的 ATG16L1，表现为受内毒素刺激时 IL1β 和 IL18 水平较高[91]。这些已经被药理学（3-甲基腺嘌呤治疗）和自噬基因抑制子（LC3B 和 Beclin1）证实，在被 PAMPs 刺激时，自噬基因抑制子可以导致高水平 IL1-β 产生[43,92]。相反的是，TLR 或雷帕霉素诱导的自噬导致了大量前 IL1-β 产生[93]。然而，自噬调节炎症体活性的分子机制尚未完全了解。自噬可以通过直接隔离和降解泛素化的炎性体和前 IL-1β 分子，或间接降低内源性导致的炎性体生成，比如线粒体 ROS 或 DNA[43,92-94]。

P62/SQSTM1 作为氧化应激的调节因子的作用　自噬除了通过调节营养敏感途径清除多泛素化蛋白和细菌, p62/SQTM1 也参与到调节炎症因子介质产生的过程中[95-97]。p62/SQTM1 蛋白可以使氧化应激反应基因上调，尤其被抗氧化转录因子 Nrf2 控制的基因。在基础条件下，Nrf2 在细胞质内被 Keap1 限制。在氧化应激发生时，p62/SQSTM1 与 Keap1 上的 Nrf2 结合位点相互作用，竞争性结合，导致 Nrf2 稳定化和核转移和靶基因转录，其中包括重要的 ROS 清除编码基因[98]。所以，Nrf2 的活化通过由自噬降解的 p62/SQSTM1-Keap1 复合体

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

加强，通过 Nrf2 激活 p62/SQSTM1 转录。

炎症调节因子的分泌 除外含有前导肽的蛋白质在内质网被修饰发生的保守的分泌过程, 通过高尔基体被转运, 通过高尔基体后的载体与质膜融合分泌, 这样一个非保守的基于自噬的分泌过程被描述。分泌的蛋白质没有前导肽这个过程最早是在酵母菌中被发现并描述。这一过程在哺乳动物细胞中也有发现, 并被称为“分泌性自噬”（同时也成为自分泌或 III 型分泌）[99-100]。分泌性自噬的基本特征是涉及 ATG 蛋白的自噬过程，并且依赖于高尔基体重组和堆积蛋白，GRASP55 和 GRASP65。分泌性自噬是一个需要探索的领域，自噬起始肽如何分泌或简单降解仍需要多方面的研究。在哺乳动物细胞中，分泌性自噬在短暂的特异性情况下，分泌前炎症细胞因子（IL-1β，IL -18）和危险信号分子（高移动性编组框-1, HMGB-1）[101]。这一过程需要 ATG5, 炎性体, GRASP55 和 Rab8a。

巨噬细胞极化的控制 单核吞噬细胞和位于他们中间的巨噬细胞在固有和适应性免疫应答的调控和表达中起到了重要作用。这些细胞的一大特征是高度多样化及可塑性。在组织中，对多种环境刺激（如 生长因子，细胞基因，微生物的产物或糖皮质激素）起应答作用时，单核吞噬细胞经过转录改编程序重塑表型和功能，在一个极度连续激活的状态下，表现为 M1 经典表型和 M2 转换表现[102]。骨髓细胞系分化成为巨噬细胞 PU.1 转录因子，然后持续表达。然后，根据巨噬细胞微环境，M1 型巨噬细胞极化由 STAT1 和 IRF-5 介导，同时 M2 型的极化由 STAT6，IRF-4 和 PPARr 介导[103]。在巨噬细胞极化的微调过程中由多种细信号分子，转录因子，外生机制和转录后调节因子参与[104]。重要的是，巨噬细胞极化是一个短暂可逆的过程[105]。通常，M1 巨噬细胞激活炎症因子反应来对抗细胞内的微生物和肿瘤细胞；同时，M2 巨噬细胞是免疫抑制细胞，通过支持肿瘤发生的关节步骤如，血管生成，组织修复重塑来参与肿瘤的生长过程。

巨噬细胞的转移与分化，我们这篇综述未涉及，但是很多证据表明自噬参与了巨噬细胞极化的过程。肝癌衍生因子与 TLR2 结合，刺激 M2 巨噬细胞极化，这是一个在肿瘤组织中由大多数肿瘤相关巨噬细胞（TAM）表达的表型，通过选择性自噬来调节细胞内 NF-kB 水平[106,107]。通过溶酶体抑制子 bafilomycin A1 治疗或 ATG5 基因敲除使自噬受损，组织 NF-kB（p65）降解，迫使 M2 巨噬细胞像 M1 表型细胞一样, 分泌高水平的炎症细胞因子[108]。另外，

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mTOR 途径是单核细胞分化为 TAM 的关键元素。通过雷帕霉素（rapamycin）治疗可以抑制 mTOR 途径，这使单核细胞向 M1 表型分化，同时，敲除 mTOR 抑制子 TSC2 形成 RNA 干扰介导 mTOR 激活，可以促使单核细胞向 M2 巨噬细胞分化。CatS 是一种在很多肿瘤中高表达的组织蛋白酶，缺乏时，可以使自噬体聚集，减弱巨噬细胞的自噬能力。最近，很多研究显示，CatS 介导的自噬流要求 M2 TAMs 表型持续极化[109]。

综上所述，自噬和自噬相关基因在调节炎症反应的过程中起到了重要作用，低氧状态通过低氧诱导因子诱导炎症反应产生，同时自噬参与其中。所以，自噬根据炎症反应的状态，整合一系列的信号系统，包括 PAMPs（TLRS 和 NLRs），细胞因子和 ROS 等来应答炎症反应，完成自身使命。

综述参考文献

[1] Y. Feng,D.He,Z.Yao,and D. J. Klionsky, The machinery of macroautophagy, Cell Researc,2014, 24(1):24-41.

[2] G. Kroemer,G. Mariño,and B. Levine, Autophagy and the integrated stress response, Molecular Cell, 2010, 40(2):280-293.

[3] D. N. Cook, D. S. Pisetsky, and D. A. Schwartz, Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease, Nature Immunology,2004;5(10):975-979 .

[4] W.-W. Li, J. Li, and J.-K. Bao, “icroautophagy: lesser-known self-eating. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012,69(7):1125-1136.

[5] S. Kaushik and A. M. Cuervo, Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world, Trends in Cell Biology, 2012,22(8):407-417.

[6] A. Stolz, A. Ernst, and I. Dikic, Cargo recognition and trafficking in selective autophagy, Nature Cell Biology, 2014,(16):495-501.

[7] C. T. Chu, H. Bayir, and V. E. Kagan, LC3 binds externalized cardiolipin on injured mitochondria to signal mitophagy in neurons: Implications for Parkinson disease, Autophagy, 2014(10):376-378.

[8] G. Ashrafi and T. L. Schwarz, The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria, Cell Death and Differentiation, 2013,(20): 31-42.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[9] C. He and B. Levine, “The Beclin 1 interactome,” Current Opinion in Cell Biology, 2010,12(22):140-149.
[10] D. G. McEwan and I. Dikic, “The three musketeers of autophagy: phosphorylation, ubiquitylation and acetylation,” Trends in Cell Biology, 2011,21(4):195-201.
[11] J. Kim, M. Kundu, B. Viollet, and K.-L. Guan, “AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1,” Nature Cell Biology,2011,13(2):132-141.
[12] C. A. Mercer, A. Kaliappan, and P. B. Dennis, “A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy,” Autophagy, 2009,5,(5):649-662.
[13] B. O. Bodemann, A. Orvedahl, T. Cheng et al., “RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly,” Cell, 2011,144(2):253-267.
[14] T. Proikas-Cezanne, Z. Takacs, P. Donnes, and O. Kohlbacher, “WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome,” Journal of Cell Science, 2015,128(2):207-217.
[15] Y. Kabeya, N. Mizushima, T. Ueno et al., “LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing,” The EMBO Journal, 2000,19(21):5720-5728.
[16] K. Moreau, B. Ravikumar, M. Renna, C. Puri, and D. C. Rubinsztein, “Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion,” Cell,2011,146(2): 303-317.
[17] H. Yamamoto, S. Kakuta, T. M. Watanabe et al., “Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation,” Journal of Cell Biology, 2012,198(2):219-233.
[18] N. Fujita, M. Hayashi-Nishino, H. Fukumoto et al., “An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure,”Molecular Biology of the Cell, 2008,19(11):4651-4659.
[19] L. Jahreiss, F.M.Menzies, and D. C. Rubinsztein, “The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes,”

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Traffic, 2008, 9(4): 574-587 .
[20] C. M. Fader,D. Sánchez,M. Furlán, and M. I. Colombo, “Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in K562 cells,” Traffic, 2008,9(2):230-250.
[21] C. M. Fader, D. G. Sanchez, M. B. Mestre, and M. I. Colombo, “TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways,” Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research, 2009,1793(12):1901-1916.
[22] C. Liang, J.-S. Lee, K.-S. Inn et al., “Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking,” Nature Cell Biology,2008, 10(7):776-787.
[23] Z. Yang, J. Huang, J. Geng, U. Nair, and D. J. Klionsky, “Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy,” Molecular Biology of the Cell, 2006,17(12):5094-5104.
[24] L. Yu, C. K.McPhee, L. Zheng et al., “Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated bymTOR,” Nature, 2010,465(7300):,942-946.
[25] I. M. Dambuza and G. D. Brown, “C-type lectins in immunity:recent developments,” Current Opinion in Immunology, 2014,32:21-27.
[26] M. Yoneyama, K. Onomoto,M. Jogi, T. Akaboshi, and T. Fujita, “Viral RNA detection by RIG-I-like receptors,” Current Opinion in Immunology, 2015,32:48-53.
[27] T. Kawasaki and T. Kawai, “Toll-like receptor signaling pathways,” Frontiers in Immunology, 2014,5:article 461.
[28] V.Motta, F. Soares, T. Sun, and D. J. Philpott, “NOD-like receptors:versatile cytosolic sentinels,” Physiological Reviews, 2015,95(1):149-178.
[29] A. T. Gewirtz, T. A. Navas, S. Lyons, P. J. Godowski, and J. L. Madara, “Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression,” Journal of Immunology, 2001,167(4):1882-1885.
[30] M. A. Delgado, R. A. Elmaoued, A. S. Davis, G. Kyei, and V. Deretic, “Toll-like receptors control autophagy,” EMBO Journal, 2008,27(7):1110-1121.
[31] C.-S. Shi and J. H. Kehrl, “MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages,” The Journal of Biological Chemistry, 2008,283(48):33175-33182.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[32] S. Bertin and V. Pierrefite-Carle, “Autophagy and toll-like receptors: a new link in cancer cells,” Autophagy, 2008, 4(8):1086-1089 .

[33] P. K. Anand, S.W. G. Tait, M. Lamkanfi et al., “TLR2 and RIP2 pathways mediate autophagy of Listeria monocytogenes via extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation,” The Journal of Biological Chemistry, 2011,286(50):42981-42991 .

[34] L. Fang, H.-M. Wu, P.-S. Ding, and R.-Y. Liu, “TLR2 mediates phagocytosis and autophagy through JNK signaling pathway in Staphylococcus aureus-stimulated RAW264.7 cells,” Cellular Signalling, 2014,26(4):806-814.

[35] Y. Xu, C. Jagannath, X.-D. Liu, A. Sharafkhaneh, K. E. Kolodziejska, and N. T. Eissa, “Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity,” Immunity, 2007,27(1):135-144.

[36] F. Schmitz, A. Heit, S. Dreher et al., “Mammalian target of rapamycin (mTOR) orchestrates the defense program of innate immune cells,” European Journal of Immunology, 2008,38(11):2981-2992 .

[37] M. van der Vaart, C. J. Korbee, G. E. Lamers et al., “The DNA damage-regulated autophagy modulator DRAM1 links mycobacterial recognition via TLR-MYD88 to autophagic defense,” Cell Host & Microbe, 2014,15(6):753-767.

[38] R. Cooney, J. Baker, O. Brain et al., “NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation,” Nature Medicine, 2010,16(1):90-97.

[39] L. H. Travassos, L. A. M. Carneiro,M. Ramjeet et al., “Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry,” Nature Immunology, 2010,11(1):55-62 .

[40] T. Yano, S. Mita, H. Ohmori et al., “Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila,” Nature Immunology, 2008, 9(8):908-916.

[41] B. G. Byrne, J. F. Dubuisson, A. D. Joshi, J. J. Persson, and M.S. Swanson, “Inflammasomecomponents coordinate autophagy and pyroptosis as macrophage responses to infection,” MBio, 2013,4(1):132-134 .

[42] J. D. Martins, J. Liberal, A. Silva, I. Ferreira, B. M. Neves, and M. T. Cruz,

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

“Autophagy and inflammasome interplay,”DNA and Cell Biology, 2015,34(4):274-281.

[43] C.-S. Shi, K. Shenderov, N.-N. Huang et al., “Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction,” Nature Immunology, 2012,13(3):255-263.

[44] N. Jounai, K. Kobiyama, M. Shiina, K. Ogata, K. J. Ishii, and F. Takeshita, “NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with Beclin1,” Journal of Immunology, 2011,186(3):1646-1655.

[45] J.Harris, “Autophagy and cytokines,” Cytokine, vol. 56,no. 2, pp.140-144, 2011.

[46] M. A. Al-Zeer, H. M. Al-Younes, P.R. Braun, J. Zerrahn, andT. F. Meyer, “IFN-γ-inducible Irga6 mediates host resistance against Chlamydia trachomatis via autophagy,” PLoS ONE, 2009,4(2):e4588.

[47] M. G. Gutierrez, S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo, and V. Deretic, “Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages,” Cell,2004,119(6):753-766.

[48] B.-H. Kim, A. R. Shenoy, P. Kumar, R. Das, S. Tiwari, and J. D. MacMicking, “A family of IFN-γ-inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection,” Science,2011, 332(6030):717-721.

[49] S. B. Singh, A. S. Davis, G. A. Taylor, and V. Deretic, “Human IRGMinduces autophagy to eliminate intracellularmycobacteria.” Science, 2006,313(5792):1438-1441.

[50] C. Bekpen, J. P.Hunn, C. Rohde et al., “Theinterferon-inducible p47 (IRG) GTPases in vertebrates: loss of the cell autonomous resistance mechanism in the human lineage,” Genome Biology, 2005,6(11): article R92.

[51] P. Brest, P. Lapaquette, M. Souidi et al., “A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn’s disease,” Nature Genetics, 2011,43(3):242-245 .

[52] C. D. Intemann, T. Thye, S. Niemann et al., “Autophagy gene variant IRGM-261T contributes to protection fromtuberculosis caused by Mycobacterium uberculosis but not by M.africanum strains,” PLoS Pathogens, 2009,5, no. (9):Article IDe1000577.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[53] T.Matsuzawa, B.-H.Kim, A. R. Shenoy, S.Kamitani, M.Miyake, and J. D. MacMicking, “IFN-gamma elicits macrophage autophagy via the p38 MAPK signaling pathway,” Journal of Immunology, 2012,189(2):813-818.

[54] P.Li,Q.Du,Z.Caoet al., “Interferon-gamma induces autophagy with growth inhibition and cell death in human hepatocellular carcinoma (HCC) cells through interferon-regulatory factor-1 (IRF-1),” Cancer Letters,2012,314(2):213-222 .

[55] H. Schmeisser, J. Bekisz, and K. C. Zoon, “New function of Type I IFN: induction of autophagy,” Journal of Interferon and Cytokine Research, 2014,34(2): 71-78 .

[56] M. Djavaheri-Mergny, M. Amelotti, J. Mathieu et al., “NF-χB activation represses tumor necrosis factor-α-induced autophagy,” The Journal of Biological Chemistry, 2006,281(41):30373-30382 .

[57] L. Jia, R. R. Dourmashkin, P. D. Allen, A. B. Gray, A. C.Newland, and S. M. Kelsey, “Inhibition of autophagy abrogates tumour necrosis factor alpha induced apoptosis in human Tlymphoblastic leukaemic cells,” British Journal of Haematology, 1997,98(3): 673-685.

[58] N.-Y. Lin, C. Beyer, A. Gieβ1 et al., “Autophagy regulates TNFα- mediated joint destruction in experimental arthritis,” Annals of the Rheumatic Diseases,2013 ,72(5): 761-768.

[59] N. Baregamian, J. Song, C. E. Bailey, J. Papaconstantinou, B. M. Evers, and D. H. Chung, “Tumor necrosis factor-alpha and apoptosis signal-regulating kinase 1 control reactive oxygen species release,mitochondrial autophagy and c-Jun N-terminal kinase/p38 phosphorylation during necrotizing enterocolitis,” OxidativeMedicine and Cellular Longevity, 2009,2(5):297- 306.

[60] M. Djavaheri-Mergny, M. Amelotti, J. Mathieu, F. Besancon, C. Bauvy, and P. Codogno, “Regulation of autophagy by NFκB transcription factor and reactives oxygen species,” Autophagy, 2007,3(4):390-392 .

[61] G. Jia, G. Cheng, D. M. Gangahar, and D. K. Agrawal, “Insulinlike growth factor-1 and TNF-α regulate autophagy through cjun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells,” Immunology and Cell Biology, 2006,84(5):448-454.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[62] U. Sivaprasad and A. Basu, “Inhibition of ERK attenuates autophagy and potentiates tumour necrosis factor-alphainduced cell death in MCF-7 cells,” Journal of Cellular and Molecular Medicine,2008,12(4):1265-1271 .

[63] J. Harris, J. C. Hope, and J. Keane, “Tumor necrosis factor blockers influence macrophage responses to Mycobacterium tuberculosis,” Journal of Infectious Diseases, 2008,198(12):1842-1850.

[64] J. Harris and J. Keane, “How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity,” Clinical and Experimental Immunology, 2010,161(1):1-9 .

[65] H. Roca, Z. S.Varcos, S. Sud,M. J. Craig, and K. J. Pienta, “CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization,” The Journal of Biological Chemistry, 2009,284(49):34342-34354 .

[66] Q.Zhang,R.Kang, H. J. Zeh,M. T. Lotze, andD.Tang, “DAMPs and autophagy: cellular adaptation to injury and unscheduled cell death,” Autophagy, 2013,9(4):451-458.

[67] Y.Qi,M. Zhang, H. Li et al., “Autophagy inhibition by sustained overproduction of IL6 contributes to arsenic carcinogenesis,” Cancer Research, 2014,v74(14): 3740-3752 .

[68] E. D. Smith, G. A. Prieto, L. Tong et al., “Rapamycin and interleukin-1β impair brain-derived neurotrophic factordependent neuron survival by modulating autophagy,” The Journal of Biological Chemistry,2014,289(30):20615-20629.

[69] Y. Ding and M. E. Choi, “Regulation of autophagy by TGF-β emerging role in kidney fibrosis,” Seminars in Nephrology, 2014,34(1):62-71.

[70] Y. Ding, J. K. Kim, S. I. Kim et al., “TGF-β1 protects against mesangial cell apoptosis via induction of autophagy,’ Journal of Biological Chemistry, 2010,285(48):37909-37919.

[71] J.Harris, S.A. deHaro, S. S. Master et al., “T helper 2 cytokines inhibit autophagic control of intracellularMycobacteriumtuberculosis,” Immunity, 2007,27(3):505-517 .

[72] H.-J. Park, S. J. Lee, S.-H. Kim et al., “IL-10 inhibits the starvation induced autophagy in macrophages via class I phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

pathway,”Molecular Immunology,2011,48(4):720-727.
[73] A.-L. Levonen, B. G. Hill, E. Kansanen, J. Zhang, and V. M.Darley-Usmar, “Redox regulation of antioxidants, autophagy,and the response to stress: implications for electrophile therapeutics,”Free Radical Biology andMedicine,2014,71(23): 196-207.
[74] E. Desideri, G. Filomeni, and M. R. Ciriolo, “Glutathione participates in themodulation of starvation-induced autophagy in carcinoma cells,” Autophagy, 2012, 8(12):1769-1781.
[75] D. M. Gwinn, D. B. Shackelford, D. F. Egan et al., “AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint,”Molecular Cell, 2008,30(2):214-226.
[76] K. Inoki, H. Ouyang, T. Zhu et al., “TSC2 integrates Wnt and energy signals via a coordinated phosphorylation byAMPKand GSK3 to regulate cell growth,” Cell,2006, 126(5):955-968.
[77] R. Scherz-Shouval, E. Shvets, and Z. Elazar, “Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy,”Autophagy, 2007, 3(4):371-373.
[78] Z.-Q. Yu, T. Ni, B. Hong et al., “Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy,” Autophagy, 2012,8(6):883-892.
[79] T. Copetti, C. Bertoli, E. Dalla, F. Demarchi, and C. Schneider,“p65/RelA modulates BECN1 transcription and autophagy,” Molecular and Cellular Biology,2009, 29(10):2594-2608.
[80] J. Ling, Y. Kang, R. Zhao et al., “KrasG12D-induced IKK2/β/NF-κB activation by IL-1α and p62 feedforward loops is required for development of pancreatic ductal adenocarcinoma,” Cancer Cell, 2012, 21(1):105-120.
[81] J. Füllgrabe, D. J. Klionsky, and B. Joseph, “The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy,”Nature Reviews Molecular Cell Biology,2014, 15(1):65-74.
[82] G. Bellot, R. Garcia-Medina, P. Gounon et al., “Hypoxiainduced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains,”Molecular and Cellular Biology,2009, 29(10):2570-2581.
[83] D.-D. Li, L.-L.Wang, R.Deng et al., “The pivotal role of c-Jun NH2 -terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cancer cells," Oncogene, 2009,28(6):886-898.
[84] T. Sun, D. Li, L. Wang et al., "C-Jun NH2-terminal kinase activation is essential for up-regulation of LC3 during ceramideinduced autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells,"Journal of Translational Medicine, 2011, 9(1):article 161.
[85] D. J. Dauer, B. Ferraro, L. Song et al., "Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer,: Oncogene, 2005,24(21):3397–3408.
[86] J. Mccormick, N. Suleman, T. M. Scarabelli, R. A. Knight,D. S. Latchman, and A. Stephanou, "STAT1 deficiency in the heart protects against myocardial infarction by enhancing autophagy," Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2012, 16(2): 386-393.
[87] J. M. Lee, M. Wagner, R. Xiao et al., "Nutrient-sensing nuclear receptors coordinate autophagy," Nature, 2014, 516(7529):112-115.
[88] J. Zhou, W. Zhang, B. Liang et al., "PPARγ activation induces autophagy in breast cancer cells," International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2009, 41, (11):2334-2342.
[89] C. Settembre, C. di Malta, V. A. Polito et al., "TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis," Science, 2011, 332(6036):,1429-1433.
[90] T. Nunes and H. S. de Souza, "Inflammasome in intestinal inflammation and cancer,"Mediators of Inflammation, 2013, (2013):Article ID 654963.
[91] T. Saitoh, N. Fujita, M. H. Jang et al., "Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production," Nature, 2008, 456(7219):264-268.
[92] K.Nakahira, J. A.Haspel, V. A. K. Rathinamet al., "Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome,"Nature Immunology, 2011,12(3):222-230.
[93] J. Harris, M. Hartman, C. Roche et al., "Autophagy controls IL-1β secretion by targeting Pro-IL-1β for degradation,"TheJournal of Biological Chemistry, 2011, 286(11):9587-9597.
[94] R. Zhou, A. S. Yazdi, P. Menu, and J. Tschopp, "A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation," Nature, 2011, 475(354):122-225.
[95] G. Matsumoto, K. Wada, M. Okuno, M. Kurosawa, and N. Nukina, "Serine 403

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins," Molecular Cell, 2011,44(2):279-289.
[96] M. T. Sorbara and S. E. Girardin, "Emerging themes in bacterial autophagy," Current Opinion inMicrobiology C, 2015, 23(2):163-170.
[97] A.Duran,R.Amanchy, J. F. Linares et al., "P62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway," Molecular Cell, 2011,44(1):134-146.
[98] M. Komatsu, H. Kurokawa, S. Waguri et al., "The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factorNrf2 through inactivation of Keapl,"Nature Cell Biology, 2010, 12(3): 213-223.
[99] V. Deretic, S. Jiang, and N. Dupont, "Autophagy intersections with conventional and unconventional secretion in tissue development, remodeling and inflammation," Trends in Cell Biology, 2012, 22(8):397-406.
[100] C. Rabouille, V. Malhotra, and W. Nickel, "Diversity in unconventional protein secretion," Journal of Cell Science, 2012,125(22):5251-5255.
[101] N. Dupont, S. Jiang,M. Pilli,W. Ornatowski, D. Bhattacharya, and V. Deretic, "Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta," The EMBO Journal, 2011, 30(23):4701-4711.
[102] L. B. Ivashkiv, "Epigenetic regulation of macrophage polarization and function," Trends in Immunology, 2013, 34(5):216-223.
[103] T. Lawrence and G. Natoli, "Transcriptional regulation of acrophage polarization: enabling diversity with identity," Nature Reviews Immunology, 2011, 11(11):750-761.
[104] A. Sica and A.Mantovani, "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas," Journal of Clinical Investigation, 2012, 122(3):787-795.
[105] E. Cassol, L.Cassetta, C. Rizzi, M. Alfano, and G. Poli, "M1 and M2a polarization of human monocyte-derived macrophages inhibits HIV-1 replication by distinct mechanisms," The Journal of Immunology, 2009, 182(10):6237-6246.
[106] C.-P. Chang, Y.-C. Su, C.-W. Hu, and H.-Y. Lei, "TLR2-dependent selective autophagy regulates NF-κB lysosomal degradation in hepatoma-derived M2 macrophage differentiation," Cell Death and Differentiation,2013, 20(3):,515-523.
[107] C.-P.Chang,Y.-C. Su, P.-H. Lee, and H.-Y. Lei, "Targeting NF-KB by autophagy

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

to polarize hepatoma-associated macrophage differentiation," Autophagy, 2013, 9(4): 619-621.
[108] W. Chen, T.Ma, X.-N. Shen et al., "Macrophage-induced tumor angiogenesis is regulated by the TSC2-mTOR pathway," Cancer Research, 2012, 32(72):1363-1372.
[109] M. Yang, J. Liu, J. Shao et al., "Cathepsin S-mediated autophagic flux in tumor-associated macrophages accelerate tumor development by promoting M2 polarization," Molecular Cancer, 2014,13(43):26-29.
[110]MIRRAKHIMOV A E, POLOTSKY V Y. Obstructive sleep apnea and non-alcoholic Fatty liver disease: is the liver another target? [J]. Frontiers in neurology, 2012, 3:149.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

致谢

时光荏苒，岁月如梭，博士研究生的学习生活即将结束。在这几年中，经历了求索的艰辛和坎坷，饱尝了成功的欢乐与失败的痛苦，在洒下辛勤汗水的同时也收获了成长的喜悦。自古谓寒窗苦读，可见学习的艰辛与清贫，但是，苦读所得到的知识，所得到的人生感悟，不是金钱、财物可衡量的。在硕士研究生毕业三年后，我有幸再一次跨入母校天津医科大学的校门，并继续追随导师吴琦教授学习，在他领导的团队中继续工作学习。再次即将毕业之际，首先我要对尊敬的吴琦教授献上真挚的谢意和敬意。

跟随吴琦教授十年，与其精湛的医术相比，更佩服的是恩师崇高的人格。恩师的每个学生在入学之初，最先学到的不是如何治病救人，而是如何做人。恩师在工作中对患者至真至诚的耐心，对学习一丝不苟的认真，对学生无微不至的关怀，这些时时刻刻感染着他的学生和身边的人。恩师是一个宽容的人，宽容到作为学生可以恣意玩笑，但是恩师也是一个严格的人，对于在学习工作中的一丁点错误都不能放任不管，甚至严厉批评。对于恩师的感情，与其说是师生，不如说父女，恩师对待学生不仅是学业上严格要求，在生活上更是无微不至的关怀，大到婚嫁生子，小到感冒生病，恩师都要操心过问。在恩师身边，学到的不仅是渊博的知识，精湛的技艺，学到更多的是如何做人。从恩师身上，我深刻体会到，做一个好医生的前提是做一个好人。对于恩师的崇敬和谢意无以言表，只好将热忱投入到工作当中，不能愧对恩师的期望。

在这几年的工作学习中，我还得到很多前辈，同事，同学的帮助。感谢天津市海河医院孙昕院长及陈怀永教授在我博士研究生期间给于的帮助。如果说，吴琦教授是我人生的导航者，孙昕院长和陈怀永教授就是我科研道路的指明灯。他们是我的科研之路的引导者，我在科研道路上的点滴进步都凝聚着他们的心血。感谢他们的帮助与鼓励，使我顺利完成了科研工作，并指导完成论文。感谢他们让我从“医生头脑”转变为“科学家头脑”，虽然距离科学家的道路很远，并且毕业以后可能仅仅徘徊在这些“细胞”、“分子”的边缘，但是，这几年所学，终身受益无尽。

感谢天津市海河医院呼吸科李莉主任，武俊平主任及于洪志主任在我博士在读期间给予的大力支持。当初硕士毕业时，临床经验尚少，经过三年住院医师

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

培训，仅仅懂得医学的皮毛，是回到海河医院后，我才迅速成长，这些与主任们的悉心教导息息相关。在海河医院呼吸科，我见到了很多只存在于书本上的疾病，同时，李莉主任精益求精的工作精神，武俊平主任刻苦钻研的学习精神，于洪志主任一丝不苟的治学精神，深深触动了我，激励我更加努力的工作学习。

感谢天津市海河医院基础医学实验室李雪、李宽在实验过程中提供的技术指导和帮助。感谢李凡，张颖超，杨书香，杨立，张素蓓等师弟、师妹们在实验及学习过程中给于的帮助。感谢天津市海河医院呼吸科全体老师及同仁在博士在读期间给予的支持与帮助。

最后要郑重感谢我的家人，在我攻读博士及工作期间给予的大力支持。感谢我的爱人及父母在我上学期间给予的无私支持，让我没有家庭的后顾之忧，全身心投入到学习与工作当中。

最后感谢所有在学习和生活中关心和帮助过我的每一位老师、同学、同事、亲人和朋友！谨此一并致以最诚挚的谢意！

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

个人简历

姓名： 邵红霞　　**性别**：女

出生年月：1983 年 10 月　　**籍贯**：天津市静海县

主要学习和工作经历：（从本科开始）

2002 年 9 月-2009 年 7 月	天津医科大学临床医学七年制，获临床医学硕士学位
2009 年 9 月至今	天津市海河医院呼吸科工作
2009 年 10 月-2012 年 10 月	天津医科大学总医院住院医师规范化培训

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net