DOI：10.12287/j.issn.2096-8965.20210110

•综　述•

自噬与 p62 /SQSTM1 在肝缺血再灌注中的作用

张海明，朱志军 *

（首都医科大学附属北京友谊医院肝移植中心，北京 101100）

【摘要】自噬是溶酶体依赖性的降解系统，p62 作为重要的蛋白载体，可促进受损蛋白经蛋白酶体和自噬体清除。p62 在线粒体自噬等选择性自噬中发挥重要作用。p62 与 Keap1 结合并通过自噬清除 Keap1，这导致游离的 Nrf2 水平增加，而 Nrf2 又可促进 p62 表达。因此自噬、p62、Nrf2 三者间存在密切的联系，相互调控。同时，Nrf2 还可促进谷胱甘肽（Glutathione, GSH）和硫氧还蛋白（Thioredoxin, TXN）等多种分子的表达，而在肝缺血再灌注损伤过程中，肝细胞内这些分子可能参与细胞死亡的过程。因此，自噬与 p62 在肝缺血再灌注中的具体机制仍需进一步研究明确。

【关键词】自噬；线粒体自噬；p62；Nrf2；Keap1

中图分类号：R363　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：2096-8965（2021）01-0070-05

Roles of autophagy and p62/SQSTM1 in hepatic ischemia-reperfusion

Zhang Haiming，Zhu Zhijun*

（Liver Transplantation Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 101100, China）

【**Abstract**】Autophagy is a lysosomal dependent degradation system, and p62 itself is an important protein carrier to facilitate the removal of damaged proteins by proteasomes and autophagosomes. p62 plays an important role in selective autophagy such as mitochondrial autophagy. p62 binds to Keap1 and clears Keap1 through autophagy, leading to increased levels of free Nrf2. Nrf2 can promote the expression of p62, glutathione (GSH) and thioredoxin (TXN). Therefore, autophagy, p62 and Nrf2 are closely related and mutually regulated. However, in the process of hepatic ischemia-reperfusion injury, these molecules in hepatocytes may participate in the process of cell death, and the specific mechanism still needs to be further studied.

【**Keywords**】Autophagy; Mitochondrial autophagy; p62; Nrf2; Keap1

自噬广泛存在于真核细胞生物中，其在细胞中主要通过降解长寿命蛋白质或破损的细胞器来发挥生物降解功能[1]，这对保持细胞内环境的稳定有很大的帮助。自噬参与了多种生理和病理过程，并且是生长发育和胚胎发育过程中凋亡细胞清除的重要机制[2]。研究发现，自噬在组织脏器缺血再灌注损伤过程中发挥双向调控作用，是决定细胞是否存活的重要因素[3]。在应对多种应激环境时，自噬能通过降解错误折叠的蛋白质和损伤的细胞器来防止细胞凋亡途径的触发，进而发挥重要的细胞保护作用[4]。在适度缺血再灌注处理的条件下上调自噬，可为细胞提供能量[5]；但是如果刺激超出细胞所能承受的范围，则会导致细胞自噬持续活化，进而引发自噬参与的细胞死亡。在器官缺血再灌注损伤的

通讯作者：朱志军（1968-），男，四川简阳人，博士生导师，主要从事肝脏移植，肝脏外科及门脉高压外科的临床与基础研究。
E-mail: zhu-zhijun@outlook.com

过程中，受损器官的自噬水平会被上调，例如，在大鼠的心肌缺血损伤模型中，心肌细胞缺血损伤后，细胞内自噬体出现显著的增加 [6, 7]；同样在小鼠肾脏缺血再灌注损伤模型中发现肾小管上皮细胞自噬水平也是上调的 [8]。但自噬被过分激活时可导致细胞的死亡，这种死亡方式被称为Ⅱ型程序性细胞死亡，又称自噬性细胞死亡 [9]。

笔者团队在既往的小鼠肝脏缺血再灌注损伤研究中发现，肝脏缺血再灌注损伤后肝细胞内自噬水平上调，自噬水平的变化与肝损伤的病理表现及损伤分子标记物的变化存在相关性。采用 Rapamycin 促进自噬时，肝组织缺血再灌注损伤加剧；采用 3-MA抑制自噬时，肝组织缺血再灌注损伤减轻 [10]。因此，自噬活化可能成为肝脏缺血再灌注损伤的关键过程，自噬与肝缺血再灌注损伤呈现正相关。而通过减少 Atg12、Atg12-Atg5 表达水平，减少肝细胞自噬体形成，抑制细胞自噬活性，可以抑制小鼠肝脏缺血再灌注损伤 [11]。在脂肪肝的损伤研究中，体内和体外实验均证实 Ex4 通过减少自噬来减轻肝细胞损伤。Ex4 的竞争性拮抗剂 Ex9-39 可以阻断 GLP1 通路，抑制 Ex4 对肝脏的保护性作用 [2]。因此，自噬也同样是脂肪变性肝缺血再灌注损伤后细胞死亡的关键因素。GLP-1R 激动剂被认为是 Ex4 的一种相对安全的激动剂，可用于减轻肝细胞损伤。因此靶向设计一种或多种自噬信号通路的抑制剂药物，是今后肝损伤保护药物研发的一个重要方向。

p62 是在哺乳动物中第一个被发现的选择性结合分子 [3, 4]，由于其能够形成聚集体，Shin 将其命名为 sequestosome 1（SQSTM1）[5]。p62 本身是一种重要的蛋白载体，能够促进受损蛋白经蛋白酶体和自噬体清除 [6]。p62 是一种自噬底物，自噬活跃后 p62 被大量清除，因而 p62 减少也成为自噬活跃的标志。p62 参与的细胞过程非常广泛，其作为重要的载体，是多个蛋白降解过程的关键功能分子，能够参与缺血再灌注过程自噬和 Nrf2 等信号通路的调控。首先 p62 是蛋白质泛素化降解过程中的关键分子，p62 被证明可以将泛素化蛋白，如 tau 蛋白，传递到蛋白酶体进行降解。此外，它还能在细胞核和细胞质之间穿梭，与泛素化物质结合，调节核质和胞质蛋白的含量。p62 除了在蛋白水解系统中发挥重要性作用，其它功能也逐渐被研究所揭示。p62 的 C 端存在一个 UBA 结构域，它是 p62 发挥载体功能的重要结构，该结构能够与泛素化的分子底物发生结合。p62 的另一个重要结构域是 LIR，后者可以与 LC3 分子结合，从而将 p62 绑定在自噬体上，最终导致泛素化蛋白与 p62 在自噬体内被同时降解，因此激活自噬可降低 p62 水平。在多种细胞系、组织（包括肝脏）和动物体（如老鼠和果蝇）中，通过药物或者基因调控抑制自噬均可增加 p62 水平。反之，p62 对自噬的影响仍不明确，在 HeLa 细胞中，p62 过表达对自噬囊泡数量无影响，敲除 p62 对自噬水平也无影响 [7]。然而，在某些细胞系中，过表达 p62 可以增强蛋白聚集，p62 的缺失导致自噬小体减少。沉默 p62 也可以激活自噬，此时，多层自噬体数量增加，最终导致自噬性细胞死亡 [8]。p62 可与自噬上游的 ULK1、VMP1 分子发生作用，促进自噬活化 [12]。

p62 可以促进包括线粒体自噬在内的多种选择性自噬 [13]。在泛素参与的线粒体自噬过程中，线粒体受损后其膜电位水平降低，此时 PTEN 基因诱导的假定激酶 1（PTEN-induced Putative Kinase，PINK1）稳定的附着于线粒体外膜上（Outer Mitochondrial Membrane，OMM）[14]。PINK1 将泛素蛋白磷酸化，并招募和磷酸化 Parkin 蛋白，Parkin 与磷酸化泛素结合后将大量 OMM 上的蛋白泛素化 [15]。这些被泛素化蛋白可以与多种自噬受体结合，包括 NDP52、OPTN、TAX1BP1 和 p62 等，最终与自噬体上的蛋白连接进入自噬体被降解 [16]。线粒体损伤时，PINK1/Parkin 可促进线粒体去极化和分裂，进而推动线粒体自噬 [17, 18]。由于 PINK1 的活化继发于线粒体膜势能的降低，因此 PINK1 对损伤线粒体的清除可能发挥至关重要的作用 [19]。多种细胞研究表明，p62 可促进依赖 PINK/Parkin 的线粒体聚集 [20] 或线粒体自噬 [21]，这显示出 p62 对线粒体自噬的推动作用。此外 PINK/Parkin 的表达存在组织特异性，在肝细胞内两种分子均有表达 [22]，这也提示 PINK/Parkin 相关机制选择性的存在于肝细胞中。

在肝缺血再灌注损伤的研究中，线粒体自噬仍然被认为是一种保护性机制 [23]。肝细胞主要通过内源性通路发生凋亡，内源性通路即线粒体通路，缺氧、辐射或毒素等损害因素导致线粒体膜的完整性丧失，这进一步引起 B-cell Lymphoma-2 家族中诱导凋亡的分子激活。在缺血 - 再灌注损伤中，细

胞质中 Bad 与 Bcl-2 和 Bcl-XL 结合，Bax 和 Bak 插入线粒体膜，引起多种促进凋亡的分子释放，如细胞色素 c、Smac/Diablo、HTRA2/Omi、凋亡诱导因子等等 [24]。因此通过线粒体自噬清除受损的线粒体，可以避免细胞内源性凋亡信号的活化。然而，在肝脏缺血再灌注的背景下，自噬对肝细胞的保护作用、损伤作用、以及线粒体自噬与自噬整体水平的关系仍需大量的研究进行明确。

p62 也可以促进 Nrf2 表达和活化，这使得 p62 对缺血再灌注损伤的影响更加复杂。Nrf2 的抑制物 Keap1 可以通过诱导 Nrf2 泛素化促 Nrf2 降解，p62 与 Keap1 存在直接结合位点，p62 与 Keap1 结合 [25] 并通过自噬清除 Keap1[26]，可导致 Nrf2 水平增加。p62 有一个与 Keap1 结合的 Keap1 DC 结构域（Keep1-interacting Region，KIR），在基础条件下，p62-KIR 结构域与 Keap1-DC 结构域的相互作用较弱，而 Keap1-DC 与 Nrf2 的 ETGE 结构域和 DLGex 结构域的相互作用较强，但是 p62-KIR 的 Ser349 位点可被多种激酶磷酸化，如 mTORC1 和 TGFR 活化激酶（Transforming Growth Factor-β-activated Kinase 1, TAK1）。磷酸化后的 p62 与 Keap1 结合能力增加，导致 Nrf2 被释放并进入细胞核 [27]。由于 p62 与自噬底物结合时可出现磷酸化，所以 Keap1-Nrf2 通路和选择性自噬存在明确的相互作用。p62 同时又是 Nrf2 的靶基因，在氧化应激的背景下 p62 与 Nrf2 相互作用可能促进形成正反馈增强机制 [28]。在肿瘤的研究中，Nrf2 促进了 p62 两种异构体的表达，包括 p62 全长蛋白和缺失 KIR 结构域的 p62 蛋白。后者仍然能发挥对自噬的作用，但不干扰 Keap1 和 Nrf2 之间的相互作用，从而稳定了 Keap1，抑制 Nrf2 调控的蛋白表达，Keap1 继续促进 p62 泛素化和自噬降解实现了该通路的负反馈调节。在 p62 相关的多种信号中，p62 与 Nrf2 的正反馈调节可能占据主要地位，研究显示，当 p62 增加时 Nrf2 出现持续活化 [25, 29, 30]。Nrf2 通路活化发挥对抗氧化应激损伤的作用。

Nrf2 是对抗缺血再灌注损伤的核心分子之一 [31]，其位于一个复杂调控网络的中心。Nrf2 控制谷胱甘肽（Glutathione, GSH）和硫氧还蛋白（Thioredoxin, TXN）抗氧化系统中关键分子的表达，也可调控还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸（Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, NADPH）再生、活性氧清除和血红素代谢所需酶的转录。Nrf2 对自噬、损伤蛋白的清除、线粒体功能也存在重要作用。因此 Nrf2 在许多研究中均被作为细胞对抗缺血再灌注损伤的关键机制。p62 清除聚集蛋白的功能和 p62 促进 Nrf 表达和活化的作用，更倾向于发挥保护性作用。

p62 存在功能多样性，是多种信号通路的结点，可通过自噬或其它机制对细胞生存产生影响。肝缺血再灌注研究中，阻断 p62 可以缓解肝缺血再灌注损伤 [32]，提示 p62 可能也存在推动缺血再灌注损伤作用。有研究认为，p62 的过度蓄积是有害的，肝细胞内过多的 p62 也可能通过活化 Nrf2 导致细胞损伤 [29]，具体机制仍不清楚，缺乏进一步的研究证据支持。笔者团队的研究发现，肝缺血再灌注后自噬水平逐步升高的同时 p62 的水平也逐渐增加，自噬标记物 LC-Ⅱ与 p62 水平同步变化。这提示 p62 可能在自噬和缺血再灌注损伤中存在一定的推动作用 [32]。在对肝缺血再灌注过程中推动自噬和细胞损伤的信号通路的进一步研究中发现：肝缺血再灌注损伤后，肝细胞内 IRF-1（Interferon Regulatory Factor 1）表达上调，p38 信号通路被活化，该通路促进自噬水平升高和肝组织损伤；IRF-1/p38 上调自噬水平促进缺血再灌注损伤的同时，也增加了 p62 的表达；下调 p62 表达，可以降低 IRF-1/p38 通路活化，减少缺血再灌注背景下的肝细胞自噬。考虑到 p62 对 Nrf2 的调控作用和聚集蛋白的清除作用，p62 在缺血再灌注损伤中的损伤作用更可能与自噬水平升高以及其对自噬的推动作用有关。

综上所述，自噬是细胞自我平衡的重要过程，p62 是细胞内蛋白降解的重要载体，Nrf2 是细胞对抗氧化应激的核心分子。上述过程和分子间存在密切的联系，相互调控。然而在肝缺血再灌注损伤过程中，肝细胞内这些分子可能参与细胞死亡的过程，具体机制仍需进一步的研究明确。

参考文献

[1] KANG R, ZEH H J, LOTZE M T, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2011, 18 (4): 571-580.

[2] GUPTA N A, KOLACHALA V L, JIANG R, et al. Mitigation of autophagy ameliorates hepatocellular damage following ischemia-reperfusion injury in murine steatotic liver[J]. American Journal of Physiology

Gastrointestinal and Liver Physiology, 2014, 307(11): G1088-G1099.

[3] LIU W J, YE L, HUANG W F, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiqutin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation[J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2016, 21(1): 29.

[4] BJORKOY G, LAMARK T, BRECH A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death[J]. The Journal of Cell Biology, 2005, 171 (4): 603-614.

[5] SHIN J. p62 and the sequestosome, a novel mechanism for protein metabolism[J]. Archives of Pharmacal Research, 1998, 21 (6): 629-633.

[6] KRAFT C, PETER M, HOFMANN K. Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12 (9): 836-841.

[7] KOROLCHUK V I, MANSILLA A, MENZIES F M, et al. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates[J]. Molecular Cell, 2009, 33(4): 517-527.

[8] NIHIRA K, MIKI Y, ONO K, et al. An inhibition of p62/SQSTM1 caused autophagic cell death of several human carcinoma cells[J]. Cancer Science, 2014, 105 (5): 568-575.

[9] MAIURI M C, ZALCKVAR E, KIMCHI A, et al. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(9): 741-752.

[10] LI S, ZHANG J, WANG Z, et al. MicroRNA-17 regulates autophagy to promote hepatic ischemia/reperfusion injury via suppression of signal transductions and activation of transcription-3 expression[J]. Liver Transplantation 2016, 22(12): 1697-1709.

[11] LI S P, HE J D, WANG Z, et al. miR-30b inhibits autophagy to alleviate hepatic ischemia-reperfusion injury via decreasing the Atg12-Atg5 conjugate[J]. World Journal of Gastroenterology, 2016, 22(18): 4501-4514.

[12] ITAKURA E, MIZUSHIMA N. p62 targeting to the autophagosome formation site requires self-oligomerization but not LC3 binding[J]. J Cell Biol, 2011, 192 (1): 17-27.

[13] 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): 1149-1163.

[14] DAI K, RADIN D P, LEONARDI D. Deciphering the dual role and prognostic potential of PINK1 across cancer types[J]. Neural Regeneration Research, 2021, 16(4): 659-665.

[15] LIN J, CHEN K, CHEN W, et al. Paradoxical mitophagy regulation by PINK1 and TUFm[J]. Molecular Cell, 2020, 80(4): 607-620.

[16] LAMARK T, SVENNING S, JOHANSEN T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm[J]. Essays in Biochemistry, 2017, 61(6): 609-624.

[17] NARENDRA D, TANAKA A, SUEN D F, et al. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy[J]. J Cell Biol, 2008, 183(5): 795-803.

[18] GU J, ZHANG T, GUO J, et al. PINK1 activation and translocation to mitochondria-associated membranes mediates mitophagy and protects against hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. Shock, 2020, 54(6): 783-793.

[19] XU Y, TANG Y, LU J, et al. PINK1-mediated mitophagy protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by restraining NLRP3 inflammasome activation[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2020, 160(49): 871-886.

[20] NARENDRA D, KANE L A, HAUSER D N, et al. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both[J]. Autophagy, 2010, 6 (8): 1090-1106.

[21] GEISLER S, HOLMSTROM K M, SKUJAT D, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12 (2): 119-131.

[22] MUKHERJEE U A, ONG S B, ONG S G, et al. Parkinson's disease proteins: novel mitochondrial targets for cardioprotection[J]. Pharmacol Ther, 2015, 156: 34-43.

[23] BHOGAL R H, WESTON C J, VELDUIS S, et al. The reactive oxygen species-mitophagy signaling pathway regulates liver endothelial cell survival during ischemia/reperfusion injury[J]. Liver Transplantation, 2018, 24 (10): 1437-1452.

[24] WU M Y, YIANG G T, LIAO W T, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018, 46 (4): 1650-1667.

[25] INAMI Y, WAGURI S, SAKAMOTO A, et al. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells[J]. J Cell Biol, 2011, 193 (2): 275-284.

[26] BAE S H, SUNG S H, OH S Y, et al. Sestrins activate Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic degradation of Keap1 and prevent oxidative liver damage[J]. Cell Metab, 2013, 17 (1): 73-84.

[27] SANCHEZ-MARTIN P, SAITO T, KOMATSU M. p62/SQSTM1: 'Jack of all trades' in health and cancer[J]. The FEBS Journal, 2019, 286 (1): 8-23.

[28] JAIN A, LAMARK T, SJOTTEM E, et al. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription[J]. J Biol Chem，2010, 285 (29): 22576-22591.

[29] KOMATSU M, KUROKAWA H, WAGURI S, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1[J]. Nat Cell Biol，2010, 12 (3): 213-223.

[30] LAU A, WANG X J, ZHAO F, et al. A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62[J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(13): 3275-3285.

[31] XU J, LIU J, LI Q, et al. Pterostilbene alleviates Abeta1-42 -induced cognitive dysfunction via inhibition of oxidative stress by activating Nrf2 signaling pathway[J]. Molecular Nutrition & Food Research，2020, 65(2): e2000711.

[32] YU Y, LI S, WANG Z, et al. Interferon regulatory factor-1 activates autophagy to aggravate hepatic ischemia-reperfusion injury via the P38/p62 pathway in mice[J]. Scientific Reports，2017, 7(1): 43684.

[收稿日期] 2020-11-03

（上接第 49 页）

[101] BELTRAN H, PRANDI D, MOSQUERA J M, et al. Divergent clonal evolution of castration-resistant neuroendocrine prostate cancer[J]. Nat Med, 2016, 22(3): 298-305.

[102] ZOU M, TOIVANEN R, MITROFANOVA A, et al. Transdifferentiation as a mechanism of treatment resistance in a mouse model of castration-resistant prostate cancer[J]. Cancer Discov, 2017, 7(7): 736-749.

[103] ALVAREZ M J, SUBRAMANIAM P S, TANG L H, et al. A precision oncology approach to the pharmacological targeting of mechanistic dependencies in neuroendocrine tumors[J]. Nat Genet, 2018, 50(7): 979-989.

[104] GONG L, YAN Q, ZHANG Y, et al. Cancer cell reprogramming: a promising therapy converting malignancy to benignity[J]. Cancer Commun (Lond), 2019, 39(1): 48.

[105] MIURA K, MINETA H, YOKOTA N, et al. Olfactory neuroblastoma with epithelial and endocrine differentiation transformed into ganglioneuroma after chemo-radiotherapy[J]. Pathol Int, 2001, 51(12): 942-947.

[106] KESLER K A, PATEL J B, KRUTER L E, et al. The "growing teratoma syndrome" in primary mediastinal nonseminomatous germ cell tumors: criteria based on current practice[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 144(2): 438-443.

[107] GHAOUTI M, ROQUET L, FAZZALARI L, et al. "Growing teratoma syndrome": an unrecognized complication of treated germ cell tumors of the testis[J]. Ann Pathol, 2013, 33(6): 402-405.

[108] GLASS T, COCHRANE D D, RASSEKH S R, et al. Growing teratoma syndrome in intracranial non-germinomatous germ cell tumors (iNGGCTs): a risk for secondary malignant transformation-a report of two cases[J]. Childs Nerv Syst, 2014, 30(5): 953-957.

[收稿日期] 2020-11-20