

自噬与脑卒中的研究进展

叶樱泽 熊晓星(综述) 古丽娟(审校)

【中图分类号】 R743.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2018)03-0326-04
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2018.03.024

自噬是指真核细胞内的自噬体将胞内变形、衰老或损伤的细胞器和生物大分子包裹转运至溶酶体腔中消化降解的过程,是维持细胞内环境稳态和细胞周期的一条重要代谢途径。自噬的正常完成是真核细胞维持自稳状态的基础,自噬的缺陷或过度激活会导致机体许多疾病的发生。最新研究发现,在神经系统疾病中自噬的过度激活可促进神经元损伤。脑卒中是由于脑血管阻塞(缺血性脑卒中)或破裂(出血性脑卒中)引起的脑局部血液循环障碍和脑组织结构功能紊乱的一类疾病,其可导致严重的认知、运动、感觉等功能异常,甚至出现较高的致残率和致死率。相关报道,在发生脑卒中的病理条件下自噬过度激活、不足或缺陷均可促进细胞死亡^[1-2]。

自噬是真核细胞维持内环境稳态的重要机制,它能否正常完成是机体内多种生理和病理过程的基础,同时它与许多疾病的发病及预后密切相关。缺血性脑卒中作为一种导致人类较高致残率和病死率的疾病,其发病机制尚不完全明确,而自噬在脑卒中中可能会过度激活或抑制,与脑缺血后细胞死亡信号通路的激活以及炎症反应等有关。本研究就自噬在缺血性脑卒中中的作用进展作一综述。

1 自噬

1.1 自噬的概念、成分及形成过程

自噬是指维持真核细胞内环境稳态的一条重要途径。在正常生理条件下自噬保持在基本水平,对机体有保护作用,但在多种应激条件下如饥饿、缺氧、线粒体损伤、炎症反应和病原体感染等^[3]均可诱导自噬过度激活,从而损伤组织细胞。在自噬的整个过程都由自噬基因(autophagy-related gene, Atg)编码的自噬相关蛋白调控。迄今为止,已有 Atg1-34 共 34 个自噬基因被成功克隆,任何一种 Atg 的缺失或突变都会导致自噬异常或者无法发生^[4]。

细胞自噬的经典形成过程包括起始、前自噬体(pre-autophagosomal structures, PAS)形成、延伸闭合、成熟、自噬溶酶体形成和降解等几个步骤^[5]。细胞受到外界应激条件的刺激后自噬在起始信号的调控下被激活,细胞质内形成 1 个双层膜杯状结构的 PAS;在自噬相关蛋白的调节下 PAS 不

断延伸包裹形成的球状自噬体与溶酶体融合后形成自噬溶酶体,并在溶酶体内的水解酶作用下将其包裹的内容物消化降解成氨基酸或多肽等物质重复利用维持内环境的稳态。此外,自噬溶酶体将底物降解完成后从顶端伸出 1 个管状结构,断裂后形成原溶酶体,接受新的溶酶体水解酶,逐渐形成成熟的溶酶体,完成溶酶体再生。近年来研究发现,自噬对受损的细胞器或蛋白质进行识别并可选择性地包裹和清除^[6-7]。

1.2 自噬的信号调控

自噬的精准调控对细胞应对外界环境的刺激至关重要,多种信号分子在自噬的形成过程中发挥调控作用,主要包括哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、Beclin-1、AMP 依赖的蛋白激酶(adenosine5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)、p53、Rab7 等信号转导通路。

1.2.1 mTOR 途径调控的自噬

mTOR 是一种在进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,通常以两种复合体的形式存在:mTOR 复合物 1 (mTORC1)和 mTOR 复合物 2(mTORC2)。前者主要参与调节细胞生长、细胞周期进程和细胞程序性凋亡等,而后者在细胞骨架蛋白的构建和细胞存活中发挥重要作用。mTOR 还可感受细胞内多种信号分子的变化,是自噬启动阶段的关键调节因子,常通过抑制 Atg1/ULK1 蛋白酶复合物的磷酸化状态,从而抑制自噬的发生^[8]。

1.2.2 Beclin1 途径调控自噬

Beclin1 蛋白作为另 1 个自噬相关蛋白,主要在起始阶段发挥重要作用,在自噬启动时它与 VPS34、Atg14 蛋白形成三聚体后不断地招募自噬相关蛋白推动自噬的进行。Beclin1 与下游自噬相关因子结合形成复合物后可正向或负向调控自噬水平,但具体的功能机制尚未完全清楚。通常认为 Beclin1 与 Bcl-2、VPS34 等因子结合形成的复合物最常见^[9]。Bcl-2 是一种常见的凋亡抑制因子,与 Beclin1 结合形成复合物,促使 Beclin1 从 p150/VPS34 复合体中解离出来,抑制 Beclin1 依赖的自噬通路,负向调控自噬水平。Liu 等^[10]研究发现,死亡相关蛋白激酶能通过 Bcl-2 竞争结合位点,促进细胞自噬,而 VPS34 作为细胞自噬的激活因子,与 Beclin1 结合后形成的复合物可正向调控 Beclin1 信号通道,上调细胞自噬水平^[11]。

1.2.3 其他相关途径调控的自噬

AMPK 作为调节细胞代谢的一种蛋白激酶,在缺血缺氧等应激条件下被激活后可参与自噬的发生,主要通过

基金项目:国家自然科学基金面上资助项目(81771283);国家自然科学基金面上资助项目(81571147)

作者单位:430060 武汉大学人民医院中心实验室[叶樱泽 古丽娟(通信作者)],神经外科(熊晓星)

AMPK-磷酸化结节硬化症复合物 2 (tuberous sclerosis complex, TSC2)/mTOR 调节相关蛋白- mTORC1 等两条通路使 mTOR 活性被抑制,从而诱导细胞自噬的发生^[12]。

作为“分子警察”的 p53,虽是目前人类发现的与肿瘤发生相关性最高的抑癌基因,但近年研究发现 p53 对自噬具有调节作用, Gauster 等^[13]研究发现通过药物抑制 p53 活性能使机体细胞自噬水平升高。

Rab7 是 GTP 酶超家族的成员之一,主要在自噬形成的后期即自噬体的成熟阶段起决定性作用, Zhan 等^[14]研究发现同型融合及液泡蛋白分选复合物与 Rab7-GTPase 可相互调控,并在自噬体与溶酶体膜融合期间调节 Rab7 的活性状态,从而影响自噬体的成熟和溶酶体的形成,维持溶酶体的功能,催化自噬泡与溶酶体融合。

2 缺血性脑卒中与自噬

缺血性脑卒中是由于局部供血中断造成该血管供应区的脑组织缺血缺氧所致的一类疾病,可导致一系列严重的病理生理变化,不仅包括神经元不可逆损伤,还可引发神经元自我修复。除了细胞凋亡、坏死这两种主要的方式,自噬也参与其中,但其具体机制尚未完全清楚。

2.1 自噬在缺血性脑卒中中的激活和调控机制

2.1.1 自噬在缺血性脑卒中中的激活

神经元作为体内一种特殊的细胞类型,对糖原的储存极少,所以正常情况下它的自噬水平较低,自噬体的生物合成也较少,但在发生缺血性脑卒中或脑缺血再灌注损伤时中枢神经系统的自噬就可能被激活。1995 年 Nitatori 等^[15]首次在沙土鼠短暂性脑缺血模型内用电子显微镜观察到海马 CA1 区细胞的自噬体,发现自噬被活化后不断有学者对自噬在脑缺血中的激活与调控机制进行进一步研究。2009 年 Puyal 等^[16]在小鼠短暂性局灶性脑缺血模型中发现神经元的溶酶体和自噬泡活性增强。2015 年 Youle 等^[17]在研究脑缺血后自噬水平的变化时发现缺血能激活自噬。

2.1.2 自噬在缺血性脑卒中中的调控机制及相关信号通路

当发生脑部血管局部中断后周围的细胞缺血缺氧,自噬被激活,但调节脑缺血中自噬活化的信号通路非常复杂,主要包括Ⅲ型 PI3K-蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB, Akt)-mTOR、AMPK-mTOR、Beclin1-Bcl-2 复合物、活性氧 (reactive oxygen species, ROS)-线粒体自噬、UVRAG-VPS16-Rab7、缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) 等信号通路。

在发生缺血性脑卒中时脑部血管局部中断,神经元的糖代谢途径供能减少,糖异生增多导致氨基酸减少,最终出现生长因子生成减少,后者可通过Ⅲ型 PI3K-Akt-mTOR 途径诱导细胞自噬^[18]。Ⅲ型 PI3K-Akt 在静息状态下普遍存在于细胞质内,但细胞受到生长因子的刺激后就被激活聚集到细胞膜上,激活下游 Akt 磷酸化,后者可磷酸化 TSC2,减弱对小 G 蛋白 Rheb (Ras homolog enriched in brain) 的抑制作用。小 G 蛋白 Rheb 活化后可激活 mTORC1 信号通道,负向调控自噬的激活。所以,在脑缺血时 PI-3K/Akt-mTOR 途径的激活对自噬起到负向调控作用^[19]。

Bcl-2 蛋白家族作为凋亡抑制因子,是缺血性脑卒中后神经元凋亡的重要调控器,包括破坏线粒体膜电位和促进细胞色素 C 释放的促凋亡蛋白 (Bax, Bcl-XS, Bak, Bid 和 Bad) 及与之功能相反的抗凋亡蛋白 (Bcl-2 和 Bcl-XL)。在发生脑缺血时细胞内营养物质缺乏, Bcl-2 通过结合 Beclin-1 形成复合物,抑制 Beclin1 依赖的自噬通路,减少自噬的发生,从而减少缺血缺氧导致的细胞死亡及脑组织损伤^[19-20]。

在细胞发生缺血缺氧时 HIF-1 被激活后参与自噬的形成^[21]。HIF-1 由诱导型 α 亚基和组成型 β 亚基两部分组成。缺氧时细胞内的泛素化被抑制,诱导 α 亚基堆积和 β 亚基发生二聚化,形成更多的 HIF-1, HIF-1 可以激活和转录细胞内多种缺氧反应基因,如促红细胞生成素、血管内皮生长因子、葡萄糖转运蛋白 1、 α -腺病毒 E1B 及 Bcl-2 相互作用蛋白 3 (Bcl-2/adenovirus e1binteracting protein 3, BNIP3) 等。其中 BNIP3 可以通过与 beclin-1 竞争结合 Bcl-2 而诱导自噬发生^[22]。同时, HIF-1 的激活也可以促进线粒体 BNIP/BNIP3L 的表达增多,后者与 Beclin1 竞争结合 Bcl-2/Bcl-XL,导致游离的 Beclin1 增多,后者与多种蛋白结合形成磷脂酰肌醇 3 激酶复合体,调节自噬蛋白在自噬前体结构中的定位,诱导自噬^[23]。

在细胞发生严重的缺血缺氧时线粒体的功能或结构可能受到损伤,能量供应减少而促进 AMPK 磷酸化,通过 AMPK-mTORC1 通路来促进自噬的发生^[24]。神经细胞线粒体功能损伤后胞内 ROS 急剧增多^[25],可通过两条途径调控自噬:(1)氧化半胱氨酸残基的催化位点激活 ATG4 的蛋白水解活性,调控自噬的形成;(2)使线粒体氧化损伤,发生功能障碍和结构损伤,诱导发生线粒体自噬。同时线粒体结构损伤后胞质内的 Ca^{2+} 浓度升高,导致 AMP/ATP 比值增加,进而激活 AMPK-TSC2-mTORC1 的途径来进一步调控细胞自噬水平。

2.2 自噬在缺血性脑卒中中的双重作用

尽管有明确的研究证明自噬在缺血缺氧后被激活,但其病理变化过程仍然存在着很多争议。大量的研究证实,自噬通过促进损伤蛋白质和细胞器的清除而在缺血性脑卒中中发挥神经保护作用,从而有利于能量的循环利用和细胞防御。但是,这些研究结果却难以解释脑细胞死亡的上升指数与自噬活动的增强成正比的现象,这就引发了在脑卒中时自噬的激活是否最终导致病理改善或恶化等问题。

诸多研究发现,自噬在缺血引起的神经元死亡中具有保护作用,但机制仍不清楚,其可能通过降解坏死或损伤的神经突触为神经元提供能量,也可能通过降解细胞中的耗能产物以维持细胞内离子平衡,从而延迟神经元死亡。Chauhan 等^[26]亦观察到腹腔注射雷帕霉素后减小大鼠局灶性脑缺血后的梗死体积,提示自噬对缺血性脑卒中中具有保护作用。

然而,也有研究发现过度激活的自噬可以加重脑损伤,抑制自噬有利于局灶性脑缺血再灌注后神经组织损伤的恢复。Wang 等^[27]研究发现在严重脑缺血的大鼠中用自噬抑制剂 3-甲基腺苷 (3-methyladenine, 3-MA) 抑制自噬,可阻止海马 CA1 区神经元发生程序性死亡,从而有助于保护神经元,提示自噬对缺血脑组织具有损伤作用。Gong 等^[28]人将

自噬基因 Atg7 缺失和正常新生鼠的脑永久性缺血模型对比后发现 Atg7 缺失能更有效地减少神经元的自噬性死亡,减轻脑损伤,表明抑制自噬具有脑保护效应。

3 出血性脑卒中与自噬

出血性脑卒中是由于脑部血管结构异常或非外伤性血管破裂所导致的一类疾病,主要包括脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)及蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)两种类型。与缺血性脑卒中比较,出血性脑卒中占的比例较小,对它的研究也相对较少。尽管已经证实自噬在许多疾病的发生中起到重要作用,但在出血性脑卒中中的确切影响和作用尚未完全清楚。近年来有研究发现自噬在出血性脑卒中后细胞的病理生理变化过程中也发挥了重要作用。Kong 等^[29]研究发现,脑出血后自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 表达水平显著上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下调,Beclin1/Bcl-2 比值增大,说明脑出血可以激活自噬。Sarkar 等^[30]研究发现,在中枢神经系统发生急性损伤时脑白质内活化的小胶质细胞中自噬体增多。Chen 等^[31]用雷帕霉素处理脑出血小鼠模型后小胶质细胞的激活被抑制,TNF- α 表达下降,表明自噬可能抑制小胶质细胞的炎症反应,发挥神经保护作用。因此,研究发生出血性脑卒中后机体对于自噬的调节机制,并通过调节自噬干预脑出血引起的细胞死亡,可能会成为治疗出血性脑卒中患者有效的辅助方法。

4 展望

脑卒中作为发病率和致残率较高的一类疾病,可导致严重的认知、运动和感觉功能障碍。自噬在两种不同类型的脑卒中的作用机制不同,其结果也不尽相同。自噬在脑卒中中到底是扮演损伤还是保护的角色,取决于细胞内外的应激程度及细胞自噬的内部反应机制,并且很可能在脑卒中整个进程的不同时段发挥不同效应。因此,通过不同空间、时间动态观察以及从多方面、多层次、多角度研究脑卒中后自噬的发生发展过程,探索自噬调节的信号通路及分子机制,了解自噬在脑卒中不同情况下发挥的相应作用,有助于为以自噬激动或抑制剂调控自噬为靶点防治脑卒中开辟新思路,也为今后能以不同类型脑卒中、不同个体、不同时间进程等个性化精准治疗脑卒中提供可行性。

参 考 文 献

- [1] Gwon DH, Hwang TW, Ro JY, et al. High endogenous accumulation of ω -3 polyunsaturated fatty acids protect against Ischemia-Reperfusion renal injury through AMPK-Mediated autophagy in Fat-1 mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10):2081.
- [2] Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, et al. The impact of autophagy on cardiovascular senescence and diseases[J]. *Int Heart J*, 2017, 58(5):666-673.
- [3] Zhang D, Qiu W, Wang P, et al. Autophagy can alleviate severe burn-induced damage to the intestinal tract in mice[J]. *Surgery*, 2017, 162(2):408-417.
- [4] Yang L, Wang H, Shen Q, et al. Long non-coding RNAs involved in autophagy regulation[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8

- (10):e3073.
- [5] Yang Z, Zeng B, Pan Y, et al. Autophagy participates in isoliquritigenin-induced melanin degradation in human epidermal keratinocytes through PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 97(1):248-254.
- [6] Banerjee R, Beal MF, Thomas B. Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles and therapeutic implications[J]. *Trends Neurosci*, 2010, 33(12):541-549.
- [7] Xie Y, Kang R, Sun X, et al. Posttranslational modification of autophagy-related proteins in macroautophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(1):28-45.
- [8] Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1):25-32.
- [9] Dong X, Zhang J, Zhou Z, et al. Maslinic acid promotes autophagy by disrupting the interaction between Bcl2 and Beclin1 in rat pheochromocytoma PC12 cells[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43):74527-74538.
- [10] Liu K, Ren T, Huang Y, et al. Apatinib promotes autophagy and apoptosis through VEGFR2/STAT3/BCL-2 signaling in osteosarcoma[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8):e3015.
- [11] Chen W, Sun Y, Liu K, et al. Autophagy: a double-edged sword for neuronal survival after cerebral ischemia[J]. *Neural Regeneration Research*, 2014, 9(12):1210-1216.
- [12] Kim SH, Park S, Yu HS, et al. The antipsychotic agent clozapine induces autophagy via the AMPK-ULK1-Beclin1 signaling pathway in the rat frontal cortex[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2018, 81(1):96-104.
- [13] Gauster M, Maninger S, Siwetz M, et al. Downregulation of p53 drives autophagy during human trophoblast differentiation[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 21(3):100-102.
- [14] Zhan L, Chen S, Li K, et al. Autophagosome maturation mediated by Rab7 contributes to neuroprotection of hypoxic preconditioning against global cerebral ischemia in rats[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(7):e2949.
- [15] Nitatori T, Sato N, Waguri S, et al. Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil hippocampus following transient ischemia is apoptosis[J]. *J Neurosci*, 1995, 15(2):1001-1011.
- [16] Puyal J, Vaslin A, Mottier V, et al. Posts ischemic treatment of neonatal cerebral ischemia should target autophagy[J]. *Ann Neurol*, 2009, 66(3):378-389.
- [17] Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy[J]. *Nature*, 2015, 524(7565):309.
- [18] Button RW, Vincent JH, Strang CJ, et al. Dual PI-3 kinase/mTOR inhibition impairs autophagy flux and induces cell death Independent of apoptosis and necroptosis[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5):5157-5175.
- [19] Xu F, Li J, Ni W, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonist 15d-prostaglandin J2 mediates neuronal autophagy after cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1):e55080.
- [20] Hombach-Klonisch S, Mehrpour M, Shojaei S, et al. Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response[J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 10(1):17.

(上接第 328 页)

- [21] Su P, Zhang J, Wang D, et al. The role of autophagy in modulation of neuroinflammation in microglia[J]. *Neuroscience*, 2016, 319(1): 155-167.
- [22] Zhou J, Yao W, Li C, et al. Administration of follicle-stimulating hormone induces autophagy via upregulation of HIF-1 α in mouse granulosa cells[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e3001.
- [23] Zhang J, Ney PA. Mechanisms and biology of B-cell leukemia/lymphoma 2/adenovirus E1B interacting protein 3 and Nip-like protein X[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(10): 1959-1969.
- [24] Zha Z, Wang J, Li S, et al. Pitavastatin attenuates AGEs-induced mitophagy via inhibition of ROS Generation in the mitochondria of cardiomyocytes[J]. *J Biomed Res*, 2017, 11(1): 56-58.
- [25] Singh MP, Kang SC. Endoplasmic reticulum stress-mediated autophagy activation attenuates fumonisin B1 induced hepatotoxicity in vitro and in vivo[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 110(10): 371-382.
- [26] Chauhan A, Sharma U, Jagannathan NR, et al. Rapamycin protects against middle cerebral artery occlusion induced focal cerebral ischemia in rats[J]. *Behav Brain Res*, 2011, 225(2): 603-609.
- [27] Wang JY, Xia Q, Chu KT, et al. Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons in rat is prevented by 3-methyladenine: a widely used inhibitor of autophagy[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70(4): 314-322.
- [28] Gong C, Hu C, Gu F, et al. Co-delivery of autophagy inhibitor ATG7 siRNA and docetaxel for breast cancer treatment[J]. *J Control Release*, 2017, 266(7): 272-286.
- [29] Kong HJ, Moon JY, Nam BH, et al. Molecular characterization of the autophagy-related gene Beclin-1 from the olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2011, 31(2): 189-195.
- [30] Liu S, Sarkar C, Dinizo M, et al. Disrupted autophagy after spinal cord injury is associated with ER stress and neuronal cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(5): e1582.
- [31] Chen HC, Fong TH, Hsu PW, et al. Multifaceted effects of rapamycin on functional recovery after spinal cord injury in rats through autophagy promotion, anti-inflammation, and neuroprotection[J]. *J Surg Res*, 2013, 179(1): e203-e210.

(2017-11-07 收稿)