

自噬与程序性坏死的交叉联系在脑缺血/再灌注中的研究进展

周莹莹 马领松 胡文杰 储照虎 金凡夫 黄四妹 徐阳

【中图分类号】 R743.3 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2021)04-0455-04
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2021.04.017

脑缺血/再灌注(Cerebral ischemia/reperfusion, I/R)的损伤机制有炎症、自噬、凋亡及程序性坏死。已有研究表明,海马 CA1 区神经元死亡方式是由受体相互作用蛋白激酶 1 (Receptor interacting protein kinase 1, RIP1)和 RIP3 调控的程序性细胞死亡。RIP3 的底物分子是混合谱系激酶结构域样蛋白(Mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL),而且此信号通路激发线粒体通透性过渡孔(Mitochondrial permeability transition pore, mPTP)通道的开放。自噬是一种高度保守的“自食”过程,降解异常蛋白质和受损细胞器以维持细胞稳态,且低水平自噬发生在大多数正常细胞中以更新细胞质及蛋白成分。自噬可与其他细胞死亡方式的信号通路发生极其复杂的交叉联系,从而决定机体内外损伤后的细胞结局。程序性细胞死亡已被证明可促进自噬的激活,亲环蛋白 D(Cyclophilin D, CypD)作为 mPTP 的调节剂,对程序性细胞死亡、自噬及细胞凋亡的通路进程均有一定的影响。本研究对自噬及程序性坏死的信号交叉通路在脑缺血再灌注损伤中的研究进展进行阐述,程序性坏死与自噬的各种分子机制及其复杂的交叉通路可能为脑缺血再灌注损伤提供可靠的治疗靶点。

1 概述

程序性坏死作为一种可调控的细胞死亡方式,其信号通路不依赖半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(Cysteine containing aspartate-specific proteases, Caspase),而涉及由 RIP1-RIP3-MLKL 坏死体参与的一系列特殊级联转导通路。程序性坏死通过各种复杂的信号通路来促进自噬的发生,而自噬同样也参与程序性坏死的分子通路,自噬是“自我吞噬”的细胞分解代谢过程,在各种应激情况下激活如营养缺乏、能量损失。当前已有研究表明在依赖程序性坏死机制的脑 I/R 损伤模型中有自噬相关蛋白如轻链 3-II (Light chain 3-II, LC3-II)、细胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)的高表达。因此,程序性坏死和自噬的信号通路之间可能存在复杂的交叉联系,从而影响脑 I/R 损伤的结局及预后。

基金项目:国家自然科学基金青年项目(81701161)

作者单位:241000 芜湖市,皖南医学院研究生学院(周莹莹 胡文杰 金凡夫 黄四妹);皖南医学院第一附属医院神经内科[马领松(通信作者) 储照虎 徐阳(通信作者)]

2 程序性坏死与脑 I/R 损伤

2.1 程序性坏死的信号通路

程序性坏死是可调控的细胞坏死形式,目前熟知的是由肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis receptor α , TNF α) 诱导发生,并与凋亡有着相似的信号通路^[1]。简要列述其分子通路为包含肿瘤坏死因子受体 1 (Tumor necrosis receptor 1, TNFR1) 相关死亡结构域 (Associated death domain, TRADD), TNFR1 相关因子 2 (TNFR1-related factor2, TRAF2) 及 RIP1 的复合体 I 形成。含有 RIP1, TRADD, 自杀相关因子 (Factor associated suicide, Fas) 相关的死亡结构域 (Fas-associated death domain, FADD) 和 Caspase-8 的复合体 II 形成。磷酸化的 RIP1 和 RIP3 相互结合后磷酸化 MLKL, 启动程序性坏死^[2]。磷酸甘油酸变位酶家族成员 5 (Phosphoglycerate mutase family member 5, PGAM5) 的两种形式, PGAM5S 和 PGAM5L 均参与内在程序性坏死的发生^[3]。有研究证实 RIP1 的下游分子也包含 ERK, 在与 RIP1 结合后被激活^[4]。RIP3 可激活代谢酶糖原磷酸化酶 (Metabolic enzymes glycogen phosphorylase, PYGL)、谷氨酸脱氢酶 1 (Glutamate dehydrogenase 1, GLUD1) 及谷氨酸氨连接酶 (Glutamate-ammonia ligase, GLUL), 且此机制促进活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的产生, 大量产生的 ROS 促进细胞程序性坏死的发生^[5-6]。

2.2 程序性坏死在脑 I/R 损伤中的机制

在全世界范围内脑缺血性疾病是导致成年人高致病率、致残率和病死率的主要原因之一,而且目前针对脑缺血性疾病的治疗成效极低^[7-8]。在梗死区的脑血管恢复血流灌注后脑组织的损伤程度反而进一步加重,这种情况称为继发性损伤或脑 I/R 损伤^[9]。Vieira 等研究指出海马 CA1 区是脑组织缺血损伤后较为敏感的组织,通过建立原代海马神经元糖剥夺 (Oxygen-glucose deprivation, OGD) 模型及鼠全脑缺血模型发现全脑缺血后 RIP3 的表达水平升高,表明其细胞死亡机制涉及程序性坏死^[10]。Font-Belmonte 等研究证实,脑 I/R 损伤后的海马 CA1 区 TNFR1 蛋白的表达水平呈时间依赖性的显著上调,在脑缺血性损伤刺激后的脑皮质及海马区,磷酸化的 RIP1 和 MLKL 蛋白均高表达^[11]。在脑缺血再灌注阶段程序性坏死相关蛋白 RIP1 和 RIP3 的表达水平均明显增高^[12]。RIP1 和 RIP3 在全脑 I/R 损伤后的海马 CA1 区发挥着同样重要的作用,细胞质中 RIP3 的表达水平上调并发生核移位^[13]。RIP3 与凋亡诱导因子 (Apoptosis-inducing factor, AIF) 结合后移位至细胞核中,诱导程序性坏

死的另一信号通路即线粒体信号通路,进而降解 DNA^[14]。目前的多项研究证实程序性坏死在脑 I/R 损伤后的激活极为普遍,且其通路中也存在着与 TNF α 诱导的程序性坏死信号通路中相一致的分子。

3 自噬与 I/R 损伤

3.1 自噬的激活

自噬分为 3 大类:微自噬、巨自噬、分子伴侣介导的自噬^[15],接下来主要阐述的是巨自噬的激活。自噬过程涉及 3 个主要的步骤:自噬诱导、自噬体-溶酶体融合以及自噬货物降解。Unc-51 样激酶 1(Unc51-like kinase 1,ULK1)、自噬相关基因 13(Autophagy related 13 gene,Atg13)和 200 kDa 的黏着斑激酶家族相互作用蛋白[Focal adhesion kinase (FAK) family interacting protein of 200 kDa,FIP200]形成的 ULK1 蛋白激酶复合体诱导巨自噬的发生^[16]。自噬诱导发生及吞噬泡形成后的下一个机制是成核,由 Beclin1、液泡蛋白分选 34(Vacuolar protein sorting,Vps34)及 Vps15 形成的 III 型磷脂酰肌醇 3 磷酸激酶(The class III phosphatidylinositol 3-kinase,PI3kIII)复合体参与成核及吞噬泡膜的早期聚集。在吞噬泡膜成核后,其延伸和扩展由 Atg12-Atg5-Atg16 复合体及 Atg8/LC3 负责,LC3-PE 结合体(LC3-II)被广泛用作自噬激活的分子标记物^[17]。吞噬泡膜成熟后形成的自噬体与溶酶体结合形成自噬溶酶体。溶酶体酸性水解酶如组织蛋白酶 B,D,L 负责降解自噬溶酶体中的整合货物,降解后所形成的小分子可回收利用以维持细胞稳态^[18]。

3.2 自噬在脑 I/R 损伤中的作用

脑 I/R 损伤中的自噬信号通路也极其复杂,并与程序性坏死发生极其复杂的交叉联系并影响脑损伤程度。Su 等建立了鼠大脑中动脉短暂闭塞(Middle cerebral artery occlusion,MCAO)模型,发现自噬相关分子蛋白 LC3 II,组织蛋白酶 B 及 Beclin1 在脑缺血 24 h 再灌注后表达水平上升^[19]。Zhang 等建立野生型小鼠的脑 I/R 损伤模型,检测发现 Beclin1,及 LC3 II 的表达水平增高,雷帕霉素靶位激酶(Target of rapamycin,mTOR)-S6KP70 信号通路与自噬的激活呈负性相关,且在 I/R 损伤后显著下调^[20]。

脑 I/R 损伤后自噬机制的激活较普遍,然而自噬在神经元死亡过程中发挥有利或不利作用取决于损伤阶段和自噬程度。现有多项证据表明脑 I/R 损伤后自噬的激活具有神经元保护及损伤的双重作用。Cui 等研究指出提前注射可抑制自噬相关蛋白 LC3-II 和 Beclin1 的异丙酚后能够减轻脑缺血损伤程度并增加神经元存活数量^[21]。Zhang 等的研究发现在氧糖剥夺再灌注的原代培养神经元模型及 MCAO 再灌注后的大鼠模型中均有自噬机制的发生。对这 2 个模型应用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3MA)和巴弗洛霉素 A1(Bafilomycin A1,BafA1)后与对照组比较,其细胞活力更为减弱,且脑组织梗死面积也进一步增加,这表明自噬的激活在脑缺血后的再灌注阶段发挥保护性作用,然而在氧糖剥夺的原代培养神经元模型及 MCAO 的大鼠模型中应用这两种自噬抑制剂表现出相反的结果,说明自噬的激

活在脑缺血期发挥损伤性作用^[22]。总而言之,自噬发生在脑损伤的不同阶段发挥着不同的作用。脑 I/R 损伤后中等程度的自噬可挽救受损细胞,而过度激活的自噬会促进细胞死亡。

4 自噬和程序性坏死与脑 I/R 损伤

4.1 自噬与程序性坏死的交叉分子

LC3 作为自噬体数量的特殊标记分子,可与程序性坏死通路中的 RIP3 及 MLKL 分子发生交叉联系。Goodall 等发现自噬机制可调节程序性坏死的激活,RIP1 募集 Atg5 后与 MLKL 形成 RIP1-MLKL-Atg5 复合体。在抑制 Atg5 后 RIP1 与 MLKL 的结合受到抑制,由此表明 Atg5 对坏死体的形成具有一定的调节作用^[23]。位于自噬体形成位点上的 P62/SQSTM1 作为自噬特异性底物,与 LC3-II 和 Atg5 没有任何交叉联系。然而 P62 的自我寡聚化及其上的 PB1 区域对于自噬体形成位点的定位至关重要,并负责自噬体的形成及受损蛋白质的降解^[24]。B 细胞淋巴瘤 2(B-cell lymphoma/leukemia-2,BCL2)与 Beclin1 结构域结合后抑制自噬激活,且负向调节吞噬泡膜的形成^[25]。抑癌基因 p53 对自噬和程序性坏死的调节过程也起到一定的作用,p53 通过胞质定位以 AMPK/mTOR 所依赖的通路负向调控自噬;也可通过阻碍 Beclin1 与 Bcl-2-Bcl-xl 复合体的结合来抑制 Bcl-2-Bcl-xl 的转录,从而抑制自噬过程^[26]。除此之外,P53 可以调控 mPTP 打开的方式来影响程序性坏死的信号通路,p53 聚集于线粒体基质后与亲环素 CypD 相结合,此复合体诱导 mPTP 的打开,从而激活程序性坏死,并使线粒体肿胀^[27]。P53 在自噬及程序性坏死的通路进程中均发挥一定的调控作用,表明 p53 是自噬和程序性坏死的交叉可调控分子。

ERK,c-Jun N 末端激酶(C-Jun N-terminal kinases,JNK)及 p38 均是丝裂原激活的蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinases,MAPKs)家族成员。ERK 的表达对程序性坏死性细胞死亡具有重要调节作用,RIP1 可通过活化 ERK 来抑制基础自噬的激活。活化的 ERK 通过下调转录因子 EB(Transcription factor EB,TFEB)上的丝氨酸位点 12 而抑制其激活,低 RIP1 表达水平不仅可促进自噬体的形成,还激活 TFEB 介导的转录及 ERK 的磷酸化^[28]。Zhang 等发现程序性坏死抑制剂 Nec-1 可抑制 ERK 的激活,并保护海马神经元免受谷氨酸诱导的程序性坏死^[4]。JNK 通过募集 RIP1 来促进程序性坏死机制的发生,JNK 的高表达对 RIP3 寡聚化和 MLKL 磷酸化至关重要,且 JNK 的缺失不利于 TNF- α 所诱导的程序性坏死的发生。与此同时,JNK 通过磷酸化 Bcl-2 上的 T69,S70,S87A 这 3 个位点参与自噬信号通路,这一参与方式使得 Beclin-1 与 Bcl-2 发生解离,从而抑制自噬激活^[29]。程序性坏死和自噬之间的信号交叉通路极其复杂,但与此相关的研究较少,所以还需进一步探究两者之间的交叉分子。

4.2 自噬与程序性坏死在脑 I/R 损伤中的交叉联系

如上所述,脑 I/R 损伤后细胞自噬及程序性坏死机制的激活均较为常见,当前越来越多的研究更倾向于探索脑 I/R 损伤过程中这两种机制之间复杂的交叉联系。脑 I/R 损伤

后程序性坏死可产生损伤关联分子模式 (Damage-associated molecular patterns, DAMPs), 引起明显的炎症反应^[1]。脑 I/R 损伤所激活的炎症小体影响损伤的进展。在氧化应激的情况下自噬的激活负责形成炎症小体, 尽管所形成的炎症小体抑制自噬的进展^[30-31]。Li 等研究指出脑 I/R 损伤后促进了 ROS 的产生、程序性坏死的激活及颗粒蛋白前体的低表达, 在抑制颗粒蛋白前体的损伤模型中 ROS 的产生有所增加, 尽管这一作用可以被 RIP1 低表达水平及程序性坏死拮抗剂 Nec-1 所减弱^[32]。Wang 等发现脑 I/R 损伤后氧化应激这一机制的发生, 且这一机制不仅促进自噬相关蛋白的表达, 还参与到自噬抑制剂对自噬发生的抑制^[33]。以上各种机制表明, 程序性坏死和自噬之间存在一定的调节作用。

内质网应激在脑 I/R 损伤机制中具有双向作用, 即内质网应激在脑缺血后的短时间内发挥保护性作用, 而在长时间的缺血性脑损伤中却转变为破坏性作用^[34]。Font-Belmonte 等研究指出全脑缺血后应用内质网应激抑制剂 Salubrinal 可降低程序性坏死相关分子的表达水平, MLKL 磷酸化及 TNFR1 蛋白的增加^[11]。Gao 等发现脑缺血后的内质网应激机制所诱导的自噬可减轻脑损伤程度^[35]。以上各种研究表明脑损伤后一些细胞损伤机制如炎症、氧化应激、内质网应激可与程序性坏死及自噬发生各种交叉调节作用, 从而影响脑损伤结局。

4.3 自噬与程序性坏死在脑 I/R 损伤中的调节机制

脑 I/R 损伤发生后自噬与程序性坏死机制所发挥的各种作用决定了脑损伤程度。Degterev 等的研究表明脑缺血后应用 Nec-1 能抑制自噬相关蛋白 LC3-II 的过表达及自噬体的形成^[36]。Nec-1 和自噬抑制剂的联合应用对于依赖程序性坏死机制的细胞死亡发挥出更好的保护作用, 这意味着坏死体及自噬体形成过程存在复杂的分子交叉联系, 故可推测自噬和程序性坏死激活之间存在重要的交叉调节作用。全脑 I/R 损伤后海马 CA1 区的 RIP3 高表达, 并从细胞质移位至细胞核内, Nec-1 通过抑制 RIP3 的激活及 RIP1-RIP3 的结合来减慢海马神经元的死亡速度。Nec-1 在脑 I/R 损伤中所表现出来的保护性作用可减轻学习、记忆及行为的受损程度^[37]。脑 I/R 损伤前预处理 Nec-1 可逆转 CA1 区神经元中 RIP3 的变化, 以抑制程序性坏死。在脑缺血后再灌注阶段组织蛋白酶 B 显著高表达, 且从溶酶体中大量释放至细胞核及细胞质中, 这一现象同样可在预处理 Nec-1 后被抑制^[13]。

目前对调控程序性坏死和自噬之间复杂的信号交叉通路仍存在大量的争议, 某些自噬抑制剂对程序性坏死的激活具有一定调节作用, 环孢菌素 A (Cyclosporine-A, CsA) 在脑 I/R 损伤中通过降低 CypD 的 PPI 酶活性来阻碍 mPTP 开放, 以发挥神经元保护效应。脑 I/R 损伤前预处理 CsA 可抑制 RIP1 及 RIP3 的表达, RIP3 下游的酶如 GLUL 和 GLUD1 的表达水平也下降, 而且自噬相关蛋白 Beclin1 表达水平及 LC3 II / LC3 I 比例均有所降低^[38]。Wang 等研究表明全脑 I/R 损伤的再灌注阶段应用自噬抑制剂 3MA 可显著抑制组织蛋白酶 B 从溶酶体移位到细胞核及细胞质中, 并对全脑 I/R 损伤后的海马 CA1 区神经元具有时间依赖性

的保护作用。此保护作用有可能涉及到程序性坏死复杂的分子机制, 从而影响神经元死亡速度^[39]。也有研究发现 3MA 可抑制全脑 I/R 损伤后 RIP3 和 AIF 的结合及 RIP3-AIF 复合体位置的改变, 且这一影响作用对 DNA 降解至关重要^[14]。Yang 等在大鼠全脑 I/R 损伤模型中发现组织蛋白酶抑制剂 CA074-me 可抑制 RIP3 过表达及核移位, 并维持溶酶体膜的完整性而发挥神经保护效应^[40]。Ryan 等研究发现在脑 I/R 损伤前预处理自噬特异性抑制剂 BafA1, RIP3 表达水平及 GLUL 活性均有所下降。因此, 在脑 I/R 损伤后调控自噬对程序性坏死的分子通路也具有一定的影响, 说明自噬和程序性坏死之间存在可调控的交叉联系^[41]。

5 结束语

本研究对脑 I/R 损伤后程序性坏死和自噬激活的机制, 及两者之间的紧密联系进行了阐述。现有多项研究明确指出脑 I/R 损伤后的细胞死亡机制有程序性坏死、自噬和凋亡, 且这些机制之间存在错综复杂的交叉网络。然而对这些机制之间的相互作用以及各种交叉分子的了解仍然有限, 故发现更多的交叉分子对于临床上治疗脑 I/R 损伤具有重要的指导意义。当前对于脑 I/R 损伤后的轻度自噬、过度自噬及程序性坏死的交叉联系的相关研究也极少, 探究程序性坏死和自噬如何调控脑 I/R 损伤后神经元受损程度对于提高临床疗效和提供治疗思路均具有重要应用价值。

参 考 文 献

- [1] Linkermann A, Green DR. Necroptosis[J]. N Engl J Med, 2014, 370(5): 455-465.
- [2] Li JX, Mcquade T, Siemer AB, et al. The RIP1/RIP3 necrosome forms a functional amyloid signaling complex required for programmed necrosis[J]. Cell, 2012, 150(2): 339-350.
- [3] Wang Z, Jiang H, Chen S, et al. The mitochondrial phosphatase PGAM5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways[J]. Cell, 2012, 148(1/2): 228-243.
- [4] Zhang M, Li J, Geng R, et al. The inhibition of ERK activation mediates the protection of necrostatin-1 on glutamate toxicity in HT-22 cells[J]. Neurotox Res, 2013, 24(1): 64-70.
- [5] Zhang DW, Shao J, Lin J, et al. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis[J]. Science, 2009, 325(5938): 332-336.
- [6] Zhang Y, Su SS, Zhao S, et al. RIP1 autophosphorylation is promoted by mitochondrial ROS and is essential for RIP3 recruitment into necrosome[J]. Nat Commun, 2017, 8:14329.
- [7] Liu L, Wang D, Wong KS, et al. Stroke and stroke care in China: huge burden, significant workload, and a National priority[J]. Stroke, 2011, 42(12): 3651-3654.
- [8] Datta A, Sarmah D, Mounica L, et al. Cell death pathways in ischemic stroke and targeted pharmacotherapy [J]. Transl Stroke Res, 2020, 11(6): 1185-1202.
- [9] Liu Q, Zhou S, Wang Y, et al. A feasible strategy for focal cerebral ischemia-reperfusion injury: remote ischemic postconditioning[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(15): 1460-1463.
- [10] Vieira M, Fernandes J, Carreto L, et al. Ischemic insults induce necroptotic cell death in hippocampal neurons through the

- up-regulation of endogenous RIP3[J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 68: 26-36.
- [11] Font-Belmonte E, Ugidos IF, Santos-Galdiano M, et al. Post-ischemic salubrin administration reduces necroptosis in a rat model of global cerebral ischemia[J]. *J Neurochem*, 2019, 151(6): 777-794.
 - [12] Tian J, Guo S, Chen H, et al. Combination of emricasan with ponatinib synergistically reduces ischemia/reperfusion injury in rat brain through simultaneous prevention of apoptosis and necroptosis[J]. *Transl Stroke Res*, 2018, 9(4): 382-392.
 - [13] Yin B, Xu Y, Wei RL, et al. Inhibition of receptor-interacting protein 3 upregulation and nuclear translocation involved in Necrostatin-1 protection against hippocampal neuronal programmed necrosis induced by ischemia/reperfusion injury[J]. *Brain Res*, 2015, 1609: 63-71.
 - [14] Xu Y, Wang J, Song X, et al. RIP3 induces ischemic neuronal DNA degradation and programmed necrosis in rat via AIF[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29362.
 - [15] Wang P, Shao BZ, Deng Z, et al. Autophagy in ischemic stroke[J]. *Prog Neurobiol*, 2018, 163-164: 98-117.
 - [16] Jung CH, Jun CB, Ro SH, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery[J]. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(7): 1992-2003.
 - [17] Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating[J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(Suppl 2): 1542-1552.
 - [18] Tanida I, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, et al. Lysosomal turnover, but not a cellular level, of endogenous LC3 is a marker for autophagy[J]. *Autophagy*, 2005, 1(2): 84-91.
 - [19] Su J, Zhang T, Wang K, et al. Autophagy activation contributes to the neuroprotection of remote ischemic preconditioning against focal cerebral ischemia in rats[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(11): 2068-2077.
 - [20] Zhang DM, Zhang T, Wang MM, et al. TIGAR alleviates ischemia/reperfusion-induced autophagy and ischemic brain injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 137: 13-23.
 - [21] Cui D, Wang L, Qi A, et al. Propofol prevents autophagic cell death following Oxygen and glucose deprivation in PC12 cells and cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35324.
 - [22] Zhang X, Yan H, Yuan Y, et al. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance[J]. *Autophagy*, 2013, 9(9): 1321-1333.
 - [23] Goodall ML, Fitzwalter BE, Zahedi S, et al. The autophagy machinery controls cell death switching between apoptosis and necroptosis[J]. *Dev Cell*, 2016, 37(4): 337-349.
 - [24] 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.
 - [25] Suzuki K, Kubota Y, Sekito T, et al. Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization[J]. *Genes Cells*, 2007, 12(2): 209-218.
 - [26] Pietrzak M, Puzianowska-Kuznicka M. p53-dependent repression of the human MCL-1 gene encoding an anti-apoptotic member of the BCL-2 family: the role of Sp1 and of basic transcription factor binding sites in the MCL-1 promoter[J]. *Biol Chem*, 2008, 389(4): 383-393.
 - [27] Yamada K, Yoshida K. Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(5): 839-848.
 - [28] Yonekawa T, Gamez G, Kim J, et al. RIP1 negatively regulates basal autophagic flux through TFEB to control sensitivity to apoptosis[J]. *EMBO Rep*, 2015, 16(6): 700-708.
 - [29] Cao M, Chen F, Xie N, et al. c-Jun n-terminal kinases differentially regulate TNF- and TLRs-mediated necroptosis through their kinase-dependent and -independent activities[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(12): 1140.
 - [30] Wang P, Liang J, Li Y, et al. Down-regulation of miRNA-30a alleviates cerebral ischemic injury through enhancing beclin 1-mediated autophagy[J]. *Neurochem Res*, 2014, 39(7): 1279-1291.
 - [31] Wang X, Li R, Wang X, et al. Umbelliferone ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury via upregulating the PPAR gamma expression and suppressing TXNIP/NLRP3 inflammation[J]. *Neurosci Lett*, 2015, 600: 182-187.
 - [32] Li X, Cheng S, Hu H, et al. Progranulin protects against cerebral ischemia-reperfusion (I/R) injury by inhibiting necroptosis and oxidative stress[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 521(3): 569-576.
 - [33] Wang M, Li YJ, Ding Y, et al. Silibinin prevents autophagic cell death upon oxidative stress in cortical neurons and cerebral Ischemia-Reperfusion injury[J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 932-943.
 - [34] Xin Q, Ji B, Cheng B, et al. Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia[J]. *Neurochem Int*, 2014, 68: 18-27.
 - [35] Gao B, Zhang XY, Han R, et al. The endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrin inhibits the activation of autophagy and neuroprotection induced by brain ischemic preconditioning[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(5): 657-666.
 - [36] Degterev A, Huang ZH, Boyce M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury[J]. *Nat Chem Biol*, 2005, 1(2): 112-119.
 - [37] Yang R, Hu K, Chen J, et al. Necrostatin-1 protects hippocampal neurons against ischemia/reperfusion injury via the RIP3/DAXX signaling pathway in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2017, 651: 207-215.
 - [38] Fakharnia F, Khodagholi F, Dargahi L, et al. Prevention of cyclophilin D-Mediated mPTP opening using Cyclosporine-A alleviates the elevation of necroptosis, autophagy and Apoptosis-Related markers following global cerebral Ischemia-Reperfusion[J]. *J Mol Neurosci*, 2017, 61(1): 52-60.
 - [39] 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.
 - [40] Xu Y, Wang J, Song X, et al. Protective mechanisms of CA074-me (other than cathepsin-B inhibition) against programmed necrosis induced by global cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Brain Res Bull*, 2016, 120: 97-105.
 - [41] Ryan F, Khodagholi F, Dargahi L, et al. Temporal pattern and crosstalk of necroptosis markers with autophagy and apoptosis associated proteins in ischemic hippocampus[J]. *Neurotox Res*, 2018, 34(1): 79-92.