

# 自噬功能异常与阿尔兹海默病发病机制的研究进展

陈洪玉 王舰浩 李易易 高锋 余杭 李芳 秦冬冬 李翔 刘松燕 王嘉贝 张茜 王志昊

【中图分类号】 R742 【文献标识码】 A 【文章编号】 1007-0478(2023)06-0626-03

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2023.06.018

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种复杂的神经退行性疾病,也是导致人类痴呆的最常见原因。AD的病理特征是异常蛋白聚集,如淀粉样斑块(Amyloid beta, A $\beta$ )和神经原纤维缠结(Neurofibrillary tangles, NFTs)。自噬(Autophagy)是真核生物一种进化保守的依赖溶酶体的清除受损细胞器和错误折叠蛋白的生物过程。越来越多的研究表明,自噬功能受损参与了AD的发病。

阿尔兹海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的老年相关的神经退行性疾病<sup>[1]</sup>。AD主要的临床表现为进行性的认知功能减退<sup>[1]</sup>。AD主要的病理改变是细胞外的淀粉样斑块(Amyloid beta, A $\beta$ )沉积和细胞内的Tau蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结(Neurofibrillary tangles, NFTs)<sup>[2]</sup>。目前认为A $\beta$ 的沉积主要由于A $\beta$ 生成过多而清除减少,NFTs的形成主要由于Tau蛋白过度磷酸化且不溶性聚集体的清除受阻。

自噬(Autophagy)是细胞通过溶酶体自身消化的过程,可以消化并循环利用一些受损的细胞器和错误折叠的蛋白及异常的聚集物<sup>[3]</sup>。自噬功能受损可能导致人体对异常蛋白的清除减少,大量的异常蛋白会形成聚集体,对细胞造成毒性,最终导致细胞死亡。目前有众多研究在AD患者及AD动物模型中观察到自噬功能的受损<sup>[4-5]</sup>。因此,本研究综述了自噬功能异常与AD发病机制的关系。

## 1 自噬的生理过程

自噬是一种分解代谢的过程,能够降解溶酶体中的蛋白和细胞器并循环利用其中的基本成分。根据被降解物(或称货物)被传递到溶酶体的方式,自噬大致分为以下三种:巨自噬、伴侣蛋白介导的自噬和微自噬,其中巨自噬是最主要也是目前研究最充分的方式,也是本研究主要讨论的方式。在巨自噬中蛋白被捕获入1个双层膜囊泡中,这个双层囊泡被称为自噬小体,然后自噬小体再融合入溶酶体;在伴侣蛋白介导的自噬中蛋白被胞质内的伴侣蛋白逐一识别,然后带到

溶酶体表面跨膜穿入溶酶体,而在微自噬中蛋白直接在溶酶体表面通过溶酶体膜内陷进入溶酶体<sup>[6]</sup>。

巨自噬过程分为3个阶段:自噬启动、自噬小体形成、自噬小体的成熟和降解。首先Unc-51样激酶(Unc-51-like kinase, ULK)复合物在细胞应激或氨基酸剥夺后被激活,ULK活化后可以磷酸化空泡蛋白分选34(Vacuolar protein-sorting 34, VPS34)复合物;VPS34复合物是一类脂质激酶,可以磷酸化磷脂酰肌醇产生磷脂酰肌醇3-磷酸(Phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P)<sup>[7]</sup>;PI3P可以招募多种PI3P结合蛋白,并和它们组合成前自噬小体样结构-吞噬泡,这一过程称为自噬启动<sup>[8]</sup>;然后,微管相关蛋白1轻链3(Microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)的羧基末端被自噬相关基因4(Autophagy-related gene 4, ATG4)剪切后暴露甘氨酸残基,形成LC3I;在ATG5-ATG12-ATG16L复合物的作用下LC3I的甘氨酸残基与磷脂酰乙醇胺结合,形成LC3II,这一过程称为LC3脂化<sup>[9]</sup>;接下来,LC3II就被共价连接到吞噬泡膜上;带有LC3II的吞噬泡延伸闭合,最终形成了自噬小体,这一过程就是自噬小体形成。一旦自噬小体形成,蛋白酶ATG4就会将LC3II从自噬小体膜上移除,然后自噬小体移动到溶酶体附近并与之融合,形成自噬溶酶体<sup>[9]</sup>。在溶酶体内存在大量水解酶,可以将自噬小体运输来的蛋白质消化水解成氨基酸,以待细胞再次循环利用。

一般情况下巨自噬的降解是非选择性,但近年来越来越多的研究证实自噬小体可以选择性识别某些蛋白,又称为选择性自噬<sup>[6]</sup>。目前选择性自噬大致有以下几种:聚集体自噬、线粒体自噬、过氧化物酶体自噬和异体自噬,其中聚集体自噬和线粒体自噬可能与神经退行性疾病的发生发展相关。

## 2 AD中的自噬功能异常

### 2.1 A $\beta$ 与自噬功能异常

生理情况下淀粉样前体蛋白(Amyloid precursor protein, APP)经两步蛋白剪切过程被代谢:首先是 $\alpha$ -分泌酶剪切APP,生成可溶性APP $\alpha$ 和C末端片段,C末端片段再被 $\gamma$ -分泌酶剪切;在病理情况下APP首先被 $\beta$ -分泌酶( $\beta$ -Site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1, BACE1)剪切生成可溶性APP $\beta$ 和 $\beta$ -C末端片段( $\beta$ -C-terminal fragment,  $\beta$ -CTF),然后 $\beta$ -CTF再被 $\gamma$ -分泌酶剪切,生成具有神经毒性的A $\beta$ 40和A $\beta$ 42。有研究发现,在人源APP敲入的小鼠脑内随着月龄增加自噬通量标记物LC3水平出现显著升高,同时A $\beta$ 沉积也逐渐加重,表明自噬功能的异常与A $\beta$ 沉积存在一定关系<sup>[10]</sup>。ULK复合物是参与自噬启动的关键分

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(82101479);国家重点研究计划项目(2021YFA1302400);湖北省实验动物研究领域项目(2022DFE021);武汉大学人民医院交叉创新人才项目(JCRCZN-2022-002)

作者单位:430060 武汉大学人民医院神经内科和武汉大学人民医院神经退行性疾病研究中心[陈洪玉 王舰浩 李易易 高锋 余杭 李芳 秦冬冬 李翔 刘松燕 王嘉贝 张茜 王志昊(通信作者)]

子,而活化的腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)能够磷酸化 ULK1,也可间接通过抑制雷帕霉素的哺乳动物靶标(Mammalian target of rapamycin, mTOR)来激活 ULK1,最终促进自噬的发生,减轻淀粉样病变<sup>[11]</sup>。ULK 活化后可以磷酸化 VPS34 复合物,自噬标志蛋白(Beclin-1)是 VPS34 复合物中的重要组分之一。Erb-b2 受体酪氨酸激酶 2(Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2, ErbB2)是一种在成年期处于休眠状态,而在 AD 发病过程中会被重新激活的蛋白,它可以通过与 Beclin-1 直接相互作用来抑制自噬通量,阻止了自噬对  $\beta$ -CTF 的清除,使得  $\gamma$ -分泌酶能够对  $\beta$ -CTF 进一步剪切形成  $A\beta$ <sup>[12]</sup>。VPS34 复合物的另一组分核受体结合因子 2(Nuclear receptor-binding factor 2, NRBF2)也是促进自噬小体成熟的关键蛋白,它可以调节 Ras 相关蛋白 7(Ras-related protein, RAB7)的上游分子,促进 RAB7-GDP 转换成 RAB7-GTP,促进自噬小体的成熟<sup>[13-14]</sup>。NRBF2 敲除小鼠表现出自噬功能受损, $A\beta$ 42 沉积增加,认知功能下降,而补充 NRBF2 后则可挽救自噬,降低  $A\beta$  水平,改善认知功能<sup>[15]</sup>。除了自噬启动阶段,还有研究发现与健康对照比较,AD 患者的神经元中 ATG4A 上调,LC3B-II/LC3B-I 比例相应下降,同时伴有细胞内  $A\beta$  沉积<sup>[16]</sup>。

除了自噬相关蛋白的改变,自噬还受上游分子 mTOR 的调控。雷帕霉素是一种 mTOR 抑制剂,它可以提高 Wingless 相关整合位点 3a(Wingless-related integration site 3a, Wnt3a)的表达,抑制糖原合酶激酶 3 $\beta$ (Glycogen synthase kinase 3 $\beta$ , GSK3 $\beta$ )的激活,上调  $\beta$ -catenin 的表达,从而促进了  $A\beta$  的清除<sup>[17]</sup>。mTOR 磷酸化水平与其活性程度相关,抑制 mTOR 磷酸化可以增高自噬相关基因 7(Autophagy-related gene 7, ATG7)、自噬相关基因 5(Autophagy-related gene 5, ATG5)水平,增高 LC3-II/LC3-I 比例,促进  $A\beta$  的清除,改善 AD 小鼠的认知功能<sup>[18]</sup>。转录因子 EB(Transcription factor EB, TFEB)是一种螺旋-环-螺旋亮氨酸拉链转录因子,主要通过上调溶酶体相关蛋白的转录,促进溶酶体生成,从而增强自噬功能。有研究已经发现,在 AD 患者脑内从 Braak IV 期开始细胞质组分内的 TFEB 增多而细胞核组分的 TFEB 减少,说明随着 AD 疾病的进展,TFEB 更多地停留在胞质而不会发挥其转录功能,进而影响细胞的溶酶体-自噬活性<sup>[19]</sup>。当过表达 TFEB 时可以上调溶酶体蛋白组织蛋白酶 D(Cathepsin D)和溶酶体相关膜蛋白 1(Lysosome-associated membrane protein 1, LAMP1)的表达以及增加解整合素金属蛋白酶 10(A disintegrin and metalloproteases 10, ADAM10)的活性,最终显著降低  $A\beta$  直接前体  $\beta$ -CTF 的负荷,表明 TFEB 调节  $A\beta$  代谢,不仅通过促进自噬清除  $\beta$ -CTF,还可以通过增加  $\alpha$ -分泌酶的剪切作用<sup>[20]</sup>。

## 2.2 Tau 与自噬功能异常

Tau 是一种主要在神经元表达的微管相关蛋白,它在生理条件下参与微管聚合并维持微管稳定性。Tau 翻译后修饰的改变能够影响 Tau 蛋白功能甚至产生致病性 Tau,过度磷酸化的 Tau 会从微管蛋白上解离,然后聚集形成 NFTs,从而损害正常神经元活动所必需的轴突稳定性和轴突运输。Tau 蛋白聚集体可与热休克同源 70(Heat shock cognate 70,

Hsc70)结合发生伴侣蛋白介导的自噬<sup>[21]</sup>。Hsc70 的辅伴侣 Bcl-2 相关致死基因 3(Bcl-2-associated athanogene 3, BAG3)通过与突触后细胞骨架蛋白突触足蛋白(Synaptopodin, SYNPO)相互作用来促进突触后间隙的自噬小体与溶酶体融合,而 BAG3 的缺失会阻碍自噬过程,导致自噬受体蛋白(Sequestosome 1, Sqstm1)积累以及 Tau 蛋白 Ser262 的磷酸化<sup>[22]</sup>。在 AD 早期兴奋性神经元就出现了 BAG3 蛋白的减少,而此时过表达 BAG3 可减少 Tau 蛋白的聚集,这可能与 AD 病变中病理性 Tau 蛋白优先在兴奋性神经元积聚有关<sup>[23]</sup>。此外,溶酶体相关膜蛋白 2A 型(Lysosome-associated membrane protein 2A, LAMP2A)是伴侣蛋白介导的自噬的另一关键蛋白,它可以与 Hsc70 结合来促进自噬货物进入溶酶体降解。通过在兴奋性神经元内敲除 LAMP2A,科学家建立了一种伴侣蛋白介导的自噬缺陷小鼠,该小鼠表现出磷酸化 Tau 蛋白增多且空间记忆的受损,而在 Tau 病变模型小鼠中过表达 LAMP2A 则导致 Tau 蛋白的磷酸化减少且播散减弱,同时小鼠的认知功能也得到改善<sup>[24]</sup>。

Tau 蛋白的传播可能与细胞分泌外泌体有关。最近的研究表明自噬活动与外泌体分泌相关,在外泌体中发现了多种自噬相关蛋白如 Sqstm1。蛋白磷酸酶弹弓同系物 1(Slingshot homolog 1, SSH1)可以去磷酸化 Sqstm1 的第 403 位丝氨酸,使 Sqstm1 失去结合泛素化货物的能力,减缓自噬通量以及自噬小体与溶酶体融合<sup>[25]</sup>;同时 SSH1 去磷酸化肌动蛋白丝切蛋白(Cofilin)的第 3 位丝氨酸,增加肌动蛋白动力学,最终使含有 Tau 蛋白的自噬小体在肌动蛋白的帮助下分泌出外泌体,导致 Tau 蛋白的传播<sup>[26]</sup>。含有 Tau 蛋白的外泌体通过内吞作用进入神经元形成内体,内体在 RAB7 的作用下与溶酶体融合形成内体溶酶体,而外泌体会对溶酶体产生透化作用,使溶酶体内环境碱化,这样外泌体内的 Tau 蛋白就逃避了溶酶体的降解来到胞质内,形成 Tau 蛋白的聚集<sup>[27]</sup>。

Tau 蛋白还可以逃避和干扰自噬过程。由于溶酶体蛋白水解酶的作用是很精确的,它能以特定的线性氨基酸序列切割底物,因此 Tau 蛋白的某些突变如第 257 位氨基酸赖氨酸突变成苏氨酸、第 279 位氨基酸天冬氨酸突变成赖氨酸、第 305 位氨基酸突变成赖氨酸,可以通过逃避自噬清除,在细胞内大量聚集而产生毒性<sup>[28]</sup>。过多的 Tau 蛋白还可以与 T 细胞胞内抗原 1 的朊病毒相关结构域结合,增高细胞内的氨基酸水平,进而激活 mTOR 通路,活化的 mTOR 则会抑制自噬<sup>[29]</sup>。病理性 Tau 还可以通过增加溶酶体膜上双控通道 2 介导的钙释放而使溶酶体碱化,干扰溶酶体清除 Tau<sup>[30]</sup>。

## 3 结束语

综上所述,自噬是 1 个高度保守的清除异常蛋白并维持细胞稳态的过程,自噬功能的异常会导致细胞内异常蛋白聚集如  $A\beta$  和 Tau,导致 AD 发病。一方面,自噬启动的受阻如抑制 ULK 复合物或 VPS34 复合物会影响自噬通量,导致  $A\beta$  清除减少;自噬的上游调节分子 mTOR 和调控自噬溶酶体基因转录的 TFEB 也会影响自噬功能,进而导致淀粉样斑块的形成;另一方面,伴侣蛋白介导的自噬与 Tau 蛋白的清

除密不可分,自噬小体在病理情况下会形成外泌体,介导 Tau 蛋白的播散。Tau 蛋白的某些突变可以逃避自噬的清除,甚至过多的 Tau 蛋白还会干扰自噬过程。因此,自噬功能异常很可能参与了 AD 的发病,针对自噬过程的干预可能是临床治疗 AD 的新方向之一。

### 参 考 文 献

- [1] 2023 Alzheimer's disease facts and figures [J]. Alzheimer's & Dementia: the Journal of the Alzheimer's Association, 2023, 19 (4): 1598-695.
- [2] Busche MA, Hyman BT. Synergy between amyloid- $\beta$  and tau in Alzheimer's disease[J]. Nat Neurosci, 2020, 23(10): 1183-1193.
- [3] Klionsky DJ, Petroni G, Amaravadi RK, et al. Autophagy in major human diseases[J]. EMBO J, 2021, 40(19): e108863.
- [4] Lee JH, Yang DS, Goulbourne CN, et al. Faulty autolysosome acidification in Alzheimer's disease mouse models induces autophagic build-up of A $\beta$  in neurons, yielding senile plaques[J]. Nat Neurosci, 2022, 25(6): 688-701.
- [5] Xu Y, Propson NE, Du SQ, et al. Autophagy deficiency modulates microglial lipid homeostasis and aggravates tau pathology and spreading[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2021, 118(27): e2023418118.
- [6] Scrivo A, Bourdenx M, Pampliega O, et al. Selective autophagy as a potential therapeutic target for neurodegenerative disorders[J]. Lancet Neurol, 2018, 17(9): 802-815.
- [7] Russell RC, Tian Y, Yuan HX, et al. ULK1 induces autophagy by phosphorylating beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(7): 741-750.
- [8] Nishimura T, Tamura N, Kono N, et al. Autophagosome formation is initiated at phosphatidylinositol synthase-enriched ER subdomains[J]. EMBO J, 2017, 36(12): 1719-1735.
- [9] Agrotis A, Pengo N, Burden JJ, et al. Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells[J]. Autophagy, 2019, 15(6): 976-997.
- [10] Jiang RC, Shimozaawa M, Mayer J, et al. Autophagy impairment in App knock-in Alzheimer's model mice[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 878303.
- [11] Wani A, Al Rihani SB, Sharma A, et al. Crocetin promotes clearance of amyloid- $\beta$  by inducing autophagy via the STK11/LKB1-mediated AMPK pathway [J]. Autophagy, 2021, 17 (11): 3813-3832.
- [12] Wang BJ, Her GM, Hu MK, et al. ErbB2 regulates autophagic flux to modulate the proteostasis of APP-CTFs in Alzheimer's disease [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017, 114(15): E3129-E3138.
- [13] Cai CZ, Zhuang XX, Zhu Q, et al. Enhancing autophagy maturation with CCZ1-MON1A complex alleviates neuropathology and memory defects in Alzheimer's disease models[J]. Theranostics, 2022, 12(4): 1738-1755.
- [14] Cai CZ, Yang C, Zhuang XX, et al. NRBF2 is a RAB7 effector required for autophagosome maturation and mediates the association of APP-CTFs with active form of RAB7 for degradation [J]. Autophagy, 2021, 17(5): 1112-1130.
- [15] Lachance V, Wang Q, Sweet E, et al. Autophagy protein NRBF2 has reduced expression in Alzheimer's brains and modulates memory and amyloid-beta homeostasis in mice[J]. Mol Neurodegener, 2019, 14(1): 43.
- [16] Shirotani K, Watanabe K, Hatta D, et al. Alterations of ATG4A and LC3B in neurons derived from Alzheimer's disease patients[J]. Genes Cells, 2023, 28(4): 319-325.
- [17] Chen JF, Long ZM, Li YZ, et al. Alteration of the Wnt/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signalling pathway by rapamycin ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model[J]. Int J Mol Med, 2019, 44(1): 313-323.
- [18] Zhu ZK, Liu YX, Li XY, et al. GPNMB mitigates Alzheimer's disease and enhances autophagy via suppressing the mTOR signal[J]. Neurosci Lett, 2022, 767: 136300.
- [19] Wang HJ, Wang RZ, Xu SH, et al. Transcription factor EB is selectively reduced in the nuclear fractions of Alzheimer's and amyotrophic lateral sclerosis brains[J]. Neurosci J, 2016, 2016: 4732837.
- [20] Yamamoto F, Taniguchi K, Mamada NM, et al. TFEB-mediated enhancement of the autophagy-lysosomal pathway dually modulates the process of amyloid  $\beta$ -protein generation in neurons [J]. Neuroscience, 2019, 402: 11-22.
- [21] Sreenivasamurthy SG, Iyaswamy A, Krishnamoorthi S, et al. Bromo-protopine, a novel protopine derivative, alleviates tau pathology by activating chaperone-mediated autophagy for Alzheimer's disease therapy [J]. Front Mol Biosci, 2022, 9: 1030534.
- [22] Ji CY, Tang MP, Zeidler C, et al. BAG3 and SYNPO (synaptopodin) facilitate phospho-MAPT/Tau degradation via autophagy in neuronal processes[J]. Autophagy, 2019, 15(7): 1199-1213.
- [23] Fu HJ, Possenti A, Freer R, et al. A tau homeostasis signature is linked with the cellular and regional vulnerability of excitatory neurons to tau pathology[J]. Nat Neurosci, 2019, 22(1): 47-56.
- [24] Bourdenx M, Martin-Segura A, Scrivo A, et al. Chaperone-mediated autophagy prevents collapse of the neuronal metastable proteome [J]. Cell, 2021, 184(10): 2696-714, e25.
- [25] Fang CX, Woo JAA, Liu T, et al. SSH1 impedes SQSTM1/p62 flux and MAPT/Tau clearance Independent of CFL (cofilin) activation[J]. Autophagy, 2021, 17(9): 2144-2165.
- [26] Cazzaro S, Fang CX, Khan H, et al. Slingshot homolog-1 mediates the secretion of small extracellular vesicles containing misfolded proteins by regulating autophagy cargo receptors and actin dynamics[J]. Front Aging Neurosci, 2022, 14: 933979.
- [27] Polanco JC, Hand GR, Briner A, et al. Exosomes induce endolysosomal permeabilization as a gateway by which exosomal tau seeds escape into the cytosol[J]. Acta Neuropathol, 2021, 141(2): 235-256.
- [28] Sampognaro PJ, Arya S, Knudsen GM, et al. Mutations in  $\alpha$ -synuclein, TDP-43 and tau prolong protein half-life through diminished degradation by lysosomal proteases[J]. Mol Neurodegener, 2023, 18(1): 29.
- [29] Li MZ, Liu EJ, Zhou QZ, et al. Intracellular accumulation of tau inhibits autophagosome formation by activating TIA1-amino acid-mTORC1 signaling[J]. Mil Med Res, 2022, 9(1): 38.
- [30] Tong BCK, Huang AS, Wu AJ, et al. Tetrandrine ameliorates cognitive deficits and mitigates tau aggregation in cell and animal models of tauopathies[J]. J Biomed Sci, 2022, 29(1): 85.