



自噬在脑缺血中的双重作用及小分子治疗药物的研究进展

卜发倩¹, 张吉发¹, 帅雯¹, 和龙^{1,2*}, 欧阳亮^{1*}

1. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 成都 610041;

2. 北京市中关村生物工程和医药企业协会, 北京 100101

* 联系人, E-mail: ouyangliang@scu.edu.cn; helong@funhaumed.com

收稿日期: 2021-06-23; 接受日期: 2021-08-19; 网络版发表日期: 2021-11-23

国家自然科学基金(批准号: 81922064, 81874290)资助

摘要 自噬是一种溶酶体参与的细胞内降解过程, 在维持细胞稳态和存活中发挥关键作用. 越来越多研究表明, 自噬在缺血性神经元损伤中承担重要角色, 具有双重作用. 多个小分子被发现可以通过调控自噬对脑缺血再灌注起到神经保护作用, 有望成为缺血性中风的新治疗药物. 本文主要阐述了自噬在脑缺血中的双重调控作用, 为进一步探究脑缺血和自噬的关系提供了理论基础. 此外, 本文总结了近3年来研究发现的通过调控自噬治疗脑缺血的小分子化合物及其作用机制, 讨论了其在中风治疗中的潜在应用.

关键词 自噬, 脑缺血损伤, 中风, 自噬调节剂

中风是一种急性脑血管疾病, 每年约有79.5万人因中风致残^[1]. 缺血性中风占有所有中风类型的60%~80%, 且发病率逐年上升, 被认为是世界上发病率、死亡率、致残率和复发率最高的致命性疾病之一. 缺血性中风的特点是脑血管病变引起脑组织供血迅速减少造成供血不足, 进而导致脑细胞代谢紊乱和死亡, 最终对脑组织造成不可逆转的损伤. 目前, 溶栓治疗和取栓治疗是临床上有效的治疗方法, 其中重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue plasminogen activator, rtPA)是美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)唯一批准的缺血性中风治疗药物^[2,3]. 但是溶栓治疗和取栓治疗的时间窗狭窄、复发率高的缺点限制了其临床应用^[4]. 此外, 溶栓治疗期间

脑缺血/再灌注损伤可能会导致一系列病理反应, 包括氧化应激、钙超载、谷氨酸兴奋性毒性、炎症和凋亡等. 因此, 寻找新的、有效的治疗缺血性中风的靶点和治疗药物迫在眉睫.

自噬(autophagy)是存在于真核细胞中的一种进化历史悠久、高度保守的分解代谢过程, 主要涉及细胞内大分子物质的循环和再利用, 此外还参与损伤细胞器的降解清除, 在维持细胞内环境的稳态中发挥着重要作用^[5]. 研究表明, 自噬参与了中风的发生发展. 1995年, Nitatori等人^[6]在沙鼠短暂脑缺血模型中观察到组织蛋白酶B免疫阳性溶酶体明显增多, 这些增多的溶酶体多为自噬溶酶体, 自噬作用通过瞬时传递增加, 这是人们首次发现自噬作用在脑缺血中被激活.

引用格式: 卜发倩, 张吉发, 帅雯, 等. 自噬在脑缺血中的双重作用及小分子治疗药物的研究进展. 中国科学: 生命科学, 2022, 52: 1827–1843
Bu F Q, Zhang J F, Shuai W, et al. The dual effects of autophagy in cerebral ischemia and small-molecular therapeutic drugs (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2022, 52: 1827–1843, doi: [10.1360/SSV-2021-0091](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0091)

随后, Kuma等人^[7]于2004年首次通过透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)在沙鼠脑缺血模型中观察到自噬体结构, 证实自噬参与了脑缺血再灌注。此外, 研究人员进一步运用药理学工具或者自噬相关基因敲除的小鼠研究自噬在脑缺血中的功能和生物学意义。有研究表明, 缺血本身即可诱导神经细胞发生自噬作为应对恶劣环境和促进能量再生的重要途径; 但是急性或严重的脑缺血可能会过度激活自噬, 从而进一步加剧细胞的损伤和死亡^[8]。这些研究结果均提示, 通过自噬调控来预防和治疗脑缺血损伤是一个潜在的新治疗目标。

小分子药物因具有理论成熟、良好依从性、靶点创新性和研发成本优势等特点, 一直被广泛研发。近年来, 越来越多的研究发现, 许多小分子化合物能通过调控自噬对脑缺血损伤发挥治疗作用。鉴于自噬在脑缺血损伤中的双重作用, 根据药物对自噬作用的调控方式, 可将靶向自噬的治疗药物主要分为激活、促进自噬作用的药物或是抑制、阻断自噬作用的药物。本文总结了自噬在脑缺血损伤中的调控, 并就近年来发现的具有调节自噬作用的小分子化合物及其药理机制、应用进行综述, 讨论了能通过调节自噬作用在脑缺血损伤中具有潜在应用价值的代表性化合物。

1 自噬的分子机制

自噬是一个在进化上高度保守的过程, 通过溶酶体系统降解和循环再利用细胞内成分。在正常的生理状态下, 自噬维持在基础水平, 有利于异常、损伤、过量成分的不断降解^[9]。自噬有三种主要类型, 即巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperon-mediated autophagy)^[10]。巨自噬通过具有双层膜的囊泡包裹胞质成分, 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体来降解底物, 是最主要的自噬调节方式。微自噬过程较简单, 依靠溶酶体直接吞噬胞质成分。分子伴侣介导的自噬则涉及到伴侣蛋白与底物蛋白跨溶酶体的易位, 通过伴侣蛋白的辅助实现选择性降解目标底物。近年来, 人们对巨自噬的机制及其在疾病中的作用研究较为透彻, 本文将重点从巨自噬(除具体说明外, 下文中均简称为自噬)在脑缺血中的作用及其小分子调节剂的研究进展方面进行综述。

自噬的进展主要可分为5个不同的阶段: 自噬的启动, 自噬小体成核, 自噬小体的延伸, 自噬体成熟及融合, 内容物的降解^[10,11](图1)。自噬可以通过饥饿、氧化应激、mTOR(mammalian target of ramamycin)抑制等多种细胞间和细胞外的刺激诱导, 自噬的启动始于ULK复合物(包括ULK1, ULK2, FIP200/RB1CC1, ATG13和ATG101)的激活。自噬小体成核后, III型磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K-III)复合物(包括AMBRA1, VPS34/PIK3C3, UVRAG/p63, VPS15, Beclin1和ATG14)被激活。自噬小体膜的扩展和延伸是由ATG12偶联体系和微管相关蛋白1轻链3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)偶联体系这两种泛素类ATG偶联体系介导的。具体而言, ATG12在ATG7的作用下与ATG10结合, 进而结合ATG5形成ATG12-ATG5复合物, 该复合物进一步与ATG16L1连接形成蛋白复合物参与自噬小体的延伸; ATG4B偶联ATG7, 使微管相关蛋白1轻链3- I (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3- I /LC3- I)结合磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)形成LC3- II, LC3- II结合于自噬体膜上直至自噬体与溶酶体融合后被降解, 是自噬体的常见蛋白标记物。自噬体成熟及融合依赖于多种蛋白的参与, 例如, 融合突触蛋白17(STX17)促进自噬体与溶酶体融合形成成熟的自噬溶酶体。最终, 溶酶体的酸性环境导致自噬体内容物降解为氨基酸或多肽, 供细胞重复使用。自噬最初被认为是一个非选择性的过程, 后来发现它可以选择性降解胞质内容物, 即通过自噬受体结合到泛素和LC3或是GABAA受体相关蛋白(GABAA receptor associated protein, GABAR-AP)来选择性调控蛋白质降解, 根据其降解底物的不同可分为线粒体自噬(mitophagy)、过氧化物酶体自噬(pexophagy)、内质网自噬(reticulophagy)、核糖体自噬(ribophagy)和异源自噬(xenophagy)^[12]。

2 自噬在脑缺血中的调控

2.1 缺血性中风的自噬激活

缺血性中风发生后, 包括活性氧(reactive oxygen species, ROS)、错误折叠蛋白聚集、细胞内钙超载、生物能量不足和氨基酸等物质缺失在内的多种应激因子都可能参与了缺血脑细胞的自噬激活^[13,14]。ROS积累引起的氧化应激是脑缺血的必然结果。脑缺血再灌

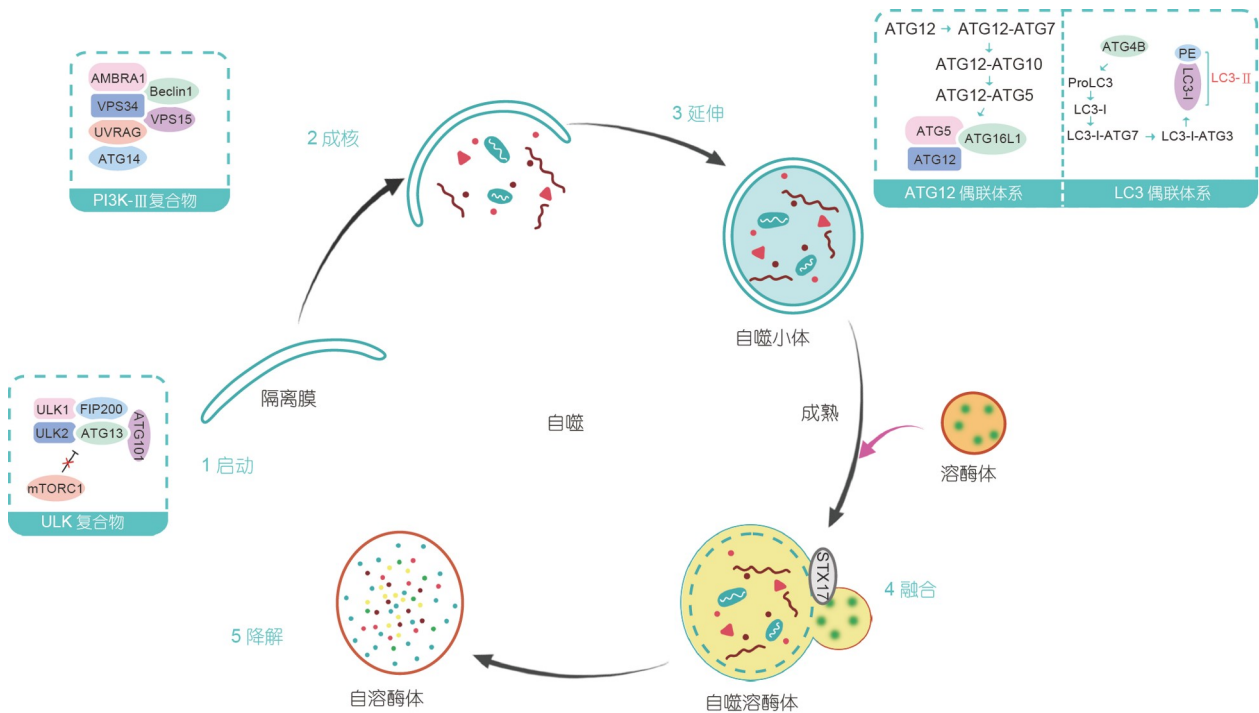


图 1 自噬分子机制。自噬发生过程可分为5个阶段，即自噬的启动、成核、自噬延伸、自噬体成熟及融合、内容物的降解。自噬的启动始于ULK复合物的激活，ULK复合物由ULK1，ULK2，FIP200/RB1CC1，ATG13和ATG101组成；ULK复合物诱导自噬小体成核，随后由PI3K-III复合物介导，PI3K-III复合物由AMBRA1，VPS34/PIK3C3，UVRAG/p63，VPS15，Beclin1和ATG14组成；囊泡的延伸封闭形成自噬体，该过程由ATG12偶联体系和LC3偶联体系两种泛素类ATG偶联体系介导；STX17促进自噬体和溶酶体融合形成自噬溶酶体，溶酶体内酸性环境导致内容物的降解

Figure 1 Schematic overview of autophagy. The process of autophagy can be divided into five stages: initiation, nucleation, elongation, fusion and degradation. The initiation of autophagy begins with activation of the ULK complex, which consists of ULK1, ULK2, FIP200/RB1CC1, ATG13 and ATG101. The ULK complex induces vesicle nucleation, which is then mediated by the PI3K-III complex. The PI3K-III complex is composed of AMBRA1, VPS34/PIK3C3, UVRAG/p63, VPS15, Beclin1 and ATG14. Vesicle expansion and elongation are mediated by two ubiquitin-like conjugation systems: ATG12-conjugation system and LC3-conjugation system. The fusion of autophagosome with lysosome is facilitated by STX17, and the acidic environment in lysosomes leads to the degradation of the cargoes

注时，细胞中氧和葡萄糖水平会迅速重新建立，导致线粒体活性过度激活，而线粒体是ROS的重要来源，因此导致ROS水平激增，最终使脑缺血损伤恶化。ROS的增加可以上调TP53，TP53介导的糖酵解和凋亡诱导因子(TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator, TI-GAR)和损伤调节自噬调控基因(damage-regulated autophagy modulator, DRAM)介导TP53的转录，并在自噬调控中发挥着重要作用^[15]。供氧减少的情况下，缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)会触发包括FUNDC1，BNIP3和NIX在内的几种线粒体自噬受体的激活^[16]。此外，ROS的增加还会激活NRF2，FOXO3和PERK通路，这些途径都参与缺血神经元的氧化应激并与自噬诱导相关^[16,17]。研究报道，在中风模型的大鼠中，褪黑素可以通过增加线粒体自噬和抑

制NLRP3炎症小体的激活来减少ROS的产生^[18]。

未折叠或错误折叠蛋白诱导内质网应激，而内质网应激主要通过三条信号通路激活自噬：肌醇依赖蛋白1 α (inositol-requiring protein-1 α , IRE1 α)，蛋白激酶R样内质网激酶(protein kinase R (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase, PERK)，转录激活因子6(activating transcription factor 6, ATF6)^[19](图2)。内质网未折叠蛋白的积累刺激IRE1 α 在内质网膜上的寡聚化和胞质结构域的自磷酸化。随后IRE1 α 与肿瘤坏死因子受体相关因子2(tumor necrosis factor receptor-associated factor-2, TRAF2)，凋亡信号调节激酶1(apoptosis signal-regulating kinase-1, ASK1)形成复合物，激活下游c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)促进细胞自噬^[19]。内质网应激时，PERK释放78 kD葡萄糖调节

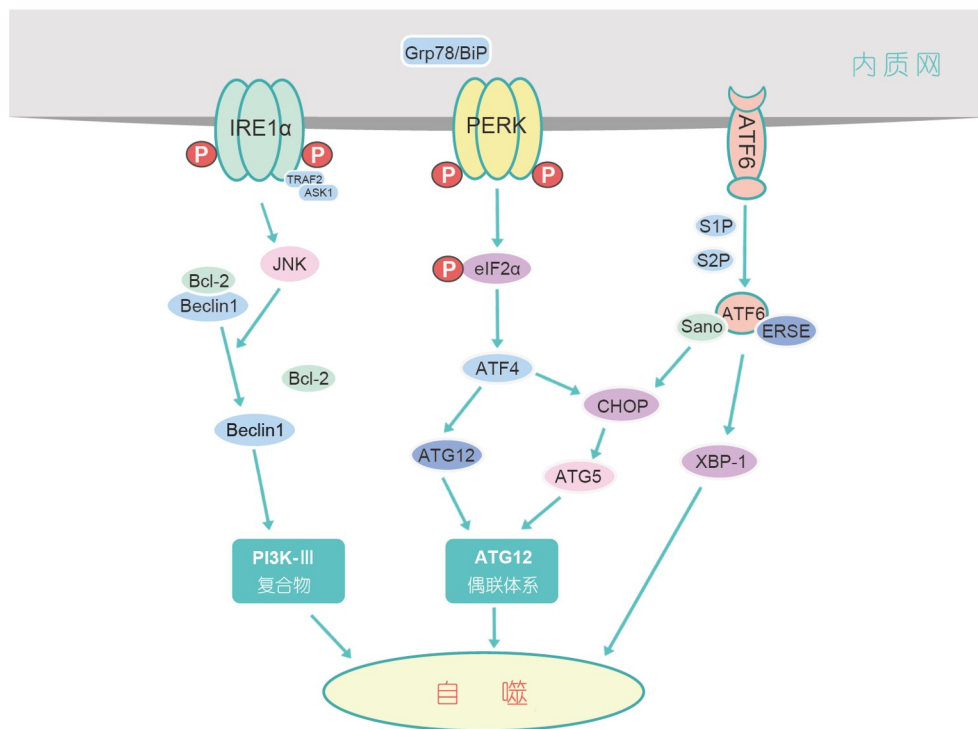


图 2 内质网应激介导的自噬及其分子机制. 内质网应激主要通过IRE1 α , PERK和ATF6三条信号通路诱导自噬. 磷酸化激活的IRE1 α 与TRAF2和ASK1形成复合物激活下游JNK, 促进Beclin1释放, 游离的Beclin1参与形成PI3K-III复合物从而激活自噬; 磷酸化激活的PERK通过ATF4转录调控ATG12诱导自噬, 并通过ATF4介导的CHOP转录调控ATG5诱导自噬; ATF6被S1P和S2P切割后的N端结构域结合Sano和ERSE, 激活CHOP和XBP-1从而激活自噬

Figure 2 Molecular mechanisms of ER stress-mediated autophagy. ER stress can induce autophagy mainly through IRE1 α , PERK and ATF6 signal pathways. Activated IRE1 α forms a complex with TRAF2 and ASK1, which then activates the downstream JNK pathway and promotes the release of Beclin1. Free Beclin1 is involved in the formation of the PI3K-III complex, which activates autophagy. Phosphorylated PERK induces autophagy through ATF4-driven transcriptional regulation of Atg12, and ATF4 mediated activation of CHOP also transcriptionally regulates ATG5 and then induces autophagy. The N-terminal domain of ATF6 cleaved by S1P and S2P binds to Sano and ERSE, which induces autophagy by activating CHOP and XBP-1

蛋白(the glucose-regulated protein 78 kD, Grp78/BiP), 使eIF2 α 磷酸化并翻译转录激活因子ATF4, 而ATF4转录调控ATG12, ATF介导的C/EBP同源蛋白(C/EBP-homologous protein, CHOP)激活转录调控ATG5^[20]. ATG12和ATG5都是ATG12偶联体系的组成部分, 介导自噬小体膜的扩展和延伸^[20]. 在内质网应激下, ATF6被转录到高尔基体后被位点1蛋白酶(site-1 protease, S1P)和位点2蛋白酶(site-2 protease, S2P)切割, 切割后的N端胞质结构域易位到细胞核中与ATF/cAMP反应元件Sano、内质网应激反应元件(ER stress-response elements, ERSE)结合后激活包括XBP-1和CHOP在内的靶基因^[20]. ATF6通过XBP-1和CHOP激活细胞自噬^[20].

缺血神经元细胞的钙超载和ATP衰竭会导致钙/钙调蛋白依赖性蛋白激酶激酶(recombinant calcium/

calmodulin dependent protein kinase kinase, CAMKK)与LKB1(liver kinase B1)的激活和AMP活化蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK)的磷酸化^[21]. 活化的AMPK通过磷酸化Raptor和TSC2抑制mTOR途径从而诱导自噬作用^[22]. 此外, 钙释放激活的死亡相关蛋白激酶(death-associated protein kinase, DAPK)参与Beclin1的磷酸化, 随后促进Beclin1从Bcl-2中解离, 诱导自噬的发生^[23,24].

2.2 自噬在缺血性中风中的双重作用

一般认为, 自噬在缺血性中风中表现出双重作用, 即适度的自噬激活可以使神经元细胞存活, 起到保护作用, 而过度自噬会促进神经元细胞的死亡^[8]. 自噬在缺血后再灌注期间清除受损的线粒体, 即线粒体自噬,

从而减轻线粒体诱导的神经元凋亡和缺血损伤^[25]。局灶性缺血模型中,在病灶边界处可以观察到自噬激活,缺血3小时后使用自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)可以明显减少脑梗死体积^[26]。在脑缺血受损伤后的慢性期,自噬抑制还可以明显改善小鼠的运动功能^[27]。在脑缺血的不同阶段,自噬也表现相反的作用:一方面,使用3-MA和渥曼青霉素(wortmannin, WM)抑制自噬通路的激活会促进神经元细胞的凋亡和坏死,增加新生大鼠缺血缺氧引起的脑梗死体积和神经功能的损伤^[28];另一方面,在脑缺血缺氧前使用雷帕霉素(rapamycin, RAPA)激活自噬通路,可以促进蛋白激酶B(protein kinase B, PKB/Akt)和cAMP反应元件结合蛋白(cAMP response element binding protein, CREB)的磷酸化,从而明显减轻神经元死亡导致的脑损伤^[29]。综上可以得出,自噬在脑缺血中的不同程度或不同作用时间可能决定了自噬是否有益于脑缺血损伤。

(1) 自噬在缺血性中风中的保护作用。Beclin1是自噬起始期的关键调控因子,诱导自噬体的形成,并通过促进包括Vps34, Vps15和其自身在内的关键自噬蛋白在自噬体前体上的积累来启动自噬^[30,31]。Fan等人^[30]发现,局灶性缺血后,Beclin1在脑组织中的表达量显著上调,与神经元自噬的时间过程一致,而3-MA可以明显降低其表达,使细胞的死亡方式从凋亡转变为细胞坏死。RAPA可以上调Beclin1的表达,诱导自噬,从而减少细胞死亡并减轻脑组织的损伤程度。RAPA的神经保护作用已经在多种鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)模型中得到证实。例如, Buckley等人^[29]发现,在小鼠MCAO模型中, RAPA处理可以明显减少脑损伤体积,提高小鼠生存率。在与生理相关的永久性缓慢再灌注形成的中风模型中,使用药物诱导自噬更有利于减少脑梗死面积和改善中风。Wu等人^[27]对大鼠采用MCAO方法诱导局灶性脑缺血再灌注,并在MCAO前后给予RAPA治疗,发现均可以通过激活自噬和减少神经元凋亡数量来减少梗死体积和改善神经功能。脑缺血后的神经元自噬作为促生存信号通路的一部分,涉及到PI3K/Akt/TSC2/mTOR/P70S6K信号通路和Akt/CREB信号通路。Wang等人^[28]探讨了烟酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyltransferase, Nampt)在脑缺血中发挥神经保护作用的机制,他们发现,脑缺血时Nampt以

SIRT1依赖的方式调控TSC2/mTOR/S6K1信号通路诱导自噬发生,从而促进神经元细胞的存活来发挥神经保护作用。Wang等人^[32]发现,在脑缺血/再灌注大鼠模型中,电针治疗可以通过激活PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导自噬,从而改善大鼠的学习记忆障碍。Carlioni等人^[33]发现,在新生大鼠脑缺氧缺血模型中, RAPA治疗可以激活PI3K/Akt/mTOR通路而激活自噬,并增加CREB的磷酸化激活,从而发挥神经保护作用。此外,脑缺血预处理诱导的自噬具有神经保护作用,可以激活内源性防御机制,这种作用和内质网应激的改善相关。Sheng等人^[25]报道,在脑缺血预处理的大鼠模型中,神经保护性自噬激活可以减少内质网应激依赖的细胞凋亡。

(2) 过度自噬加重缺血性中风损伤。研究人员在大鼠永久性大脑中动脉闭塞模型中,观察到自噬体和自噬溶酶体数量的明显增加,使用3-MA治疗可以有效减少脑梗死体积,减轻脑水肿并改善大鼠的运动障碍^[34]。对大鼠进行氧葡萄糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, ODG)24小时后, 3-MA和WM可以通过抑制自噬来减轻神经元的损伤^[35]。对成年大鼠进行全脑缺血再灌注损伤,缺血前3-MA治疗可抑制缺血损伤激活的自噬,防止海马CA1神经元程序性坏死的发生^[26]。上述研究表明,自噬对脑缺血损伤也存在促进作用。Beclin1诱导的自噬对缺血性中风除了表现出保护作用外,在其他研究中也表现出加重脑缺血损伤的有害作用。有研究探讨了Beclin1依赖性自噬在短暂MCAO后神经再生过程中的作用,使用RNA干扰技术下调脑缺血大鼠的Beclin1表达可以减少脑梗死体积,抑制组织损伤和改善神经功能障碍^[36]。此外,通过下调Beclin1来抑制自噬可减轻局灶性脑梗死后的丘脑继发性退行性损伤^[37]。研究发现, AMPK介导的自噬可以扩大脑缺血体积,加重病理损伤。Li等人^[38]利用基因敲除的方法检测AMPK亚型对缺血性中风的影响,发现AMPK在局灶性中风模型中是有害的, AMPK的催化异构体 α -2参与了其有害作用的激活,用AMPK抑制剂抑制AMPK的激活可以减少中风损伤,即使在中风发生后治疗也可以有效地保护神经细胞。此外,自噬相关基因ATG7也是缺氧/缺血性脑损伤诱导的神经元细胞死亡的关键基因。新生小鼠受到脑缺氧/缺血损伤后,观察到自噬体的形成显著增加,海马神经元的大量死亡受到caspase-3依赖或非依赖的调节^[39]。而ATG7基因缺失的新

生小鼠, 对缺氧/缺血诱导的caspase-3激活和神经元死亡均表现出完全的抵抗作用, 几乎没有神经功能的损伤^[39]. 对小鼠神经元选择性缺失ATG7基因可以防止缺氧/缺血诱导的自噬, 使小鼠脑梗死体积减少42%, 并减少大脑多个区域的细胞死亡^[40].

3 靶向自噬治疗脑缺血的药物

已有大量研究报道各种药物可调节神经元细胞的自噬对脑缺血损伤起到治疗作用. 根据这些药物对自噬作用的不同调控方式, 可将这些药物分为两大类, 即通过诱导或促进自噬作用保护缺血神经元细胞的药物, 以及通过抑制或阻断自噬作用保护缺血神经元细胞的药物(表1). 本文收集了近3年来通过调节自噬减轻脑缺血损伤的小分子药物, 这些药物大多数属于天然来源化合物, 另一部分则是长期临床应用或者在实验室研究中发现. 在这些化合物中, 绝大部分已经通过机制研究获得了具体作用机制, 有望被开发成治疗脑缺血损伤的新型小分子药物; 还有一部分药物的具体作用机制则还有待研究和验证, 具有广阔的发展空间和光明的应用前景.

3.1 诱导或促进自噬的药物

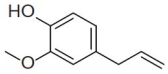
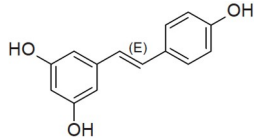
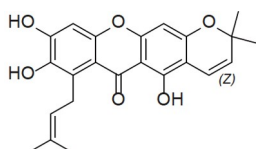
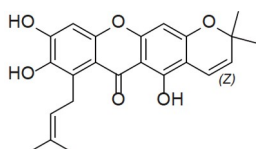
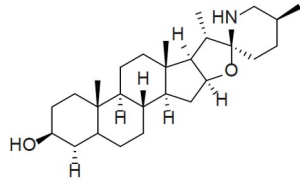
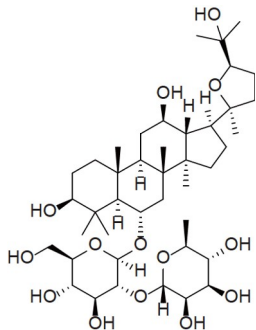
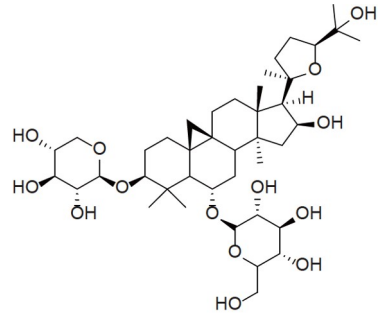
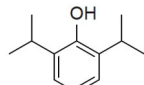
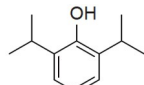
近年来, 许多研究发现一些天然来源的小分子化合物具有诱导/促进自噬减轻脑缺血损伤的作用. 丁香酚(eugenol)是中药石菖蒲(*Acorus tatarinowii* Schott)活性成分之一, 对脑缺血再灌注损伤具有保护作用^[41]. 体内外研究表明, 丁香酚可以通过调节AMPK/mTOR/P70S6K信号通路诱导细胞自噬, 明显减轻脑缺血再灌注损伤及伴随的神经功能损伤^[41]. 白藜芦醇(resveratrol)是一种非黄酮类多酚有机化合物, 可以通过抑制电子传递链降低ATP水平, 从而导致AMPK的激活^[42]. 在体外培养的神经元和内皮细胞中, 白藜芦醇激活AMPK, 并通过激活自噬对内皮细胞中游离脂肪酸诱导的氧化应激表现出保护作用^[43]. 二苯乙烯苷(stilbene glycoside)是从何首乌(*Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald)中分离得到的具有神经保护作用的单体成分. 机制研究表明, 二苯乙烯苷通过促进SIRT3/AMPK的表达, 促进缺血神经元线粒体自噬, 抑制细胞凋亡^[44]. Garciesculenxanthone B(GeB)是一种从藤黄(*Garcinia ham-burghy* Hook. f.)中提取出的咕吨酮类化合物, 可稳定蛋

白激酶PINK1, 并促进PINK1-Parkin介导的线粒体自噬, 对缺血再灌注诱导的小鼠脑损伤起到保护作用^[45]. 转录因子EB(transcription factor EB, TFEB)作为自噬体和溶酶体生物发生的主要调节因子, 通过激活自噬-溶酶体通路(autophagy-lysosomal pathway, ALP)对脑缺血诱导的神经元损伤具有神经保护作用^[46]. 番茄碱(tomatidine)是一种天然存在于茄科植物未成熟番茄(*Lycopersicon esculentum* Miller)中的甾体生物碱, 在哺乳动物细胞或线虫中可以激活自噬降解. 最新研究表明, 番茄碱能够通过促进溶酶体活性对缺血损伤的神经元细胞起到保护作用, 这种保护可能涉及到TFEB相关机制^[47]. 伪人参皂苷F11(pseudoginsenoside F11, PF11)是一种从西洋参(*Panax quiquefolium* L.)中分离出来的奥克梯隆型皂苷, 研究表明, PF11可通过促进钙调磷酸酶介导的TFEB核易位来减轻永久性脑缺血ALP功能障碍, 证实了PF11的抗脑缺血自噬机制^[48]. 黄芪甲苷IV(astragaloside IV)是从中药黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.)的干植物根中分离得到的小分子皂苷, 具有抗氧化、抗炎、抗病毒、抗衰老、抗血小板聚集等多种生物活性^[49]. 体内外研究表明, 黄芪甲苷IV通过增强脑缺血诱导的保护性自噬抑制细胞凋亡, 对缺氧缺血造成的脑损伤具有神经保护作用^[50]. 花青素(anthocyanin)是一种苯并吡喃衍生物, 广泛存在于绝大多数陆生植物的液泡中, 被报道可以减轻MCAO大鼠神经血管单元的损伤^[51]. 在ODG处理的SH-SY5Y细胞中, 花青素能显著增加细胞的自噬通量, 抑制氧化应激^[51]. 自噬激动剂RAPA可增强花青素的抗炎作用, 而自噬抑制剂3-MA则抑制花青素的神经细胞保护作用^[51].

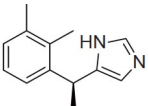
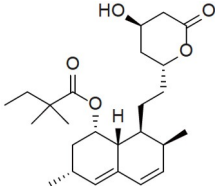
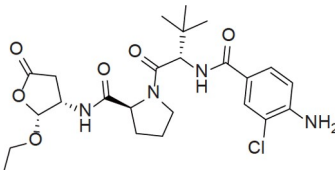
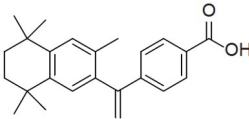
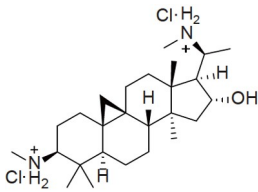
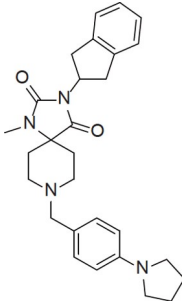
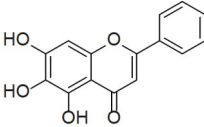
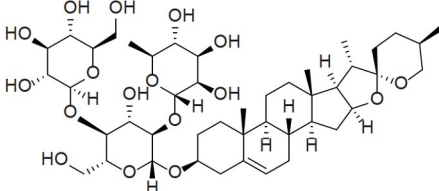
此外, 在长期的临床应用或实验室研究中, 许多治疗其他疾病的小分子化合物被发现具有诱导/促进自噬并减轻脑缺血损伤的作用. 异丙酚(propofol)作为一种静脉麻醉药, 具有起效和恢复时间快, 副作用少的优点, 被广泛应用于临床危重患者的麻醉和镇静^[52]. 临床用药中发现, 异丙酚在缺血性中风、脑缺血再灌注损伤、蛛网膜下腔出血、急性脑损伤等神经损伤病例中均表现出良好的保护作用. 在脑缺血再灌注大鼠模型中, 异丙酚预处理可以激活PI3K/Akt信号通路从而激活细胞保护性自噬, 减轻大脑损伤, 而PI3K/Akt通路抑制剂LY294002可以逆转异丙酚的神经保护作用^[53]. 右旋美托咪啶(dexmedetomidine, DEX)是一种选

表 1 脑缺血疾病中的自噬调节剂及其作用机制

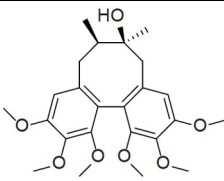
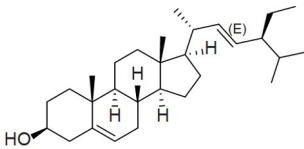
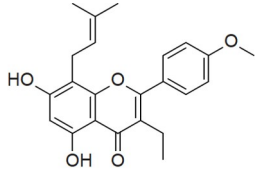
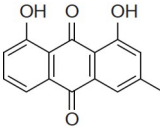
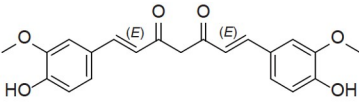
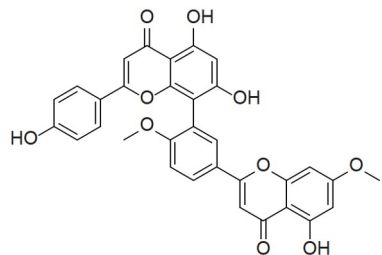
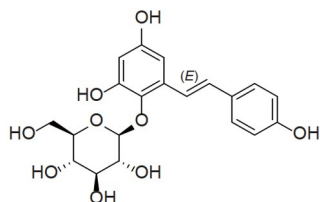
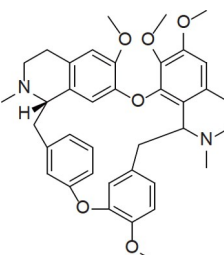
Table 1 Autophagy modulators in cerebral ischemia disease and their mechanisms of action

化合物	化学结构	对自噬的影响	机制	研究对象
丁香酚 ^[41]		诱导	AMPK/mTOR/P70S6K	HT22细胞; Sprague-Dawley大鼠
白藜芦醇 ^[42,43]		诱导	AMPK	Wistar大鼠
二苯乙烯苷 ^[44]		促进		
Garciesculenxanthone B ^[45]		促进	PINK1-Parkin	YFP-Parkin HeLa细胞; SH-SY5Y细胞; C57BL/6小鼠
番茄碱 ^[47]		促进	TFEB	C57BL/6小鼠; 小鼠神经母细胞瘤2a (N2a)细胞
伪人参皂苷F11 ^[48]		减轻自噬-溶酶体通路功能障碍	TFEB	Sprague-Dawley大鼠
黄芪甲苷IV ^[49,50]		促进	Bax/Bcl-2↓; LC3II/LC3I↑; p62↓	HT22细胞; Sprague-Dawley大鼠
花青素 ^[51]		促进	LC3BI↑; SQSTM1↓	SH-SY5Y细胞
异丙酚 ^[52,53]		促进	PI3K/Akt	Wistar大鼠

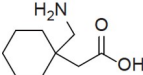
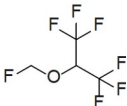
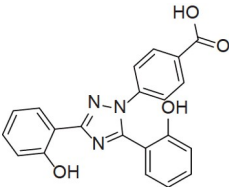
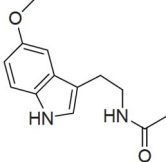
(表1续1)

化合物	化学结构	对自噬的影响	机制	研究对象
右旋美托咪啶 ^[54-56]		诱导	PI3K/Akt, HIF-1 α , TSC2/mTOR	C57/BL6小鼠
辛伐他汀 ^[59]		促进	mTOR/SIRT1	Sprague-Dawley 大鼠
VX-765 ^[60-62]		激活	AMPK/mTOR	Sprague-Dawley 大鼠
贝沙罗汀 ^[63]		减少自噬通量	LC3B $\downarrow$; p62 $\uparrow$	N2a细胞; P301L-Tau TG小鼠
JLX-001 ^[65]		诱导	AMPK-ULK1	Sprague-Dawley 大鼠
化合物R6 ^[66]		诱导	mTOR	U2OS_Bim细胞; Sprague-Dawley 大鼠
黄芩苷 ^[67,68]		抑制	PI3K/Akt/mTOR	Sprague-Dawley 大鼠
三角叶薯蓣皂苷 ^[69]		抑制	PI3K/Akt/mTOR	Sprague-Dawley 大鼠

(表1续2)

化合物	化学结构	对自噬的影响	机制	研究对象
五味子甲素 ^[70,71]		抑制	AMPK/mTOR	PC12细胞; C57BL/6J小鼠
二氯甲烷 ^[72]	CH ₂ Cl ₂	抑制	Akt/mTOR	Sprague-Dawley 大鼠
豆甾醇 ^[73]		失活	AMPK/mTOR; JNK	Wistar大鼠
淫羊藿次苷 II ^[78]		抑制	GSK-3β	Sprague-Dawley 大鼠
大黄酚 ^[79]		抑制	NIX	昆明小鼠
姜黄素 ^[81]		抑制	HIF-1α	PC12细胞
银杏双黄酮 ^[82]		抑制	NF-κB/p53	Sprague-Dawley 大鼠
四羟基二苯乙烯苷 ^[83,84]		抑制	NADPH-induced OS	昆明小鼠
粉防己碱 ^[85]		抑制	LC3↓	Sprague-Dawley 大鼠

(表1续3)

化合物	化学结构	对自噬的影响	机制	研究对象
加巴喷丁 ^[86]		抑制	PI3K/Akt/mTOR	Sprague-Dawley大鼠
氯化锂 ^[87]	LiCl	抑制	mTOR	C57BL/6小鼠
七氟醚 ^[88]		抑制	TLR4/NF-κB	Sprague-Dawley大鼠
地拉罗司 ^[89]		抑制	intracellular Fe ²⁺ accumulation	SH-SY5Y细胞; ddY小鼠
褪黑素 ^[18,90,91]		抑制	NRSF, JAK2-STAT3	PC12细胞; Sprague-Dawley大鼠
		促进	SIRT3/AMPK/mTOR	C57/BL6小鼠

择性α₂肾上腺素受体激动剂, 在临床上广泛作为一种镇静剂使用。许多研究表明, α₂受体激动剂可以减弱缺血再灌注损伤引起的脑缺血、心脏骤停和肾缺血损伤等。DEX可调控PI3K/Akt信号通路保护大鼠C6胶质瘤细胞免受ODG诱导的损伤, 也可通过HIF-1α抑制神经元自噬对脑缺血后的损伤起到保护作用^[54,55]。而在星形胶质细胞中, DEX通过调控TSC2/mTOR信号通路激活自噬, 对ODG诱导的神经细胞急性缺血性损伤具有保护作用^[56]。他汀类药物是3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶抑制剂, 广泛应用于治疗有心血管疾病风险的高脂血症患者。此外, 在成人和新生儿缺血性脑损伤模型中, 他汀类药物也显示出保护作用^[57,58]。在低氧缺血诱导的脑损伤新生儿模型中, 辛伐他汀(simvastatin, Sim)预处理具有神经保护作用, 这种神经保护作用与mTOR/SIRT1的调节和自噬激活存在紧密联系^[59]。VX-765是一种选择性小分子caspase-1抑制剂, 在体内外均可通过血脑屏障减少炎症反应, 在临床上已被用于治疗癫痫^[60,61]。此外, 机制研究表明, VX-765在体内外通过AMPK/mTOR信号通路激活自噬, 保护人脐带间充质干细胞(human umbilical mesenchymal

stem cells, HUMSCs)免受缺血诱导的炎症反应和凋亡^[62]。贝沙罗汀(bexarotene)是一种维甲酸X受体(retinoid X receptor, RXR)激动剂, 临床批准用于治疗难治性皮肤T细胞淋巴瘤。贝沙罗汀可以增加LC3B和p62的表达水平, 通过减少自噬通量对缺血后神经损伤起神经保护作用, 改善老年小鼠血栓栓塞性中风^[63]。三萜生物碱环维黄杨星D(cycloviobuxine D, CVB-D)是从中药黄杨(Buxus sinica (Rehder & E. H. Wilson) M. Cheng)中提取的主要活性成分, 临床已被用于治疗心脏病、心肌梗死和心律失常等疾病^[64]。JLX-001是化学合成的CVB-D二盐酸盐, 在MCAO再灌注所致大鼠局灶性脑缺血模型中, 能起到减轻缺血性中风损伤的作用, 机制研究发现, JLX-001是通过激活AMPK-ULK1信号通路诱导自噬来发挥神经保护作用^[65]。Cao等人^[66]研究表明, 化合物R6(3-(2,3-dihydro-1H-inden-2-yl)-1-ethyl-8-(4-(pyrrolidin-1-yl)benzyl)-1,3,8-triazaspiro[4.5]decane-2,4-dione)可以通过抑制mTOR激活自噬, 阻止细胞凋亡, 对大鼠脑缺血再灌注模型具有显著的神经保护作用, 显示出作为神经退行性疾病治疗候选药物的潜力。

3.2 抑制或阻断自噬的药物

一些天然来源小分子化合物可以通过抑制/阻断自噬过程对脑缺血损伤起到治疗作用. 黄芩苷(5,6,7-trihydroxyflavone, baicalein)是从中药黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)中提取的主要活性成分^[67]. 在缺血性中风急性期和亚急性期给予黄芩苷均显示出良好的治疗前景, 在亚急性期期间给药时, 黄芩苷通过促进PI3K/Akt/mTOR信号通路磷酸化抑制自噬, 对缺血再灌注损伤表现出神经保护作用^[68]. 三角叶薯蓣皂苷(deltonin)是从盾叶薯蓣(*Dioscorea zingiberensis* C. H. Wright)中分离得到的活性成分之一, 它可以通过调节PI3K/Akt/mTOR信号通路降低自噬活性, 对缺血性中风起到神经保护作用^[69]. 五味子甲素(schizandrin A, SA)是从中药五味子(*Schisandra Chinensis* (Turcz.) Baill.)中分离得到的木脂素类化合物, 具有抗肿瘤、抗炎、抗肝损伤等多种细胞保护活性^[70]. 此外, SA还可通过调节AMPK/mTOR信号通路抑制自噬来改善脑缺血再灌注损伤, 在保护脑缺血神经元方面具有治疗价值^[71]. 胡椒(*Piper nigrum* L.和*P. longum* L.)是一种中国传统中草药, 其中二氯甲烷(dichloromethane)组分在MCAO模型中具有神经保护作用. 机制研究表明, 二氯甲烷通过激活Akt/mTOR信号通路抑制凋亡和自噬来减轻缺血性脑损伤^[72]. 豆甾醇(stigmasterol)是一种天然存在的甾体类衍生物, 显示出良好的抗癌、抗氧化应激等活性. 在脑缺血再灌注大鼠模型中, 豆甾醇的神经保护作用可能与通过AMPK/mTOR和JNK信号通路降低氧化应激和自噬失活相关^[73]. 金纳多(ginaton)是银杏(*Ginkgo biloba* L.)叶提取物, 其主要成分为萜类化合物、黄酮类化合物、烷基酚、聚戊烯醇和有机酸, 在我国被广泛应用于治疗急性缺血性中风^[74]. 机制研究表明, 金纳多通过激活AMPK通路诱导细胞自噬, 同时可维持线粒体稳态和抑制细胞凋亡^[75]. 木香油方是回药的经典方剂, 主要由木香(*Aucklandia lappa Dence*)、胡椒(*Piper nigrum* L.)、大戟(*Euphorbia pekinensis* Rupr)、细辛(*sarum heterotropoides* Fr. Var. *mandshuricum* (Maxim.) kitag.)和海狗肾(*Callorhinus ursinus* Linnaeus)五味药材组成^[76]. 研究表明, 木香油方可以通过AMPK/mTOR信号通路抑制缺氧缺血诱导的细胞自噬, 对缺血性中风具有治疗潜力^[77]. 淫羊藿次苷II(icariside II, ICS II)是中药淫羊藿(*Epimedium*

brevicornu Maxim.)的主要活性成分之一, 具有抗氧化作用, 表现出神经保护功能. ICS II预处理可以改善沙鼠脑缺血再灌注后的脑微循环障碍, 减轻海马神经元损伤. 研究表明, ICS II可以直接与PDE 5和GSK-3 β 结合, 通过抑制GSK-3 β 介导的自噬激活来减轻脑OGD和缺血导致的损伤^[78]. 中药大黄(*Rheum palmatum* L.)通过抗氧化、抗炎、抑制神经元凋亡等多种机制对脑缺血再灌注损伤具有神经保护作用, 其中大黄酚(chrysophanol)是大黄的有效成分之一. 在脑缺血再灌注小鼠模型中, 大黄酚可能通过线粒体受体Nip3-like protein X(NIX)蛋白调控线粒体自噬, 通过降低线粒体自噬水平来减轻缺血再灌注对海马的损伤^[79]. 姜黄素(curcumin)是从姜黄(*Curcuma longa* L.)中分离出来的一种脂溶性酚类色素, 具有抗炎和抗氧化的药理活性. HIF-1 α 被认为是脑缺血再灌注的重要调节因子, HIF-1 α 表达水平升高可以诱导缺血器官的自噬激活^[80]. 在缺血再灌注的PC12细胞模型中, 姜黄素处理可减少细胞凋亡, 抑制自噬和HIF-1 α 表达水平, 且自噬与HIF-1 α 具有相互调节作用, 即抑制自噬可降低HIF-1 α 的表达, 降低HIF-1 α 又可导致自噬抑制^[81]. 银杏双黄酮(ginkgetin)也是银杏叶提取物, 主要成分是银杏黄酮苷. 与金纳多相反, 银杏双黄酮可通过抑制NF- κ B/p53信号通路减轻脑缺血再灌注诱导的自噬和凋亡^[82]. 四羟基二苯乙烯苷(tetrahydroxystilbene glucoside, TSG)是中药何首乌(*Fallopia multiflora* (Thunb.) Harald.)的主要活性成分, 具有抗氧化、抗炎、降血脂和神经保护作用等广泛的药理活性, 在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)小鼠模型中可以通过抑制自噬发挥抗AD的作用^[83]; 在脑缺血再灌注小鼠模型中, 通过抑制NADPH诱导的氧自由基, 减少神经元凋亡和自噬发挥保护作用^[84]. 粉防己碱(tetrandrine, Tet)是一种从防己(*Stephania tetrandra* S. Moore)根中分离得到的双苄基异喹啉类生物碱, 具有抗炎、抗癌、免疫抑制等生物活性, 广泛应用于我国临床. Tet对缺血后的氧化损伤具有保护作用, 表现为一氧化氮和丙二醛水平降低, 谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶水平升高, 降低自噬标志物LC3水平, 通过降低缺血再灌注的亚急性期神经元的氧化应激、凋亡和自噬减轻神经元损伤^[85].

临床上一些具有其他适应症的小分子药物, 也通过研究证明具有抑制/阻断自噬治疗脑缺血损伤的能力. 加巴喷丁(gabapentin, GBP)是一种临床常用的镇痛

药, 辅助抗癫痫药和预防偏头痛的药物, 可减少脑缺血再灌注引起的神经元损伤. 体内外研究表明, GBP剂量依赖性预处理通过激活PI3K/Akt/mTOR信号通路降低自噬水平和活性氧自由基水平, 对脑缺血再灌注损伤提供神经保护功能^[86]. 锂(lithium)是一种常用的抑郁症治疗药物, 已被证明可以减轻神经退行性疾病和急性脑损伤引起的认知障碍, 具有神经保护作用. 研究表明, 氯化锂(lithium chloride, LiCl)可以通过激活mTOR抑制过度自噬来减轻反复脑缺血再灌注导致的认知障碍, 是一种很有应用前景的治疗药物^[87]. 七氟醚(sevoflurane)是一种常用于神经外科的挥发性麻醉剂, 临床用药发现七氟醚后处理具有神经保护作用. 在MCAO大鼠模型中, 七氟醚后处理可以通过抑制自噬和凋亡来缓解大脑损伤, 其机制与TLR4/NF- κ B信号通路相关^[88]. 地拉罗司(deferasirox)是美国FDA批准的第一个能够常规使用的口服驱铁剂, 用于治疗输血后的慢性铁负荷过多. 细胞内铁的快速积累可能诱导铁蛋白的增加, 从而导致自噬和凋亡相关的细胞死亡. 地拉罗司对脑缺血表现出神经保护作用, 并通过抑制铁的积累, 表现出抗自噬和抗凋亡作用^[89].

此外, 研究发现某些化合物对自噬的调节具有双重作用, 既可以通过诱导自噬改善脑缺血损伤, 又可以通过抑制自噬保护神经元细胞的过度损伤. 褪黑素(melatonin, MT)是人大脑中分泌的一种神经激素, 具有抗凋亡、抗炎和抗氧化应激的特点, 在脑缺血再灌注中发挥重要的神经保护作用^[18]. 体内外研究表明, MT可以通过调控miR-26a-5p-神经元限制性沉默因子(neuron-restrictive silencing factor, NRSF)和JAK2-STAT3信号通路, 改善脑缺血再灌注损伤诱导的自噬、炎症和氧化应激, 为缺血性中风等中枢神经系统疾病提供新的治疗思路^[90]. 相反, 另有研究表明, MT

可以促进MCAO后SIRT3的表达, 并通过SIRT3信号通路减轻脑缺血再灌注损伤, 而SIRT3通过调节AMPK/mTOR通路诱导自噬来保护神经元免受氧和葡萄糖剥夺损伤^[91,92].

4 总结和展望

调控自噬作为一种新的缺血性脑损伤治疗方式已经得到诸多关注, 目前已有大量调控自噬的化合物研究. 但自噬在脑缺血中是有益还是有害至今仍存在争议, 未有针对调节自噬治疗中风的临床试验, 因此自噬在脑缺血中的机制和相关治疗药物还具有很大的研究价值. 自噬被认为是一种保护缺血神经元的内源性策略, 而过度自噬却加重缺血神经元的损伤. 在脑缺血再灌注期间诱导的自噬激活通过清除损伤细胞器和内容物对细胞起到保护作用; 而在缺血损伤后的慢性期, 自噬可能加重细胞损伤促进细胞凋亡, 在这个阶段抑制自噬反而会减轻脑损伤, 对神经元起到保护作用. 总地来说, 自噬是否有益于脑缺血, 或许取决于其在脑缺血中激活的程度或是发挥作用的阶段. 目前, 已发现许多小分子化合物通过调控自噬对脑缺血发挥神经保护作用, 化合物通过不同的信号通路或者靶点激活、促进自噬或阻断、抑制自噬, 甚至同一个化合物在脑缺血中通过不同的信号通路调控自噬, 改善缺血导致的神经元损伤, 为治疗缺血脑中风提供新的治疗策略. 本文总结的近三年来研究的化合物大多是天然产物, 它们通过调节自噬在神经系统疾病中具有很好的潜在应用价值, 为今后寻找新的脑缺血损伤治疗药物提供了方向. 此外, 部分化合物是从临床应用中发现具有调节自噬治疗脑缺血损伤的潜力, 这为治疗缺血性脑损伤提供了新思路.

参考文献

- 1 Benjamin E J, Blaha M J, Chiuve S E, et al. Heart disease and stroke statistics—2017 update: a report from the american heart association. *Circulation*, 2017, 135: e146
- 2 Medcalf R L. Plasminogen activation-based thrombolysis for ischaemic stroke: the diversity of targets may demand new approaches. *Curr Drug Targets*, 2011, 12: 1772–1781
- 3 Hafez S, Hoda M N, Guo X, et al. Comparative analysis of different methods of ischemia/reperfusion in hyperglycemic stroke outcomes: interaction with tPA. *Transl Stroke Res*, 2015, 6: 171–180
- 4 Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 2008, 359: 1317–1329

- 5 Galluzzi L, Bravo-San Pedro J M, Levine B, et al. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. *Nat Rev Drug Discov*, 2017, 16: 487–511
- 6 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 Neurosci*, 1995, 15: 1001–1011
- 7 Kuma A, Hatano M, Matsui M, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature*, 2004, 432: 1032–1036
- 8 Liu J, Guo Z N, Yan X L, et al. Crosstalk between autophagy and ferroptosis and its putative role in ischemic stroke. *Front Cell Neurosci*, 2020, 14: 577403
- 9 Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat Cell Biol*, 2018, 20: 521–527
- 10 Levy J M M, Towers C G, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17: 528–542
- 11 Zhang J, Wang G, Zhou Y, et al. Mechanisms of autophagy and relevant small-molecule compounds for targeted cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 1803–1826
- 12 Mizushima N, Levine B. Autophagy in human diseases. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1564–1576
- 13 Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32: 37–43
- 14 Loi M, Fregno I, Guerra C, et al. Eat it right: ER-phagy and recovER-phagy. *Biochem Soc Trans*, 2018, 46: 699–706
- 15 Cheung E C, Ludwig R L, Vousden K H. Mitochondrial localization of TIGAR under hypoxia stimulates HK2 and lowers ROS and cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 20491–20496
- 16 Liu L, Feng D, Chen G, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 2012, 14: 177–185
- 17 Kim H J, Joe Y, Kim S K, et al. Carbon monoxide protects against hepatic steatosis in mice by inducing sestrin-2 via the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway. *Free Radic Biol Med*, 2017, 110: 81–91
- 18 Wu J, Bai Y, Wang Y, et al. Melatonin and regulation of autophagy: mechanisms and therapeutic implications. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105279
- 19 Thangaraj A, Sil S, Tripathi A, et al. Targeting endoplasmic reticulum stress and autophagy as therapeutic approaches for neurological diseases. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. New York: Academic Press, 2020. 285–325
- 20 Song S, Tan J, Miao Y, et al. Crosstalk of ER stress-mediated autophagy and ER-phagy: involvement of UPR and the core autophagy machinery. *J Cell Physiol*, 2018, 233: 3867–3874
- 21 Gabryel B, Kost A, Kasprowska D. Neuronal autophagy in cerebral ischemia—a potential target for neuroprotective strategies? *Pharmacol Rep*, 2012, 64: 1–15
- 22 Li J, McCullough L D. Effects of AMP-activated protein kinase in cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30: 480–492
- 23 Simon B, Huat A S, Temmerman K, et al. Death-associated protein kinase activity is regulated by coupled calcium/calmodulin binding to two distinct sites. *Structure*, 2016, 24: 851–861
- 24 Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, et al. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-X_L. *Autophagy*, 2009, 5: 720–722
- 25 Sheng R, Liu X Q, Zhang L S, et al. Autophagy regulates endoplasmic reticulum stress in ischemic preconditioning. *Autophagy*, 2012, 8: 310–325
- 26 Wang J Y, Xia Q, Chu K T, 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 Neuropathol Exp Neurol*, 2011, 70: 314–322
- 27 Wu X L, Lu S S, Liu M R, et al. Melatonin receptor agonist ramelteon attenuates mouse acute and chronic ischemic brain injury. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41: 1016–1024
- 28 Wang P, Guan Y F, Du H, et al. Induction of autophagy contributes to the neuroprotection of nicotinamide phosphoribosyltransferase in cerebral ischemia. *Autophagy*, 2012, 8: 77–87
- 29 Buckley K M, Hess D L, Sazonova I Y, et al. Rapamycin up-regulation of autophagy reduces infarct size and improves outcomes in both permanent MCAO, and embolic MCAO, murine models of stroke. *Exp Trans Stroke Med*, 2014, 6: 8
- 30 Fan J, Zhang Z, Chao X, et al. Ischemic preconditioning enhances autophagy but suppresses autophagic cell death in rat spinal neurons following ischemia-reperfusion. *Brain Res*, 2014, 1562: 76–86
- 31 Xu H D, Qin Z H. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy. In: Qin Z H, ed. *Autophagy: Biology and Diseases*. Advances in Experimental Medicine and

- Biology. Singapore: Springer, 2019. 109–126
- 32 Wang H L, Liu F L, Li R Q, et al. Electroacupuncture improves learning and memory functions in a rat cerebral ischemia/reperfusion injury model through PI3K/Akt signaling pathway activation. *Neural Regen Res*, 2021, 16: 1011–1016
- 33 Carloni S, Girelli S, Scopa C, et al. Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy*, 2010, 6: 366–377
- 34 Wen Y D, Sheng R, Zhang L S, et al. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy*, 2008, 4: 762–769
- 35 Adhami F, Liao G, Morozov Y M, et al. Cerebral ischemia-hypoxia induces intravascular coagulation and autophagy. *Am J Pathol*, 2006, 169: 566–583
- 36 Zheng Y Q, Liu J X, Li X Z, et al. RNA interference-mediated downregulation of Beclin1 attenuates cerebral ischemic injury in rats. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 919–927
- 37 Xing S, Zhang Y, Li J, et al. Beclin 1 knockdown inhibits autophagic activation and prevents the secondary neurodegenerative damage in the ipsilateral thalamus following focal cerebral infarction. *Autophagy*, 2012, 8: 63–76
- 38 Li J, Zeng Z, Viollet B, et al. Neuroprotective effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke. *Stroke*, 2007, 38: 2992–2999
- 39 Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, et al. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *Am J Pathol*, 2008, 172: 454–469
- 40 Xie C, Ginet V, Sun Y, et al. Neuroprotection by selective neuronal deletion of *Atg7* in neonatal brain injury. *Autophagy*, 2016, 12: 410–423
- 41 Sun X, Wang D, Zhang T, et al. Eugenol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy via AMPK-mTOR-P70S6K pathway. *Front Pharmacol*, 2020, 11
- 42 Madrigal-Perez L A, Ramos-Gomez M. Resveratrol inhibition of cellular respiration: new paradigm for an old mechanism. *Int J Mol Sci*, 2016, 17: 368
- 43 Pineda-Ramírez N, Alquisiras-Burgos I, Ortiz-Plata A, et al. Resveratrol activates neuronal autophagy through AMPK in the ischemic brain. *Mol Neurobiol*, 2020, 57: 1055–1069
- 44 Li Y, Hu K, Liang M, et al. Stilbene glycoside upregulates SIRT3/AMPK to promotes neuronal mitochondrial autophagy and inhibit apoptosis in ischemic stroke. *Adv Clin Exp Med*, 2021, 30: 139–146
- 45 Wu M, Lu G, Lao Y Z, et al. Garcisculenxanthone B induces PINK1-Parkin-mediated mitophagy and prevents ischemia-reperfusion brain injury in mice. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42: 199–208
- 46 Tan S, Yu C Y, Sim Z W, et al. Pomegranate activates TFEB to promote autophagy-lysosomal fitness and mitophagy. *Sci Rep*, 2019, 9: 727
- 47 Ahsan A, Zheng Y, Ma S, et al. Tomatidine protects against ischemic neuronal injury by improving lysosomal function. *Eur J Pharmacol*, 2020, 882: 173280
- 48 Fu X, Liu Y, Zhang H, et al. Pseudoginsenoside F11 ameliorates the dysfunction of the autophagy-lysosomal pathway by activating calcineurin-mediated TFEB nuclear translocation in neuron during permanent cerebral ischemia. *Exp Neurol*, 2021, 338: 113598
- 49 Huang X P, Tan H, Chen B Y, et al. *Astragalus* extract alleviates nerve injury after cerebral ischemia by improving energy metabolism and inhibiting apoptosis. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35: 449–454
- 50 Zhang Y, Zhang Y, Jin X F, et al. The role of astragaloside IV against cerebral ischemia/reperfusion injury: suppression of apoptosis via promotion of P62-LC3-autophagy. *Molecules*, 2019, 24: 1838
- 51 Cai Y, Li X, Pan Z, et al. Anthocyanin ameliorates hypoxia and ischemia induced inflammation and apoptosis by increasing autophagic flux in SH-SY5Y cells. *Eur J Pharmacol*, 2020, 883: 173360
- 52 Wehrmann T, Triantafyllou K. Propofol sedation in gastrointestinal endoscopy: a gastroenterologist's perspective. *Digestion*, 2010, 82: 106–109
- 53 Chen Y, Li Z. Protective effects of propofol on rats with cerebral ischemia-reperfusion injury via the PI3K/Akt pathway. *J Mol Neurosci*, 2021, 71: 810–820
- 54 Zhang F, Ding T, Yu L, et al. Dexmedetomidine protects against oxygen-glucose deprivation-induced injury through the I2 imidazoline receptor-PI3K/AKT pathway in rat C6 glioma cells. *J Pharmacy Pharmacol*, 2012, 64: 120–127
- 55 Luo C, Ouyang M W, Fang Y Y, et al. Dexmedetomidine protects mouse brain from ischemia-reperfusion injury via inhibiting neuronal autophagy through up-regulating HIF-1 α . *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 197

- 56 Zhu C, Zhou Q, Luo C, et al. Dexmedetomidine protects against oxygen-glucose deprivation-induced injury through inducing astrocytes autophagy via TSC2/mTOR pathway. *Neuromol Med*, 2020, 22: 210–217
- 57 Saeedi Saravi S S, Saeedi Saravi S S, Arefidoust A, et al. The beneficial effects of HMG-CoA reductase inhibitors in the processes of neurodegeneration. *Metab Brain Dis*, 2017, 32: 949–965
- 58 Carloni S, Girelli S, Buonocore G, et al. Simvastatin acutely reduces ischemic brain damage in the immature rat via Akt and CREB activation. *Exp Neurol*, 2009, 220: 82–89
- 59 Carloni S, Balduini W. Simvastatin preconditioning confers neuroprotection against hypoxia-ischemia induced brain damage in neonatal rats via autophagy and silent information regulator 1 (SIRT1) activation. *Exp Neurol*, 2020, 324: 113117
- 60 Boxer M B, Quinn A M, Shen M, et al. A highly potent and selective caspase 1 inhibitor that utilizes a key 3-cyanopropanoic acid moiety. *Chemmedchem*, 2010, 5: 730–738
- 61 Bialer M, Johannessen S I, Levy R H, et al. Progress report on new antiepileptic drugs: a summary of the Eleventh Eilat Conference (EILAT XI). *Epilepsy Res*, 2013, 103: 2–30
- 62 Sun Z, Gu L, Wu K, et al. VX-765 enhances autophagy of human umbilical cord mesenchymal stem cells against stroke-induced apoptosis and inflammatory responses via AMPK/mTOR signaling pathway. *CNS Neurosci Ther*, 2020, 26: 952–961
- 63 Huuskonen M T, Loppi S, Dhungana H, et al. Bexarotene targets autophagy and is protective against thromboembolic stroke in aged mice with tauopathy. *Sci Rep*, 2016, 6: 33176
- 64 Guo Q, Guo J, Yang R, et al. Cyclovirobuxine D attenuates doxorubicin-induced cardiomyopathy by suppression of oxidative damage and mitochondrial biogenesis impairment. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 1–11
- 65 Ao L Y, Li W T, Zhou L, et al. Therapeutic effects of JLX-001 on ischemic stroke by inducing autophagy via AMPK-ULK1 signaling pathway in rats. *Brain Res Bull*, 2019, 153: 162–170
- 66 Cao R, Li L, Ying Z, et al. A small molecule protects mitochondrial integrity by inhibiting mTOR activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116: 23332–23338
- 67 Liang W, Huang X, Chen W. The effects of baicalin and baicalein on cerebral ischemia: a review. *Aging Dis*, 2017, 8: 850–867
- 68 Yang S, Wang H, Yang Y, et al. Baicalein administered in the subacute phase ameliorates ischemia-reperfusion-induced brain injury by reducing neuroinflammation and neuronal damage. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 109102
- 69 Zhang Y, Tian Z, Wan H, et al. Deltonin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury in correlation with modulation of autophagy and inflammation. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16: 871–879
- 70 Sowndhararajan K, Deepa P, Kim M, et al. An overview of neuroprotective and cognitive enhancement properties of lignans from *Schisandra chinensis*. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 958–968
- 71 Wang G, Wang T, Zhang Y, et al. Schizandrin protects against OGD/R-induced neuronal injury by suppressing autophagy: involvement of the AMPK/mTOR pathway. *Molecules*, 2019, 24: 3624
- 72 Zhang Y, He Q, Yang M, et al. Dichloromethane extraction from *Piper nigrum* L. and *P. longum* L. to mitigate ischemic stroke by activating the AKT/mTOR signaling pathway to suppress autophagy. *Brain Res*, 2020, 1749: 147047
- 73 Sun J, Li X, Liu J, et al. Stigmasterol exerts neuro-protective effect against ischemic/reperfusion injury through reduction of oxidative stress and inactivation of autophagy. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 2991–3001
- 74 Yang X, Zheng T, Hong H, et al. Neuroprotective effects of *Ginkgo biloba* extract and Ginkgolide B against oxygen-glucose deprivation/reoxygenation and glucose injury in a new in vitro multicellular network model. *Front Med*, 2018, 12: 307–318
- 75 Li X, Zhang D, Bai Y, et al. Ginaton improves neurological function in ischemic stroke rats via inducing autophagy and maintaining mitochondrial homeostasis. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2019, 15: 1813–1822
- 76 Zhao Q, Cheng X, Wang X, et al. Neuroprotective effect and mechanism of Mu-Xiang-You-Fang on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *J Ethnopharmacol*, 2016, 192: 140–147
- 77 Ma H X, Hou F, Chen A L, et al. Mu-Xiang-You-Fang protects PC12 cells against OGD/R-induced autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway. *J Ethnopharmacol*, 2020, 252: 112583
- 78 Gao J, Long L, Xu F, et al. Icariside II, a phosphodiesterase 5 inhibitor, attenuates cerebral ischaemia/reperfusion injury by inhibiting glycogen synthase kinase-3 β -mediated activation of autophagy. *Br J Pharmacol*, 2020, 177: 1434–1452
- 79 Cui W H, Zhang H H, Qu Z M, et al. Effects of chrysophanol on hippocampal damage and mitochondrial autophagy in mice with cerebral

- ischemia reperfusion. *Int J Neurosci*, 2020, doi: 10.1080/00207454.2020.1830085
- 80 Bartczek P, Li L, Ernst A S, et al. Neuronal HIF-1 α and HIF-2 α deficiency improves neuronal survival and sensorimotor function in the early acute phase after ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2017, 37: 291–306
- 81 Hou Y, Wang J, Feng J. The neuroprotective effects of curcumin are associated with the regulation of the reciprocal function between autophagy and HIF-1 α in cerebral ischemia-reperfusion injury. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 1135–1144
- 82 Pan J, Li X, Guo F, et al. Ginkgetin attenuates cerebral ischemia-reperfusion induced autophagy and cell death via modulation of the NF- κ B/p53 signaling pathway. *Biosci Rep*, 2019, 39
- 83 Hongbo L, Yun L, Jiankui G, et al. Tetrahydroxy stilbene glucoside improved the behavioral disorders of APP695V717I transgenic mice by inhibiting the expression of Beclin-1 and LC3-II. *J Trad Chin Med*, 2015, 35: 295–300
- 84 Yu F, Xue W, Dong L, et al. Tetrahydroxystilbene glucoside suppresses NADPH oxidative stress to mitigate apoptosis and autophagy induced by cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 1–9
- 85 Wang Y, Cai X, Wu Z, et al. Tetrandrine attenuates ischemia/reperfusion-induced neuronal damage in the subacute phase. *Mol Med Rep*, 2021, 23: 297
- 86 Yan B C, Wang J, Rui Y, et al. Neuroprotective effects of gabapentin against cerebral ischemia reperfusion-induced neuronal autophagic injury via regulation of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathways. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2019, 78: 157–171
- 87 Xiao Y, Fan M, Jin W, et al. Lithium chloride ameliorated spatial cognitive impairment through activating mTOR phosphorylation and inhibiting excessive autophagy in the repeated cerebral ischemia-reperfusion mouse model. *Exp Ther Med*, 2020, 20: 1
- 88 Shi C X, Jin J, Wang X Q, et al. Sevoflurane attenuates brain damage through inhibiting autophagy and apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion rats. *Mol Med Rep*, 2020, 21: 123–130
- 89 Imai T, Tsuji S, Matsubara H, et al. Deferasirox, a trivalent iron chelator, ameliorates neuronal damage in hemorrhagic stroke models. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2021, 394: 73–84
- 90 Yang B, Zang L E, Cui J W, et al. Melatonin plays a protective role by regulating miR-26a-5p-NRSF and JAK2-STAT3 pathway to improve autophagy, inflammation and oxidative stress of cerebral ischemia-reperfusion injury. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 3177–3188
- 91 Liu L, Chen H, Jin J, et al. Melatonin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through SIRT3 activation. *Life Sci*, 2019, 239: 117036
- 92 Dai S H, Chen T, Li X, et al. Sirt3 confers protection against neuronal ischemia by inducing autophagy: involvement of the AMPK-mTOR pathway. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 345–353

The dual effects of autophagy in cerebral ischemia and small-molecular therapeutic drugs

BU FaQian¹, ZHANG JiFa¹, SHUAI Wen¹, HE Long^{1,2} & OUYANG Liang¹

¹ State Key Laboratory of Biotherapy and Cancer Center, West China Hospital, and Collaborative Innovation Center of Biotherapy, Sichuan University, Chengdu 610041, China;

² BEIJING ZHONGGUANCUN ENTERPRISE ASSOCIATION OF BIOTECH.& PHARMA, Beijing 100101, China

Autophagy is an intracellular degradation system through a lysosome-dependent pathway, which plays a critical role in maintaining cell homeostasis and survival. An increasing number of studies have shown that autophagy is important in the development of ischemia neuron injury with dual effects. Many compounds have been discovered to exhibit a neuroprotective effect through regulating autophagy in ischemia/reperfusion injury, and are expected to become potential drugs for the treatment of ischemic stroke. In this review, the modulation of autophagy in cerebral ischemia as well as its dual effects is discussed, which may provide ideas for further studies on the relationship between cerebral ischemia and autophagy. In addition, the compounds that have been discovered in recent three years to treat cerebral ischemia by regulating autophagy and their mechanisms of action are summarized, and their potential applications in stroke treatment are discussed.

autophagy, cerebral ischemia injury, stroke, autophagy modulators

doi: [10.1360/SSV-2021-0091](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0091)



欧阳亮, 博士, 教授, 博士生导师, 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室研究员, 国家自然科学基金优秀青年基金获得者(2019年), 四川省天府科技菁英获得者(2020年), 四川省学术与技术带头人后备人选, 二十二届中国药学会-施维雅青年药物化学奖获得者(2019年), 中国医学科学院医学健康长寿青年奖掖项目获得者(2019年), 中国医学科学院医学健康长寿创新大赛优胜奖获得者(2020年), 四川大学好未来优秀学者奖获得者(2020年), 四川大学科技领军人才培养项目获得者. 现担任四川省药理学学会理事(2018至今), 四川省药理学学会肿瘤药理委员会委员(2017至今), 《药学报》, *Acta Pharmaceutica Sinica B*(2017至今), *Chinese Chemical Letters*(2017至今)青年编委, *Frontiers in Pharmacology* (2017至今), *Mini Review in Medicinal Chemistry*(2017至今), *Signal Transduction and Targeted Therapy*(2020至今)编委. 近年来, 作为项目负责人承担了国家自然科学基金5项, 重大新药创制科技重大专项子任务1项, 科技部国家重点研发计划子任务1项, 四川省科技厅重大项目. 受邀在国内外药物化学和转化医学学术会议作主旨报告6次, 参编英文专著3本. 在*Chemical Science*, *Journal of Medicinal Chemistry*, *Autophagy*等刊物发表SCI论文70余篇(第一或通讯40余篇), 总被引超4000次, 单篇最高被引超900次. 申请发明专利十余项, 部分专利正积极实现临床转化.