

自噬相关因素在缺血再灌注损伤中的研究进展

安民 黄雪竹*

(重庆市妇幼保健院手术麻醉科, 重庆 404000)

摘要:在缺血缺氧等应激状态下自噬作为机体的一种防御机制,通过适时清除损伤及老化的细胞器,维持细胞内环境的稳定以及细胞的正常生长。缺血再灌注损伤时,线粒体产生的活性氧爆发以及线粒体通透性的改变均可诱发自噬,而自噬对于维持细胞线粒体的功能也扮演着重要的角色。本文通过阐述自噬在缺血再灌注中的研究进展,特别是自噬与线粒体的相互作用与影响,揭示自噬功能的调节有可能成为缺血再灌注损伤中预防与治疗的潜在靶点。

关键词:自噬;缺血再灌注;线粒体;活性氧;线粒体通透性孔道

中图分类号:R614.27 **文献标识码:**A **doi:**10.16507/j.issn.1006-6055.2015.05.031

Progress of Autophagy Related Factors in Ischemia and Reperfusion Injury

AN Min HUANG Xuezhu*

(Department of Anesthesiology, Chongqing Health Center for Women and Children, Chongqing 404000)

Abstract:Autophagy clears the damage and the aging cells as a defense mechanism of the body under stress, such as ischemia and hypoxia, maintaining cell homeostasis and normal cell growth. The outbreak of ROS from mitochondrial and the change of mitochondrial permeability can induce specific cellular autophagy in ischemia and reperfusion (IR) injury, autophagy also plays an important role in the maintenance of mitochondrial function. Progress of autophagy related factors in ischemia and reperfusion is described, especially the function and influence between autophagy and mitochondria, revealing the function of regulating autophagy may become a potential target for the prevention and treatment in ischemia and reperfusion injury.

Key words:autophagy; ischemia and reperfusion; mitochondria; reactive oxygen species; mitochondrial permeability transition

1 引言

自噬是细胞依靠溶酶体对大批量老化或受损蛋白和细胞器进行降解的一条重要途径。在细胞缺乏营养或能量供应时,部分细胞质与细胞器被包裹入一种特异性的双层膜或多层膜结构自噬体(auto-phagosome)中,形成的自噬体再与溶酶体融合形成自噬溶酶体(autolysosome),降解其所包裹的内容物。细胞自噬可以是非选择性的,在生理情况下将细胞质及细胞器降解为氨基酸、游离脂肪酸等小分子物质,再重新利用这些物质合成大分子或者三磷酸腺苷 ATP,从而为饥饿或缺血缺氧的细胞提供基本能量^[1]。而选择性自噬则主要是在营养供应条件下发生的靶物特异性自噬(如线粒体、过氧化物酶体的自噬等),主要用于清除受损的细胞器,防止其对细胞造成进一步损伤^[2]。

近年来越来越多的研究表明,线粒体自噬在维持细胞内线粒体的正常功能和基因组稳定性上起着重要作用。Lemasters^[3]首次提出了线粒体自噬(mitophagy)的概念,在活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生、营养缺乏、细胞衰老等外界刺激的作用下,细胞内的线粒体发生去极化损伤,损伤的线粒体被特异性地包裹进入自噬体中并与溶酶体融合,从而完成损伤线粒体的降解^[4]。同时,线粒体也是细胞凋亡的参与者,可调控细胞的凋亡途径。线粒体自噬作为一种防御机制,能够清除损伤的线粒体,确保细胞内线粒体功能稳定,提高应激环境中细胞的存活能力,而如果线粒体自噬的防御功能得不到充分发挥,各种损害因素就会诱导细胞凋亡。已有研究表明,线粒体自噬更多地参与了神经退行性疾病以及衰老相关疾病的调控,但其在组织缺血性损伤中的作用及机制研究尚处于起步阶段^[5]。

2 缺血再灌注中与自噬相关的因素

缺血再灌注时,各种有害因素的产生会对组织

2015-04-07 收稿,2015-05-01 接受

* 通讯作者: E-mail:441030968@qq.com

器官造成损伤。为了减少这种损伤,机体会通过激活自噬或者凋亡来维持内环境的氧化还原稳态。细胞中的雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是调节自噬的关键因子。mTOR 的活化状态抑制细胞的自噬作用。在缺血缺氧时,AMP/ATP 比值增加,AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)活性增强,磷酸化激活结节性硬化复合物 1/2 (tuberous sclerosis proteins, TSC1/2)蛋白,通过抑制 mTOR 促进自噬形成^[6]。最新的研究^[7]提示自噬与 mTOR 的互反馈调控作用是促进细胞存活/细胞保护的重要机制。自噬初期,mTOR 主要受 AMPK-mTOR 通路调节而被抑制,不断诱导自噬产生;自噬后期,mTOR 则主要受细胞内存活激酶(phosphatidylinositol 3-kinase serine-threonine kinase, PI3K/Akt)-mTOR 通路调节而被激活,抑制自噬直至终止自噬,以防自噬过度^[8]。

Beclin1 是近年发现参与自噬调控的蛋白之一。Beclin1 作为自噬标记物,已成为衡量自噬发生程度的检测指标,也是人工干预自噬活性的靶点之一。Rami 等^[9]的研究表明,大鼠脑缺血再灌注中,神经细胞在再灌注 6 h 时 Beclin1 的表达增加,在 24 h 达到高峰,并持续至少 48 h。当缺血再灌注对心肌细胞造成损伤后,心肌细胞中的自噬过程也受到相应的影响,通过上调表达 Beclin1 增强自噬,对细胞产生保护效应,Beclin1 表达的增加被认为是一种应激反应,其作为自噬表达产物的变化反映了细胞代谢的异常^[10]。

目前自噬在缺血再灌注中的影响与作用还存在着争议。大部分研究认为自噬的增加对于组织缺血再灌注起到保护作用,也有研究认为抑制自噬能起到保护作用,李宁等^[11]报道经典的自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)抑制自噬后,凋亡细胞减少,而坏死细胞增加,使用自噬激活剂雷帕霉素增强自噬活性后,坏死细胞减少,脑损伤减轻;而 Wang 等^[12]的研究表明使用 3-MA 则减少了缺血再灌注中海马神经元的坏死。Matsui 等^[13]研究发现在大鼠心肌缺血再灌注损伤中,缺血和再灌注两个时期介导自噬产生的信号通路并不相同。在缺血期,机体通过 AMPK 依赖的自噬途径保护缺血心肌, mTOR 信号通路失活,激活自噬;而 beclin1 途径激活自噬加重再灌注损伤,应用 TOR 抑制剂后自噬并不减轻,过度自噬大量降解细胞内的蛋白质和细胞

器,使细胞的能量过度消耗,最终引起细胞凋亡或死亡。研究表明抗凋亡蛋白 Bcl-2 可通过抑制 beclin1 依赖性自噬,降低缺血再灌注中的细胞死亡。Bcl-2 抗自噬的作用并不影响 Bcl-2 与促凋亡蛋白 Bax 结合而发挥抗凋亡作用,Bcl-2 与 Beclin1 结合被认为可以维持自噬处于一定水平而保持细胞存活^[14]。Zhai 等^[15]的研究提示抑制 GSK-3 β 酶可减轻再灌注损伤导致的自噬,而自噬的抑制对再灌注损伤起着保护作用。这一结果提示在缺血期间通过上调自噬,可提高心肌细胞的生存能力,而再灌注时期 beclin1 的表达引发的过度自噬可导致细胞损伤。自噬的双重作用在脑缺血模型中同样存在^[16]。因此再灌注时期抑制自噬被认为是一项新的治疗策略,这也表明自噬在不同环境以及不同时期对组织细胞的影响也不完全相同。

3 线粒体与自噬之间的相互影响

线粒体是细胞呼吸和物质氧化的中心,是机体产生 ATP 的重要场所。由于线粒体在生物氧化和能量转换过程中产生活性氧,线粒体 DNA 又比核 DNA 更容易发生突变,因此线粒体是一种比较容易受到损伤的细胞器,其在缺血性损伤中释放细胞色素 C 等多种蛋白,并诱发线粒体依赖的神经元凋亡^[17],及时清除细胞内受损的线粒体对于细胞维持正常的状态具有重要的作用。

3.1 线粒体对自噬的影响

在脑缺血期间,脑细胞中的线粒体被大量破坏,不能有效利用有氧代谢产生 ATP,血液再灌注所带入的氧,除了供细胞氧化供能外,也生成更多的 ROS。目前的研究表明线粒体来源的 ROS 作为信号分子参与自噬的调节^[18],ROS 引起线粒体蛋白质或线粒体 DNA 的氧化损伤,导致蛋白质错误折叠形成聚集体。同时,线粒体内膜非特异性孔道开放,线粒体通透性孔道(mitochondrial permeability transition, MPT)改变,提供信号诱导自噬。段秋红团队^[19]在神经细胞缺血再灌注损伤中通过使用褪黑素处理,发现褪黑素在保护神经细胞免受缺血再灌注损伤的同时诱导出线粒体自噬,提示线粒体自噬可能是褪黑素发挥神经保护作用的机制之一。有证据表明^[20]结扎大鼠冠状动脉后,通过上调线粒体自噬可减轻凋亡细胞的死亡以及有利于心肌的重塑,提示上调线粒体自噬能使心肌对缺血损伤产生耐受。研究^[21]发现在 IR 损伤模型中可诱导神经元发

生线粒体自噬,自噬通过清除损伤线粒体进而发挥脑保护作用。缺血再灌注诱导并激活线粒体自噬的现象不仅在神经元细胞、心肌细胞中被观察到,而且在肾脏细胞和肝细胞中也均可发生^[22,23]。

有研究发现^[24],在 ROS 信号中,线粒体通透性孔道扮演着重要角色,这被认为与 Bnip3 有关。Bnip3 隶属于 Bcl-2 蛋白超家族,是一种线粒体促凋亡蛋白。心肌细胞中的 Bnip3 的表达能够介导线粒体的损伤,从而激活细胞发生自噬^[25]。当外界刺激较弱时,有限的 MPT 开放破坏小部分线粒体,此时自噬的激活是作为细胞的一种自我保护机制而发生。还有研究^[26]发现,外源性的过氧化氢(H₂O₂)处理能导致心肌细胞氧化应激和线粒体损伤,并激活自噬选择性地降解氧化损伤的细胞,这对于减缓细胞低氧损伤和促进存活起着重要的作用。随着外界刺激的增强,当自噬不足以清除损伤线粒体时,细胞会发生凋亡。最后,当外界刺激持续加强,细胞内所有线粒体 MPT 发生强烈改变,导致细胞内 ATP 急剧下降,细胞产能系统遭到破坏,不能提供自噬或者凋亡所需能量,这时,细胞发生坏死^[27]。因此,MPT 开放的程度可能决定着细胞是发生自噬还是凋亡或者坏死(氧化应激反应介导自噬的作用途径如图 1 所示)。

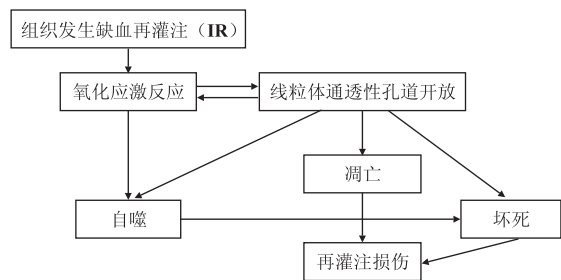


图1 氧化应激反应在缺血再灌注中介导自噬的产生

3.2 自噬对线粒体的影响

Zhang 等^[28]研究了自噬在维持线粒体功能中所扮演的角色。在酵母菌自噬相关基因(autophagy-related gene,ATG)突变的模型中,由于自噬功能的缺失,这些细胞的线粒体膜电位降低,ROS 活性的水平增高,且更易于积聚功能障碍的线粒体。而在肝缺血再灌注中,老龄小鼠肝内的自噬相关蛋白减少,增加了它们对损伤的敏感性,而增强自噬作用可望减轻缺血再灌注后的肝损伤,同时也能恢复线粒体功能^[29]。以上研究说明自噬在维持线粒体功能上也起着重要的作用,但其具体机制尚需做更深入的研究。

4 结束语

目前缺血期与再灌注期之间不同自噬基因的表达及其对组织器官的影响还有待进一步研究。需要注意的是,线粒体作为重要的细胞器之一,对缺血应激状态下的细胞命运发挥着重要作用。该过程中线粒体自噬通过降解细胞内受到损伤的线粒体和清除过量产生的 ROS,防止细胞进入凋亡或死亡途径。细胞自噬这一主动调节过程有可能成为相关疾病预防与治疗的潜在靶点。如何在缺血及再灌注血运重建的同时,通过调节线粒体功能维持自噬水平,发挥细胞自噬的内源性保护机制仍需进一步的探讨。

参考文献

[1] PREIFER U. Morphological and functional aspects of cellular autophagy [J]. Acta Morphologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 1972, 20(3): 247-267.

[2] 谢洪,李艳君,陈英玉. 线粒体自噬[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(12): 1081-1087.

[3] LEMASTERS J J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. Rejuvenation Research, 2005, 8(1): 3-5.

[4] KIM I, RODRIQUEZ E S, LEMASTERS J J, et al. Selective degradation of mitochondria by mitophagy [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007, 462(2): 245-253.

[5] YU D, Li M, Ni B, et al. Induction of neuronal mitophagy in acute spinal cord injury in rats. Neurotoxicity Research, 2013, 24(4): 512-522.

[6] 方永奇,刘林. 神经细胞自噬的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(3): 453-455.

[7] 马芹芹,刘立亚,黄秀兰. Beclin 1 与 mTOR 对心肌缺血/再灌注损伤中自噬的交互调控机制[J]. 心脏杂志, 2012, 24(3): 395-401.

[8] YUTAKA M, HIROMITSU T, QU X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion; roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy [J]. Circulation Research, 2007, 100(6): 914-922.

[9] RAMI A, LANGHAGEN A, STEIGER S. Focal cerebral ischemia induces upregulation of Beclin 1 and autophagy-like cell death [J]. Neurobiology of Disease, 2008, 29(1): 132-141.

[10] 肖健,何斌,朱晓燕. 缺血再灌注损伤诱导心肌细胞自噬相关基因过表达[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(7): 776-778.

[11] 李宁,田炜,郝志梅. 自噬与缺血/再灌注损伤[J]. 广东医学, 2014, 35(2): 302-304.

[12] Wang J Y, Xia Q, Chu K T, et al. Severe global cerebral ischemia-induced programmed necrosis of hippocampal CA1 neurons is prevented by 3-methyladenine; a widely used inhibitor of autophagy [J]. Journal of Neuropathology and Experimental Neurology, 2011, 70(4): 314-322.

[13] MATSUI Y, TAKAGI H, QU X, et al. Distinct roles of autophagy

in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and beclin 1 in Mediating autophagy[J]. Circulation Research, 2007, 100(6): 914-922.

[14] LUO S, RUBINSZTEIN D C. Apoptosis blocks Beclin1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. Cell Death and Differentiation, 2010, 17(2):268-277.

[15] ZHAI P, SCIARRETTA S, GALEOTTI J, et al. Differential roles of GSK-3 β during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion [J]. Circulation Research, 2011,109 (5):502-511.

[16] 张翔南,陈忠. 缺血性脑损伤中的自噬—研究进展与挑战[J]. 中国科学:生命科学,2014,44(4):379-386.

[17] JEMMERSON R, DUBINSKY J M, BRUSTOVETSKY N. Cytochrome C release from CNS mitochondria and potential for clinical intervention in apoptosis-mediated CNS diseases. Antioxidants and Redox Signaling, 2005, 7 (9-10): 1158 - 1172.

[18] 纪元,龙建纲,刘健康. 自噬发生中的 ROS 调节机制[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2014,30(4):321-327.

[19] 王忠强,段秋红,王剑. 线粒体自噬在褪黑素抗缺血再灌注损伤中的作用[J]. 卒中与神经疾病,2007,14(5):296-298.

[20] HAMACHER B A, BRADY N R, GOTTLIEB R A. Enhancing macroautophagy protects against ischemia/reperfusion injury in cardiac myocytes[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281 (40):29776-29787.

[21] ZHANG X, YAN H, YUAN Y, et al. Cerebral ischemia-reperfusion-induced autophagy protects against neuronal injury by mitochondrial clearance. Autophagy,2013, 9(9): 1321-1333.

[22] SANSANWAL P, SARWAL M M. Abnormal mitochondrial autophagy in nephropathic cystinosis[J]. Autophagy, 2010, 6(7): 971-973.

[23] CARDINAL J, PAN P, TSUNG A. Protective role of cisplatin in ischemic liver injury through induction of autophagy[J]. Autophagy, 2009, 5(8):1211-1212.

[24] PEIXOTO P M, DEJEAN L M, KINNALLY K W. The therapeutic potential of mitochondrial channels in cancer, ischemia - reperfusion injury, and neurodegeneration[J]. Mitochondrion, 2012,12 (1): 14-23.

[25] RIKKA S, QUINSAY MN, THOMAS RL, et al. Bnip3 impairs mitochondrial bioenergetics and stimulates mitochondrial turnover [J]. Cell Death and Differentiation, 2011,18(4):721-731.

[26] HARIHARAN N, ZHAI P, SADOSHIMA J. Oxidative stress stimulates autophagic flux during ischemia/reperfusion [J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2011, 14(11): 2179-90.

[27] 谢凤,柳威,陈临溪. 自噬参与心脏疾病调控的研究进展[J], 生物化学与生物物理进展, 2012,39(3):224-233.

[28] ZHANG Y, QI H, TAYLOR R, et al. The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains[J]. Autophagy, 2007, 3(4):337-346.

[29] WANG J H, AHN I S, FISCHER T D, et al. Autophagy suppresses age-dependent ischemia and reperfusion injury in livers of mice [J]. Gastroenterology, 2011,141 (6): 2188-2199.

(上接第 578 页)

[4] DULIN J N, KAROLY E D, WANG Y, et al. Licofelone Modulates Neuroinflammation and Attenuates Mechanical Hypersensitivity in the Chronic Phase of Spinal Cord Injury [J]. Journal of neuroscience,2013, 33(2): 652-664.

[5] MOHAMMADI E, GHAEDI K, ESMAILIE A, et al. Gene expression profiling of liver X receptor alpha and Bcl-2-associated X protein in experimental transection spinal cord-injured rats[J]. Journal of spinal cord medicine,2013, 36(1): 66-71.

[6] KASAI M, FUKUMITSU H, SOUMIYA H, et al. Caffeic acid phenethyl ester reduces spinal cord injury-evoked locomotor dysfunction[J]. Biomedical research-tokyo,2011, 32(1): 1-7.

[7] CIZKOVA D, NOVOTNA I, SLOVINSKA L, et al. Repetitive Intrathecal Catheter Delivery of Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cells Improves Functional Recovery in a Rat Model of Contusive Spinal Cord Injury[J]. Journal of neurotrauma,2011, 28(9): 1951-1961.

[8] HYUN S J, RHIM S C, KANG J K, et al. Combined motor- and somatosensory-evoked potential monitoring for spine and spinal cord surgery: correlation of clinical and neurophysiological data in 85 consecutive procedures[J]. Spinal cord,2009, 47(8): 616-622.

[9] VIGNES J R, DELOIRE M, PETRY K. Animal Models of Sacral Neuromodulation for Detrusor Overactivity [J]. Neurourology and urodynamics,2009, 28(1): 8-12.

[10] FRY C H, DANESHGARI F, THOR K, et al. Animal Models and Their Use in Understanding Lower Urinary Tract Dysfunction[J]. Neurourology and urodynamics,2010, 29(4): 603-608.