

## · 综 述 ·

## 自噬在创伤性脑损伤中作用的研究进展

丁 可 综述,王汉东 审校

〔摘要〕 自噬是一种在进化过程中高度保守的细胞内机制,其主要作用为将细胞内异常的蛋白、细胞器降解,维持细胞稳定。已有多项研究表明自噬在创伤性脑损伤后激活。但是自噬在创伤性脑损伤中的作用提供新的方向。

〔关键词〕 自噬;创伤性脑损伤;保护作用;损伤作用

〔中图分类号〕 R651.15 〔文献标志码〕 A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.02.022

自噬 (autophagy), 来源于希腊词根 auto 和 phagy, 意为“自己”和“吃”, 其对维持细胞内环境稳定有着重要作用。在能量供给正常状态下, 自噬处于稳定状态, 可以将细胞内老化、损伤或变性的蛋白和细胞器隔绝降解成氨基酸、脂肪酸, 使其回收利用; 在能量供给缺乏状态下, 自噬过程增强, 不仅是老化、变性的, 有生理作用的部分蛋白和细胞器亦被降解, 为细胞提供能量, 维持细胞稳态。自噬在多种病理状态下存在, 诸如: 神经变性疾病, 脑缺血, 炎症, 肿瘤等。同时, 自噬在多种组织创伤中, 包括肺损伤、肝损伤、脊髓损伤等也被发现起着重要作用。近来, 在创伤性脑损伤中, 自噬的作用被很多研究关注, 越来越多的关于自噬和创伤性脑损伤的文献被发表。因此, 我们将近来的自噬在创伤性脑损伤中作用的研究进展予以综述, 为创伤性脑损伤的治疗提供新的思路 and 方向。

## 1 自噬的概念

自噬是一种在进化过程中高度保守的细胞内机制, 其主要作用为将细胞内过多的, 老旧的或者不需要的大分子 (包括长命蛋白) 和细胞器 (线粒体、过氧化物酶体、高尔基体、内质网) 等异常的蛋白、细胞器降解, 维持细胞稳定。自噬最初在哺乳动物体内发现, 但是在酵母细胞内研究的最多、最详尽。到目前已有 30 多种与自噬机制相关的基因被鉴别, 它们被命名为“自噬相关基因” (autophagy-related genes, Atg)。在哺乳动物细胞中, 有三种自噬的形式, 为大自噬 (macroautophagy)、小自噬 (microautophagy) 和分子伴侣介导的自噬 (chaperone-mediated autophagy, CMA)。其中, 大自噬为神经系统细胞自噬的主要形式, 同时也是与创伤性脑损伤研究最多

的自噬形式, 因此, 本文的“自噬”主要指代大自噬。

自噬的发生起始为形成双层膜结构的隔绝囊泡 (sequestering phagophore), 亦被称为前自噬体 (pre-autophagosomal)。其膜结构主要由内质网、高尔基体、线粒体、质膜等细胞器提供<sup>[1-3]</sup>。前自噬体延长、内曲, 然后端对端融合, 形成闭环的双层膜结构, 将需要降解的细胞质内的成分予以隔绝封闭。这种双层膜结构的囊为自噬体 (autophagosome)。自噬体与溶酶体相结合, 形成自噬-溶酶体 (autophagolysosome), 将隔绝的大分子或细胞器分解成氨基酸、脂肪酸, 以供能量代谢或者装配新的细胞器或者蛋白。

## 2 自噬的研究方法

**2.1 透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM)** 自噬的典型形态学特征为局灶的退化的胞浆细胞器或者大分子结构, 周围被双层膜结构的隔绝囊泡或者自噬体环绕。TEM 对于定量或者定性监测自噬过程中各种结构的变化是可靠和重要的方法<sup>[4]</sup>。自噬体在 TEM 下可见为双层平行膜结构, 膜之间为低密度电子层<sup>[5-6]</sup>。自噬体内包含的细胞器或者胞质通常是完整的, 与胞浆内另外地方的细胞器或者胞质是相同的<sup>[4,7]</sup>。而自噬-溶酶体由于内层膜被溶酶体酶消化, TEM 下通常为单层膜结构, 内含处于降解阶段的各种细胞质<sup>[4,7]</sup>。TEM 为目前研究自噬的金标准。

**2.2 自噬相关基因 8 (Agt8) 和微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)** Agt8 和 LC3 是同源蛋白, 酵母中自噬相关基因 8 编码蛋白为 Agt8, 在哺乳动物细胞中为 LC3。LC3 蛋白主要参与了自噬体后期形成的过程, 主要是前自噬体的延长和闭环<sup>[8]</sup>。LC3 分为 LC3-I 和 LC3-II, LC3-II 是 LC3-I 结合了磷脂酰丝氨酸所形成<sup>[9]</sup>。由 LC3-II 位于前自噬体和自噬体成熟的蛋白标致。对于 LC3 的监测, 主要通过蛋白印迹电泳

基金项目: 国家自然科学基金资助 (81371357)

作者单位: 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院神经外科

(Western blotting), 绿色荧光蛋白-LC3 荧光显微镜 (GFP-LC3 fluorescence microscopy) 来实现。

**2.3 泛素化底物蛋白 P62** P62 为一连接 LC3 和泛素化底物的蛋白<sup>[10]</sup>, 其和多泛素化蛋白合并后一起并入成熟的自噬体, 并被自噬-溶酶体降解, 因此 P62 可作为自噬状态的指标蛋白: P62 升高提示自噬活动的下降, 而 P62 下降提示自噬的激活<sup>[11-13]</sup>。

**2.4 自噬相关基因 6 (Atg6) 和 BCL2 相互作用蛋白 1 (Beclin-1)** Beclin-1 是酵母 Atg6 基因的同源表达产物, Bcl-2 的相互作用蛋白, 可与磷脂酰肌醇三激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3-K) 形成复合物参与自噬体的形成<sup>[14]</sup>。Beclin-1 和 Bcl-2 结合时处于抑制状态<sup>[15]</sup>, 当其 Bcl-2 解离时激活自噬。Beclin-1 是自噬的调控位点, 其可以激活自噬<sup>[16]</sup>。通过免疫印迹蛋白电泳检测其在特定组织中的 Beclin-1 表达水平, 可以对待测组织中细胞的自噬活性进行监测并判断其水平。

### 3 在创伤性脑损伤中自噬增强

Diskin 等<sup>[17]</sup>于 2005 年首先报道了创伤性脑损伤后自噬升高。他们发现在小鼠遭受闭合性脑损伤 (closed head injury, CHI) 后, Beclin-1 蛋白在神经元和胶质细胞表达升高。与未受伤半球相比, 伤灶周围皮层中有大量细胞 Beclin-1 蛋白荧光免疫阳性反应。同时, 荧光双染 Beclin-1 和 TUNEL, 有 17% ~ 37% 神经元细胞双阳性, 说明相当数量的垂死的神经元细胞同时存在着自噬增强。Lai 等<sup>[18]</sup>第一例报道了使用 TEM 研究创伤性脑损伤后关于自噬的超微结构变化。其使用控制性皮层损伤 (controlled cortical impact, CCI) 小鼠模型, 发现伤后同侧的皮层和海马, 自噬体特征性的双侧囊泡包含细胞质器的结构显著增多。同时, 受伤侧皮层的 LC3-II 叫对侧升高了 1 倍。Luo 等<sup>[19]</sup>使用小鼠自由落体脑损伤模型, 发现伤后 Beclin-1、LC3-II 升高, 而 P62 下降。在大鼠创伤性脑损伤模型中, 自噬增强也很多见。Zhang 等<sup>[20]</sup>使用 CCI 大鼠模型对自噬进行研究。伤后 1 h 起, TEM 观察到自噬体, 一直持续到 32 d。LC3 和 Beclin-1 伤后 1 h 也升高, 8 d 到达峰值, 伤后 32 d 仍未恢复至基线。Liu 等<sup>[21]</sup>使用液压撞击损伤 (fluid percussion injury, FPI) 大鼠模型调查 TBI 自噬改变, 和假手术组相比, 损伤组大鼠的 LC3-II 升高 1 ~ 2 倍, TEM 下, 伤后 4 h 开始, 自噬体和自噬溶酶体在神经元积聚。创伤性脑损伤后自噬增强不仅在动物模型中得到证实, 在人体临床标本中也有发现。Clark 等<sup>[22]</sup>对 5 例重型颅脑外伤患者行去骨瓣减压

术后取得的颞叶标本进行研究, 发现有 4 位患者脑组织中出现 LC3-II 蛋白表达, 2 位冰冻切片免疫荧光染色出现了特征性的 LC3 小点样的密集荧光, 说明创伤性脑损伤后人体脑组织出现了自噬增强。

### 4 自噬在创伤性脑损伤中的作用

创伤性脑损伤后自噬增强在动物模型和人体标本中已被证实, 但自噬在其中的作用现在仍然有争议, 不同的研究往往得出截然相反的结论。

**4.1 保护作用** 首先证实自噬在创伤性脑损伤中起保护作用的报道是 2007 年 Erlich 等<sup>[23]</sup>关于雷帕霉素在创伤性脑损伤中的保护作用的研究。雷帕霉素为吸水链霉菌属的产物, 多作为免疫抑制剂使用, 同时其还有抗炎、抑制细胞增殖等作用。其机制为抑制哺乳动物雷帕霉素目标蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR), 从而解除对磷脂酰肌醇三激酶的抑制, 激活自噬。Erlich 等<sup>[23]</sup>使用小鼠 CHI 模型, 伤后 4 h 单次腹腔注射雷帕霉素 (0.5 和 1.0 mg/kg) 后 Beclin-1 显著增加, 说明自噬增强。同时提高了神经行为功能评分, 抑制 p70S6K 磷酸化, 减少小胶/巨噬细胞活化, 增加损伤灶存活神经元数量。证实了雷帕霉素激活自噬对 TBI 后小鼠起保护作用。Zhang 等<sup>[20]</sup>分别使用荧光双染伤灶周围脑组织的 caspase-3 (凋亡标志物) 和 LC3, 海马组织的 Fluoro-Jade (神经元变性标志物) 和 Beclin-1 来研究凋亡、神经元变性和自噬的关系。结果显示早期 (3 h) 只有很少的 caspase-3 和 LC3 重合, 伤后 24 h caspase-3 和 LC3 重合细胞增多, 提示早期自噬保护皮层细胞免于凋亡, 后期凋亡激活了自噬, 以期维持细胞稳态。而 Fluoro-Jade 和 Beclin-1 在 6 h 和 48 h 均未重合, 提示在早期和晚期自噬避免了海马细胞的变性。

**4.2 损伤作用** Lai 等<sup>[18]</sup>首先报道了自噬在创伤性脑损伤中的损伤作用。氧化应激可以诱发自噬, 因此其使用了抗氧化剂  $\gamma$ -glutamylcysteinyl ethyl ester (GCEE) 来观察自噬和神经功能评分的变化。结果显示 GCEE 抑制了氧化应激, 减少了外伤后 LC3-II 的升高, 说明自噬被抗氧化剂抑制。同时, 还发现 GCEE 可以减少小鼠受损半球海马 CA1 和 CA3 区域神经元的死亡, 提高了外伤后小鼠水迷宫的评分。因此推论自噬在创伤性脑损伤中起着损伤作用。另外关于自噬在创伤性脑损伤中的损伤作用的研究引入了自噬的两种抑制剂, 3-MA 和 BAF。Luo 等<sup>[19]</sup>使用小鼠自由落体脑损伤模型, 于致伤前 10 min 行侧脑室注射 3-MA 或者 BAF, 观察自噬抑制后对于小鼠的影响。结果显示自噬被抑制 (Beclin-1、LC3-

II 升高,而 P62 下降),抑制自噬缓解了外伤导致的神经细胞损伤(PI 阳性细胞减少),提高了运动功能评分和水迷宫学习能力,减少了细胞凋亡。

上述结果显示,抑制自噬减少了外伤后神经元的数量减少,缓解神经细胞损伤,提供了神经功能评分。这反证了自噬在创伤性脑损伤中的损伤作用。

**4.3 现有研究存在的问题与展望** 上述关于自噬保护或者损伤作用的研究多为使用外源性药物激活或者抑制自噬,观察其对细胞或机体的影响。但是迄今为止,还没有一种特异性的自噬激动剂和抑制剂,现有的药物多是非特异性的作用,所以研究结果必须考虑除了对自噬的影响,药物对其他环节或靶点的作用。例如,3-MA 是非特异性的 PI3K 抑制剂,除了对自噬的影响,其对炎症、凋亡等其他多种通路都有影响。前述的 3-MA 缓解了神经细胞损伤,提高了神经功能评分是抑制自噬的结果还是抑制炎症或者其他通路的结果是难以判定的。因此,特异性的自噬调控药物的出现,可以为阐明自噬在创伤性脑损伤中的作用提供帮助。同时借助分子生物学技术可以实现自噬相关基因的精确敲低,从而特异性影响自噬,观察结果。在脑缺血和自噬的研究中使用慢病毒为载体的 *Becn1* shRNA 敲低了编码 Beclin-1 蛋白的基因的方法已经实现<sup>[24]</sup>。这些都是将来研究的方向。

综上所述,各种研究证据表明在创伤性脑损伤后的受损脑组织中自噬增加,但自噬对于组织损伤的作用仍存在争议,缺乏直接证据,需要对其作用的准确机制及调控途径进行进一步的研究。引入新的靶向药物和分子生物学技术是将来研究的方向,可以明确自噬对受损脑组织的作用,为改善创伤性脑损伤患者的治疗提供新的思路和方向。

## 【参考文献】

- [1] Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, et al. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation [J]. *Cell*, 2010, 141(4): 656-667.
- [2] Hamasaki M, Yoshimori T. Where do they come from Insights into autophagosome formation [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(7): 1296-1301.
- [3] Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, et al. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures [J]. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(8): 747-757.
- [4] Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, et al. Monitoring autophagy by electron microscopy in Mammalian cells [J]. *Methods Enzymol*, 2009, 452: 143-164.
- [5] Eskelinen EL. To be or not to be? Examples of incorrect identification of autophagic compartments in conventional transmission electron microscopy of mammalian cells [J]. *Autophagy*, 2008, 4(2): 257-260.
- [6] Eskelinen EL, Kovacs AL. Double membranes vs. lipid bilayers, and their significance for correct identification of macroautophagic

- structures [J]. *Autophagy*, 2011, 7(9): 931-932.
- [7] Eskelinen EL. Fine structure of the autophagosome [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 11-28.
- [8] Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, et al. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis [J]. *EMBO J*, 2010, 29(11): 1792-1802.
- [9] Sou YS, Tanida I, Komatsu M, et al. Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16 [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(6): 3017-3024.
- [10] Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death [J]. *J Cell Biol*, 2005, 171(4): 603-614.
- [11] Cui J, Bai XY, Shi S, et al. Age-related changes in the function of autophagy in rat kidneys [J]. *Age (Dordr)*, 2012, 34(2): 329-339.
- [12] Nezis IP, Simonsen A, Sagona AP, et al. Ref(2)P, the Drosophila melanogaster homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain [J]. *J Cell Biol*, 2008, 180(6): 1065-1071.
- [13] Bartlett BJ, Isakson P, Lewerenz J, et al. p62, Ref(2)P and ubiquitinated proteins are conserved markers of neuronal aging, aggregate formation and progressive autophagic defects [J]. *Autophagy*, 2011, 7(6): 572-583.
- [14] Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2445-2462.
- [15] Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy [J]. *Cell*, 2005, 122(6): 927-939.
- [16] Yue Z, Jin S, Yang C, et al. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(25): 15077-15082.
- [17] Diskin T, Tal-Or P, Erlich S, et al. Closed head injury induces up-regulation of Beclin 1 at the cortical site of injury [J]. *J Neurotrauma*, 2005, 22(7): 750-762.
- [18] Lai Y, Hickey R W, Chen Y, et al. Autophagy is increased after traumatic brain injury in mice and is partially inhibited by the antioxidant gamma-glutamylcysteinyl ethyl ester [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(3): 540-550.
- [19] Luo CL, Li BX, Li QQ, et al. Autophagy is involved in traumatic brain injury-induced cell death and contributes to functional outcome deficits in mice [J]. *Neuroscience*, 2011, 184: 54-63.
- [20] Zhang YB, Li SX, Chen XP, et al. Autophagy is activated and might protect neurons from degeneration after traumatic brain injury [J]. *Neurosci Bull*, 2008, 24(3): 143-149.
- [21] Liu CL, Chen S, Dietrich D, et al. Changes in autophagy after traumatic brain injury [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(4): 674-683.
- [22] Clark RS, Bayir H, Chu CT, et al. Autophagy is increased in mice after traumatic brain injury and is detectable in human brain after trauma and critical illness [J]. *Autophagy*, 2008, 4(1): 88-90.
- [23] Erlich S, Alexandrovich A, Shohami E, et al. Rapamycin is a neuroprotective treatment for traumatic brain injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 26(1): 86-93.
- [24] 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 [J]. *Autophagy*, 2012, 8(1): 63-76.

(收稿日期:2013-12-04;修回日期:2013-12-19)  
(本文编辑:黄攸生)