

DOI: 10.13376/j.cblls/2014050

文章编号: 1004-0374(2014)04-0340-09

自噬稳态调控与阿尔茨海默病防治策略

张莹^{#*}, 郭舒涵[#], 房芳[#], 何金生, 彭向雷

(北京交通大学理学院生命科学与生物工程研究院, 北京 100044)

摘要: 自噬是真核细胞中降解易聚集蛋白质的重要途径, 以应激和损伤时更为显著。自噬与阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 密切相关, 在 AD 中起到“双刃剑”的作用, 与致病性 β 淀粉样肽 (A β) 和细胞骨架相关 tau 蛋白的生成和代谢都有密切的关系。随着对自噬机制的深入了解, 人们发现了自噬在 AD 病理过程中的调节作用。综述了自噬的基本机制、自噬与 AD 发病的互作关系以及如何从自噬的信号转导途径入手, 调整 AD 自噬稳态及重平衡, 从而探索新的 AD 治疗性药物靶标。

关键词: 自噬; 阿尔茨海默病; β 淀粉样肽

中图分类号: Q255; R749.16 **文献标志码:** A

Regulation of autophagy: the strategy for prevention and treatment of Alzheimer's disease

ZHANG Ying^{#*}, GUO Shu-Han[#], FANG Fang[#], HE Jin-Sheng, PENG Xiang-Lei

(College of Life Sciences and Bioengineering, Beijing Jiaotong University, Beijing 100044, China)

Abstract: Autophagy is a vital degradation process responsible for the clearance of aggregate-prone proteins, especially under stress and injury conditions. Autophagy is closely related with the neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease (AD). It has dual lives in AD pathogenesis, which is involved in generation and metabolism of β -amyloid peptide (A β) and microtubule-associated protein tau. People are getting to know the contribution of autophagy to AD with the development of neuroscience. Here, the basics of autophagy, interaction with AD and how to obtain autophagic balance are reviewed, so as to provide clues to AD therapeutic targets.

Key words: autophagy; Alzheimer's disease; β -amyloid peptide

自噬 (autophagy)^[1], 是相对于 I 型程序性细胞死亡 (programmed cell death, PCD)——凋亡 (apoptosis) 的另一种 (II 型) 程序性细胞死亡^[2-3]。PCD 最初是发育生物学中提出的概念, 其含义是在发育过程中发生的某类细胞的大量死亡, 而这种细胞死亡要求一定的基因表达。自噬也是一个主动的由基因决定并精密调节的生命过程。所有的真核细胞通过两大系统来降解细胞内的蛋白质, 一种是泛素-蛋白酶体系统, 另一种就是自噬系统^[4-5]。自噬降解蛋白质和细胞器的作用在生物体正常发育过程中以及对某些环境胁迫的反应过程非常关键^[6], 尤其是对于以细胞内蛋白质聚集为主要特征的神经退变性疾病, 如阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)。最近的研究结果认为, 自噬是降解和清除这类异常聚集蛋白

质的主要机制^[7-10], 因而逐渐被 AD 防治研究领域所关注。

1 自噬的一般机制

自噬是真核细胞特有而保守的生命现象。在自噬过程中, 部分或整个细胞质和细胞器被包裹进双层膜的囊泡, 形成自噬泡 (autophagic vacuoles) 或自噬体 (autophagosomes)^[11]。自噬体形成后很快与溶

收稿日期: 2013-12-23; 修回日期: 2014-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81100809, 8127-1417); 中央高校基本科研业务费专项资金 (2010JBZ003)

#并列第一作者

*通信作者: E-mail: yingzhang@bjtu.edu.cn; Tel: 010-51684351-201

酶体结合形成自噬溶酶体,完成对内容物的降解^[12]。根据被降解物进入溶酶体腔的途径和机制的不同,可以把自噬分为3种形式,如图1:巨自噬(macroautophagy)、微自噬(microautophagy)和分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)。巨自噬即通常所说的自噬,是自噬体与溶酶体融合,形成自噬溶酶体(autolysosomes),进而降解内容物;微自噬是溶酶体膜内陷主动吞噬而降解内容物;CMA则与分子伴侣 hsp70 以及溶酶体膜受体相关,选择性降解含有一种五肽蛋白基序(KFERQ)的胞浆蛋白质^[7]。

1.1 自噬体的发生过程

自噬体的半衰期只有 8 min 左右,其发生过程可分为4个阶段,如图1(参考[13-15]绘制)。

1.1.1 自噬体的诱导发生^[16]

自噬体的发生受机体发育阶段和细胞营养调节的影响。丰富营养条件可抑制非特异性自噬体的发生,反之,营养缺乏可以诱导自噬的发生。磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)是形成自噬体所必需的因素,与哺乳动物雷帕霉素靶点(mammalian target of rapamycin, mTOR)都是调控自噬的重要分子^[17]。3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)则是 III 型 PI3K 的抑制剂,通过抑制 Vps34-

Beclin 1 复合物的功能,从而抑制细胞自噬。

1.1.2 自噬体的形成^[16]

自噬被诱导后,具有双层膜的自噬体就开始在胞浆中形成,将要被降解的胞浆成分隔离开,形成直径 300~900 nm 的双层膜自噬体。

1.1.3 自噬体与溶酶体融合^[11,16]

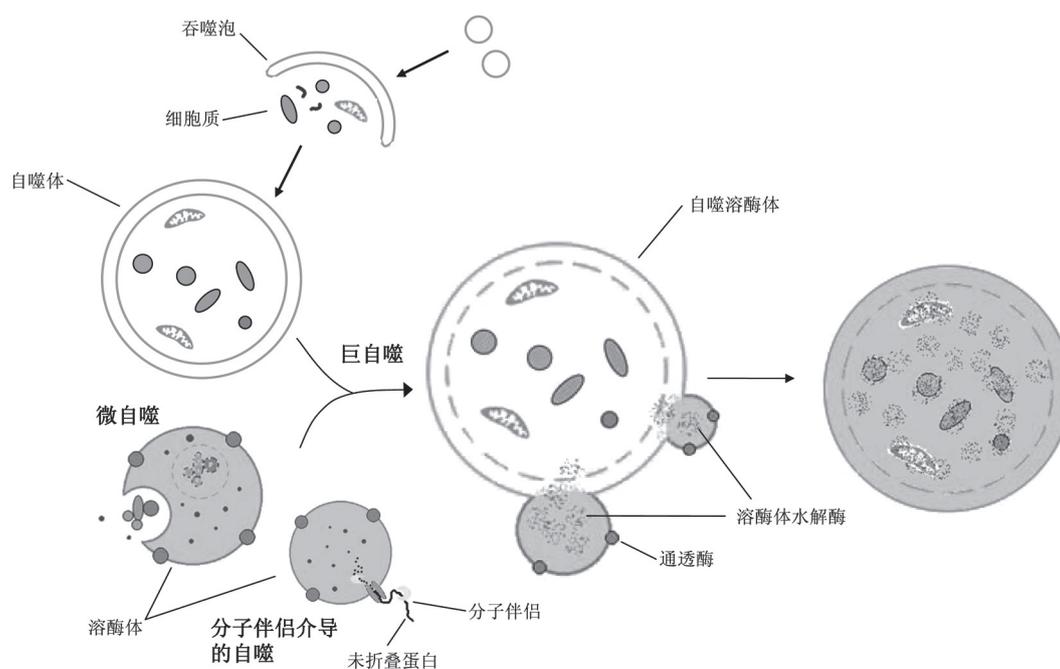
在哺乳动物细胞中,自噬体在溶酶体上的定植以及与溶酶体的融合,与自噬体本身的运输和酸化相关。自噬体与溶酶体的融合依赖于微管,但具体作用机制尚不明确。巴弗洛霉素 A1 (bafilomycin A1)^[17]抑制自噬体与溶酶体的融合。

1.1.4 自噬体的崩解^[16]

自噬体到达溶酶体后,外层膜与溶酶体膜融合,内膜包裹着细胞物质进入溶酶体而被消化^[18]。

1.2 自噬关联的基因网络

由于酵母是较简单的真核细胞,易于进行基因操作,因此是理想的研究自噬的模式生物。目前已经鉴定出大约 30 种参与酵母自噬的特定基因,另外,还有 50 多种相关基因^[16],统一命名为酵母自噬相关基因(autophagy-related gene, ATG)。哺乳动物自噬基因的命名与酵母相似,但是有个别差异,如酵母的 Atg8 在哺乳动物中称为微管相关蛋白 1 轻链 3 (micro-tubule associated protein 1 light chain 3,



图中所示自噬分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬3种形式。通常所说的自噬即巨自噬,主要过程有自噬体的诱导、形成,与溶酶体融合,以及崩解。

图1 自噬的分类和主要过程示意图

MAPLC3, LC3)^[4], 酵母的 Atg6 在哺乳动物中称为 Beclin 1。随着研究的深入, 许多酵母中自噬相关基因的同源物均已在哺乳动物中找到, 并分离鉴定成功, 这说明自噬是一个进化保守的过程, 其分子机制从酵母到哺乳动物十分相似^[16]。

Atg8/LC3 是一种泛素样蛋白, 可与磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine, PE) 结合。在酵母中, 这种共轭形式称为 Atg8-PE。LC3 蛋白有 3 种亚型: pre-LC3、LC3-I 和 LC3-II。新合成的 pre-LC3 经过 Atg4 参与的剪切 (C 末端剪去 22 个氨基酸) 而形成胞浆蛋白 LC3-I; 然后, Atg7 和 Atg3 分别发挥 E1 样和 E2 样酶的作用, 同时 Atg5-Atg12-Atg16 复合物 (参见下文) 发挥 E3 样酶的作用, 使 LC3-I 的 C 端的甘氨酸与 PE 的 N 端偶联并且定位在自噬体膜上。对应于未偶联的 LC3-I, PE 偶联的分子被称为 LC3-II^[19]。因此, LC3-II 是公认的自噬标志分子。在酵母中, 自噬发生时 Atg8 的水平至少增加 9 倍。然而, 在哺乳动物细胞中 LC3 总水平不一定会改变, 通常会发生 LC3-I 向 LC3-II 的转化^[4]。

1.3 自噬的分子机制

自噬中重要的调控复合物和两个类泛素化调控系统 (表 1)^[19] 决定了自噬体起源、发生和发展进程, 理清这些上下游 Atg 复合物的关系对于研究自噬的分子机制和调控十分关键。

在处于最上游的 Atg1/ULK 复合物中, 饥饿等诱导因素降低 TORC1 的活性, 导致 Atg13 去磷酸化, 引起 Atg1-Atg13 结合到核心亚基 Atg17-Atg29-Atg31^[19]。在哺乳动物中, ULK1 发挥主导作用, 而 FIP200-Atg101 相当于 Atg17-Atg29-Atg31^[19]。

III 型 PI3K 复合物则对自噬体膜中一种特殊的

脂类分子磷脂酰肌醇 -3- 磷酸 (phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P) 的形成至关重要^[19], 从而使 Atg2-Atg18/WIPI 复合物的募集乃至 Atg9 囊泡的正常分布成为可能。

自噬体的形成与两个泛素样结合系统 (Atg12 途径和 Atg8 途径) 密切相关, 一个是调节自噬蛋白 Atg12-Atg5 结合的系统, 另一个是 Atg8 脂化系统。其中, 3 种蛋白 (Atg12-Atg5-Atg16) 形成复合体, Atg8 和磷脂酰乙醇胺也形成一个复合体, 并相互作用, 在自噬体形成中发挥重要作用^[16, 19]。

在哺乳动物自噬体的形成过程中, 由 Atg3、Atg5、Atg7、Atg10、Atg12 参与组成的两条泛素样蛋白加工修饰过程起着至关重要的作用^[20]。Atg12 首先由 Atg7 活化, 之后转运至 E2 样酶 Atg10, 最后与 Atg5 结合, 此时形成自噬体前体。Atg12-Atg5^[21] 与 Atg16 形成六聚体复合物 (Atg12-Atg5-Atg16)₂, 促进了自噬泡的伸展扩张, 使之由开始的小囊泡样、杯样结构逐渐发展为半环状、环状结构。Atg5-Atg12-Atg16 复合物的最重要功能是作为 E3 连接酶介导 Atg8 和 PE 的共价连接。最后, 孤立的自噬体前体膜连接形成完整的自噬体^[22]。

Atg5 基因缺陷的鼠胚胎干细胞缺乏 Atg12-Atg5 复合物, 其 LC3-I 到 LC3-II 的修饰同时受到影响^[23]。在哺乳动物细胞 HEK293 中, Atg3 除作用于其底物 LC3、相对分子质量为 1.6×10^4 的高尔基体相关 ATP 酶增强子 (Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa, GATE-16) 和 γ -氨基丁酸受体相关蛋白 GABARAP (γ -aminobutyric acid receptor associated protein) 外, 还与 Atg12 和 Atg12-Atg5 复合物相互作用。在 Atg7 存在的情况下, HEK293 细胞过

表1 参与自噬的蛋白复合物及其功能

名称	酵母体系	哺乳动物细胞体系	功能
Atg1/ULK复合物	Atg1-Atg13-Atg17-Atg29-Atg31	ULK1-Atg13-FIP200-Atg101	目前所知最上游的Atg复合物, 募集下游Atg蛋白
III型PI3K复合物	Vps34-Atg6/Vps30-Vps15-Atg14	Vps34-Beclin1-Vps15-Atg14L	组成三型磷脂酰肌醇三磷酸激酶复合物, 提供PI3P, 从而募集PI3P结合蛋白Atg18/WIPI
Atg2-Atg18/WIPI	Atg2-Atg18	Atg2-WIPI	有助于Atg9囊泡的正常分布
Atg9	Atg9囊泡结构	/	提供自噬体生成的生物膜来源
Atg12-Atg5-Atg16	Atg12-Atg5-Atg16	/	作为Atg8/LC3的E3样酶, 介导Atg8和PE的共价连接
Atg8/LC3	Atg8/LC3	/	稳定结合与自噬的特征性结构; LC3与PE结合即为LC3-II, 是自噬标志物; 可能与自噬体膜的闭合有关

量表达哺乳动物 Atg3 可促进 Atg12-Atg5 复合物的形成。哺乳动物 Atg10 除结合 Atg12 外,还与 LC3 相互作用。Atg10 与 Atg12 形成 E2 样底物中间物,但不与 LC3 结合。在 Atg7 存在下,过量表达 Atg10 还可促进 LC3-I 到 LC3-II 的修饰。

这些结果说明,Atg12 结合和 LC3 修饰两条泛素样修饰过程相互偶联,Atg10 和 Atg3 两种 E2 样酶在调控自噬上述两条泛素样修饰过程中发挥重要作用。

2 自噬与AD的关系

AD 是一种老年人中常见的神经系统变性疾病。AD 隐匿起病,主要表现为缓慢进展的记忆力下降,言语、视空间和认知功能障碍^[24]。AD 的发病机制至今仍未阐明^[24],其病理改变主要表现为细胞外的老年斑 (senile plaques, SPs)、细胞内的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)、突触病变和海马神经元丢失。老年斑主要是 β -淀粉样肽 (β -amyloid peptide, A β) 异常折叠后聚集所形成,神经原纤维缠结则是命名为 tau 的细胞骨架相关蛋白的异常磷酸化后的聚集体。据此, Costanzo 等^[25]将 AD 归为一种蛋白质的异常折叠性疾病,其发病机制与巨自噬途径最为相关。虽然 SPs 和 NFTs 等是 AD 的特征性病变,但是动物模型研究表明,在过量表达家族性 AD (familial AD, FAD) 相关的人类 PS1 和 APP 基因突变体的低龄 PS-APP 小鼠的脑内, A β 淀粉样蛋白聚集之前就可以检测到突触内有大量的自噬体^[26-27],这一结果提示自噬是 AD 脑内的早期病理反应,而不是 A β 斑块引起的结果。

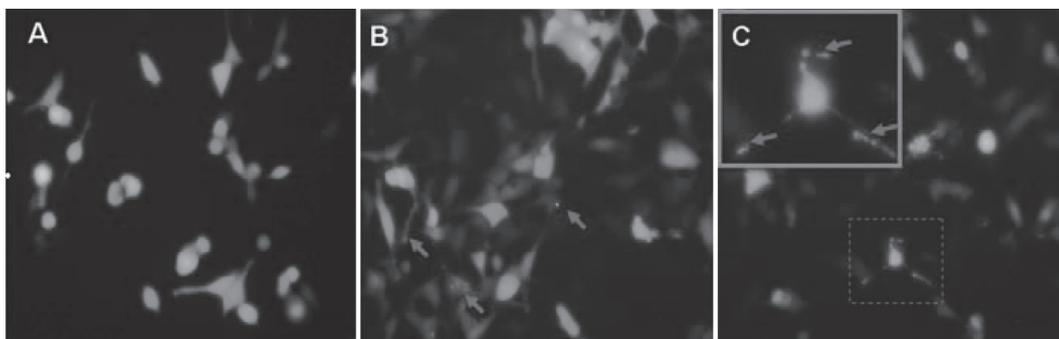
2.1 A β 及tau与自噬的互作

自噬是 APP 代谢的途径, A β 的生成与自噬过

程的各阶段密切相关^[27-28]。以雷帕霉素或营养阻断的方式抑制 mTOR 来诱导自噬,大量的 γ 分泌酶复合物从内体-内质网系统转位至自噬体,同时 γ 分泌酶的活性增强,结果导致小鼠成纤维细胞内 A β 水平增加 2 倍^[26]。自噬体与溶酶体的结合则是细胞释放和清除 A β 的重要环节^[29-30]。2013 年, Nilsson 等^[31]研究表明, A β 分泌及斑块的形成依赖于自噬,自噬缺陷的 APP 转基因小鼠脑内细胞外 A β 斑块明显降低,但是却伴随着细胞内 A β 的异常聚集。因此,自噬促进 APP 代谢中 A β 的生成以及向细胞外分泌,并通过溶酶体途径促进 A β 的转运,与 AD 病理性标志 SPs 的形成密切相关。

自噬促进 APP 各种代谢片段包括 AICD (amyloid- β protein precursor intracellular domain)^[32]、A β ^[33] 以及 APP-CTF (a myloid precursor protein cleaved C-terminal fragment)^[34] 的降解和清除。这种作用也依赖多种生物大分子的介导和参与,如生长因子受体结合蛋白 2 (Grb2) 促进神经元细胞内 AICD 过量负荷的清除;适配体复合物 AP2/PICALM 通过与 LC3 互作,最终通过自噬促进 APP-CTF 的降解;少突胶质细胞前体 NG 细胞通过自噬介导 A β 的清除;间充质干细胞也在自噬介导的 A β 清除中起一定的作用^[35];细胞外的 A β 又可以诱导自噬,通常表现为 LC3 的易位 (图 2)。Fonseca 等^[36]研究表明, A β 介导小鼠神经干细胞分化。

自噬甚至与 A β 的“朊病毒样传播 (prion-like transmission)”^[37] 机制密切相关。Nath 等^[37]研究发现了一种依赖于细胞接触的神经元细胞之间的特异性的 A β 42 寡聚体传播,而这种现象并不发生在氨基酸重排后的对照组 (scrambled A β 42 寡聚体)。同时, Nath 等^[37]的结果显示,细胞获得的 A β 寡聚



图中所示均为表达EGFP-LC3融合蛋白的HEK293细胞。A, 无处理对照组; B, 经过血清去除处理12 h; C, 经过A β 处理12 h。图中箭头所指均为LC3在细胞内的易位。

图2 A β 诱导LC3在细胞内易位

体逐渐定位于溶酶体。自噬是解释这种淀粉样蛋白在细胞之间传播的可能机制^[38]。

Tau 蛋白被认为是“ $A\beta$ 级联反应”的下游效应, tau 磷酸化促进其聚集的机制为人们所熟知, 在此不再赘述。自噬起到清除 tau 聚集的作用^[39], 同样 tau 的某些亚单位也与细胞器的自噬存在相互作用。一种具有神经毒性的相对分子质量为 $2.0 \times 10^4 \sim 2.2 \times 10^4$ 的 NH_2 -tau 片段影响神经元内线粒体大小、形态及动态分布和自噬性清除, 这种影响线粒体的质控作用与 $A\beta$ 诱导自噬是否有关, 目前尚不清楚^[40]。

2.2 AD中“自噬稳态失衡”的情况

自噬在 AD 中起到“双刃剑”的作用^[41-42]。在 AD 早期, 由于突变、蛋白质的损伤和聚集诱发的自噬激活可以作为代偿机制起到保护性的作用; 但是由于溶酶体的作用, 自噬循环快速进行使自噬体很快被代谢降解, 所以正常情况下并不容易检测到自噬体; 如果这种状态持续存在, 或者再合并溶酶体功能异常, 就会逐渐形成病理改变^[43]。因此, 决定其“神经保护”和“神经退变”作用趋势的关键是: 平衡^[44]。动物模型实验表明, AD 中同时存在自噬的激活和破坏, 即“自噬失衡”^[27]。在 AD 中, 自噬途径紊乱表现为多方面: (1) 自噬体形成异常; (2) 自噬体清除障碍; (3) 自噬性细胞死亡; (4) 以上情形相互伴随出现。在 AD 的早期, 甚至是轻度认识损害 (mild cognitive impairment, MCI) 阶段, 由于可溶性异常折叠蛋白开始增加, 导致反应性的自噬体过度形成, 是机体试图清除异常蛋白质的生理性调控, 此时表现为自噬体增加。随着致病因素的持续存在, AD 患者脑内会出现 Caspase 等蛋白介导的 Beclin 1 蛋白剪切^[45], 随之 Beclin 1 的表达水平下降, 从而抑制自噬的激活, 此时特征为自噬体异常减少, 异常折叠蛋白的水平增加。在 AD 的晚期, 常常表现为自噬小泡的过剩, 出现这种现象的原因可能是溶酶体降解功能的下降^[27, 46]。

文献提示, 包括衰老在内的多种 AD 风险因素可以诱发自噬过度激活, 从而最终导致占 95% 以上的散发性 AD (sporadic AD, SAD); AD 关联的基因突变, 往往是通过自噬途径的过度激活而加速 APP 代谢, 从而导致 $A\beta$ 产生水平过高, 以致 FAD 淀粉样变病理形成^[27]。在 AD 的晚期, 自噬功能的障碍则使其原有的神经保护作用丧失, 因而不能够抗衡凋亡以及其他细胞毒性蛋白 (如 tau) 的损伤作用, 从而导致神经元的死亡^[27]。

2.3 自噬的调控与AD发病机制的联系

Beclin 1^[47] 与 AD 中自噬以及疾病的发生最为相关。在 AD 患者脑内, Beclin 1 的表达水平明显下降, 以致足以引起自噬小体形成的异常^[48]。通过遗传学手段降低 Beclin 1 的表达水平, 结果使神经元自噬下降、溶酶体代谢紊乱, 促使细胞内外的 $A\beta$ 聚集, 加重神经退变的进程^[49]。相反, 增加 Beclin 1 的表达则能够减轻 $A\beta$ 的淀粉样病理改变^[49]。这样的结果说明, 在特定的阶段, 自噬的上调对于改善 AD 的病变是有正面作用的。Jaeger 等^[50] 研究表明, 下调 Beclin 1 的表达致使 APP、APP-CTF 以及 $A\beta$ 的水平增加, 其原因可能是影响了自噬体的形成; 而自噬则促进这些蛋白质的降解。然而, Beclin 1 的水平却不受 APP 的负反馈调节。

野生型 PS1 (presenilin 1, 早老素 1) 抑制内质网应激以及相关的自噬激活^[51], 突变型 PS1 则增强 γ 分泌酶的活性, 促进 APP 蛋白 γ 位点的剪切, 从而增加 β 分泌酶与 γ 分泌酶的共同作用产物—— $A\beta$ 的生成; 但是在 PS1 突变体转基因动物模型中, 神经元中出现大量的囊泡结构, 溶酶体功能激活, 而内吞系统 (endosomal system) 却没有明显改变。通过电镜和相关抗体对细胞超微结构的进一步分析表明, AD 病理组织中的囊泡结构其实是一种自噬体结构。利用特异性的自噬体标记 (如 LC3、Rab5 等)、特殊的自噬体形态结构、电镜和免疫电镜技术研究发现, 在 AD 病理组织和 PS1/APP 转基因鼠的神经元中有大量的自噬体形成。Ohta 等^[52] 研究发现, 基线自噬水平的损伤促进 PS1 表达和 γ 分泌酶的活性, 而这种作用可以被自噬激活剂——白藜芦醇 (resveratrol) 所减轻。研究结果还提示, 自噬-溶酶体系统通过通用控制蛋白 (general control nonderepressible 2, GCN2) 调控 γ 分泌酶的活性。AD 中可能存在自噬体的运输和成熟障碍, 而溶酶体堆积可能是一种自噬过程障碍的继发表现^[41]。

Komatsu 等^[53] 日本学者利用自噬相关蛋白 APG5 或 APG7 建立的基因敲除小鼠研究发现, 单纯自噬障碍就可产生神经变性疾病的表型, 而病理上也表现为细胞内包涵体的形成。学者们提出即使在缺乏明确的致病蛋白的同时, 自噬功能的缺失或是失代偿也可能导致细胞对蛋白质、细胞器或是异常聚集体的降解能力降低, 并最终导致包涵体形成和神经元变性死亡。这些都进一步证实了自噬溶酶体功能对于异常蛋白聚集体的降解及其在神经变性疾病中的重要作用。

此外,在神经变性 Lurcher 小鼠中发现神经元的死亡表现为大量自噬体形成,早期细胞器丢失,而无明显的细胞骨架和细胞核改变。一些凋亡蛋白(Caspase)也无明显改变,用自噬抑制剂可以改善这些病理表现。有部分学者提出了自噬性死亡,认为其是一种有别于凋亡、坏死的第三种细胞的程序性死亡^[54]。可能的机制是由于自噬功能的过激(auto-phagic stress)导致细胞器和营养物质的匮乏,最终导致细胞死亡^[55]。而AD中自噬异常是否也是一种自噬性死亡,目前还没有定论,有待于进一步的研究来阐明。

3 自噬与AD治疗的药物新靶标

调节自噬平衡,维持自噬稳态,是最近提出的AD治疗新策略。对于AD患者,脑内自噬水平明显降低,因此,治疗的原则就是上调自噬。因此,与自噬通路相关的各种信号分子便成为调节自噬的候选靶标。更重要的是,AD的核心问题是淀粉样蛋白质的聚集。那么上调自噬是否有利于清除异常蛋白聚集,是否有利于抵抗此类蛋白质的神经细胞损伤,则成为验证治疗靶标选择成功与否的判定标准。

3.1 自噬与新的AD生物标志物

AD治疗中遇到的问题离不开生物标志物的选择和确立。生物标志物指的是能够客观反应疾病的生物或病理进程的检测指标,既可以做为疾病危险因素预测,也可以做为病程监测和治疗效果评价的工具。由于缺乏AD早期或者无症状期AD乃至MCI阶段的有效生物标记物,所以,人们往往错过了有效的治疗时机,亦即所谓的“窗口”。对患者采取治疗的时期较晚,也是当前影响AD治疗效果的一个重要因素。要解决这一问题,就对特异性强的AD早期诊断生物标志物的选择提出了新的要求。

溶酶体网络调控蛋白有可能成为潜在的脑脊液中新的AD生物标志物^[56]。未来对AD的治疗策略的希望在于“早期干预”,至少早于患者症状出现之前10年。溶酶体网络系统,包括内体、溶酶体以及自噬体循环,则是最早被关注的热点。Armstrong等^[56]检测了AD患者CSF酶体网络的34个蛋白,发现其中6个,即早期内体抗原1(early endosomal antigen 1,EEA1)、溶酶体相关膜蛋白1和2(lysosomal-associated membrane proteins 1 and 2,LAMP-1,LAMP-2),以及LC3、Rab3和Rab7,与对照组相比明显升高。这6个蛋白有可能成为新的特异性的AD早期生物标志物。

3.2 靶向于mTOR依赖途径

mTOR的抑制剂雷帕霉素已经被证实具有上调自噬的作用^[57]。这一结果同样在多种神经退变性疾病的细胞模型、果蝇模型和小鼠模型中分别得到证实。在亨廷顿舞蹈症(Huntington's disease,HD)的模型中,雷帕霉素的处理能够同时降低可溶性突变huntingtin以及细胞内该蛋白的聚集产物,从而起到保护细胞免受其损伤的作用^[58-59]。类似的情况也出现在其他疾病模型,如脊髓小脑共济失调III型(spinocerebellar ataxia type 3)^[60]、额颞叶痴呆(frontotemporal dementia,FTD)和帕金森病(Parkinson's disease,PD)^[61]。但是,雷帕霉素的长期治疗策略却是不可行的。这是因为mTOR同时参与机体很多与自噬无关的生理功能,包括调控核糖体生物功能和蛋白质转运。用雷帕霉素长期治疗的患者则会出现伤口愈合减缓和免疫抑制等副作用。

3.3 靶向于mTOR非依赖途径

情绪稳定剂(如碳酸锂)等可以通过抑制肌醇单磷酸酶(inositol mono-phosphatase)而诱导非mTOR依赖的自噬。锂制剂还增加了突变型huntingtin和 α -synuclein聚集蛋白的清除代谢。细胞实验表明,丙戊酸钠(sodium valproate)和卡马西平(carbamazepine)则通过抑制了肌醇(inositol)的合成而诱导自噬,同样也达到诱导抑制淀粉样蛋白聚集和抵抗其细胞毒性的作用。美国FDA批准的此类药物中有14种可以通过mTOR非依赖途径来调节自噬。这些化合物大多数的作用靶点是cAMP-Epac-PLC ϵ -IP3和Ca²⁺-calpain-G α 通路^[62]。

3.4 靶向于自噬过程的“节点”

调控自噬是近年来备受关注的多种疾病治疗策略的核心内容^[63]。AD的治疗也不例外,而调控的目的不外乎降低毒性蛋白质聚集物的含量,促进自噬溶酶体的代谢,调整应激导致的蛋白质合成紊乱,避免溶酶体膜的不稳定而抑制凋亡级联反应和细胞坏死。因此,治疗的靶点就要放在自噬过程的关键环节:(1)促进自噬的激活以及自噬对象的封存和局限化;(2)诱导特异性的自噬,促进自噬溶酶体的形成;(3)促进溶酶体的效率,解决自噬体过度堆积的问题;(4)保持溶酶体的稳定性,避免细胞损伤。

Shoji-Kawata等^[64]发现了一种具有自噬激活作用的肽——Tat-Beclin 1,这段肽的来源是自噬相关蛋白Beclin 1。Tat-Beclin 1可以结合人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus,HIV)-1的Nef以及自噬负调控蛋白GAPR-1,降低富含多聚谷氨

酰胺蛋白的聚集, 抑制多种病原生物 (包括 HIV-1) 的体外复制。具有这种类似特性的多肽很可能成为人类疾病治疗的新药物^[64]。

3.5 AD免疫治疗与自噬

本课题组曾尝试用靶向于 A β 寡聚体 (A β oligomers, A β Os) 的单克隆抗体腹腔注射快速老化小鼠 SAMP8, 实验数据提示该方法有一定的治疗效果^[65]。为了进一步阐明其免疫治疗的机制, 本课题组又检测了各组动物脑内 LC3 的表达情况, 初步发现治疗组脑内 LC3-II 水平有增加的趋势 (未发表的结果), 提示自噬参与了免疫治疗的过程。2013 年, Gu 等^[39] 研究结果与本课题组的一致: 靶向于 p-tau 396/404 的抗体通过自噬进入细胞内而清除脑内病理性 tau 蛋白的聚集, 并检测到抗体与内体-溶酶体标志物 EEA1、Rab7 和 LAMP2 共定位, 与自噬通路的标志物 LC3 和 p62 具有部分的共定位。Takamura 等^[66] 的研究也表明, 靶向 A β Os 的免疫治疗改善 AD 的自噬平衡状态, 同时也发现细胞内 A β Os 是 tau 作用的上游因素, 而细胞外 A β Os 则与诱导细胞凋亡、自噬损伤以及 A β Os 在自噬体内聚集有关。

此外, 综合运用针对各种靶点的药物, 不但容易达到自噬平衡的调节, 而且每种药物的剂量和副作用也会有所降低。

4 结语

大量的研究结果表明, 自噬的损伤和失衡是 AD 发病的重要早期因素, 这些也为将调节自噬平衡作为 AD 治疗策略之一提供了合理的依据。深入分析和掌握自噬的生物学特征以及各阶段演变的有机联系, 筛选与早期 AD 相关的自噬调控的关键基因, 寻求切实有效的治疗靶点, 将为最终解决 AD 的预防和治疗问题提供有力的支持。

[参 考 文 献]

- [1] De Duve C, Wattiaux R. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol*, 1966, 28: 435-92
- [2] Zakeri Z, Bursch W, Tenniswood M, et al. Cell death: programmed, apoptosis, necrosis, or other? *Cell Death Differ*, 1995, 2(2): 87-96
- [3] Paglin S, Hollister T, Delohery T, et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. *Cancer Res*, 2001, 61(2): 439-44
- [4] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J*, 2000, 19(21): 5720-8
- [5] Gao C, Cao W, Bao L, et al. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting dishevelled degradation. *Nat Cell Biol*, 2010, 12(8): 781-90
- [6] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7): 713-20
- [7] Garcia-Arencibia M, Hochfeld WE, Toh PP, et al. Autophagy, a guardian against neurodegeneration. *Semin Cell Dev Biol*, 2010, 21(7): 691-8
- [8] Agholme L, Hallbeck M, Benedikz E, et al. Amyloid β secretion, generation, and lysosomal sequestration in response to proteasome inhibition: involvement of autophagy. *J Alzheimers Dis*, 2012, 31(2): 343-58
- [9] Metcalf DJ, Garcia-Arencibia M, Hochfeld WE, et al. Autophagy and misfolded proteins in neurodegeneration. *Exp Neurol*, 2010, 238(1): 22-8
- [10] He C, Wei Y, Sun K, et al. Beclin 2 functions in autophagy, degradation of G protein-coupled receptors, and metabolism. *Cell*, 2013, 154(5): 1085-99
- [11] Takats S, Juhasz G. A genetic model with specifically impaired autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 2013, 9(8): 1251-2
- [12] Nixon RA. Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 23): 4081-91
- [13] Yang J, Carra S, Zhu WG, et al. The Regulation of the autophagic network and its Implications for human disease. *Int J Biol Sci*, 2013, 9(10): 1121-33
- [14] Wang Y, Qin ZH. Coordination of autophagy with other cellular activities. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(5): 585-94
- [15] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-75
- [16] Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurol*, 2011, 8(2): 108-17
- [17] Musiwaro P, Smith M, Manifava M, et al. Characteristics and requirements of basal autophagy in HEK 293 cells. *Autophagy*, 2013, 9(9): 1407-17
- [18] Dugail I. Lysosome/lipid droplet interplay in metabolic diseases. *Biochimie*, 2014, 96: 102-5
- [19] Shibutani ST, Yoshimori T. A current perspective of autophagosome biogenesis. *Cell Res*, 2014, 24(1): 58-68
- [20] Alonso S, Pethe K, Russell DG, et al. Lysosomal killing of *Mycobacterium* mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(14): 6031-6
- [21] Sakoh-Nakatogawa M, Matoba K, Asai E, et al. Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20(4): 433-9
- [22] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2679-88
- [23] Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, et al. Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse

- embryonic stem cells. *J Cell Biol*, 2001, 152(4): 657-68
- [24] Krstic D, Knuesel I. Deciphering the mechanism underlying late-onset Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*, 2013, 9(1): 25-34
- [25] Costanzo M, Zurzolo C. The cell biology of prion-like spread of protein aggregates: mechanisms and implication in neurodegeneration. *Biochem J*, 2013, 452(1): 1-17
- [26] Yu WH, Cuervo AM, Kumar A, et al. Macroautophagy--a novel β -amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease. *J Cell Biol*, 2005, 171(1): 87-98
- [27] Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, et al. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005, 64(2): 113-22
- [28] Yu WH, Kumar A, Peterhoff C, et al. Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for β amyloid peptide overproduction and localization in Alzheimer's disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2531-40
- [29] LeBlanc AC, Goodyer CG. Role of endoplasmic reticulum, endosomal-lysosomal compartments, and microtubules in amyloid precursor protein metabolism of human neurons. *J Neurochem*, 1999, 72(5): 1832-42
- [30] Rajendran L, Honscho M, Zahn TR, et al. Alzheimer's disease β -amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(30): 11172-7
- [31] Nilsson P, Loganathan K, Sekiguchi M, et al. $A\beta$ secretion and plaque formation depend on autophagy. *Cell Rep*, 2013, 5(1): 61-9
- [32] Roy K, Raychaudhuri M, Chakrabarti O, et al. Growth factor receptor-bound protein 2 promotes autophagic removal of amyloid- β protein precursor intracellular domain overload in neuronal cells. *J Alzheimers Dis*, 2014, 38(4): 881-95
- [33] Li W, Tang Y, Fan Z, et al. Autophagy is involved in oligodendroglial precursor-mediated clearance of amyloid peptide. *Mol Neurodegener*, 2013, 8: 27
- [34] Tian Y, Chang JC, Fan EY, et al. Adaptor complex AP2/PICALM, through interaction with LC3, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(42): 17071-6
- [35] Shin JY, Park HJ, Kim HN, et al. Mesenchymal stem cells enhance autophagy and increase β -amyloid clearance in Alzheimer disease models. *Autophagy*, 2014, 10(1): 32-44
- [36] Fonseca MB, Sola S, Xavier JM, et al. Amyloid β peptides promote autophagy-dependent differentiation of mouse neural stem cells: $A\beta$ mediated neural differentiation. *Mol Neurobiol*, 2013, 48(3): 824-40
- [37] Nath S, Agholme L, Kurudenkandy FR, et al. Spreading of neurodegenerative pathology via neuron-to-neuron transmission of β -amyloid. *J Neurosci*, 2012, 32(26): 8767-77
- [38] Fernandez-Borges N, Erana H, Elezgarai SR, et al. Infectivity versus seeding in neurodegenerative diseases sharing a prion-Like mechanism. *Int J Cell Biol*, 2013, 2013: 583498
- [39] Gu J, Congdon EE, Sigurdsson EM. Two novel Tau antibodies targeting the 396/404 region are primarily taken up by neurons and reduce Tau protein pathology. *J Biol Chem*, 2013, 288(46): 33081-95
- [40] Amadoro G, Corsetti V, Florenzano F, et al. AD-linked, toxic NH2 human tau affects the quality control of mitochondria in neurons. *Neurobiol Dis*, 2014, 62: 489-507
- [41] Rubinsztein DC, DiFiglia M, Heintz N, et al. Autophagy and its possible roles in nervous system diseases, damage and repair. *Autophagy*, 2005, 1(1): 11-22
- [42] Hung SY, Huang WP, Liou H C, et al. Autophagy protects neuron from $A\beta$ -induced cytotoxicity. *Autophagy*, 2009, 5(4): 502-10
- [43] Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med*, 2013, 19(8):983-97
- [44] Cherra SJ 3rd, Chu CT. Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. *Future Neurol*, 2008, 3(3): 309-23
- [45] Rohn TT, Wirawan E, Brown RJ, et al. Depletion of Beclin-1 due to proteolytic cleavage by caspases in the Alzheimer's disease brain. *Neurobiol Dis*, 2010, 43(1): 68-78
- [46] Boland B, Kumar A, Lee S, et al. Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2008, 28(27): 6926-37
- [47] Salminen A, Kaarniranta K, Kauppinen A, et al. Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome. *Prog Neurobiol*, 2013, 106-107: 33-54
- [48] Pickford F, Masliah E, Britschgi M, et al. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice. *J Clin Invest*, 2008, 118(6): 2190-9
- [49] Spencer B, Potkar R, Trejo M, et al. Beclin 1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in α -synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases. *J Neurosci*, 2009, 29(43): 13578-88
- [50] Jaeger PA, Pickford F, Sun CH, et al. Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS One*, 2010, 5(6): e11102
- [51] Szaraz P, Banhegyi G, Marcolongo P, et al. Transient knockdown of presenilin-1 provokes endoplasmic reticulum stress related formation of autophagosomes in HepG2 cells. *Arch Biochem Biophys*, 2013, 538(2): 57-63
- [52] Ohta K, Mizuno A, Ueda M, et al. Autophagy impairment stimulates PS1 expression and gamma-secretase activity. *Autophagy*, 2010, 6(3): 345-52
- [53] Komatsu M, Waguri S, Chiba T, et al. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*, 2006, 441(7095): 880-4
- [54] Yue Z, Horton A, Bravin M, et al. A novel protein complex linking the delta 2 glutamate receptor and autophagy: implications for neurodegeneration in lurcher mice. *Neuron*, 2002, 35(5): 921-33

- [55] Chu CT. Autophagic stress in neuronal injury and disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006, 65(5): 423-32
- [56] Armstrong A, Mattsson N, Appelqvist H, et al. Lysosomal network proteins as potential novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 2014, 16(1): 150-60
- [57] Xie ZG, Xie Y, Dong QR. Inhibition of the mammalian target of rapamycin leads to autophagy activation and cell death of MG63 osteosarcoma cells. *Oncol Lett*, 2013, 6(5): 1465-9
- [58] Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet*, 2004, 36(6): 585-95
- [59] Ravikumar B, Duden R, Rubinsztein DC. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(9): 1107-17
- [60] Menzies FM, Huebener J, Renna M, et al. Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain*, 2010, 133(Pt 1): 93-104
- [61] Berger Z, Ravikumar B, Menzies FM, et al. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins. *Hum Mol Genet*, 2006, 15(3): 433-42
- [62] Sarkar S, Floto RA, Berger Z, et al. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol*, 2005, 170(7): 1101-11
- [63] Rubinsztein DC, Codogno P, Levine B. Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 2013, 11(9): 709-30
- [64] Shoji-Kawata S, Sumpter R, Leveno M, et al. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide. *Nature*, 2013, 494(7436): 201-6
- [65] Zhang Y, He JS, Wang X, et al. Administration of amyloid- β 42 oligomer-specific monoclonal antibody improved memory performance in SAMP8 mice. *J Alzheimers Dis*, 2011, 23(3): 551-61
- [66] Takamura A, Sato Y, Watabe D, et al. Sortilin is required for toxic action of A β oligomers (A β O $_s$): extracellular A β O $_s$ trigger apoptosis, and intraneuronal A β O $_s$ impair degradation pathways. *Life Sci*, 2012, 91(23-24): 1177-86