

自噬与帕金森病及中药干预研究

何建成

〔作者简介〕 何建成,医学博士、教授、博士生导师。上海中医药大学基础医学院经方理论应用研究中心主任,主要从事中医药防治心脑血管疾病的基础与临床研究。兼任世界中医药学会联合会急症专业委员会副理事长、国际医学生物特征识别学会理事、上海市中医脑病专业委员会副主任委员、上海市中西医结合学会诊断专业委员会主任委员、国家科技奖励评审专家、教育部科技奖励评审专家、国家自然科学基金项目评审专家等职。发表学术论文 180 余篇,主编教材或著作 10 余部,主持并完成国家级及省级科研成果 10 余项,研究工作曾获得科技成果奖 9 项,获授权专利 3 项。

摘 要 自噬途径在帕金森病的发生、发展机制中发挥着重要作用, α -突触核蛋白、富亮氨酸重复激酶、泛素羧基末端水解酶、丝氨酸/苏氨酸激酶 PTEN 诱导激酶和 E3 泛素连接酶、以及雷帕霉素靶点等帕金森病相关基因与通路,均不同程度参与自噬调节。中药可通过诱导自噬,提高自噬水平,进而发挥防治帕金森病的作用。

关键词 自噬 帕金森病 LC3 II/LC3 I

中图分类号 R594

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.06.001

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是临床常见的神经退行性疾病之一,是以中脑多巴胺能神经元进行性减少以及路易小体(Lewy body)的出现为主要病理特点,以震颤、僵硬、运动迟缓、步态异常等为主要临床表现^[1]。目前主要应用左旋多巴(levodopa, L-DOPA)替代治疗,但其长期使用会产生疗效递减以及异动症等运动障碍的不良反应,且 L-DOPA 并不能阻止多巴胺能神经元进行性凋亡的病理进程^[2]。深入阐明 PD 的内在发病机制,进而寻求药物有效的干预靶点势在必行。

PD 的发病机制十分复杂,目前认为主要为氧化应激、兴奋性毒性、神经炎性、线粒体的功能障碍、内质网应激等多种病理因素所导致的多巴胺能神经元的减少甚至凋亡^[3]。而在机体中,神经元必须具有基本的自噬活性,才能确保其正常发挥细胞功能。基于此,越来越多的研究者认为自噬(autophagy)活性不足或功能缺陷所导致的变性蛋白以及损伤细胞器的累积,可能是 PD 等神经退行性疾病发生、发展的重要原因。近年来的许多研究表明,多个 PD 相关基因与通路,如 α -突触核蛋白(α -synuclein)、富亮氨酸重复激酶 2(leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2)、

泛素羧基末端水解酶 L1(ubiquitin carboxy terminal hydrolases L1, UCH-L1)、丝氨酸/苏氨酸激酶 PTEN 诱导激酶 1(PTEN induced putative kinase 1, PINK1)和 E3 泛素连接酶 parkin、以及雷帕霉素靶点(the mammalian target of rapamycin, mTOR)等,均直接或间接地参与到自噬调节的过程中,与自噬途径之间关联密切。因此,深入探讨自噬在 PD 发生、发展过程中的作用,对于明确本病的发病机制、寻找新的治疗靶点以及有效新药的研发等有重要意义。

一、自噬概述

自噬广泛存在于真核生物中,是细胞器再循环的重要机制,其特殊的功能发挥与发生方式,对维持细胞的自身稳态与代谢平衡,具有十分重要的意义。

1. 自噬及其功能:自噬是真核生物细胞中一种高度保守的细胞生物学过程。指细胞中的错误折叠蛋白、受损的细胞器或其他需要降解的物质,被细胞内双层的隔离膜包裹形成自噬体(autophagosome),然后与溶酶体结合形成自噬溶酶体(autolysosome),进而降解内容物的过程。可见,细胞自噬实质上是一条溶酶体依赖的通路,对于细胞器的更新以及胞内蛋白质的代谢等都具有重要的作用^[4]。

多种研究表明,自噬具有促进细胞死亡以及保护细胞的双重作用。一方面,自噬可以作为一种适应性的反应,保护细胞免受内源性、外源性刺激导致的细胞损害。另一方面,应激物刺激过度会引发自噬过度

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81573899);上海市生物医药领域科技支撑项目(16401902400)

作者单位:201203 上海中医药大学

激活,此时自噬即成为促细胞死亡的机制,导致细胞发生一种不同于凋亡的细胞程序性死亡——Ⅱ型程序性细胞死亡,即自噬性细胞死亡^[5]。总之,自噬促进细胞存活还是死亡作用的发挥取决于特异性刺激、细胞类型及环境条件等因素。

2. 自噬的发生过程与方式:细胞自噬的发生过程可分为几个阶段,首先是隔离膜的形成,目前认为隔离膜主要来自细胞中粗面内质网上无核糖体附着区的双层膜部分脱落,形成的一个扁平双层膜结构。隔离膜又称自噬泡(phagophore),其形成是细胞自噬发生的标志,之后隔离膜不断延伸,将错误折叠蛋白、受损的细胞器以及其他物质逐渐包裹起来,形成自噬体,最后自噬体与溶酶体结合形成自噬溶酶体,降解其内含物,完成胞内物质的代谢以及细胞器的更新^[6,7]。

细胞自噬的方式大致有3种:①巨自噬(macroautophagy):是细胞自噬的主要方式,指细胞内的自噬膜将部分胞质及需降解的细胞器、蛋白质等成分包裹形成自噬体后再转运至溶酶体,与溶酶体结合后降解其内容物的过程;②微自噬(microautophagy):指胞质内物质直接被溶酶体膜内陷、吞噬并由其水解酶降解,没有中间的转运过程;③分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA):指胞质内物质的降解需由热休克同源蛋白70(Hsp70)介导, Hsp70可特异性识别靶蛋白KFERQ的氨基酸序列,进一步由溶酶体相关膜蛋白2A识别并通过溶酶体膜,最后被溶酶体酶消化降解的过程^[8]。

总体而言,巨自噬可以通过清除受损的蛋白质和细胞器,促进细胞存活;微自噬则选择性降解无用的细胞器;CMA具有蛋白特异性而复杂、难溶的高聚体蛋白则只能通过巨自噬来清除^[9]。

二、自噬与PD

近年来的研究表明,PD涉及的自噬异常主要以巨自噬和CMA为主^[10]。多种PD相关基因、蛋白和通路都参与到自噬的过程中,可见自噬在PD的发病机制中占有重要地位。

1. α -synuclein与自噬机制: α -synuclein是脑中广泛表达的一种可溶性蛋白质。纤维状的 α -synuclein是细胞内路易小体的主要组成部分,而路易小体的形成正是PD特征性的标志物,因此目前认为, α -synuclein为PD发生病理过程中的关键蛋白。 α -synuclein与自噬过程关系密切,与巨自噬及CMA途径均存在相互作用。有研究表明,CMA途径可能

参与到 α -synuclein的降解过程中,底物蛋白与溶酶体受体LAMP2A(lysosome-associated membrane protein 2A)的过表达可上调CMA,进而降低 α -synuclein的表达水平及毒性等^[11]。而另一方面,已有研究表明A30P和A53T作为两种 α -synuclein的突变体,与LAMP2A受体亲和力更高,两者结合后可阻断CMA途径,进而诱发家族性PD^[12]。在PD中,过表达的 α -synuclein和 α -synuclein A53T也可通过CMA介导的对心肌细胞特异性增强因子2D(myocyte-specific enhancer factor 2D, MEF2D)的降解,干扰MEF2D与HSC70的结合,导致神经细胞的死亡。

基于较多研究显示自噬是 α -synuclein的一种降解途径,有研究者通过MPTP建立小鼠PD模型,免疫组化染色发现,应用自噬诱导物海藻糖干预后可增加小鼠黑质区DA神经元的数量^[13]。提示自噬诱导剂可能通过诱导细胞自噬,清除 α -synuclein A30P和A53T,有望成为PD的潜在治疗方法,值得进一步验证应用。

2. LRRK2与自噬机制:LRRK2存在于大脑特定区域,包括皮质、纹状体、海马、小脑以及黑质等,被认为是诱发晚期PD最常见的致病基因。LRRK2基因突变是家族性PD常见的发病原因之一,而研究者在散发性PD的路易小体和神经突触中,也发现有LRRK2的表达增加^[14]。LRRK2主要存在于细胞质中,其突变体可诱发蛋白质的聚集或神经元的死亡,这一过程的发生与自噬有紧密的关联^[15]。有研究表明,PD的发生过程中,LRRK2是CMA的降解底物,而LRRK2突变体的过表达会阻断LAMP2A复合物的装配,降低CMA的有效负荷,影响PD中 α -synuclein的CMA降解效率^[16]。有研究者在携带A53T型 α -synuclein的转基因小鼠中发现,LRRK2突变体的过表达会加速神经退行性改变以及 α -synuclein的累积,而敲除LRRK2相关基因则可能影响自噬的过程,延缓神经细胞中 α -synuclein的集聚和PD等神经退行性病变的进程^[17]。可见LRRK2与PD中自噬异常均有密切的关系。

3. UCH-L1与自噬机制:UCH-L1通常表达于大脑、睾丸、卵巢以及某些肿瘤的周边组织中,而在神经元中呈高表达,占大脑总蛋白的1%~2%,且UCH-L1与PD等神经退行性疾病的发生关联密切。突变型UCH-L1与渐行性的多巴胺能神经元的丢失有关。在细胞内,突变型UCH-L1与CMA底物、溶

酶体受体 LAMP-2A、HSC70 以及热休克蛋白 90 (Hsp90) 等高度亲和,且相互作用,通过抑制 CMA 途径,使 α -synuclein 表达量增加,进而促进 PD 的发生、发展进程^[18]。

有研究者关注到 UCH-L1 与 PD 以及自噬的紧密联系,并由此入手探索 PD 的靶向治疗方法。自噬抑制剂 3-MA 刺激细胞后,检测发现 UCH-L1 的降解被显著抑制,值得深入探讨。同时,在散发性 PD 患者的大脑中,氧化/羰基化水平呈升高状态,而 UCH-L1 则是羰基化的 1 个主要的靶点。羰基化的 UCH-L1 能使 UCH-L1 与 LAMP-2A、HSC70 以及 Hsp90 的相互作用异常增加,因此有研究者认为羰基化的 UCH-L1 可能为散发性 PD 的治疗靶点之一^[19]。

4. PINK1/parkin 与自噬机制:PINK1、parkin 是常染色体隐性遗传 PD 的致病基因,两者分别编码 PINK1 和 parkin 蛋白。parkin 是 PINK1 的下游磷酸化靶点,二者可共同调节线粒体自噬,参与线粒体的质量控制,而线粒体的质控也正是 PINK1 与 parkin 抑制 PD 的重要机制^[20]。

总体而言,PINK1、parkin 作为与 PD 密切相关的基因,在巨自噬对线粒体的特异性降解过程,即线粒体自噬 (mitophagy) 中发挥重要的作用。在 PINK1/parkin 介导的线粒体自噬中,线粒体的损伤会导致 PINK1 集聚,吸引 parkin 并诱导线粒体自噬的发生。有研究者在利用 PINK1、自噬激活因子 Beclin-1 和自噬抑制蛋白 Bcl-XL 重组质粒的研究中发现,过度表达的 PINK1 会抑制 Bcl-XL 与 Beclin-1 的相互作用,提高自噬下游蛋白 LC3 II/LC3 I 的表达,因此认为 PINK1 是通过与 Bcl-XL 的相互作用,释放 beclin-1 来激活自噬过程的,为今后 PD 相关研究提供了新的方向^[21]。

5. mTOR 依赖/非依赖途径与自噬机制:以上诸多研究表明,自噬缺陷是 PD 的常见特征,应用药理学或基因治疗手段提高自噬功能,抑制神经元的损伤,可望为 PD 提供更有效的治疗方法。而激活自噬可通过调节 mTOR 依赖途径或 mTOR 非依赖途径来实现。用雷帕霉素及其类似物等激活自噬,是目前 PD 研究最多的 mTOR 依赖性药理学手段。有研究表明,雷帕霉素在 PD 体内外模型中皆能保护多巴胺神经元的损伤。亦有研究者将雷帕霉素应用于 MPTP 造模的 PD 小鼠中,发现脑内的多巴胺能神经元、TH 以及自噬蛋白 LC3 明显增多, α -synuclein 显著下降^[22]。mTOR 是自噬的主要负调节因子,抑制 mTOR

的活性,可诱导自噬的激活。锂盐、卡马西平等亦可诱导 mTOR 非依赖性自噬,降低对鱼藤酮诱导的 SH-SY5Y 细胞 PD 模型的细胞损伤^[23]。

前述研究表明,从自噬机制出发研制的药物与治法,在未来 PD 的防治方面,将具有巨大的发展潜力与广阔的应用前景。

三、PD 的中药干预

较多研究提示,线粒体的自噬缺陷与 PD 的发生密切相关,LC3 是线粒体自噬水平的重要标志物之一。而 LC3 翻译后形成膜结合型的 LC3 II 长期存在于自噬的整个过程中。而 LC3 II 的出现提示自噬的出现^[24]。目前认为,自噬水平的检测主要是通过蛋白印迹法 (Western blot) 检测自噬标志物 LC3 的转换,即 LC3 II/LC3 I 比值。有研究者研究中药方剂 (葛根、当归、黄芩、桔梗、白芷、升麻、远志、石菖蒲、龙眼、莱菔子等) 对神经保护的作用,结果发现该方剂能通过提高自噬水平进而减少 α -synuclein 的聚集,保护神经因子分化的 PC12 细胞,发挥神经保护的作用^[25]。亦有研究者发现,芍药苷可以显著提高 PC12 细胞的存活率,减少乳酸脱氢酶的漏出,降低细胞凋亡率,而其作用机制主要是通过提高 LC3 II 水平,降低分子伴侣自噬通路的活性发挥的。

本课题组应用 Western blot 法检测技术,观察了中药复方地黄颗粒对 PD 模型大鼠自噬水平标志物 LC3 II/LC3 I 比值的影响。结果表明,在改善 PD 症状和病理表现的同时,复方地黄颗粒可显著提高的 LC3 II/LC3 I 比值,提示提高自噬水平可能是复方地黄颗粒治疗 PD 的重要机制。上述研究结果表明,自噬在中医药防治 PD 的研究中可望成为新的研究方向,而相关药物作用靶点和机制的阐明将为临床中药治疗 PD 的方案制定提供重要的依据,并可能为新药的开发提供方向。

四、展 望

综上所述,自噬是维持细胞稳态与应激平衡的重要代谢过程,这一机制对于 PD 等神经退行性疾病而言尤为重要。以上诸多研究都证实,自噬的功能障碍参与了 PD 的发病机制,自噬缺陷或许在一定程度上可作为 PD 的病理指标之一,而应用多种手段激活自噬可望成为 PD 新的治疗靶向所在。

当然有关自噬与 PD 的发病机制研究仍有很多问题亟待阐明。在疾病的不同阶段自噬所发挥的作用仍不甚明了,不恰当或过度的激活自噬必会进一步导致神经细胞的凋亡、加重病情,如何适度激活自噬

以及维持自噬功能将成为今后研究的重点与难点。充分认识自噬及其在 PD 发病机制中的作用,寻找中药的作用靶标及基因治疗方法等,必将为 PD 的预防、治疗提供更有效的干预措施。

参考文献

- Ali SF, Binienda ZK, Imam SZ, *et al.* Molecular aspects of dopaminergic neurodegeneration: gene – environment interaction in parkin dysfunction[J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2011, 8 (12): 4702 – 4713
- Iravani MM, Jenner P. Mechanisms underlying the onset and expression of levodopa – induced dyskinesia and their pharmacological manipulation[J]. *J Neural Transm*, 2011, 118(12): 1661 – 1690
- Saiki S, Sato S, Hattori N. Molecular pathogenesis of Parkinson's disease: update[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 2012, 83 (4): 430 – 436
- Alfonso S, Natascia V. The interplay between mitochondria and autophagy and its role in the aging process[J]. *Exp Gerontol*, 2014, 56 (8): 147 – 153
- Lees A J, Hardy J, Revesz T. Parkinson's disease[J]. *Lancet*, 2009, 373(9680): 2055 – 2066
- Saeid G, Shahla S, Behzad Y, *et al.* Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 112 (12): 24 – 49
- 刘斌, 孙静, 张晋霞, 等. 自噬及自噬相关蛋白在帕金森病模型大鼠黑质纹状体中的表达及意义[J]. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2014, 21(3): 187 – 191
- Nikoletopoulou V, Papandreou M E, Tavernarakis N. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(8): 398 – 407
- Cook C, Stetler C, Petrucelli L, *et al.* Disruption of protein quality control in Parkinson's disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2(5): a009423
- Xilouri M, Stefanis L. Chaperone mediated autophagy to the rescue: A new – fangled target for the treatment of neurodegenerative diseases[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2015, 66: 29 – 36
- HJ P, JY Shina, H N Kima, *et al.* Neuroprotective effects of mesenchymal stem cells through autophagy modulation in a parkinsonian model[J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(8): 1920 – 1928
- Priscilla De Rosa, Elettra Sara Marini, Vania Gelmetti, *et al.* Candidate genes for Parkinson disease: lessons from pathogenesis[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 449: 68 – 76
- 吴锋, 秦巨峰. 自噬诱导剂海藻糖对帕金森症小鼠的治疗作用[J]. *交通医学*, 2014, 28(4): 316 – 317, 321
- Li T, Yang D, Sushchky S, *et al.* Models for LRRK2 – linked parkinsonism. *Parkinsons Dis*, 2011, 2011: 942412
- Harris – White ME, Ferbas KG, Johnson MF, *et al.* A cell – penetrating ester of the neural metabolite lanthionine ketimine stimulates autophagy through the mTORC1 pathway: evidence for a mechanism of action with pharmacological implications for neurodegenerative pathologies[J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 84(11): 60 – 68
- Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, *et al.* Interplay of LRRK2 with chaperone – mediated autophagy[J]. *Nat Neurosci*, 2013, 16: 394 – 406
- Sokhna M S Yakhine – Diop, Jose M Bravo – San Pedro, Ruben Gomez – Sanchez R, *et al.* G 2019S LRRK2 mutant fibroblasts from Parkinson's disease patients show increased sensitivity to neurotoxin 1 – methyl – 4 – phenylpyridinium dependent of autophagy[J]. *Toxicology*, 2014, 324(3): 1 – 9
- Liu B, Sun J, Zhang JX, *et al.* Autophagy – related protein expression in the substantia nigra and eldepryl intervention in rat models of Parkinson's disease[J]. *Brain Res*, 2015, 1625(2): 180 – 188
- Kabuta T, Wada K. Insights into links between familial and sporadic Parkinson's disease: physical relationship between UCH – L1 variants and chaperone – mediated autophagy[J]. *Autophagy*, 2008, 4(6): 827 – 829
- Norris KL, Hao R, Chen LF, *et al.* Convergence of parkin, PINK1, and α – Synuclein on stress – induced mitochondrial morphological remodeling[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290: 13862 – 13874
- 佟明明, 姜长安. 帕金森氏病相关蛋白 Pink1 促进自噬的研究[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2013, 44(3): 366 – 370
- Liu K, Shi N, Sun Y, *et al.* Therapeutic effects of rapamycin on MPTP – induced Parkinsonism in mice[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(1): 201 – 207
- Giordano S, Darley – Usmar V, Zhang J. Autophagy as an essential cellular antioxidant pathway in neurodegenerative disease[J]. *Redox Biol*, 2013, 2: 82 – 90
- Guo Y, Yu W, Sun D, *et al.* A novel protective mechanism for mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH2) in type i diabetes – induced cardiac dysfunction: Role of AMPK – regulated autophagy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852: 319 – 331
- Bae N, Ahn T, Chung S, *et al.* The neuroprotective of modified Yeoldahanso – tang via autophagy enhancement in models of Parkinson's disease[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134 (2): 313 – 322

(收稿日期: 2017 – 03 – 02)

(修回日期: 2017 – 03 – 06)