

自噬现象及其在脊髓缺血再灌注损伤中作用的研究进展

Research progress of autophagy in spinal cord ischemia and reperfusion injury

殷建¹, 殷照阳², 杨海源¹, 殷国勇¹, 凡进¹

(1 南京医科大学第一附属医院脊柱外科 210029 南京市; 2 江苏省连云港市第一人民医院骨科 222000)

doi: 10.3969/j.issn.1004-406X.2015.06.14

中图分类号: R683.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2015)-06-0557-06

脊髓缺血再灌注损伤 (spinal cord ischemia-reperfusion injury, SCII) 指的是脊髓神经细胞经历一段时间的缺血后得到血液再灌注, 却出现了明显的神经功能障碍, 甚至不可逆性脊髓神经元迟发性死亡, 可以引起患者四肢截瘫甚至死亡等一系列并发症^[1,2], 是目前发生率和致残率都较高的疾病, 严重威胁患者的生命健康, 增加了患者及其家人、社会的经济、心理负担。脊髓血液由椎动脉的降支分出单一的脊髓前动脉和成对的脊髓后动脉, 以及肋间动脉、腰动脉、髂动脉分出的脊髓支(根动脉)供应。外伤或临床上脊柱、胸心、血管外科的部分手术常需要暂时性的阻断腰动脉或胸腹主动脉而阻断部分脊髓血供, 当脊髓血液再灌注后常会引起脊髓损伤症状。目前对 SCII 损伤的机

制研究已成为脊柱外科和神经学科等领域的热点和难点, 其中自噬被认为在 SCII 中对脊髓的损伤及保护起重要作用。自噬是普遍存在的、真核细胞特有的生命现象, 在细胞的生长发育和老化的过程中清除多余或损伤细胞器、维持细胞内环境稳态具有重要作用。笔者就自噬的发生发展及其在脊髓缺血再灌注损伤中的损伤或保护机制进行综述, 以期临床患者减轻损伤、提高生活质量提供新思路。

1 “自噬”(Autophagy)的起源

20 世纪 50 年代, 比利时科学家 Christian de Duve 使用电镜观察到了自噬体 (autophagosome) 的构造, 1962 年, Ashford 等使用透射电镜观察到了胰岛素处理后小鼠肝细胞中的自噬现象^[3], 近年来自噬在 SCII 中的研究逐渐成为研究热点。真核细胞内主要存在两种降解细胞质内蛋白质的途径: 泛素-蛋白酶体系统和自噬, 前者主要是有选择性地降解蛋白质, 相比之下后者缺乏选择性^[4]。自噬作为真核细胞所特有的、广泛存在的依赖溶酶体消化细胞产物

第一作者简介: 男 (1990-), 硕士研究生在读, 研究方向: 脊柱与脊髓损伤

电话: (025)68136474 E-mail: yinjian0511@163.com

通讯作者: 凡进 E-mail: fanjin@nimu.edu.cn

31. Miyashiro K, Kunii I, Manna TD, et al. Severe hypercalcemia in a 9-year-old Brazilian girl due to a novel inactivating mutation of the calcium-sensing receptor [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(12): 5936-5941.
32. Rivas AM, Lado-Abeal J. Diffuse idiopathic skeletal hyperostosis and familial hypocalciuric hypercalcemia: a unique association in a young female[J]. Am J Med Sci, 2013, 346(3): 247-249.
33. Gokhale Y, Godkar D, Hedge U, et al. Quadriplegia complicating ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. J Assoc Physicians India, 2002, 50: 432-434.
34. Zhang W, Wei P, Chen Y, et al. Down-regulated expression of vimentin induced by mechanical stress in fibroblasts derived from patients with ossification of the posterior longitudinal ligament[J]. Eur Spine J, 2014, 23(11): 2410-2415.
35. Kang YM, Suk KS, Lee BH, et al. Herniated intervertebral

disk induces hypertrophy and ossification of ligamentum flavum[J]. J Spinal Disord Tech, 2014, 27(7): 382-389.

36. 张耀, 刘宝戈, 林欣, 等. 生物力学因素与 BMP2 单核苷酸多态性对颈椎后纵韧带骨化成骨作用的影响 [J]. 医学研究杂志, 2014, 43(10): 85-91.
37. Wang H, Liu D, Yang Z, et al. Association of bone morphogenetic protein-2 gene polymorphisms with susceptibility to ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine and its severity in Chinese patients [J]. Eur Spine J, 2008, 17(7): 956-964.
38. Li JM, Zhang Y, Ren Y, et al. Uniaxial cyclic stretch promotes osteogenic differentiation and synthesis of BMP2 in the C3H10T1/2 cells with BMP2 gene variant of rs2273073 (T/G)[J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106598.

(收稿日期: 2015-01-22 末次修回日期: 2015-06-04)

(本文编辑 李伟霞)

或外源性物质的一种降解机制,以实现细胞本身的代谢需要及某些细胞器的更新,对维持细胞稳态具有重要意义^[5]。当自噬发生时,高尔基体、多聚核糖体、内质网的降解早于核解体,自噬过程中线粒体功能完整,为自噬提供能量。当线粒体大部分溶解变性、染色质断裂、核解体时称之为自噬性细胞死亡,为了与凋亡相区别,这种细胞死亡方式被称为Ⅱ型程序性细胞死亡。

2 自噬的发生

自噬的发生过程可分为 4 个阶段:①分隔膜形成;②自噬体形成;③自噬体的运输和融合;④自噬体的裂解。正常生理情况下机体保持低水平的自噬以维持细胞的代谢及细胞器的更新。当受到外界环境刺激时(如缺氧、缺糖、氨基酸、能量缺乏等),会激活细胞内自噬,进而通过单层或双层膜包裹带降解的物形成自噬体,运送至溶酶体结合形成自噬溶酶体并由多种酶消化降解受损的细胞结构或衰老的细胞器等,同时为合成新的细胞器提供原料,以维持细胞生存。但是也有的研究表明自噬同样会引起细胞损伤甚至死亡^[6]。

哺乳动物自噬体形成与自噬相关基因 3 (autophagy associated gene 3, Atg3)、Atg5、Atg7、Atg10、Atg12 和 LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1-LC3) 参与组成的两条泛素样蛋白加工修饰过程相关^[7]。其泛素样加工修饰过程可以相互调节。Atg12 定位在前自噬泡双层隔离膜或分隔膜的整个延长阶段,与前自噬泡的形成相关。LC3 定位于自噬体分隔膜(未和 PE 结合)、内外膜及自噬溶酶体膜(和 PE 结合)上,与酵母 Atg7/8 同源。LC3 前体形成后被蛋白酶 ATG4 加工成胞浆可溶性 LC3-I (18kDa),其可与自噬泡膜表面的磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE) 结合成膜结合形式 LC3-II (16kDa)。LC3-II 定位于前自噬体和自噬体,是自噬体的标志性分子,其含量的多少与自噬泡的数量成正比。

3 自噬的分类

根据细胞物质运送到溶酶体内的途径不同将自噬分为 3 类^[8]:①巨自噬(macroautophagy):多数学者认为是在外界环境的刺激下由非溶酶体来源的单层膜凹陷形成杯状双层膜样分隔膜,进而完全包绕待降解物形成自噬体,接着与溶酶体融合、降解^[9]。这种在应激时激活的自噬能在缺乏营养的情况下产生维持细胞生存的大分子物质和能量,清除变性、受损、坏死的细胞器,起保护作用。巨自噬主要由自噬因子 Beclin-1、LC3、P62 等来调节。也有研究认为自噬体的膜不是直接来源于高尔基体或内质网,而是在胞浆中重新生成的,具体的机制尚不清楚。②微自噬(microautophagy):是指溶酶体膜直接包裹长寿命蛋白并降解的过程,主要参与正常生理情况下细胞器的降解^[10]。③分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy CMA):是指胞浆内的分子伴侣 Hsc73 识别底物蛋白分子

的特定氨基酸序列并与之结合形成复合物,然后与溶酶体受体结合使底物发生去折叠并被转移至溶酶体腔降解的过程^[11]。后文所涉及的自噬都是指巨自噬。

4 自噬的调节

细胞自噬是在严格的调控下发生的,主要参与调节的蛋白分子有:磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)、雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)、GAI3 蛋白以及氨基酸、激素等。

4.1 PI3K

PI3K 有 I、II、III 三种亚型。PI3K I 通过磷酸化其产物 PKB/Akt 激活 mTOR 信号途径而抑制自噬^[12]。PI3K III (Vps34) 是将细胞内物质向溶酶体进行运输的众多途径中的一种关键酶,能促进自噬的发生^[13]。它通过催化底物形成 3-磷酸磷脂酰肌醇(PI3P),PI3P 能诱导自噬,同时阻止凋亡和坏死的发展^[14]。有研究表明^[15], III 型 PI3K 能与 Beclin-1 形成的复合物位于跨高尔基网(the trans-Golgi network, TGN)上,该复合物可通过控制 PI3P 从 TGN 到达独立膜来调控自噬。Carlioni 等^[16]在新生大鼠缺血、缺氧性脑损伤模型中经脑室注射 Class III PI3K 抑制剂渥曼青霉素(wortmannin)和 3-MA (3-methylamphetamine, 3-MA),结果显示实验组中 Beclin-1 显著下降,自噬被明显抑制。近年来对 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)研究发现,TLR2 可分别通过 PI3K/Akt/mTOR 途径和丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)(ERK1/2)/Th2 immune responses 途径抑制自噬,同时可通过 MyD88/MAPA(p38)Th2 immune responses 途径促进自噬。TLR4 作用机制与 TLR2 相反。

4.2 TOR 激酶

目前对 TOR 激酶信号途径的研究主要是在酵母细胞中,在人类中的同源基因是 FRAP1 (FK506 binding protein 12-rapamycin associated protein 1)。TOR 激酶是一个丝/苏氨酸蛋白激酶,接受多种上游信号的调控,如 Class I PI3K、IGF-1/2、MAPK 等,能感受氨基酸、ATP、激素的变化,是调控细胞生长的关键物质。TOR 激酶可使 Atg13 磷酸化,通过抑制 Atg1 激酶活性和 Atg13-Atg17 的相互作用从而抑制自噬^[17],还可以通过激活下游效应因子控制与自噬相关的基因转录和翻译^[18],在自噬的发生中起着“门卫(gatekeeper)”的作用^[19]。雷帕霉素作为 mTOR (Mammalian Target of Rapamycin 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白)的抑制剂,能使自噬特异性蛋白磷酸化酶模式发生转换,使 Atg13 去磷酸化及 Atg1 等自噬基因活化,从而促进自噬的发生^[20]。

4.3 GAI3 蛋白和氨基酸

GTP 的结合 G 蛋白亚基 GAI3 是自噬抑制因子,GDP 的 GAI3 则是自噬的活化因子。G alpha 相关蛋白(G alpha interacting protein, GAIP) 是 G 蛋白信号调节因子 3 (regulator of G-protein signaling 3, RGS3)家族成员之

一,能通过 GAI3 蛋白加速 GTP 的水解促进自噬发生^[21]。氨基酸作为自噬过程中蛋白降解终产物通过负反馈调节自噬^[22],也可通过抑制 Raf-1 激酶的活化进而抑制 GAIP 依赖的自噬。由此可见 GAI3、GTP 和氨基酸相互关联共同调节自噬的发生。

除上述分子之外,能促进自噬的还有:胰高血糖素、Beclin-1(与酵母 Atg6 同源)、高浓度的 cAMP、结节性硬化复合物 1、2(TSC1、2)、PTEN、AGS3 等;抑制自噬的有:胰岛素、哺乳动物核糖体蛋白 S6(p70S6)等;另外,酪蛋白激酶、钙离子等也可调控自噬,但具体机制目前尚不清楚^[23]。

研究发现,自噬在组织器官的缺血阶段和再灌注阶段的激活方式是不同的。缺血阶段是通过抑制 mTOR/AMPK 信号通路促进自噬的发生。当组织器官缺血时细胞处于缺氧、缺糖、氨基酸缺乏状态,细胞内 ATP 浓度迅速下降,ATP/AMP 升高引起 AMPK (AMP-activated protein kinase,单磷酸腺苷激活的蛋白激酶,是维持细胞稳态最敏感的能量感受器)活化,进而磷酸化激活 TSC1/2(结节性硬化 1/2 蛋白)。TSC1/2 是 mTOR 激酶的负性调节物质,通过 Rheb 抑制 mTOR 激酶,从而促进自噬的发生。再灌注阶段则是通过 PI3K/Beclin-1 信号通路调节自噬。有研究证实,心肌缺血阶段是通过抑制 mTOR 途径诱发自噬^[24],但是在脊髓神经细胞中机制尚不清晰,由于神经元几乎只通过葡萄糖来提供能量和合成蛋白质碳链,因此其内化和利用葡萄糖能力与胰岛素无关,无法通过 mTOR 信号途径调节自噬,缺血缺氧后可能是通过激活 PI3K III 信号途径发生自噬,与再灌注阶段调节自噬的方式相似。组织器官再灌注时,细胞内的 AMPK 被迅速灭活,Beclin-1 表达上调,PI3K III 与 Beclin-1 形成复合物产生 PI3P 从而促进自噬的发生。

5 自噬的检测

5.1 检测自噬的金标准

目前公认的检测自噬的金标准为透射电镜下观察自噬结构的超微形态^[25]。透射电镜下可见损伤的细胞器如线粒体肿胀变形,其周围出现空泡状双层膜样结构,继而双层膜环绕成自噬体^[26],自噬体与溶酶体融合形成而自噬溶酶体,其在电镜下是单层膜结构,被自噬体包裹的成分已降解。由于自噬体的数量受生成和消除两个方面的因素影响,所以电镜观察仅能证明自噬过程的存在,难以反映自噬的强弱。近来发现的免疫金电镜技术结合图像分析软件能对所有自噬泡面积进行测量,从而能定量分析自噬的强弱^[27]。

5.2 自噬体膜的标志性蛋白 LC3 的检测

检测 LC3 常用的方法有 Western blot、免疫荧光、GFP-LC3。LC3 可与绿色荧光蛋白 GFP 结合成 LC3-GFP,用荧光显微镜可检测 LC3-I 转变为 LC3-II 这一过程。

5.3 western blot 检测 LC3-II/LC3-I 的比值

一般认为,LC3-II/LC3-I 的比值检测大于 1 时存在

自噬。需要注意的是,LC3 抗体对 LC3-II 有更高的亲和力,会造成假阳性,所以需与方法②结合使用,同时也要考虑溶酶体活性的影响。

5.4 检测长寿蛋白的批量降解

用同位素标记细胞内长寿命蛋白,通过检测自噬性降解产物的放射性活度来反应自噬性降解力的强弱。属非特异检测。

5.5 单丹(磺)酰戊二胺(MDC)法

自噬形成所依赖的第二个泛素样结合系统中的 Apg8(位于自噬囊泡膜上)可与 MDC 结合后呈荧光显色,荧光斑点的数量与自噬活性相关^[28]。因为此过程中自噬体和所有酸性胞液都能被染色,故此法亦属非特异性检测,仅对处于物质降解阶段的晚期自噬具有特异性。

5.6 间接检测法

当自噬体与溶酶融合、消化后,可见自噬体内不可降解的残体,在显微镜下对残体的观察(主要是脂褐素颗粒)可以间接反映自噬的活性^[29]。

5.7 “自噬潮”分析

自噬是一个动态变化的过程,“自噬潮”也是一个动态连续的概念,它通过观测整个自噬的过程,包括自噬体的形成、自噬的底物向溶酶体的运送以及在溶酶体内降解,能够可靠地反应自噬的强弱^[30]。

6 SCII 后自噬的预防和治疗

近年来自噬在肿瘤、脑损伤中有较多的研究,但是在 SCII 中的研究却刚刚起步。脊髓神经元对缺血缺氧极其敏感,在某些损伤或人为干预等因素作用下,脊髓神经元经过一定时间的缺血(缺氧)后,尽管得到了血液的再灌注,却出现了明显的神经功能障碍,甚至出现不可逆性脊髓神经元迟发性损伤。原发性脊髓损伤在现实中往往难以控制,但是继发伤害可以通过人为干预降至最低,而减轻神经损伤的关键在于如何有效地防治脊髓神经细胞在再灌注时及再灌注后的损伤和死亡。目前研究表明,自噬在其中扮有重要角色。自噬的发现加深了我们对于脊髓继发性损伤机制的理解,而缺血预处理、高压氧预处理和药物预处理也为防治脊髓缺血再灌注损伤提供了一个新的思路。

自噬和凋亡同时存在于在 SCII 中,他们的相互作用关系密不可分。有学者认为自噬先于凋亡,如自噬抑制剂 3-MA 可以延迟凋亡,但是凋亡抑制剂不能抑制自噬。自噬的抑制可以提高细胞对凋亡信号的敏感性。细胞中抑制自噬活性可以将死亡信号由自噬型细胞死亡转到凋亡型细胞死亡。SCII 刺激可激活 JNK(c-Jun 氨基端激酶),其介导 Bcl-2 中某些位点磷酸化,使 Bcl-2 与 Beclin-1 结合力下降、Beclin-1 被释放后激活自噬^[31]。长期刺激可使大量的 Bcl-2 磷酸化,p-Bcl-2 与抗凋亡蛋白 BAX 结合抑制凋亡;极度刺激下可使 Bcl-2 多位点磷酸化(高磷酸化),其与 BAX 分离而诱发凋亡^[32]。越来越多的证据表明,beclin-1 才是自噬的“守门人”,凋亡和自噬的具体的作用机制有

待进一步探讨分析。

6.1 缺血预处理

在脊髓缺血再灌注阶段,谷氨酸介导的兴奋毒性、氧自由基和炎症是造成损伤的重要因素,而缺血预处理或高压氧预处理可显著减轻SCII带来的损伤。Fan等^[33]在建立的缺血预处理大鼠脊髓缺血再灌注模型(缺血30min)中发现,缺血预处理(缺血、再灌注预处理时间均为5min/次,共三次)能显著延长自噬标志性蛋白LC3-II在缺血再灌注后的脊髓神经细胞中的持续时间,减缓LC3-II的衰减,同时降低p-Bcl-2的表达,抑制伴随而来的Bcl-2/Beclin-1复合体的分离,从而抑制了Beclin-1介导的细胞自噬性死亡。因此认为尽管自噬在SCII中具有保护作用,但是自噬的持续时间很短(再灌注3h开始表达,24h后显著降低),通过缺血预处理可以维持细胞自噬溶酶体的活性,延长自噬持续的时间和强度从而减轻SCII带来的损伤,所以他们认为自噬是具有两面性的。Desai等^[34]在心脏缺血再灌注模型中也发现Bcl-1上调,与脊髓缺血再灌注模型中的结论一致。

6.2 高压氧预处理

以往观点认为氧自由基(ROS),如:过氧化氢(H_2O_2)、超氧根离子($O_2^{\cdot-}$)、氢氧根($OH^{\cdot}$)等是造成SCII的因素之一。Nie等^[35]通过建立高压氧预处理兔脊髓缺血再灌注模型发现高压氧预处理对神经细胞起保护是因为高压氧预处理可以产生非致死量的内源性ROS,而这些ROS可以通过激活内源性抗氧化物酶,以清除SCII中积聚的ROS。他们的依据是高压氧预处理可以增加ROS的产生^[36],而运用ROS除剂或抗氧化物酶清除剂可以明显抑制高压氧预处理带来的保护作用。而王永春等^[37]则认为高压氧预处理还可以通过线粒体内产生的ROS诱导自噬而起保护作用。ROS可部分通过Class III PI3K信号途径调节饥饿诱导的自噬^[38]。Li等^[39]通过建立兔脊髓缺血再灌注模型发现诱导型一氧化氮合酶(inducible NOS, iNOS)可以通过促进p-BAD(B细胞白血病-淋巴瘤-2关联死亡蛋白,BAD)去磷酸化,降低BAD和14-3-3的结合力,诱发神经元凋亡。而高压氧预处理产生的ROS可刺激产生原生型NOS(constitutive NOS, cNOS)和热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs),通过调节自噬而对SCII起保护作用^[40]。

第四军医大学曾毅等^[41]同样认为自噬是SCII中的损伤因素。他们在建立的糖氧剥夺诱导原代培养的脊髓神经元损伤的模型中,用重复高压氧预处理(98% O_2 、2% CO_2 , 0.35MPa; 2h/d, 第3~7天)5d后发现,与对照组相比,实验组脊髓神经细胞Bcl-2表达增加,同时Beclin-1、Caspase-3、LC3-II表达减少,LDH释放减少。因此他们认为高压氧预处理可以通过增加抗凋亡蛋白Bcl-2的表达抑制细胞自噬,从而保护脊髓神经细胞^[41]。

6.3 自噬抑制剂

苏州大学魏兴等^[42]通过构建胸主动脉球囊阻断合并体循环低血压(MAP=40mmHg)构建大鼠脊髓缺血再灌注

模型的研究发现,脊髓缺血再灌注损伤后beclin-1和LC3于再灌注3h后明显升高,24h到达高峰,持续至48h。自噬相关蛋白P62下调,与LC3反相同步,于3h明显下降,24h下降到最低点(神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞中均可见)。自噬抑制剂3-MA能明显抑制脊髓损伤后细胞自噬的表达,改善神经功能,增加脊髓前角神经元数,减轻脊髓缺血再灌注损伤。因此他们认为自噬在脊髓缺血再灌注中具有损伤作用,而自噬抑制剂3-MA通过抑制III型PI3K调节路径起到保护脊髓神经细胞的作用。

6.4 细胞移植

Yin等^[43]经腹夹闭腹主动脉建立大鼠脊髓缺血再灌注模型,运用骨髓间充质干细胞移植来治疗SCII。实验研究发现骨髓间充质干细胞移植能显著增加脊髓神经元微管相关蛋白2(Microtubule-associated protein 2, MAP2)和生长相关蛋白43(Growth-associated protein 43, GAP43)的表达,降低Beclin-1和LC3B的含量。他们认为骨髓间充质干细胞对神经元的保护修复作用是通过抑制SCII后神经元的自噬,促进神经突出的生长和再生而产生的。因此他们同样认为自噬在SCII中主要起损伤性作用。

6.5 低温处理

Fujita等^[44]研究了低温对SCII中自噬作用的影响。他们经股动脉插管阻塞腹主动脉建立兔脊髓缺血再灌注模型。通过对自噬相关蛋白Beclin-1、Bcl-2和GABARAP表达量的测定探讨低温对SCII中自噬作用的影响。与常温组相比,低温处理能显著减少脊髓运动神经元的丢失,Beclin-1和GABARAP在常温模型中显著升高,而低温组中Beclin-1和GABARAP的表达被抑制,自噬抑制蛋白Bcl-2表达量明显增多。这提示低温处理能抑制脊髓神经元自噬的发生,而自噬又可导致运动神经元迟发性死亡。因此他们也认为自噬在SCII中起损伤性作用,应用低温处理可以通过增加自噬抑制蛋白Bcl-2的表达而减缓这种损伤。

Baba等^[45]建立兔腹主动脉球囊阻断脊髓缺血再灌注模型(缺血15min),通过检测脊髓腹侧运动神经元中的LC3-II和GABARRAP(γ -aminobutyric-acid type-A-receptor-associated protein)发现,GABARRAP在缺血8h后开始明显升高,2d达到高峰;而LC3-II在缺血2d时明显升高。GABARRAP作为哺乳动物酵母Atg8的同源基因,和LC-3 II一样结合在自噬溶酶体膜上。他们认为脊髓缺血可以引发运动神经元内的自噬,而自噬又是导致细胞死亡的重要原因。同时他们还认为自噬具有两面性,一方面可导致细胞损伤甚至是死亡,另一方面可以清除损伤的细胞,并产生游离的氨基酸和脂肪酸,有利于线粒体内ATP和蛋白质的合成,起到保护作用。因此自噬在脊髓缺血再灌注中是“扮演”有利还是有害的角色取决于刺激的强度(LC-3 II、GABARRAP的表达量)。

7 小结

综上所述,自噬具有两面性。缺血和再灌注可以引起脊髓神经细胞内自噬的发生,而自噬又是导致细胞损伤、死亡的重要因素。对此目前有三种主流观点:①在缺血再灌注期间自噬始终起损伤性作用;②缺血阶段自噬起保护作用,再灌注期间主要是损伤性作用;③再灌注早期自噬通过抑制凋亡起保护作用,再灌注阶段晚期起损伤性作用。但是这些观点目前都处于假设阶段,还有待实验进一步证实。通过缺血预处理^[33]、高压氧预处理^[35,41]或者应用自噬抑制剂^[42]均可通过抑制自噬的发生而减轻细胞损伤。但是自噬本身就是正常细胞基础生命活动的一部分,一定强度的自噬在清除损伤的细胞、线粒体内 ATP 以及蛋白质的合成中具有积极作用。另外在神经细胞缺血再灌注中,自噬也可以通过抑制凋亡途径减少其导致的细胞损伤,从而起到保护作用。

自噬同样在 SCII 中扮演重要角色。有研究表明临床中有 5%~16% 的术中有脊髓缺血的患者在术后出现了截瘫^[46,47],所以弄清楚自噬在其中的作用机制对于临床上防治损伤,提高患者生命质量具有重要的实际意义。缺血或高压氧预处理可以提高患者术中及术后对缺血的耐受,减轻脊髓神经细胞的损伤,为临床预防和治疗 SCII 提供了一个新的思路。虽然高压氧/缺血预处理^[33,35]在实验动物身上已经证明具有保护作用,但是目前还没有临床证据能充分证明其治疗 SCII 是有效的,要运用在临床实践中还需要进一步的研究实验。另外对缺血预处理强度的把握也是临床实践中所面临的挑战。

自噬贯穿于真核生物的生长发育和生理病理过程中,通过降解受损细胞器如线粒体或有害物质等为遗传或生化损伤提供一道保护性屏障,如果自噬受到抑制则会导致一系列疾病的发生^[48]。相比于兔,大鼠的脊髓血供和人类相似度更高,希望能够通过建立大鼠脊髓体外、体内缺血再灌注模型,通过进一步检测自噬相关蛋白,分析 SCII 中自噬的双重作用及其与凋亡信号通路之间的相互联系;探讨最佳缺血预处理时间及运用于临床实践的可能性;研究高压氧预处理和损伤后高压氧治疗的疗效。自噬具有两面性,如何调节自噬的活性以期起到最大保护作用将对 SCII 的诊治具有重要意义。

8 参考文献

- Anderberg L, Aldskogius H, Holtz A. Spinal cord injury—scientific challenges for the unknown future [J]. Ups J Med Sci, 2007, 112(3): 259–288.
- 王鹏, 殷国勇, 曹晓建, 等. 细胞凋亡信号调节激酶 1 在脊髓缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2007, 17(9): 671–675.
- Ashford TP, Porter KR. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes [J]. J Cell Biol, 1962, 12: 198–202.
- Klionsky DJ. The molecular machinery of autophagy: unanswered questions [J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 1): 7–18.
- Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword [J]. Science, 2004, 306(5698): 990–995.
- Dadakhuaev S, Jung EJ, Noh HS, et al. Interplay between autophagy and apoptosis in TrkA-induced cell death [J]. Autophagy, 2009, 5(1): 103–105.
- Alonso S, Pethe K, Russell DG, et al. Lysosomal killing of Mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(14): 6031–6036.
- Munz C. Enhancing immunity through autophagy[J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27: 423–449.
- Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814–822.
- Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum [J]. Autophagy, 2011, 7(7): 673–682.
- Dice JF. Chaperone-mediated autophagy[J]. Autophagy, 2007, 3(4): 295–299.
- Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, et al. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells[J]. J Biol Chem, 2000, 275(2): 992–998.
- Yan Y, Backer JM. Regulation of class III (Vps34) PI3Ks[J]. Biochem Soc Trans, 2007, 35(Pt 2): 239–241.
- Castino R, Bellio N, Folio C, et al. Inhibition of PI3k class III-dependent autophagy prevents apoptosis and necrosis by oxidative stress in dopaminergic neuroblastoma cells[J]. Toxicol Sci, 2010, 117(1): 152–162.
- Vergne I, Deretic V. The role of PI3P phosphatases in the regulation of autophagy[J]. FEBS Lett, 2010, 584(7): 1313–1318.
- Carlioni S, Buonocore G, Balduini W. Protective role of autophagy in neonatal hypoxia-ischemia induced brain injury [J]. Neurobiol Dis, 2008, 32(3): 329–339.
- Kamada Y, Yoshino K, Kondo C, et al. Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy [J]. Mol Cell Biol, 2010, 30(4): 1049–1058.
- Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer [J]. Trends Mol Med, 2005, 11(8): 353–361.
- Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, et al. Molecular mechanism and regulation of autophagy [J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(12): 1421–1434.
- Chang YY, Juhasz G, Goraksha-Hicks P, et al. Nutrient-dependent regulation of autophagy through the target of rapamycin pathway [J]. Biochem Soc Trans, 2009, 37(Pt 1): 232–236.
- Pattingre S, Petiot A, Codogno P. Analyses of Galpha-interacting protein and activator of G-protein-signaling-3 functions in macroautophagy[J]. Methods Enzymol, 2004, 390: 17–31.
- Eskelinen EL, Saftig P. Autophagy: a lysosomal degradation

- pathway with a central role in health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(4): 664–673.
23. Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2 [J]. *Mol Cell*, 2007, 25(2): 193–205.
 24. 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]. *Circ Res*, 2007, 100(6): 914–922.
 25. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36(12): 2491–2502.
 26. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells [J]. *Cell Struct Funct*, 2002, 27(6): 421–429.
 27. Swanlund JM, Kregel KC, Oberley TD. Investigating autophagy: quantitative morphometric analysis using electron microscopy [J]. *Autophagy*, 2010, 6(2): 270–277.
 28. Shen ZY, Xu LY, Li EM, et al. Autophagy and endocytosis in the amnion [J]. *J Struct Biol*, 2008, 162(2): 197–204.
 29. Martinet W, De Meyer GR, Andries L, et al. In situ detection of starvation-induced autophagy [J]. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(1): 85–96.
 30. Rubinsztein DC, Cuervo AM, Ravikumar B, et al. In search of an "autophagometer"[J]. *Autophagy*, 2009, 5(5):585–589.
 31. Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy[J]. *Cell*, 2005, 122(6): 927–939.
 32. Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, et al. Autophagy and apoptosis: where do they meet[J]? *Apoptosis*, 2014, 19(4): 555–566.
 33. Fan J, Zhang Z, Chao X, et al. Ischemic preconditioning enhances autophagy but suppresses autophagic cell death in rat spinal neurons following ischemia-reperfusion [J]. *Brain Res*, 2014, 1562: 76–86.
 34. Desai S, Liu Z, Yao J, et al. Heat shock factor 1(HSF1) controls chemoresistance and autophagy through transcriptional regulation of autophagy-related protein 7(ATG7)[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(13): 9165–9176.
 35. Nie H, Xiong L, Lao N, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning induces tolerance against spinal cord ischemia by upregulation of antioxidant enzymes in rabbits [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006, 26(5): 666–674.
 36. Benedetti S, Lamorgese A, Piersantelli M, et al. Oxidative stress and antioxidant status in patients undergoing prolonged exposure to hyperbaric oxygen [J]. *Clin Biochem*, 2004, 37(4): 312–317.
 37. Wang YC, Zhang S, Du TY, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning reduces ischemia-reperfusion injury by stimulating autophagy in neurocyte [J]. *Brain Res*, 2010, 1323: 149–151.
 38. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, et al. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4[J]. *EMBO J*, 2007, 26(7): 1749–1760.
 39. Li Y, Gu J, Liu Y, et al. iNOS participates in apoptosis of spinal cord neurons via p-BAD dephosphorylation following ischemia/reperfusion(I/R) injury in rat spinal cord[J]. *Neurosci Lett*, 2013, 545: 117–122.
 40. Wang L, Li W, Kang Z, et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats[J]. *J Neurotrauma*, 2009, 26(1): 55–66.
 41. 曾毅, 张昊鹏, 邓姣, 等. 自噬在高压氧预处理预防脊髓缺血再灌注损伤中的作用机制研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2012, 12(26): 5036–5040.
 42. 魏兴. 大鼠脊髓缺血再灌注损伤后自噬表达及作用的实验研究[D]. 苏州大学, 2013.
 43. Yin F, Meng C, Lu R, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells repair spinal cord ischemia/reperfusion injury by promoting axonal growth and anti-autophagy[J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(18): 1665–1671.
 44. Fujita S, Sakurai M, Baba H, et al. Autophagy-mediated stress response in motor neurons after hypothermic spinal cord ischemia in rabbits [J]. *J Vasc Surg*, 2014, May 10. [Epub ahead of print].
 45. Baba H, Sakurai M, Abe K, et al. Autophagy-mediated stress response in motor neuron after transient ischemia in rabbits[J]. *J Vasc Surg*, 2009, 50(2): 381–387.
 46. Ku B, Woo J S, Liang C, et al. An insight into the mechanistic role of Beclin 1 and its inhibition by prosurvival Bcl-2 family proteins[J]. *Autophagy*, 2008, 4(4): 519–520.
 47. Wada T, Pippin JW, Marshall CB, et al. Dexamethasone prevents podocyte apoptosis induced by puromycin aminonucleoside: role of p53 and Bcl-2-related family proteins[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(9): 2615–2625.
 48. Eisenstein M. Molecular biology: remove, reuse, recycle[J]. *Nature*, 2014, 514(7522): S2–S4.

(收稿日期:2015-01-26 修回日期:2015-05-05)

(本文编辑 彭向峰)