[34] O´Brien JT, Thomas A. Vascular dementia[J]. Lancet, 2015, 386(10004): 1698-1706.
[35] Arboleda-Velasquez JF, Zhou Z, Shin HK, et al. Linking Notch signaling to ischemic stroke[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(12): 4856-4861.
[36] Gripp KW, Robbins KM, Sobreira NL, et al. Truncating mutations in the last exon of NOTCH3 cause lateral meningocele syndrome[J]. Am J Med Genet A, 2015, 167A(2): 271-281.
[37] Stojanov D, Groadanovic D, Petrovic S, et al. De novo mutation in the NOTCH3 gene causing CADASIL[J]. Bosnian J Basic Med Sci, 2014, 14(1): 48-50.

核转录相关因子 2 和自噬在血管性痴呆中的作用机制研究

高立伟[1],李萌[1],许静[2]　综述　　董艳红[2]　审校
1. 河北医科大学研究生院,河北省石家庄市　050000
2. 河北省人民医院,河北省石家庄市　050051

摘　要:自噬和氧化应激在血管性痴呆(VD)的发生、发展中起着重要作用,但确切的机制目前尚不清楚。而核转录相关因子 2(Nrf2)在氧化应激中扮演着重要的角色,本文将进一步探讨自噬和 Nrf2 信号通路所调控的氧化应激在 VD 的发生、发展中的作用,并寻求两者之间的联系,为预防和治疗 VD 提供新的思路。

关键词:血管性痴呆;核转录相关因子 2;自噬;氧化应激

DOI:10.16636/j.cnki.jinn.2018.06.021

血管性痴呆(vascular dementia, VD)是指由各种血管病因素引起的学习、记忆功能缺损为主要症状的一种获得性、持续性智能损害综合征,是继阿尔茨海默病(Alzheimer´s disease, AD)之后世界上第二位最常见的痴呆原因,约占所有痴呆总数的 15% ~50%。其发病涉及自噬、氧化应激、炎症、凋亡等。而核转录相关因子 2(nuclear transcription factor 2, Nrf2)信号通路因其参与多种疾病的发生、发展,并与自噬存在着复杂的关系,近几年一直成为研究热点。且有研究证实,自噬对 VD 的研究具有重要意义。故本文将就 Nrf2 和自噬在 VD 中的作用机制作一综述以期为 VD 研究提供新思路。

1　Nrf2 对 VD 的影响

1.1　氧化应激在 VD 中的作用

慢性脑低灌注(chronic cerebral hypoperfusion, CCH)引起的氧化应激增强是 VD 发病机制中一个不可忽视的因素。由于大脑中含有大量的可氧化多不饱和脂肪酸和低水平的内生抗氧化剂,在过强的氧化应激中,大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生将引起脑组织高耗氧使其更易受到损害[1]。不平衡的抗氧化剂和 ROS 比例不仅导致血管内皮细胞、神经胶质细胞和神经元细胞受损,也使神经血管解偶联,进一步加重脑血流减少,过度产生的 ROS 同时可以破坏线粒体功能并进一步诱导缺氧和氧化应激,造成 VD 发生、发展[2,3]。目前有研究发现,在 VD 发生过程中过量的 ROS 主要是由还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶的非吞噬细胞氧化酶(non-phagocytic cell oxidase, NOX)家族产生的。NOX 的激活存在于各种与认知障碍相关的急、慢性神经系统疾病,是 CCH 诱导的氧化应激和认知功能障碍的关键因素[4]。因此,NOX 的调节可能成为 VD 的潜在治疗靶点[5]。

1.2　Nrf2 对氧化应激的调节作用

Nrf2 是在外源或内源性应激条件下,通过调节

基金项目:河北省科学技术厅项目(16397795D);河北省财政厅项目(G2015001);河北省科技支撑计划项目(14277787D)
收稿日期:2018-04-09;**修回日期:**2018-08-21
作者简介:高立伟(1992-),男,硕士研究生在读,主要从事自噬与认知障碍研究。
通信作者:董艳红(1971-),女,主任医师,教授,博士,硕士生导师,主要从事认知功能障碍的研究。d_yanhongniu@163.com。

体内氧化应激进行自我保护的最重要的转录因子之一,通过与抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)结合后启动下游抗炎、抗氧化蛋白质的表达。正常状态下,Nrf2 因结合 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白 1(Kelch-like ECH-associated protein1, keap1)而被抑制活性。当氧化应激时,Keap1 与 Nrf2 分离,Nrf2 信号通路被激活,启动抗氧化应激保护机制。NADPH 氧化酶的 NOX 家族可以调节 Nrf2 的活化,有研究发现,在 Nrf2 基因敲除小鼠的脑细胞中 ROS 明显多于野生小鼠,也就是说 NADPH 氧化酶的表达和活化亦受 Keap1-Nrf2 途径调节[6]。进一步的研究发现,NADPH 氧化酶的 NOX4 与 Nrf2 存在负反馈回路,在稳态条件下,NOX4 产生超氧化物和过氧化氢,通过氧化半胱氨酸传感器使 Keap1 失活而激活 Nrf2,激活的 Nrf2 抑制 NOX4 的转录以降低 ROS 产生[1]。

1.3 Nrf2 在 VD 发生机制中的作用

VD 的发生、发展与过度氧化应激产生的 ROS 存在密切关联,而 Nrf2 既影响 ROS 的产生,又影响 ROS 的清除,故 Nrf2 在 VD 的发生机制中扮演着重要的角色。有动物实验发现[7],当使野生型小鼠 Nrf2 基因表达上调时,有利于延缓痴呆的进展,而在 Nrf2 基因敲除的小鼠上,VD 的表现往往更重。此外,亦有研究表明 Nrf2 基因在改善脑血流量方面也起着积极的作用,这可能与 Nrf2 影响了胆固醇的摄取和外排的调节和微血管的氧化应激有关[8]。由此提示我们,Nrf2 的活化剂对 VD 可能存在一定的治疗作用,对延缓 VD 的进展具有积极的意义。

2 自噬对 VD 的影响

自噬是一种高度保守的真核生物降解过程,其分子机制和功能在哺乳动物细胞和酵母中具有典型特征,即吞噬自身细胞质蛋白或细胞器并使其包被进入囊泡,并和溶酶体融合形成自噬溶酶体,降解其所包裹的内容物,藉此实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。自噬在机体的生理和病理过程中都能见到,但其在 VD 中所起的作用是正面还是负面的目前尚未完全阐明,了解自噬与 VD 的关系,对我们的预防与治疗具有重要意义。

目前有研究表明[9],在 VD 模型组大鼠中发现海马 CA1 区的神经元严重受损,且自噬相关蛋白 Beclin1、组织蛋白酶 B(cathepsin B)和微管相关蛋白 1 的轻链 3 水平较假手术组相比升高,最终结果表明自噬和自噬相关蛋白(autophagy associated gene, ATG)参与了 VD 的病理改变,并且抑制自噬具有神经保护作用。ATG 是一组进化保守的基因,参与自噬小体在细胞中的整个过程。Koike 等[10]通过敲除 caspase 3 基因研究发现缺血缺氧(hypoxia ischemia, HI)诱导的新生小鼠海马神经元死亡仅 35% 得以挽救,说明即使新生小鼠也仅 35% 神经元死亡依赖于 caspase3,而 caspase3 敲除对成年小鼠无任何保护作用。该研究者进一步通过选择性敲除 Atg7 基因后发现,新生小鼠中 caspase 依赖以及非 caspase 依赖的海马神经元死亡均能被阻断,ATG7 缺陷初生小鼠的病侧海马锥体细胞层的损伤体积比野生型小鼠明显减小,接近 100% 神经元死亡被挽救,表明 ATG 基因敲除可减轻缺血、缺氧后海马区神经细胞的破坏,且自噬可能位于众多神经细胞死亡机制的上游。一些神经系统保护剂如干细胞生长因子和胶质细胞系源性神经营养因子等可通过降低自噬及凋亡作用来发挥神经系统保护作用,许多药物的作用机制也被证明可通过调节自噬来改善缺血后脑损伤。然而,具有基础活性的自噬对神经系统具有一定的保护作用[11]。在通过脑缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)的实验中,激活自噬可使致命性缺血损伤的程度有所减轻,而且 IPC 的神经保护作用可以被自噬诱导剂模拟[12]。最近一项研究证实了自噬可通过刺激胆固醇外流,从而抑制坏死核心形成和脂质积聚来达到预防血管性疾病的作用[13]。雷帕霉素靶体蛋白(the mammalian target of rapamycin, mTOR)是一种能够抑制自噬的丝/苏氨酸蛋白激酶,在调节自噬和细胞生长繁殖等方面发挥着重要的作用。动物研究表明,雷帕霉素可通过抑制 mTOR 信号通路增强自噬,参与保护 SAMP8 小鼠的神经元,并且在治疗认知衰退方面具有潜在作用[14]。此外亦有一些研究发现,抑制自噬可能使细胞死亡的形式从凋亡变成坏死。而诱导自噬会减缓细胞凋亡转变为坏死的发展过程。这可能是因为自噬具有维持脑缺血缺氧后维持细胞充足能量的作用。细胞自噬通过向细胞供应能量或者借助与凋亡之间的相互作用,延缓细胞坏死而诱导细胞凋亡,从而起到一定的脑保护作用。

VD 的发生、发展涉及的因素很多,机制复杂,而自噬在众多神经细胞死亡机制中位于上游,处于重要地位。但自噬在 VD 中的作用具有双面性,适

度的自噬可抑制 VD 的进展，而过强和过弱的自噬却可加速神经细胞的损害。因此，在不同的情况下对自噬进行分别研究可能有助于我们寻求自噬反应的平衡点，了解不同条件下自噬的作用和功能将对我们的研究产生重要意义。

3　自噬与 Nrf2 的相互作用

自噬和 Nrf2 之间存在着密切的联系，二者有着共同的调节途径——磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B（phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B，PI3K/Akt）、磷酸腺苷蛋白激酶（Adenosine 5'-monophosphate（AMP）-activated protein kinase，AMPK）和蛋白激酶 C（protein kinase C，PKC）。PI3K/Akt 信号通路可以通过促进下游 mTOR 信号分子激活，抑制自噬。同时，可以通过 Akt 使 Nrf2 磷酸化，促使其与 Keap1 解离进入细胞核中，从而调节 Nrf2/ARE 下游抗氧化酶的表达，发挥抗氧化作用[15]。此外，自噬的抑制剂 3-甲基腺嘌呤可通过抑制 PI3K 信号通路干扰或阻断自噬体形成，且其同时也阻断了 Nrf2-ARE 信号通路的激活。由此可见，通过激活 PI3K/Akt 通路可以抑制自噬，激活 Nrf2/ARE 通路，而反过来抑制自噬后将也可同时抑制了 Nrf2/ARE 通路，说明自噬同 Nrf2 的联系存在其他通道。AMPK 以结节硬化复合物 1/2（TSC1/TSC2）途径抑制 mTOR 活性，增加自噬水平，同时激活 Nrf2/ARE 通路的抗氧化及抗炎性反应[16]。而异常激活的 Nrf2 也可以增加 mTOR 的活性，其机制是突变的 Nrf2 使 mTOR 信号通路的小 G 蛋白激活剂表达上调，从而激活 mTOR 信号通路[17]。PKC 是 Nrf2 磷酸化后与 Keap1 解离入核的必要条件之一，在自噬中亦扮演着重要角色，通过负调控细胞内源性 ROS 水平来达到负调控自噬水平，提示 ROS 是一种重要的自噬激活信号。但关于 ROS 介导的两者关系目前仍存有争议，Nrf2 信号通路和自噬具有协同消除 ROS 的作用，所以 Nrf2 信号通路与自噬之间不仅仅存在上调或下调的关系。而且 ROS 可以直接作用于 Nrf2/Keap1 而激活 Nrf2 信号通路，所以 ROS 在自噬调节和 Nrf2 信号通路之间的作用机制仍需要更多的实验加以探究。

p62 是一种涉及各种细胞过程的多功能衔接蛋白，在选择性自噬、细胞存活、细胞死亡、氧化应激、DNA 修复和炎症中均具有调节功能，还可以与各种结合伴侣相互作用，成为各种细胞信号转导级联的信号枢纽，如 Keap1-Nrf2 和 m-TOR。P62 与 Keap1 上的 Nrf2 结合位点相互作用，竞争 Keap1 结合，导致 Nrf2 从与 Keap1 结合的抑制状态中解离出来转移到细胞核中以激活抗氧化作用元件 ARE（antioxidant response element）驱动的基因[19]，新形成的 p62-Keap1 复合体通过自噬在自噬体中降解，从而调节 Nrf2 蛋白稳定性及其在整个应激反应和细胞保护基因系统中的转录活性。一方面，p62 作为链接自噬相关蛋白质、微管相关蛋白 1 轻链 3、聚泛素化蛋白质之间的桥梁，可通过泛素信号途径将聚合的蛋白质、受损的线粒体及入侵的细菌作为受体转运到自噬小体中并将其降解。另一方面，p62 促进 Nrf2 激活，Nrf2 的转录激活反过来诱导 p62 产生，进而导致 Nrf2 再次激活，使 Nrf2 与 p62 形成一个正反馈通路。许多药物如维拉帕米等已经被证实其细胞保护作用就是依赖这种正反馈通路[20]。而自噬降解 P62 可能是终止这一正反馈环路的一种方法。在敲除 Atg7 基因的小鼠模型，即自噬功能受损的小鼠中可以发现大量的 p62 和 Keap1 的聚合物[19]。由此可见，p62 可以视为沟通自噬同 Nrf2 信号通路之间的一个桥梁，自噬可以通过调节 p62 来影响 Nrf2 活性。Nrf2 的转录活性亦控制着 p62 的表达水平，并直接或间接调节自噬程序中其他参与者的表达和活性。目前关于自噬对 Nrf2 信号通路的影响的研究较多，而 Nrf2 对自噬的影响的报道较少，关于 p62 介导的两者关系仍待进一步探究。

综上所述，探讨自噬及 Nrf2 在 VD 病理生理学中的作用将是一个非常有前景的领域，两者对于 VD 的发生、发展起着重要的作用。PI3K/Akt、AMPK、PKC、p62 和 ROS 等因素共同参与着自噬与 Nrf2 信号通路的相互调控。国内外大量的研究证明了两者之间存在着复杂的联系，以 Nrf2 信号通路和自噬为靶点进行研究，了解 Nrf2 如何影响自噬起始、进展和自噬溶酶体清除，为 VD 的预防及治疗提供新的思路。

参　考　文　献

[1]　Kovac S，Angelova PR，Holmstrom KM，et al. Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase [J]. Biochim Biophys Acta，2015，1850（4）：794-801.

[2]　Venkat P，Chopp M，Chen J. Models and mechanisms of vascular dementia [J]. Exp Neurol，2015，272：97-

108.

[3] Zhang X, Wu B, Nie K, et al. Effects of acupuncture on declined cerebral blood flow, impaired mitochondrial respiratory function and oxidative stress in multi-infarct dementia rats [J]. Neurochemistry Int, 2014, 65: 23-29.

[4] Du S, Wang X, Xiao L, et al. Molecular Mechanisms of Vascular Dementia: What Can Be Learned from Animal Models of Chronic Cerebral Hypoperfusion? [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(5): 3670-3682.

[5] Choi D, Lee J. A Mini-Review of the NADPH Oxidases in Vascular Dementia: Correlation with NOXs and Risk Factors for VaD[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(12): 2500.

[6] Lin CC, Yang CC, Chen YW, et al. Arachidonic Acid Induces ARE/Nrf2-Dependent Heme Oxygenase-1 Transcription in Rat Brain Astrocytes [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(4): 3328-3343.

[7] Wang XR, Shi GX, Yang JW, et al. Acupuncture ameliorates cognitive impairment and hippocampus neuronal loss in experimental vascular dementia through Nrf2-mediated antioxidant response [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 89: 1077-1084.

[8] Ooi B, Goh B, Yap W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Involvement of Nrf2 Antioxidant Redox Signaling in Macrophage Foam Cells Formation [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(12): 2336.

[9] Liu B, Tang J, Zhang J, et al. Autophagy activation aggravates neuronal injury in the hippocampus of vascular dementia rats[J]. Neural Regen Res, 2014, 9(13): 1288-1296.

[10] Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, et al. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury[J]. Am J Pathol, 2008, 172(2): 454-469.

[11] Lfan MF, Sandu RE, Leanu AZV, et al. Autophagy in aging and disease[J]. Rom J Morphol Embryol, 2017, 58(1): 27.

[12] Sheng R, Zhang LS, Han R, et al. Autophagy activation is associated with neuroprotection in a rat model of focal cerebral ischemic preconditioning[J]. Autophagy, 2010, 6(4): 482-494.

[13] Michiels CF, Kurdi A, Timmermans J, et al. Spermidine reduces lipid accumulation and necrotic core formation in atherosclerotic plaques via induction of autophagy[J]. Atherosclerosis, 2016, 251: 319-327.

[14] Wang Y, Ma Q, Ma X, et al. Role of mammalian target of rapamycin signaling in autophagy and the neurodegenerative process using a senescence accelerated mouse-prone 8 model [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(2): 1051-1057.

[15] Hui Y, Chengyong T, Cheng L, et al. Resveratrol Attenuates the Cytotoxicity Induced by Amyloid-β1-42 in PC12 Cells by Upregulating Heme Oxygenase-1 via the PI3K/Akt/Nrf2 Pathway[J]. Neurochem Res, 2018, 43(2): 297-305.

[16] 李德林,高建. 自噬对 Nrf2/ARE 通路的调控及在肝脏疾病中的作用[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(10): 1135-1138.

[17] Shibata T, Saito S, Kokubu A, et al. Global Downstream Pathway Analysis Reveals a Dependence of Oncogenic NF-E2-Related Factor 2 Mutation on the mTOR Growth Signaling Pathway [J]. Cancer Res, 2010, 70(22): 9095-9105.

[18] Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, et al. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(3): 213-223.

[19] Lee DH, Park JS, Lee YS, et al. The hypertension drug, verapamil, activates Nrf2 by promoting p62-dependent autophagic Keap1 degradation and prevents acetaminophen-induced cytotoxicity[J]. BMB Rep, 2017, 50(2): 91-96.