

脑缺血损伤中锌离子稳态与自噬的相关性

丁锚 杨楠 刘克建 赵咏梅

100053 首都医科大学宣武医院 北京市老年病医疗研究中心 脑血管病转化医学北京市重点实验室

通信作者: 赵咏梅, Email: zhaoym@ccmu.edu.cn

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.08.010

【摘要】 锌离子(Zn^{2+})既具有神经毒性也具有神经保护作用,这与脑内 Zn^{2+} 的稳态有关。游离的 Zn^{2+} 主要通过锌转运蛋白以及锌指蛋白等多种蛋白发挥催化作用,参与调节生物体内包括自噬在内的数百种生理过程。脑缺血损伤可以诱导 Zn^{2+} 的病理性释放,从而导致神经元过度自噬,最终引起细胞死亡。同样,自噬水平的紊乱也会引起细胞内 Zn^{2+} 代谢异常。现对脑缺血损伤过程中锌与自噬之间的相互作用及调控关系进行阐述。

【关键词】 自噬; 脑缺血; 锌离子

基金项目: 国家自然科学基金项目(81971095)

Interaction between zinc homeostasis and autophagy in cerebral ischemia injury Ding Mao, Yang Nan, Liu Kejian, Zhao Yongmei

Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing Geriatric Medical Research Center, Beijing Key Laboratory of Translational Medicine for Cerebrovascular Diseases, Beijing 100053, China

Corresponding author: Zhao Yongmei, Email: zhaoym@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Zinc (Zn^{2+}) has both neurotoxic and neuroprotective capabilities which is related to the homeostasis of Zn^{2+} in the brain. Labile Zn^{2+} plays a catalytic role mainly through zinc transporters, zinc finger proteins and some other proteins, and participates in hundreds of physiological processes including autophagy. Cerebral ischemic injury induces the pathological release of Zn^{2+} , which may ultimately cause cell death by inducing excessive neuronal autophagy. The disorder of autophagy also causes abnormal metabolism of Zn^{2+} . This review aims to discuss the interaction and reciprocal regulation between Zn^{2+} and autophagy during cerebral ischemia injury.

【Key words】 Autophagy; Cerebral ischemia; Zn^{2+}

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81971095)

锌是一种重要的细胞营养物质,对维持生物蛋白质的结构和功能具有重要作用。体内游离锌离子(Zn^{2+})浓度发生改变时,细胞会启动相应的机制维持锌的稳态,但过量 Zn^{2+} 具有细胞毒性,能引起细胞凋亡。研究发现,缺血性脑卒中发生后,脑中谷氨酸能神经元的终末端会释放出 Zn^{2+} ,大量 Zn^{2+} 聚集影响细胞代谢甚至造成细胞死亡^[1]。因此, Zn^{2+} 的病理性释放被认为是缺血性脑损伤的重要原因之一。锌调节了生物体内数百种生理过程,其中也包括自噬。很多研究表明,锌能正向调控自噬,当游离 Zn^{2+} 达到中等水平(20~200 $\mu\text{mol/L}$)时,明显增强细胞自噬,而自噬调节紊乱同样会影响 Zn^{2+} 代谢稳态^[2],其在脑缺血损伤过程中同样发挥了重要作

用。因此。本综述重点介绍锌与自噬在脑缺血损伤中的相互关系。

一、 Zn^{2+} 稳态与脑缺血损伤

1. Zn^{2+} 生理功能及稳态: 作为人体内含量第二的金属元素,锌参与了100多种蛋白质的组成。绝大多数的锌与蛋白质紧密结合,但仍有一部分锌以“游离”的形式存在。正常情况下,游离 Zn^{2+} 主要储存在谷氨酸能神经元的突触前膜囊泡中,因此人体血浆(0.70~1.50 $\mu\text{g/L}$)及脑脊液(29.4~38.0 $\mu\text{g/L}$)中 Zn^{2+} 浓度较低^[3]。当神经元兴奋时,大量 Zn^{2+} 从突触末端释放出来,转移并聚集于突触后神经元内,导致细胞内 Zn^{2+} 浓度迅速上升。因此,维持细胞内外 Zn^{2+} 浓度,保持锌稳态是正常细胞生存所必

需。锌在细胞内的分布和稳态通过一系列蛋白质调节,主要包括锌转运体(Zn²⁺ transporters, ZnTs)、锌导入蛋白(Zn²⁺ importing proteins, ZIPs)、金属硫蛋白(metallothioneins, MTs)。Zn²⁺转运蛋白家族(ZnTs、ZIPs)主要调节线粒体、溶酶体等细胞器摄取和释放Zn²⁺; MTs则更多参与调节细胞内Zn²⁺的稳态^[4]。

2. 脑缺血再灌注后Zn²⁺变化: 研究报道, 脑缺血后囊泡释放Zn²⁺会抑制谷氨酸诱导的钙内流, 低浓度的Zn²⁺通过阻断钙内流起到保护神经元作用; 而较高浓度的Zn²⁺能引起神经元的活性降低, 导致神经元死亡^[5]。因此, 神经元缺血后囊泡释放的Zn²⁺可能根据其浓度不同表现出双相效应。特异性Zn²⁺螯合剂[N, N, N', N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine, TPEN]具有神经细胞膜渗透性, 能结合并去除细胞内、外游离的Zn²⁺。本课题组前期研究发现, 脑缺血再灌注24 h后, 胞浆内游离Zn²⁺持续积累, 并与凋亡神经元共定位。TPEN处理可降低脑缺血再灌注大鼠神经元内游离Zn²⁺含量并减轻细胞凋亡, 说明螯合Zn²⁺可减少脑缺血再灌注损伤后的神经元死亡^[6]。这一研究为内源性Zn²⁺导致脑缺血再灌注后神经元死亡提供了体内证据, 证明游离Zn²⁺聚积是导致脑缺血再灌注损伤的重要原因之一。Wang等^[7]也证明TPEN可以减轻由过量Zn²⁺引发的氧化应激损伤及炎症反应, 减少缺氧/缺血引起的神经元死亡。除了观察到Zn²⁺在神经元中的变化外, 我们前期研究还发现, 低氧条件下高浓度的Zn²⁺通过增加多聚(ADP-核糖)聚合酶1蛋白的表达, 进而诱导星形胶质细胞的死亡^[8]。此外, 还有报道显示, 脑缺血后细胞外大量的Zn²⁺能促进小胶质细胞产生促炎细胞因子, 从而诱导神经元凋亡^[1]。本课题组近期的研究还发现, 缺血大鼠脑内的微血管中含有大量的Zn²⁺, 高浓度的Zn²⁺导致微血管紧密连接蛋白的丢失和内皮细胞的凋亡, 说明脑缺血后过度释放的游离Zn²⁺还可以引起血-脑脊液屏障的破坏^[9]。

二、Zn²⁺与细胞自噬

1. 自噬的过程及自噬在Zn²⁺代谢中的作用: 自噬是真核细胞物质分解代谢的主要途径, 对维持细胞存活和稳态具有重要作用。自噬作为细胞的一种内源性保护机制, 可以去除功能失调的线粒体从而产生神经保护作用; 然而, 过度激活的自噬是有害的。研究表明, 脑缺血损伤等应激条件下自噬被过度激活, 进而造成细胞损伤。因此, 自噬在脑缺血损伤过程中发挥重要作用。

很多研究证明, 自噬的失调会破坏体内Zn²⁺的稳态。研究发现, 自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenin, 3-MA)可以减弱癫痫发作导致的新生大鼠海马体中ZnT1和ZnT2的表达, 使Zn²⁺代谢发生改变^[10]。还有研究观察到, 在人肝细胞中3-MA可以下调ZnT10的数量, 证明自噬对ZnTs具有直接调节作用^[11]。因此, 自噬对Zn²⁺稳态的调控可以通过ZnTs介导。另有一些假设认为, 存在于核内体和溶酶体上的锌转运蛋白同样可能存在于自噬溶酶体膜, 如Zip4、Zip14、Zip8、ZnT10和ZnT4以及TRPML1通道。Zip4、Zip14、Zip8和TRPML1能够促进锌从自噬体中流出, 而ZnT10和ZnT4则促进锌进入自噬体^[12]。正是这些Zn²⁺转运蛋白的存在, 才使得自噬对细胞内Zn²⁺稳态的调节得以实现。

2. Zn²⁺对自噬的调节: 近几年, 越来越多的研究发现, Zn²⁺对细胞自噬具有正向调控作用。锌在脑细胞自噬体的形成过程中发挥重要作用, 锌的过度缺乏会破坏细胞器的完整性从而影响自噬溶酶体的形成, 最终影响自噬发生^[2]。因此, 在生理条件下, 低浓度的Zn²⁺对细胞基础自噬具有重要作用。然而, 高浓度Zn²⁺可引起小肠上皮细胞过度自噬, 导致细胞凋亡, 说明Zn²⁺诱导自噬的过度激活会造成细胞病理性损伤^[13]。也有学者认为, 过量Zn²⁺诱导的自噬在初始阶段可能是一种具有保护作用的适应性反应, 当不断增强的自噬超过细胞的调节能力后, 最终导致细胞自噬性死亡^[2]。

MT3能结合Zn²⁺并且具有重要的神经生理调节功能, 是唯一在脑内表达的MTs。生理条件下, MT3释放的Zn²⁺能使细胞内异常蛋白质聚集体和细胞器降解, 有助于正常细胞的自噬。研究报道, MT3所含的Zn²⁺结合位点对氧化还原状态高度敏感^[14]。Cho等^[15]发现, 敲除MT3基因的小鼠星形胶质细胞在过氧化氢刺激下的自噬水平及细胞死亡率均降低, 说明氧化应激导致MT3释放大量Zn²⁺, 游离Zn²⁺过度激活自噬从而导致细胞死亡。因此, MT3可作为氧化应激过程中毒性游离Zn²⁺的主要来源。溶酶体是自噬过程中的重要效应细胞器, 有研究观察到, 正常条件下溶酶体内游离Zn²⁺含量较低; 而暴露于过氧化氢或大量游离Zn²⁺环境下, 溶酶体中的Zn²⁺迅速上升, 迅速增加的Zn²⁺导致溶酶体发生膜解体, 释放出的组织蛋白酶等参与细胞器的降解, 最终引起细胞死亡^[16]。因此, MT3很可能通过调节溶酶体中Zn²⁺的水平, 从而调节溶酶体的功能, 进而影响细胞自噬。此外, 锌对自噬的调控作用还可能通过

细胞外信号调节激酶 1/2 的磷酸化、诱导含有金属反应转录因子 MTF1 结合位点的自噬基因表达、调节 microRNA 的甲基化等途径实现^[2]。

3. 脑缺血损伤过程中 Zn^{2+} 与自噬的相互调节: 本课题组前期研究发现, 低氧能够显著增加 Zn^{2+} 的含量及毒性作用^[8], 而脑缺血的发生恰能导致神经元的缺氧。我们利用低氧/复氧星形胶质细胞模型探究 Zn^{2+} 与自噬的关系, 发现添加外源性 Zn^{2+} 后低氧的星形胶质细胞自噬水平及细胞死亡率比单纯低氧组显著增加, 说明过量 Zn^{2+} 增加了细胞的自噬水平, 引起细胞死亡; 3-MA 处理可显著减少低氧条件下 Zn^{2+} 引起的细胞死亡, 进一步说明锌通过诱导过度自噬最终引起细胞死亡^[17]。Zhao 等^[18] 在脑外伤大鼠模型中也证明, 神经元损伤时突触前膜大量释放 Zn^{2+} 可能引起神经元的自噬与凋亡。氧化应激导致线粒体功能障碍, 活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS) 生成是缺血性卒中后细胞死亡的主要诱因。

近期研究发现, 线粒体是脑缺血再灌注早期 Zn^{2+} 积累的主要部位^[19], 缺血触发游离 Zn^{2+} 的释放及积累, 进而促进线粒体产生 ROS; 随着再灌注时间延长, 神经元 NADPH 氧化酶的激活导致锌的进一步积累, 锌的积累反过来继续刺激 ROS 生成。锌的积累与 NADPH 氧化酶诱导 ROS 的产生之间存在正反馈环, 协同促进脑损伤^[20]。在体外研究中发现, Zn^{2+} 增加低氧条件下星形胶质细胞的 ROS 水平, 清除 ROS 可减少低氧条件下 Zn^{2+} 引起的自噬, 说明过量 Zn^{2+} 通过促进 ROS 产生从而诱导细胞自噬及死亡^[17]。尽管 Zn^{2+} 可以促进氧化应激损伤, 但另有一些报道显示 Zn^{2+} 具有抗氧化作用。有研究发现, Zn^{2+} 预处理能够减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤所引起的氧化应激损伤, 减少 ROS 产生, 从而降低细胞自噬及凋亡^[21]。 Zn^{2+} 对氧化应激及自噬的不同影响可能与研究所用的动物模型、缺血时间及观察时间窗有关。但是, Zn^{2+} 通过影响线粒体 ROS 产生进而调控细胞自噬这一途径的存在是不可否认的。

脑缺血损伤模型中自噬对 Zn^{2+} 调节的研究尚少, 但是有研究发现, 急性脑损伤过程中自噬体和溶酶体数量迅速增加, 而后大量的 Zn^{2+} 聚集在自噬体和溶酶体中, 抑制自噬过程, 则自噬体中游离 Zn^{2+} 减少, 说明急性脑损伤引发的自噬能影响细胞内 Zn^{2+} 的分布^[22]。此外, 在过氧化氢诱导的人星形胶质细胞自噬及三苯氧胺诱导 MCF-7 细胞自噬过程中都出现游离 Zn^{2+} 在自噬小体和溶酶体上聚集的现象。3-MA 抑制自噬后, 细胞内的游离 Zn^{2+} 均减少,

说明自噬的发生能影响自噬体和溶酶体膜上的锌转运蛋白进而破坏 Zn^{2+} 稳态^[15]。

三、小结

综上所述, 锌作为体内重要的金属元素, 在脑血管病中的作用越来越受到人们的重视, 而自噬作为一种常见的物质降解形式也在缺血性脑血管病中被广泛研究, 两者之间的关系以及相互作用机制正在被逐渐认识。缺少 Zn^{2+} 会造成正常细胞自噬受限; 而 Zn^{2+} 对脑缺血再灌注损伤的毒性作用也可以通过过度激活自噬而实现。同样, 自噬调节紊乱可以导致体内 Zn^{2+} 稳态失衡。因此, 深入探讨脑缺血损伤后锌与细胞自噬的关系将有助于进一步揭示脑缺血损伤的深层机制并制订更全面的神细胞保护措施。

利益冲突 文章所有作者共同认可文章无相关利益冲突

作者贡献声明 论文撰写为丁锚, 论文修订为丁锚、杨楠、赵咏梅、刘克建审校

参 考 文 献

- [1] Higashi Y, Aratake T, Shimizu S, et al. Brain zinc dyshomeostasis and glial cells in ischemic stroke[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2019, 154(3): 138-142. DOI: 10.1254/fpj.154.138.
- [2] Liuzzi JP, Pazos R. Interplay between autophagy and Zinc[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2020, 62: 126636. DOI: 10.1016/j.jtemb.2020.126636.
- [3] Kapaki E, Segdiitsa J, Papageorgiou C. Zinc, copper and magnesium concentration in serum and CSF of patients with neurological disorders[J]. *Acta Neurol Scand*, 1989, 79(5): 373-378. DOI: 10.1111/j.1600-0404.1989.tb03803.x.
- [4] Qi Z, Liu KJ. The interaction of zinc and the blood-brain barrier under physiological and ischemic conditions[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 364: 114-119. DOI: 10.1016/j.taap.2018.12.018.
- [5] Kim YH, Eom JW, Koh JY. Mechanism of Zinc Excitotoxicity: a focus on AMPK[J]. *Front Neurosci*, 2020, 14: 577958. DOI: 10.3389/fnins.2020.577958.
- [6] Zhao Y, Pan R, Li S, et al. Chelating intracellularly accumulated Zinc decreased ischemic brain injury through reducing neuronal apoptotic death[J]. *Stroke*, 2014, 45(4): 1139-1147. DOI: 10.1161/STROKEAHA.113.004296.
- [7] Wang WM, Liu Z, Liu AJ, et al. The Zinc ion chelating agent TPEN attenuates neuronal death/apoptosis caused by hypoxia/ischemia via mediating the pathophysiological cascade including excitotoxicity, oxidative stress, and inflammation[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(9): 708-717. DOI: 10.1111/ens.12428.
- [8] Pan R, Chen C, Liu WL, et al. Zinc promotes the death of hypoxic astrocytes by upregulating hypoxia-induced hypoxia-inducible factor-1alpha expression via poly(ADP-ribose) polymerase-1 [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2013, 19(7): 511-520. DOI: 10.1111/ens.12098.
- [9] Qi Z, Shi W, Zhao Y, et al. Zinc accumulation in mitochondria promotes ischemia-induced BBB disruption through Drp1-dependent mitochondria fission[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 377: 114601. DOI: 10.1016/j.taap.2019.114601.

前庭性偏头痛基因学研究进展

陈祺慧 潘永惠

150001 哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科

通信作者: 潘永惠, Email: aigui1993@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1009-6574.2021.08.011

【摘要】 前庭性偏头痛是临床常见的良性复发性眩晕疾病,因其反复发作的临床特点、在人群中的高发病率以及较差的药物治疗反应,严重影响了患者生活质量。作为一种遗传性疾病,前庭性偏头痛的基因学研究对揭示其发病机制、开发诊断标记物及新型治疗手段有着重要的作用。现对前庭性偏头痛的基因学研究进展加以综述,以期为今后前庭性偏头痛的临床诊疗提供参考。

【关键词】 前庭性偏头痛; 眩晕; 基因学; 发病机制; 综述

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFC1307205); 国家自然科学基金项目(82071549); 黑龙江省自然科学基金重点课题(ZD2019H006); 黑龙江省教育科学“十三五”规划2019年度重点课题(GJB1319086)

Advances in genetics of vestibular migraine Chen Qihui, Pan Yonghui

Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: Pan Yonghui, Email: aigui1993@126.com

【Abstract】 Vestibular migraine is a common benign recurrent vertigo. Its recurrent clinical characteristics, high incidence rate in the crowd and poor drug response have seriously affected the quality of life of patients. As a genetic disease, the genetic research of vestibular migraine plays an important role in revealing its pathogenesis, developing diagnostic markers and new treatment methods. This article reviews the

- [10] Jin MF, Ni H, Li LL. Leptin maintained Zinc homeostasis against glutamate-induced excitotoxicity by preventing mitophagy-mediated mitochondrial activation in HT22 hippocampal neuronal cells[J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 322. DOI: 10.3389/fneur.2018.00322.
- [11] Liuzzi JP, Narayanan V, Doan H, et al. Effect of zinc intake on hepatic autophagy during acute alcohol intoxication[J]. *Biometals*, 2018, 31(2): 217-232. DOI: 10.1007/s10534-018-0077-7.
- [12] Kambe T, Matsunaga M, Takeda TA. Understanding the contribution of Zinc transporters in the function of the early secretory pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): 2179. DOI: 10.3390/ijms18102179.
- [13] Zhou X, Li Y, Li C. Autophagy plays a positive role in zinc-induced apoptosis in intestinal porcine epithelial cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 44: 392-402. DOI: 10.1016/j.tiv.2017.08.006.
- [14] Koh J, Lee S. Metallothionein-3 as a multifunctional player in the control of cellular processes and diseases[J]. *Molecular Brain*, 2020, 13(1): 116. DOI: 10.1186/s13041-020-00654-w.
- [15] Cho YH, Lee SH, Lee SJ, et al. A role of metallothionein-3 in radiation-induced autophagy in glioma cells[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 2015. DOI: 10.1038/s41598-020-58237-7.
- [16] Rudolf E, Rudolf K. Acute increases in intracellular Zinc lead to an increased lysosomal and mitochondrial autophagy and subsequent cell demise in malignant melanoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(2): 667. DOI: 10.3390/ijms22020667.
- [17] Pan R, Timmins GS, Liu W, et al. Autophagy mediates astrocyte death during Zinc-potentiated ischemia—reperfusion injury[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2015, 166(1): 89-95. DOI: 10.1007/s12011-015-0287-6.
- [18] Zhao L, Liu Q, Ma S, et al. TPEN attenuates neural autophagy induced by synaptically-released Zinc translocation and improves histological outcomes after traumatic brain injury in rats[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2018, 48(4): 446-452.
- [19] Dong W, Qi Z, Liang J, et al. Reduction of zinc accumulation in mitochondria contributes to decreased cerebral ischemic injury by normobaric hyperoxia treatment in an experimental stroke model[J]. *Exp Neurol*, 2015, 272: 181-189. DOI: 10.1016/j.expneurol.2015.04.005.
- [20] Zhao Y, Yan F, Yin J, et al. Synergistic interaction between Zinc and reactive oxygen species amplifies ischemic brain injury in rats[J]. *Stroke*, 2018, 49(9): 2200-2210. DOI: 10.1161/STROKEAHA.118.021179.
- [21] Hadj AN, Baulies A, Bouhleb A, et al. Zinc mitigates renal ischemia-reperfusion injury in rats by modulating oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, and autophagy[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(11): 8677-8690. DOI: 10.1002/jcp.26747.
- [22] Lee S, Cho KS, Koh J. Oxidative injury triggers autophagy in astrocytes: the role of endogenous zinc[J]. *Glia*, 2009, 57(12): 1351-1361. DOI: 10.1002/glia.20854.

(收稿日期: 2021-03-01)

(本文编辑: 赵金鑫)