

魏海军, 张钺, 杨舒涵, 等. 自噬参与糖尿病血管病变的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(11): 132-140.

Wei HJ, Zhang C, Yang SH, et al. Role of autophagy in the progression of diabetic angiopathy [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(11): 132-140.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.11.020

自噬参与糖尿病血管病变的研究进展

魏海军¹, 张 钺¹, 杨舒涵¹, 郑 杨¹, 申嘉陵¹, 刘 勇^{1,2}, 何延政^{1,3}, 孙晓磊^{1,2*}

(1. 西南医科大学附属医院血管外科, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学心血管研究所, 四川 泸州 646000;
3. 四川省卫生健康委员会, 成都 610041)

【摘要】 糖尿病血管病变是糖尿病较严重的慢性并发症之一。在高糖状态下, 血管正常功能受到损害的同时常常会引起一系列血管并发症, 如: 糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、下肢动脉硬化闭塞、主动脉瘤等。而近来的研究表明, 自噬作为一种细胞内蛋白质降解途径和一种机体防御机制, 在糖尿病血管病变中发挥着重要作用。此文章综述了自噬相关分子、糖尿病自噬调控途径以及自噬在糖尿病相关血管病变中的不同作用, 并对自噬参与糖尿病血管病变的机制进行了深入探讨, 提出了靶向自噬的机制研究可能会开辟一个新的治疗糖尿病血管病变途径的学说。

【关键词】 自噬; 糖尿病血管病变; 血管损伤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 11-0132-09

Role of autophagy in the progression of diabetic angiopathy

WEI Haijun¹, ZHANG Cheng¹, YANG Shuhan¹, ZHENG Yang¹, SHEN Jialing¹, LIU Yong^{1,2},
HE Yanzheng^{1,3}, SUN Xiaolei^{1,2*}

(1. Department of Vascular Surgery, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China.
2. Cardiovascular Research Institute, Southwest Medical University, Luzhou 646000. 3. Health Commission of Sichuan Province, Chengdu 610041)

【Abstract】 Diabetic angiopathy is one of the most serious complications of diabetes. In a state of high glucose, normal functions of blood vessels are damaged, which leads to a series of vascular complications such as diabetic retinopathy, diabetic nephropathy, lower extremity arteriosclerosis occlusion and aortic aneurysm. However, recent studies have revealed that autophagy as an intracellular protein degradation pathway and stress defense mechanism, plays a significant role in the progression of diabetic angiopathy. Thus, we have summarized the progress on research with respect to autophagy-related genes, autophagy signaling pathways and the roles of autophagy in diabetic angiopathy and discuss the detailed mechanisms, which may provide treatment options for diabetic angiopathy.

【Keywords】 autophagy; diabetic angiopathy; vascular injury

自噬 (autophagy) 是真核生物特有的一种分解代谢过程, 在各种细胞内或细胞外刺激条件下, 细胞质中受损的蛋白质、细胞器被双层囊泡膜结构包裹后, 与溶酶体融合, 使得囊泡内容物降解以供细

【基金项目】 四川省科技厅课题面上项目 (2018JY0400); 四川省卫计委课题重点研究项目 (18ZD019); 泸州-西南医科大学科技战略合作项目 (2017LZXNYD-J19)。

【作者简介】 魏海军 (1994—), 男, 硕士, 研究方向: 外周血管的基础与临床研究。E-mail: weihaijun_jd@163.com

【通信作者】 孙晓磊 (1981—), 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 外周血管的基础与临床研究。

E-mail: sunxiaolei@swmu.edu.cn, sunxiaolei_lg@163.com

胞再利用。近年来,关于糖尿病血管损伤的病理生理机制有较多研究,其中高糖环境是导致糖尿病血管损伤的关键因素之一。而自噬作为一种机体的防御机制,在糖尿病血管损伤中发挥的作用不可小视。

1 自噬

1.1 自噬概述及其相关分子

自噬的过程包括:分隔膜、吞噬泡的形成,溶酶体与吞噬泡的融合,内容物的降解与释放等过程。自噬的生理功能主要体现在以下几个方面:(1)胞内蛋白可通过自噬被降解,实现细胞器的更新和转化,从而维持细胞内环境的稳态^[1];(2)由自噬产生的降解产物可被机体循环再利用以提供能量^[2];(3)自噬作为一种防御机制,能在外界不良刺激和应激条件下产生适应性反应,保护受损的组织或细胞。但是,当自噬被过度激活时,又可作为一种程序性死亡调控程序,调控细胞的死亡^[2]。自噬主要以三种不同的形式存在:巨自噬,微自噬和伴侣介导的自噬^[3-4],所有这些都促进溶酶体中细胞溶质的蛋白水解降解。巨自噬和微自噬都能够通过选择性和非选择性机制吞噬大型结构分子。在伴侣蛋白介导的自噬(CMA)中,靶向蛋白与伴侣蛋白(例如 Hsc-70)形成复合物,穿过溶酶体膜,该蛋白被溶酶体膜受体溶酶体相关膜蛋白 2A(LAMP-2A)识别,从而导致蛋白的变性和退化。

自噬相关基因(autophagy related gene, Atg)负责调控自噬的过程,它的基因片段在进化上相对保守。自噬的调控机制十分复杂,它包含 Atg 及其所编码的蛋白产物参与自噬的诱导,分隔膜的形成,自噬体的产生、成熟等过程。ULK1 复合物(ULK1、FIP200、Atg13)是连接上游刺激信号与下游自噬体形成的桥梁,能接收上游各种信号刺激并做出应答^[5],从而诱导自噬产生。而 PI3K 复合物(Atg6/Beclin-1、Atg14、Vps34/PI3KC3、Vps15)可介导分隔膜的产生^[6]。另外,Atg12 的结合过程与微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain 3, LC3)的修饰过程,这两个泛素化过程在自噬体的延伸阶段发挥着重要作用^[7]。LC3 是由哺乳动物细胞酵母菌 Atg8 编码产生的一种自噬相关蛋白,被认为是一种自噬标志分子。前体 LC3 合成之后,被水解切割掉特异片段后,形成 LC3I。LC3I 又在 Atg7 和 Atg12-Atg5-Atg16 L 的作用下,转变为

LC3II,始终结合于自噬体膜上,所以 LC3II 的含量也可以反映自噬体的数量。Beclin-1 是由哺乳动物细胞酵母菌 Atg6 编码产生的一种自噬相关蛋白^[8],可介导自噬蛋白定位于吞噬泡,继而调控自噬体的形成与成熟,其表达量的多少亦可反应自噬活性的强弱。

1.2 糖尿病状态下自噬调控的分子机制

目前的研究中,糖尿病通过以下通路影响细胞的自噬:氧化应激反应(oxidative stress)、内质网应激(ER stress)、mTOR 依赖性信号通路、AMPK 途径等。

2 型糖尿病的特征是高血糖和高胰岛素血症,通常伴有糖原和脂质的细胞内蓄积。糖基化和脂肪酸中间体的积累破坏了线粒体和过氧化物酶体的稳定性,导致产生活性氧^[9]。并且营养物质的过量也会促进未折叠蛋白和潜在毒性脂质池的形成,从而引起内质网应激^[10-11]。自噬通过去除部分去极化的线粒体,将 ROS 水平维持在一定的水平,另一方面,ROS 可以通过抑制 mTOR、增加 Beclin-1 的表达、LC3-I 向 LC3-II 的转化激活自噬^[12-15]。此外,ROS 可以作为激活 JNK-1 的信号分子^[16],大量的 ROS 导致线粒体通透性转变孔的开放使线粒体膜电位的破坏,从而导致 PINK1/parkin 介导的自噬发生^[17-19],ROS 还可以通过转录水平(在细胞核中)和翻译水平(在细胞质中)调节来诱导自噬过程^[20],ROS 升高分别激活转录因子 HIF-1 α 、p53、FOXO3、Nrf2,促进 BNIP3、NIX、TIGAR、LC3 和 p62 的转录^[21]。

内质网应激通过 UPR 途径和内质网 Ca²⁺转运来诱导自噬^[22]。UPR 的三个途径:(a) PERK 通路——它的激活导致转录因子 4(transcription factor 4, ATF4)的翻译^[23], (b) IRE1 α 通路——激活 c-Jun-N-terminal 激酶(JNK 途径^[24]和通过移码突变的方式修饰 x-box 结合蛋白 1(x-box binding protein 1, XBP1)的 mRNA^[25], (c) ATF6 通路——调节其他 UPR 成员包括 XBP1^[26]。PERK 通路通过 ATF4 诱导 ATG5、ATG7、ATG10 等自噬相关基因的转录从而影响自噬^[27]。PERK 通路也促进了聚谷氨酰胺 72(polyglutamine 72, PolyQ72)诱导 LC3-I 向 LC3-II 的转化过程^[28]。在内质网应激的早期阶段,激活的 IRE1 α 通过 JUK 途径磷酸化参与诱导自噬过程的 Bcl-2,从而导致 Bcl-2 从 Beclin-1 分离出来^[29]。此外,XBP-1—IRE1 α 途径的另一个参与者,也会促进

Beclin-1 转录。ATF6 通过诱导 XBP-1 的转录间接参与自噬过程^[22]。ER 应激下,过度的 Ca^{2+} 进入细胞质中通过 3 个不同的机制诱导自噬:(a) 刺激依赖 CamKK/AMPK 途径导致 mTOR 抑制^[30], (b) 激活的坏死相关蛋白激酶 (death-associated protein kinase, DAPK) 通过参与磷酸化 Beclin-1^[31], (c) 激活 PKC 途径从而导致 Bcl2-Beclin-1 复合体分离。

高血糖可激活 mTOR 信号通路减轻细胞自噬。mTOR 的机制靶标是经典的营养途径,通过与两种不同的蛋白复合物 mTOR 复合物 1 (mTORC1) 和 mTOR 复合物 2 (mTORC2) 结合来调节自噬活性。其中, mTORC1 通过直接磷酸化抑制 Ulk1 复合物的活性,从而抑制自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin-1 的表达^[32-33]。mTORC1 在高血糖情况下被很大程度的激活^[34]。通过特异性地敲低相关基因或者使用雷帕霉素 (mTOR 的抑制剂) 抑制 mTORC1 的表达,可以促进自噬的恢复可以减轻糖尿病对细胞的产生的不利影响^[35]。

AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 是一种营养敏感的激酶,在葡萄糖不足的情况下,AMPK 通过 Ser317 和 Ser777 的磷酸化直接激活 ULK1,从而促进自噬。相反,高葡萄糖下的 mTOR 或 AKT 活性增强导致 Ser757 处的 ULK1 磷酸化,抑制 ULK1 活化,从而破坏 ULK1 和 AMPK 之间的相互作用,并减少 AMPK 下游信号通路的自噬诱导作用^[32]。AMPK 的激活还可以在 Beclin-1 与 BCL-2 分离后刺激 JNK1 形成 VPS34 蛋白复合物 17,并激活自噬^[36]。其他研究也报道,AMPK 调节 FoxO 转录因子的表达,从而诱导自噬相关基因的表达^[37]。

2 自噬参与糖尿病相关血管病变

2.1 微血管病变

2.1.1 自噬在糖尿病视网膜病变中的作用

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是一种糖尿病微血管并发症,占致失明原因的 5%,其组织学特征包括血-视网膜屏障破裂、新生血管形成、毛细血管无灌注、周细胞脱落、内皮细胞减少和纤维血管增生异常。研究表明,毛细血管闭塞和毛细血管通透性的增加将破坏血-视网膜屏障,是产生血管渗漏的主要原因,而血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 既可促进血管渗漏,又可导致新生血管生成,在 DR 中扮演了重要的角色。近几年的研究中表明,自噬在糖尿病

视网膜病变的新生血管的形成以及血管渗漏中起着重要的作用,而自噬可以调节 VEGF 的分泌从而减轻相应的病变。

高糖环境可以使细胞中的 ROS 水平增高,导致炎症反应,从而使释放 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1 β 、IL-17A、IL-8 和 IL-6,在这些炎症介质水平的升高的同时,VEGF 连同其可溶性受体 sIL-2R 的表达也相应增加,VEGF 的升高促进新生血管的形成使 DR 进一步加重^[38]。Müller 细胞是糖尿病视网膜病变中分泌 VEGF 较多的细胞之一,研究发现高糖水平可以促进 Müller 细胞中的自噬标记物升高,但是 p62/SQSTM1 与内质网应激水平也持续升高,其结果导致溶酶体功能失调使得自噬功能障碍而导致细胞的凋亡,VEGF 的释放增加^[39];通过转染 siRNA 抑制 p62/SQSTM1 的表达以及 mTOR 的抑制剂 Rapamycin,激活 cathepsin L 的活性使溶酶体水解活性增强,导致自噬体降解,使细胞的自噬功能恢复从而抑制 VEGF 的分泌。与此类似的研究也说明^[40],高糖导致的 p62/SQSTM1 的表达升高,可以被三七皂苷 (notoginsenoside R1, NGR1) 通过 PINK1 依赖的线粒体自噬途径抑制,降低 Müller 细胞中的 ROS 水平以及炎症反应,从而降低 VEGF 的表达;NGR1 上调了 HG 诱导的 rMC-1 细胞和 db/db 小鼠视网膜中 PINK1 和 Parkin 的水平,增加了 LC3II/LC3I 的比例,并下调了 p62/SQSTM1 的水平,从而减少细胞中的 ROS 水平以及炎症反应,降低 VEGF 的表达。

高血糖除了可以直接影响 p62/SQSTM1 的表达以外,还可以损伤血-视屏障导致低密度脂蛋白 (LDL) 从血管中渗出。经过氧化以及糖基化修饰后的低密度脂蛋白 (HOG-LDL) 在早期的 DR 中有很强的驱动作用。然而在这个过程中,诱发的自噬会导致细胞出现死亡以及 VEGF 的分泌,导致新生血管形成从而加重糖尿病视网膜病变。研究发现 Müller 细胞经过 HOG-LDL 刺激后使 AMPK 激活导致自噬相关蛋白 ATG-5、Beclin-1、LC3II/LC3I 蛋白水平明显升高,与此同时凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达也进一步升高说明自噬的激活会导致细胞凋亡^[41]。他们的研究中使用苕基四羟基喹啉 (benzyltetrahydroxyquinoline, berberine) 可以抑制 AMPK 的激活减轻细胞中 HOG-LDL 导致的自噬性细胞死亡、炎症反应以及血管新生等。近几年的一些研究通过高糖培养视网膜内皮细胞 (retinal

endothelial cells, RECs) 来建立糖尿病视网膜的血管新生病变的体外模型来进一步探寻 DR 的内在机制。Mao 等^[42] 研究提示去乙酰化酶 3 (Sirtuin 3, Sir3) 可以抑制 HRECs 中迁移相关因子 MMP-2、MMP-9、血管新生因子 VEGF、HIF-1 α 和 IGF-1 的表达, 而且研究中发现过表达 Sir3 可以促进 LC3I 以及 LC3II 的表达以促进细胞自噬, 并且细胞自噬后期可以降低 VEGF、HIF-1 α 的表达, 故 Sir3 可能通过自噬来抑制 HRECs 的血管新生。Mao 等^[43] 进一步研究发现在体内实验和体外实验中发现 miR-204-5p 可以促进糖尿病大鼠视网膜的血管新生, 其中 LC3II 以及 LC3I/LC3II 的表达降低, 说明通过降低 miR-204-5p 的表达可以促进 LC3II 的表达从而减低 VEGF 的分泌。

综上所述, 自噬在糖尿病视网膜病变中在多个细胞中起着调节作用, 目前大部分的研究肯定了自噬在 DR 中的保护作用, 但是在某些情况, 过度自噬也将会导致 DR 进一步恶化^[41], 这两种作用的相互联系尚需进一步研究阐明。

2.1.2 自噬在糖尿病肾病中的作用

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 作为糖尿病最严重的并发症之一, 目前已成为继肾小球肾炎后终末期肾病的第 2 位原因, DN 的一个重要临床特征是尿蛋白。在蛋白尿的糖尿病患者中发现肾小球滤过屏障的结构改变, 包括肾小球内皮细胞损伤^[44-45]。近来有越来越多的证据表明, 肾小球血管周围的足细胞自噬水平对糖尿病肾病发展有重要的作用。在不同类型的细胞中, 自噬发挥的作用也有所不同:

(1) 足细胞 足细胞损伤是 DN 中关键因子, 可以作为 DN 演变的临床预测指标。在高糖的反复刺激下, 维持细胞内稳态对于足细胞的命运极为重要^[46]。近几年的研究中发现, 自噬可以维持足细胞的稳态, 从而改善糖尿病肾病。研究发现, 相当一部分肾保护药物是通过 mTOR/AMPK 途径促进自噬相关蛋白如 LC3II、Beclin-1 等的表达, 增强自噬形成, 从而对足细胞产生保护作用^[47-53]。Liu 等^[54] 研究发现, 在高血糖下, 足细胞中 β -arrestin-1 和 β -arrestin-2 的表达水平增高, 而且 β -arrestin-1 和 β -arrestin-2 可以通过抑制 ATG12-ATG5 的结合来抑制足细胞自噬, 导致肾的损伤, 这可能成为治疗糖尿病肾病新的靶点。

既往的研究显示, 在糖尿病肾病的动物模型中

发现了上皮-间充质转换 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 的病理现象。EMT 是一个动态的发展过程, 其特征在于上皮细胞获得间充质细胞 (如成肌纤维细胞) 的特征, 这会导致上皮细胞标记物 (如 E-钙黏着蛋白) 表达降低, 间充质标记物 (如 α -SMA 和 纤连蛋白) 的表达增强, 从而破坏肾小管基底膜以及增强足细胞的迁移^[55]。Jin 等^[56] 发现高糖培养下, 足细胞中 STIM1 激活 TRPC6 和 Orail 通道, 使钙离子通道打开, 导致 p62 表达增高和 LC3II/LC3I 降低从而抑制自噬, 最终加速了 EMT 的发生。Jin 等^[57] 在进一步研究后发现, HMGB1 通过激活 AKT/mTOR 通路抑制 LC3II 的表达和促进 p62 的升高, 从而导致足细胞的 EMT 的增强。这些研究说明, 自噬抑制足细胞的 EMT, 从而抑制糖尿病肾病的进展。

(2) 肾小球内皮细胞 Lenoir 等^[58] 发现内皮细胞自噬与糖尿病肾病之间相关的直接证据。他们研究显示, 内皮细胞特异性自噬缺陷小鼠会出现严重的肾小球损伤, 表明内皮细胞自噬对糖尿病所引起的应激起着重要的保护作用; 并且内皮细胞特异性自噬缺陷小鼠模型可提供足细胞和近端肾小管细胞以外的其他肾细胞中糖尿病肾病自噬的重要信息。晚期糖基化终末产物 (AGEs) 和 AGEs 受体 (RAGE) 被证明在糖尿病性肾病中起重要作用。Hou 等^[59] 研究表明丹酚酸 A (salvianolic acid A, SalA) 通过 AGE-RAGE-Nox4 轴减弱了 AGEs 诱导的 ROS, 从而促进 Atg5、Atg7、Atg12、LC3II/LC3I 的表达以及抑制 p62 的表达, 从而恢复高糖导致的内皮细胞自噬紊乱, 抑制 DN 的进程。Lim 等^[60] 的研究表明, 西那卡塞 (Cinacalcet) 通过 CaMKK β -LKB1-AMPK 轴促进肾小球内皮细胞中 LC3II/LC3I、Beclin-1 的表达, 从而减轻高糖对肾小球的损伤。这些研究证明, 肾小球内皮细胞中自噬的激活对肾脏功能起着保护作用。

2.2 外周血管病变

2.2.1 自噬在糖尿病动脉粥样硬化性病变中的作用

动脉粥样硬化是导致心脑血管疾病以及下肢动脉硬化的主要原因, 它是以脂质蓄积和炎症细胞浸润为特征的慢性炎症性过程。在糖尿病导致的动脉硬化疾病中, 自噬起着调节作用。Tian 等^[61] 的研究发现, 高糖激活 mTOR 信号通路抑制 LC3II/LC3I 以及 Beclin-1 的表达以及增加 SQSTM1/p62 堆

抑制自噬,导致内质网应激相关蛋白如 p-JNK、CHOP 和 Caspase-12 表达升高,诱导凋亡,从而促进链脲菌素诱导的糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化。Tian 等^[62]的研究发现,糖尿病状态下,糖化高密度脂蛋白引起巨噬细胞的凋亡并伴随内质网应激活化—包括核转位激活转录因子 6、蛋白激酶样 ER 激酶 (PERK) 的磷酸化和真核生物翻译起始因子 2 以及 C/EPB 同源蛋白的上调,通过加入自噬诱导剂雷帕霉素 (Rapamycin, RAPA) 可以抑制上述过程,从而抑制巨噬细胞的凋亡;而加入自噬的抑制剂 3-MA 或抑制 Beclin-1 表达可以促进这一过程,导致巨噬细胞的凋亡,从而促进糖尿病动脉粥样硬化性疾病的进展。Lazaro 等^[63]的实验也证明核样因子 2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) 可以通过促进自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3II/LC3I 的表达升高, SQSTM1 表达的降低来抑制血管壁的炎症相关水平,使糖尿病导致的动脉粥样硬化向好的方向发展。

动脉粥样硬化的始发事件是血管内皮细胞的损伤^[8]。高血糖可导致内皮细胞内的活性氧水平上升,从而导致炎症,内皮细胞的损伤最终导致细胞凋亡。Xie 等^[64]的研究中发现,AGEs 可以使血管内皮细胞中的活性氧水平升高,作为一种防御机制,机体内的自噬水平相应的增加,而且自噬相关的抑制剂 3-MA 加重了 AGEs 对内皮细胞的损伤。Fetterman 等^[65]研究发现在内皮细胞中,自噬可以激活一氧化氮合酶 (eNOS);通过从糖尿病病人以及正常人中收集内皮细胞分析发现,相比于正常人来讲,糖尿病病人内皮细胞的 p62 水平明显升高,标志着自噬通量降低。虽然糖尿病组与正常组的 LC3 以及 Beclin-1 水平相似,但是在糖尿病组中的自噬终末期的标志物溶酶体蛋白 Lamp2a 的水平明显升高,通过抑制终末期的自噬,使自噬长期处于活跃水平导致 eNOS 激活,从而减轻内皮细胞的损伤。Bai 等^[66]的研究中提出高血糖导致动脉硬化的新机制,他们的研究指出内皮细胞中的小窝蛋白 1 (caveolin-1, CAV1) 具有介导脂质大分子物质胞吞的作用,它有两种类型的 LC3 相互作用区 (LC3-interacting region, LIR): CAV1 支架结构域 (the CAV1 scaffolding domain, CSD) 和膜内结构域 (intramembrane domain, IMD)。CAV1 可以与 CAVIN1-LC3B 结合并形成复合物。由于小窝相关蛋白 1 (caveolae associated protein 1, CAVIN1) 没有

LC3 结合片段,而 CAV1 具有超过 2 个 LIR,所以 CAV1 作为 CAVIN1 和 LC3B 之间的中间连接体可以介导自噬抑制。当 CAV1 作为结构蛋白存在于膜小窝或小窝中以介导 LDL 转胞作用时,IMD 中的 LIR 被掩埋,CAV1 仅对通过 CSD 的自噬发挥抑制作用。当 CAV1 存在于细胞质中时,CAV1 通过 IMD 可能有机会与 LC3B 结合并介导 CAV1 的自噬降解。在正常的葡萄糖环境下,CAV1 在细胞质中的自噬降解和利用 CAV1 形成膜小泡保持了一定的稳态,并且在内皮细胞膜中小泡的形成相对较少,因此内吞小窝对 LDL 的胞吞作用也维持在相对较低的水平。通过抑制 AMPK-mTOR-PIK3C3 途径,高葡萄糖抑制了 CAV1-CAVIN1-LC3B 介导的 CAV1 自噬降解。结果,更多的 CAV1 积累在细胞质中,在细胞膜中形成更多的小孔并促进 LDL 跨内皮细胞的胞吞作用,从而促进动脉粥样硬化脂质在内皮下的滞留,这个机制或许可为糖尿病导致动脉粥样硬化提供新的治疗方案。

与此同时,其他的一些研究也发现自噬在内皮功能保护中的不利作用。Cai 等^[67]的研究发现,与正常组比较,高糖组自噬相关蛋白 Atg7、LC3II/LC3I 的水平明显升高,而且这个过程中凋亡相关蛋白 Bax、BCL-2 蛋白水平也明显升高,说明高糖可能导致内皮细胞的自噬性死亡,而 GLP-1 高血糖素样肽-1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 通过 GLP-1R-ERK1/2 依赖性通路,恢复 HDAC6 活性,抑制高糖导致内皮细胞功能障碍和过度自噬性死亡,提示自噬在内皮细胞中有害的一面。除此之外,Qiu 等^[68]发现,高糖降低血管平滑肌细胞内硫化氢的水平,激活 AMPK/mTOR 通路导致 LC3II/LC3I、Beclin-1 的水平升高以及 P62 降低,而这个自噬增强的过程可以导致平滑肌细胞的功能紊乱,也提示了自噬在糖尿病动脉粥样硬化过程中的不利作用。

2.2.2 自噬在糖尿病血栓形成以及瘤样扩张状态中的作用

大约 65% 的糖尿病患者死于血栓性事件,包括心脏病发作和中风^[69]。其中大约 40% ~ 60% 的糖尿病病人对抗血栓药物阿司匹林耐受^[70],进一步的研究发现糖尿病病人血液中血小板被显著激活^[71]。Lee 等^[71]研究发现,高糖可以导致血小板内的 ROS 水平升高,pp53 的激活,线粒体功能紊乱,导致血小板的凋亡从而形成血栓;而激活线粒体自噬可以维持线粒体功能抑制血小板的功能紊乱,从而抑制

血栓的形成。Paul 等^[72]通过饥饿的方式抑制血小板的聚集,自噬相关的因子 Atg3、Atg5、Atg7、Atg12、Atg16、Beclin-1、LC3II/I 明显上升,加入自噬抑制剂 3-MA 可以恢复血小板的聚集,进一步证实了自噬在血小板的聚集中的有利的作用。

主动脉中膜平滑肌细胞的减少导致中膜薄弱可以导致动脉瘤的形成,糖尿病状态下,腹主动脉瘤与胸主动脉瘤的发病率明显降低^[73]。Zheng 等^[74]发现,腹主动脉瘤患者组织中自噬相关基因转录因子 TG4b、Atg6/Beclin-1、Bnip3 和 Vps34 等表达升高,伴随整合素/CD44 的激活和 p38/MAPK 信号通路的增强,同时,LC3 蛋白表达水平且 LC3II/I 值也相应增高。另外,Giusti 等^[75]通过微阵列分析技术对腹主动脉瘤患者和正常人的外周血进行基因表达谱差异分析,发现自噬相关基因 Atg5 表达上调。因此,腹主动脉瘤患者中自噬水平的升高很可能与机体自身的防御抵抗机制密切相关。近来又有研究发现,RAPA 可极大地延缓腹主动脉瘤的发病进程,但 RAPA 同时也是一种炎症抑制剂,故不能完全确定 RAPA 是否通过激活自噬而减轻腹主动脉瘤的进展^[76]。这些研究都证实自噬和高血糖可能参与腹主动脉瘤的病理过程,但目前尚没有更多研究阐明自噬、糖尿病以及动脉瘤之间相互关系。

上述研究结果显示,虽然自噬相关基因在糖尿病外周血管病变中上调,但自噬在糖尿病外周血管病变发病机制中的具体机制仍未阐明。体外实验中,许多糖尿病外周血管病变相关因子可以激活自噬而发挥保护性作用,且此保护作用是通过减弱氧化应激和炎症信号转导而起效;体内实验中,越来越多的证据表明自噬在动脉粥样硬化中起保护作用,且可维持动脉粥样硬化斑块的稳定性。其中,RAPA 减轻糖尿病外周血管病变的机制尚不清楚,但其为激活自噬治疗糖尿病外周血管病变提供了新的方向。

3 结语与展望

作为机体的防御机制和蛋白质降解的重要途径,自噬在糖尿病血管病变中的作用正在渐渐被探索、挖掘。本文综述了自噬分别在糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病、糖尿病外周血管病变、糖尿病心脑血管病变中的作用,并对自噬参与糖尿病血管病变的分子生物学机制进行了深入探讨(图 1)。就目前的研究趋势来看,通过使用自噬激活剂和抑制剂来调控自噬的水平已经成为了学者们的惯用思路,当然,过表达特定自噬相关基因或使其被敲除也是目前常用的研究方法。但是大多数研究都是从细胞

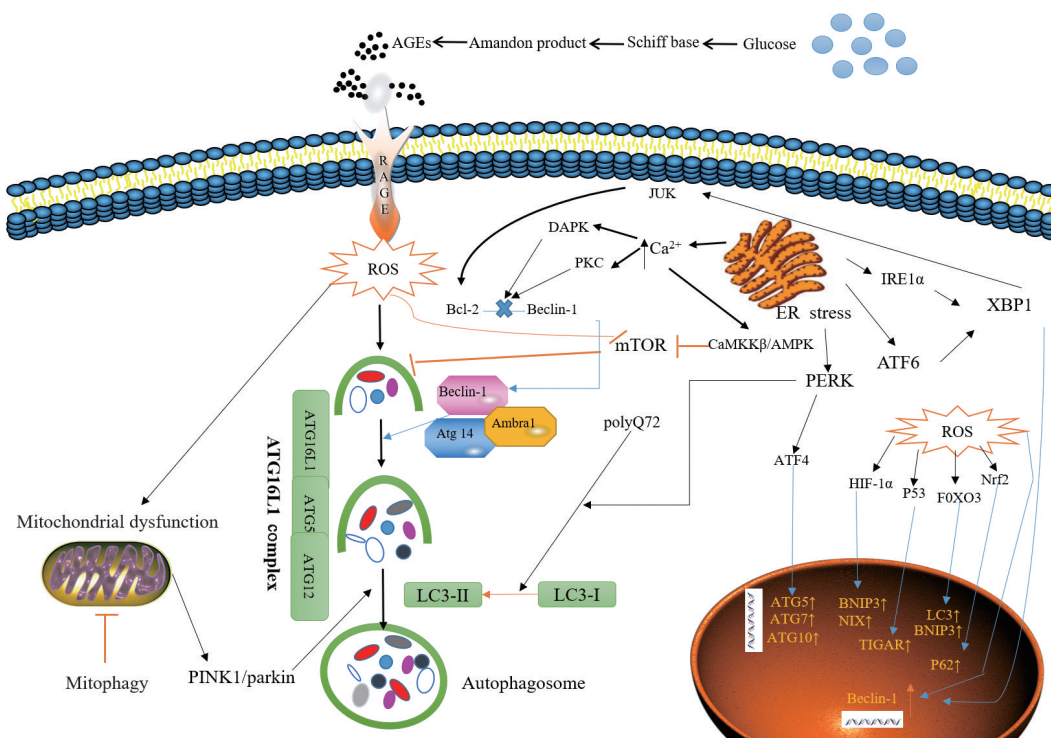


图 1 糖尿病状态下自噬调节的信号通路

Figure 1 Signal pathways regulating autophagy in diabetes

水平出发探究自噬在相关病理状态下的作用,也使得其后续的功能检测方法受限,因而建议从整体水平更加全面地探究自噬在糖尿病血管病变中的作用。并且,自噬在某些糖尿病血管病变中的病理生理作用仍未阐述清楚,部分结论仍有争议,所以未来仍需深入研究。糖尿病血管病变的病理生理机制十分复杂,因此找寻其发病机制中的关键因子或重要的信号通路就显得尤为重要,通过自噬筛选的相应靶点可以作为治疗糖尿病血管病变的新途径。虽然目前自噬在糖尿病血管病变中的发生机制仍未阐明,但相信随着研究的不断深入,靶向自噬的机制研究一定会为糖尿病血管病变的治疗开创新局面。

参考文献:

- [1] Klionsky DJ. Autophagy revisited: A conversation with christian de duve [J]. *Autophagy*, 2008, 4(6): 740-743.
- [2] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 728-741.
- [3] 杨根梦, 洪仕君, 王一航, 等. Keap1/Nrf2/p62 和 NLRP3 炎症小体与自噬调节作用的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(3): 103-107.
- [4] 张茹鑫, 李承罡, 杜若琛, 等. 人脐带间充质干细胞对自然衰老大鼠海马自噬水平的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2020, 28(6): 796-804.
- [5] Mizushima N. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 132-139.
- [6] Lubrano C, Genovesi G, Specchia P, et al. Obesity and metabolic comorbidities: Environmental diseases? [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 640673.
- [7] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: Core molecular machinery and signaling regulation [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2010, 22(2): 124-131.
- [8] 赵善民, 肖邦, 林丽芳, 等. RNA 干扰抑制 beclin1 基因对裸鼹鼠成纤维细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(6): 557-561, 566.
- [9] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications [J]. *Circ Res*, 2010, 107(9): 1058-1070.
- [10] Shang L, Chen S, Du F, et al. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by ULK1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(12): 4788-4793.
- [11] Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, et al. Overview of macroautophagy regulation in mammalian cells [J]. *Cell Res*, 2010, 20(7): 748-762.
- [12] Lavallard VJ, Meijer AJ, Codogno P, et al. Autophagy, signaling and obesity [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 66(6): 513-525.
- [13] Alexander A, Cai SL, Kim J, et al. Atm signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(9): 4153-4158.
- [14] Chen Y, McMillan-Ward E, Kong J, et al. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(1): 171-182.
- [15] 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*, 2019, 38(10): e101812.
- [16] Zhao Y, Qu T, Wang P, et al. Unravelling the relationship between macroautophagy and mitochondrial ROS in cancer therapy [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(5): 517-531.
- [17] Liu L, Sakakibara K, Chen Q, et al. Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems [J]. *Cell Res*, 2014, 24(7): 787-795.
- [18] Feng D, Liu L, Zhu Y, et al. Molecular signaling toward mitophagy and its physiological significance [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(12): 1697-1705.
- [19] Boya P, Esteban-Martinez L, Serrano-Puebla A, et al. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging [J]. *Prog Retin Eye Res*, 2016, 55: 206-245.
- [20] Li L, Tan J, Miao Y, et al. Ros and autophagy: Interactions and molecular regulatory mechanisms [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(5): 615-621.
- [21] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ros: Physiology and pathology [J]. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36(1): 30-38.
- [22] Song S, Tan J, Miao Y, et al. Crosstalk of autophagy and apoptosis: Involvement of the dual role of autophagy under ER stress [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(11): 2977-2984.
- [23] Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress [J]. *Mol Cell*, 2003, 11(3): 619-633.
- [24] Ron D, Hubbard SR. How IRE1 reacts to ER stress [J]. *Cell*, 2008, 132(1): 24-26.
- [25] Calton M, Zeng H, Urano F, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA [J]. *Nature*, 2002, 415(6867): 92-96.
- [26] Nakka VP, Prakash-Babu P, Vemuganti R. Crosstalk between endoplasmic reticulum stress, oxidative stress, and autophagy: Potential therapeutic targets for acute CNS injuries [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1): 532-544.
- [27] B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, et al. The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(16): 7683-7699.
- [28] Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, et al. ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation [J]. *Cell Death Differ*, 2007, 14(2): 230-239.
- [29] Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy [J]. *Cell*, 2005, 122(6): 927-939.

- [30] Hoyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, et al. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase- β , and Bcl-2 [J]. *Mol Cell*, 2007, 25(2): 193–205.
- [31] Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, et al. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL [J]. *Autophagy*, 2009, 5(5): 720–722.
- [32] Ding Y, Choi ME. Autophagy in diabetic nephropathy [J]. *J Endocrinol*, 2015, 224(1): R15–R30.
- [33] Dehdashtian E, Mehrzadi S, Yousefi B, et al. Diabetic retinopathy pathogenesis and the ameliorating effects of melatonin; involvement of autophagy, inflammation and oxidative stress [J]. *Life Sci*, 2018, 193: 20–33.
- [34] Gödel M, Hartleben B, Herbach N, et al. Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice [J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6): 2197–2209.
- [35] 李嘉欣, 马婷婷, 南一, 等. 糖尿病肾病发病机制研究进展 [J]. *临床肾脏病杂志*, 2019, 19(11): 860–864.
- [36] Yao F, Zhang M, Chen L. 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) improves autophagic activity in diabetes and diabetic complications [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2016, 6(1): 20–25.
- [37] Kubli DA, Gustafsson AB. Cardiomyocyte health: Adapting to metabolic changes through autophagy [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2014, 25(3): 156–164.
- [38] Feng S, Yu H, Yu Y, et al. Levels of inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-17a, and TNF- α in aqueous humour of patients with diabetic retinopathy [J]. *J Diabetes Res*, 2018, 2018: 8546423.
- [39] Lopes de Faria JM, Duarte DA, Montemurro C, et al. Defective autophagy in diabetic retinopathy [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(10): 4356–4366.
- [40] Zhou P, Xie W, Meng X, et al. Notoginsenoside R1 ameliorates diabetic retinopathy through PINK1-dependent activation of mitophagy [J]. *Cells*, 2019, 8(3): 213.
- [41] Fu D, Yu JY, Connell AR, et al. Beneficial effects of berberine on oxidized LDL-induced cytotoxicity to human retinal müller cells [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(7): 3369–3379.
- [42] Mao XB, You ZP, Wu C, et al. Potential suppression of the high glucose and insulin-induced retinal neovascularization by Sirtuin 3 in the human retinal endothelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482(2): 341–345.
- [43] Mao XB, Cheng YH, Xu YY. miR-204-5p promotes diabetic retinopathy development via downregulation of microtubule-associated protein 1 light chain 3 [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(4): 2945–2952.
- [44] Gnudi L, Coward RJM, Long DA. Diabetic nephropathy: Perspective on novel molecular mechanisms [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(11): 820–830.
- [45] Yasuda-Yamahara M, Kume S, Tagawa A, et al. Emerging role of podocyte autophagy in the progression of diabetic nephropathy [J]. *Autophagy*, 2015, 11(12): 2385–2386.
- [46] Fang L, Zhou Y, Cao H, et al. Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60546.
- [47] Dusabimana T, Park EJ, Je J, et al. Geniposide improves diabetic nephropathy by enhancing ULK1-mediated autophagy and reducing oxidative stress through AMPK activation [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(4): 1651.
- [48] Zhang Z, Tang S, Gui W, et al. Liver X receptor activation induces podocyte injury via inhibiting autophagic activity [J]. *J Physiol Biochem*, 2020, 76(2): 317–328.
- [49] Yoshibayashi M, Kume S, Yasuda-Yamahara M, et al. Protective role of podocyte autophagy against glomerular endothelial dysfunction in diabetes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525(2): 319–325.
- [50] Yang F, Qu Q, Zhao C, et al. Paecilomyces cicadae-fermented radix astragali activates podocyte autophagy by attenuating PI3K/Akt/mTOR pathways to protect against diabetic nephropathy in mice [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 129: 110479.
- [51] Xu J, Deng Y, Wang Y, et al. SPAG5-AS1 inhibited autophagy and aggravated apoptosis of podocytes via SPAG5/AKT/mTOR pathway [J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(2): e12738.
- [52] Li C, Guan XM, Wang RY, et al. Berberine mitigates high glucose-induced podocyte apoptosis by modulating autophagy via the mTOR/P70S6K/4EBP1 pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 243: 117277.
- [53] Zhou D, Zhou M, Wang Z, et al. Progranulin alleviates podocyte injury via regulating CAMKK/AMPK-mediated autophagy under diabetic conditions [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2019, 97(11): 1507–1520.
- [54] Liu J, Li QX, Wang XJ, et al. B-arrestins promote podocyte injury by inhibition of autophagy in diabetic nephropathy [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(4): e2183.
- [55] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: Pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1): 1–12.
- [56] Jin J, Wu D, Zhao L, et al. Effect of autophagy and stromal interaction molecule 1 on podocyte epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2018, 11(5): 2450–2459.
- [57] Jin J, Gong J, Zhao L, et al. Inhibition of high mobility group box 1 (HMGB1) attenuates podocyte apoptosis and epithelial-mesenchymal transition by regulating autophagy flux [J]. *J Diabetes*, 2019, 11(10): 826–836.
- [58] Lenoir O, Jasiek M, Hénique C, et al. Endothelial cell and podocyte autophagy synergistically protect from diabetes-induced glomerulosclerosis [J]. *Autophagy*, 2015, 11(7): 1130–1145.
- [59] Hou B, Qiang G, Zhao Y, et al. Salvianolic acid a protects against diabetic nephropathy through ameliorating glomerular endothelial dysfunction via inhibiting AGE-RAGE signaling [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(6): 2378–2394.
- [60] Lim JH, Kim HW, Kim MY, et al. Cinacalcet-mediated

- activation of the CaMKK β -LKB1-AMPK pathway attenuates diabetic nephropathy in db/db mice by modulation of apoptosis and autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(3): 270.
- [61] Tian J, Popal MS, Liu Y, et al. Ginkgo biloba leaf extract attenuates atherosclerosis in streptozotocin-induced diabetic ApoE^{-/-} mice by inhibiting endoplasmic reticulum stress via restoration of autophagy through the mTOR signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 8134678.
- [62] Tian H, Li Y, Kang P, et al. Endoplasmic reticulum stress-dependent autophagy inhibits glycated high-density lipoprotein-induced macrophage apoptosis by inhibiting chop pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(4): 2954-2969.
- [63] Lazaro I, Lopez-Sanz L, Bernal S, et al. Nrf2 activation provides atheroprotection in diabetic mice through concerted upregulation of antioxidant, anti-inflammatory, and autophagy mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 819.
- [64] Xie Y, You SJ, Zhang YL, et al. Protective role of autophagy in age-induced early injury of human vascular endothelial cells [J]. *Mol Med Rep*, 2011, 4(3): 459-464.
- [65] Fetterman JL, Holbrook M, Flint N, et al. Restoration of autophagy in endothelial cells from patients with diabetes mellitus improves nitric oxide signaling [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 247: 207-217.
- [66] Bai X, Yang X, Jia X, et al. CAV1-CAVIN1-LC3B-mediated autophagy regulates high glucose-stimulated LDL transcytosis [J]. *Autophagy*, 2020, 16(6): 1111-1129.
- [67] Cai X, She M, Xu M, et al. GLP-1 treatment protects endothelial cells from oxidative stress-induced autophagy and endothelial dysfunction [J]. *Int J Biol Sci*, 2018, 14(12): 1696-1708.
- [68] Qiu X, Liu K, Xiao L, et al. Alpha-lipoic acid regulates the autophagy of vascular smooth muscle cells in diabetes by elevating hydrogen sulfide level [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(11): 3723-3738.
- [69] Ferreiro JL, Angiolillo DJ. Diabetes and antiplatelet therapy in acute coronary syndrome [J]. *Circulation*, 2011, 123(7): 798-813.
- [70] Price HC, Holman RR. Primary prevention of cardiovascular events in diabetes: Is there a role for aspirin? [J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2009, 6(3): 168-169.
- [71] Lee SH, Du J, Stitham J, et al. Inducing mitophagy in diabetic platelets protects against severe oxidative stress [J]. *EMBO Mol Med*, 2016, 8(7): 779-795.
- [72] Paul M, Hemshekhar M, Kemparaju K, et al. Aggregation is impaired in starved platelets due to enhanced autophagy and cellular energy depletion [J]. *Platelets*, 2019, 30(4): 487-497.
- [73] Raffort J, Lareyre F, Clément M, et al. Diabetes and aortic aneurysm: Current state of the art [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(13): 1702-1713.
- [74] Zheng YH, Tian C, Meng Y, et al. Osteopontin stimulates autophagy via integrin/CD44 and p38 MAPK signaling pathways in vascular smooth muscle cells [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(1): 127-135.
- [75] Giusti B, Rossi L, Lapini I, et al. Gene expression profiling of peripheral blood in patients with abdominal aortic aneurysm [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2009, 38(1): 104-112.
- [76] Rouer M, Xu BH, Xuan HJ, et al. Rapamycin limits the growth of established experimental abdominal aortic aneurysms [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2014, 47(5): 493-500.

[收稿日期]2020-12-16