

· 综 述 ·

脑缺血后神经元自噬与凋亡机制及中药干预作用的研究进展

曹慧, 徐立, 宋文婷(中国中医科学院 西苑医院 基础医学研究所, 北京市中药药理重点实验室, 北京 100091)

摘要: 脑缺血是一种常见的脑血管疾病, 致残、致死率高, 导致严重的经济和社会负担。缺血诱导的细胞自噬失调及凋亡参与了脑缺血引发的神经损伤。中药具有多成分、多靶点的优势, 可作用于脑缺血后神经损伤的不同阶段。已发现多数中药活性成分可通过调控自噬及凋亡而发挥脑保护作用。该文综述了脑缺血后细胞异常自噬与凋亡的分子生物学基础及中药对其靶点和通路的作用, 可为脑缺血后神经元的保护提供治疗思路。

关键词: 脑缺血; 神经元; 自噬; 凋亡; 中药干预; 药理机制

中图分类号: R285.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)03-0441-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.03.020

Review of the Mechanism of Neuronal Autophagy and Apoptosis and the Intervention of Traditional Chinese Medicine After Cerebral Ischemia

CAO Hui, XU Li, SONG Wenting (Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, Beijing 100091, China)

Abstract: Cerebral ischemia is a common cerebrovascular disease with a high rate of disability and mortality, resulting a heavy economic and social burden. Studies have suggested that dysregulation of autophagy and excessive apoptosis of neurons are responsible for neurological damage caused by cerebral ischemia. Traditional Chinese medicine has the advantage of multi-component and multi-target, and plays its role in different stages of cerebral ischemia. It has been found that most of the active components of traditional Chinese medicine can play a cerebral protective role by regulating autophagy and apoptosis. This article reviews the molecular biological basis of abnormal autophagy and apoptosis after cerebral ischemia and the effects of traditional Chinese medicine on disease targets and pathways. This article aims at providing treatment ideas for the protection of neurons after ischemia.

Keywords: Cerebral ischemia; neuron; autophagy; apoptosis; intervention of traditional Chinese medicine; pharmacological mechanism

脑中风, 又称脑卒中, 是一种常见的脑血管疾病, 具有高致残率和高致死率的特点, 且该病的发病率逐年升高。据调查显示, 中国目前罹患中风人数约有 1 300 万, 其中缺血性中风患者占 80%, 中风导致的死亡人数占总死亡人口的 20%, 且存活患者中有 50%~70% 的患者留下严重残疾, 给家庭及社

会带来沉重的负担^[1-2]。目前脑缺血的首选治疗方案是恢复缺血区供血, 然而恢复灌注后, 过量活性氧的产生、炎症因子的大量募集及细胞异常死亡会进一步加剧神经损伤。因此, 如何最大程度地保护受损神经成为治疗的关键。

自噬和凋亡是脑缺血后神经元的主要死亡形式,

收稿日期: 2020-10-19

作者简介: 曹慧, 女, 硕士研究生, 研究方向: 脑保护中药药理研究。Email: 1014641950@qq.com。通信作者: 宋文婷, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 脑血管病药理研究、中药新药研发。Email: wentingsong1@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81603617); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助项目(ZZ13-YQ-007)。

越来越多的研究认为调节自噬与凋亡是脑缺血有潜力的治疗策略。中药具有多成分、多靶点的作用特点,在脑缺血治疗方面具有明显的优势^[3]。目前已发现多数中药活性成分可通过调控自噬及凋亡发挥脑保护作用^[4-5]。在现有研究基础上,深入研究药物对自噬、凋亡调控作用的机制,有助于阐释药物作用的分子机制,加快药物研发进程。本文通过归纳脑缺血中自噬、凋亡的关键靶点、信号通路的功能及中药活性成分干预作用的研究进展,以期对日后脑缺血神经元保护及相关药物研发提供思路和参考。

1 自噬

自噬是细胞自我吞噬的过程,在此过程中细胞自身物质包被进入囊泡,形成自噬体,自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,从而降解细胞自身物质。因此,自噬更多是一种降解机制,帮助清除受损、老化的细胞器。研究^[6]表明自噬对维持脑内细胞稳态必不可少,在应激状态下,自噬最先被激活。在病理状态下,自噬是一把“双刃剑”,只有有效的自噬才具有神经保护作用。有效的自噬是指自噬体的形成与自噬通量(指自噬溶酶体的形成与降解过程)相等,既不会因自噬不足而无法完成清除代谢受损、老化的细胞器,也不会因过度自噬而形成自噬体的堆积,加重损伤^[7]。因此,如何将自噬维持在有益的水平是未来脑保护研究的重要方向。

1.1 自噬作用靶点及中药活性成分的调节作用 Beclin-1、微管相关蛋白轻链 3(LC3)、p62 是评价自噬水平的关键自噬蛋白。中药活性成分可通过调节不同自噬蛋白作用于脑缺血后的细胞自噬来降低细胞死亡率,实现脑保护。

1.1.1 Beclin-1 Beclin-1 是酵母自噬相关基因 Atg6 (Atg6)的哺乳动物同源基因,参与自噬体的形成,是调控自噬过程的关键蛋白。缺血后 Beclin-1 表达显著升高,与 III 类磷脂酰肌醇 3-激酶(Class III PI3K,亦称为 Vps34)形成 Beclin-1-Vps34 复合物。Beclin-1-Vps34 复合物是自噬体的前体。Beclin-1 可促进自噬体的形成,同时通过增加自噬关键蛋白在 Beclin-1-Vps34 复合物上的积累来启动自噬^[8-9]。现代药理研究^[10]发现葛根素能通过下调缺血半暗带中 Beclin-1 的表达,抑制缺血诱导的神经元自噬,从而发挥脑缺血后的神经保护作用。此外,在体外氧糖剥夺(OGD)实验中,淫羊藿的有效成分淫羊藿苷可显著降低 Beclin-1 的表达,抑制 OGD 诱导的细胞自噬,从而显著提高 PC12 细胞的活力^[11]。

1.1.2 LC3 LC3-II 是由 LC3 经过两步转化形成的。首先,LC3 在 Atg4 作用下形成 LC3-I,接着 LC3-I 转化形成 LC3-II。LC3-II 作为自噬体细胞膜的标志物,自噬体的降解或自噬通量增加都会导致 LC3-II 水平的降低^[12-14],故单一的 LC3-II 水平无法准确反映整体自噬水平。LC3-I 是 LC3-II 的前体,若 LC3-II/LC3-I 比值升高则说明自噬体形成增加,此时自噬水平高,所以选用 LC3-II/LC3-I 更能准确反映自噬水平的变化^[15]。脑缺血可导致 LC3-II/LC3-I 比值显著升高,表明脑缺血后自噬处于高水平状态,而姜黄素可透过血脑屏障通过抑制 LC3-II/LC3-I 比值的升高,降低自噬活性,改善脑缺血后神经功能丢失及脑梗死来发挥脑保护作用^[16]。

1.1.3 p62 p62 是由 SQSTM1 基因编码的衔接子,在自噬信号转导中起到重要作用^[17]。自噬是消耗 p62 的过程,给予黄芪甲苷 IV 处理后,p62 水平显著降低,表明黄芪甲苷 IV 可促进自噬,减少脑梗死体积,改善缺血性损伤^[18]。槲皮的活性成分京尼平苷也具有相似作用,其可通过下调 OGD 后 BV-2 小胶质细胞中 p62 的表达,增加 OGD 后小胶质细胞的自噬活性,从而减少细胞死亡,发挥神经保护作用^[19]。另外,黄芪中的活性成分毛蕊异黄酮可通过增加 p62 的表达,促进脑缺血损伤后错误折叠或突变蛋白质的泛素化及降解来调节自噬水平,增加神经细胞的存活率,从而发挥脑保护作用^[20]。

1.2 自噬通路及中药活性成分的调节作用 在脑缺血病理状态下,一些激酶响应缺血缺氧刺激,产生级联反应,调控细胞自噬,在该信号传导途径上下游有多个效应因子协同参与,构成自噬信号通路。中药活性成分可通过作用于磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)与 AMP 依赖的蛋白激酶(AMPK)/mTOR 等常见自噬信号通路来调节细胞自噬,促进细胞存活,减轻缺血损伤,起到脑保护作用。

1.2.1 MAPK 信号通路 MAPK 家族包括 c-Jun 氨基末端激酶 1-3(JNK1-3),p38(α , β , γ 和 δ)和细胞外调节蛋白激酶(ERK)家族,在脑缺血后被激活,传导细胞应激^[21]。当 JNK、p38 活化受到抑制时,LC3-II/LC3-I 比例显著降低,Beclin-1 表达受到抑制,细胞异常自噬死亡减少^[22]。麦冬中的鲁斯可皂苷元可通过抑制 MAPK 信号通路,减少 OGD 诱导的内皮细胞 bEnd.3 细胞自噬,对中风后血脑屏障具有保护作用^[23]。在脑缺血动物模型中,姜黄素可通过抑制

p38/MAPK 信号通路来减弱自噬活性,从而发挥神经保护作用^[16]。在大鼠脑缺血亚急性期给予黄芩苷干预,可抑制 JNK 及 p38 的激活,减少神经元丢失,从而发挥抗缺血性神经损伤作用^[24]。而 ERK 则表现相反作用,当 ERK 激活时,表现抑制自噬作用,从而减轻缺血性脑损伤^[25]。

1.2.2 PI3K/Akt/mTOR 信号通路 PI3K 蛋白家族参与各种细胞功能的调节,如细胞增殖、分化和凋亡。PI3K 主要分为 I 类、II 类和 III 类 3 类,其中 III 类 PI3K 可与 Beclin-1 形成复合物,启动自噬^[8]。研究发现枸杞多糖可通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,下调 LC3-II/LC3-I 比例,抑制过度自噬引起的细胞死亡,从而发挥脑保护作用^[26]。在海马神经元 OGD 实验中,丹参酮 IIA 可通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制 OGD 诱导的神经元自噬,增强细胞活力^[27]。此外,mTOR 作为细胞自噬及存活信号转导的重要靶点,主要有 mTORC1 和 mTORC2 2 种类型,其中参与自噬信号转导的主要是 mTORC1^[28]。mTORC1 表达的上调可抑制自噬促存活,但也有研究证实抑制 mTORC1 表达,可诱导“中度”自噬,同样增加细胞存活率,减轻缺血损伤^[29]。

1.2.3 AMPK/mTOR 信号通路 AMPK 是丝氨酸/苏氨酸激酶的一员,是维持代谢稳态的关键能量传感器,也是 mTOR 上游的调节因子。研究^[30]发现 AMPK/mTOR 信号通路参与了脑缺血再灌注后自噬的激活。最近一项研究^[31]发现,五味子素可通过抑制 AMPK/mTOR 信号通路,逆转 OGD 导致的 PC12 细胞中 LC3-II/LC3-I 比例的升高,在自噬体形成早期抑制自噬,从而减轻缺血性神经损伤。在小鼠脑缺血再灌注模型中,生脉注射液能够显著抑制自噬相关蛋白 Beclin-1 的表达,减轻脑缺血诱导的细胞自噬。并发现这种脑保护作用与生脉注射液抑制 AMPK/mTOR 信号通路有关^[32],其发挥作用的可能是人参、麦冬、五味子中的皂苷类成分。也有研究发现,银杏内酯 K 可通过激活 AMPK/mTOR 信号通路诱导保护性自噬的发生,促进 OGD 后星形胶质细胞的增殖与迁移,是治疗脑缺血的潜在药物^[33]。

2 凋亡

凋亡是一个复杂的生理过程,凋亡网络包含多条信号通路,最终通过调控下游凋亡因子的表达来诱发凋亡。脑缺血后有效、适度的自噬具有神经保护作用,而当出现无效自噬或自噬受到抑制时,则会诱导细胞走向凋亡^[6]。凋亡是缺血致损伤的重要诱因

之一,因而抑制细胞凋亡对脑缺血后的神经保护至关重要。

2.1 凋亡作用靶点及中药活性成分的调节作用 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)家族、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)与核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)是细胞凋亡的关键调节剂,药物通过靶向调控这些分子靶点的表达,抑制细胞过度凋亡。这些靶点可从多种途径参与细胞凋亡的调控,大量药物可通过作用这些靶点表现出较好的神经保护作用^[34-37]。

2.1.1 Bcl-2 家族 Bcl-2 家族为多种凋亡信号通路的下游靶点,其家族成员包括促凋亡蛋白 Bax、Bak、Bad 及抗凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-xl 等^[38]。脑缺血产生的 DNA 损伤、内质网应激均会导致促凋亡与抗凋亡蛋白的表达失衡,诱发凋亡^[39-41]。Bcl-2 家族的促凋亡作用起于仅含一个 Bcl-2 同源域蛋白(BH3-only)的激活。BH3-only 作为凋亡的启动元件,在受到死亡刺激后,灭活抗凋亡蛋白,并促进促凋亡蛋白的释放,从而诱导细胞凋亡^[42]。研究发现人参皂苷 Rg1 可减少促凋亡蛋白 Bax 的表达,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,对 OGD 诱导的神经干细胞凋亡具有抑制作用^[43]。阿魏酸可逆转缺血后 Bax/Bcl-2 比例的上升,抑制细胞色素 C(Cyt-C)介导的 caspase-3 依赖的细胞凋亡途径,从而抑制神经元凋亡^[44]。

2.1.2 Caspase-3 脑缺血后促凋亡蛋白表达增加,Bax 与 Bak 形成寡聚体插入线粒体膜,破坏线粒体膜的完整性,导致 Cyt-C 从线粒体内释放,激活 caspase-9^[45],进而激活 caspase-3,引发级联反应,促使细胞发生凋亡^[46]。Caspase-3 在脑缺血后神经元凋亡中起关键作用,受多种信号调控。抑制 Cyt-C 的表达、增加 Bcl-2 表达、下调 Bax 表达均可减少 caspase-3 的活化,减少凋亡^[47]。研究发现红景天苷可抑制 Bad 的表达^[48-49],减少 caspase-3 活化,达到脑保护作用^[50]。迷迭香酸通过下调 Bax 的表达来抑制 caspase-3 诱导的细胞凋亡^[51]。Caspase-3 是凋亡信号通路中的下游靶点,可被多条途径调控,如大鼠脑缺血再灌注后给予银杏黄素干预,可激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路而下调 caspase-3 表达,显著减少大鼠脑梗死体积^[52];在体外 OGD 造成的缺血模型中,异槲皮素可通过抑制 Toll 样受体 4/核因子激活的 B 细胞的 κ -轻链增强(TLR4/NF- κ B)信号通路而抑制 caspase-3 活性,抑制 OGD 导致的神经元细胞凋亡^[53]。因此,对 caspase-3 的调控作用可能是多数药物发挥脑保护作用的机制所在。

2.1.3 Nrf2 Nrf2 是细胞抗氧化系统中的关键因子,参与了缺血后的神经元凋亡及氧化应激过程。当脑缺血后, Nrf2 表达受到抑制,其下游血红素氧合酶 1 (HO-1)表达减少,继而介导氧化应激反应^[54],加重脑损伤。但当 Nrf2 被激活后, Bcl-2/Bax 比例升高,从而减轻 Bax 与 Bak 对线粒体膜的破坏,抑制线粒体途径介导的细胞凋亡^[55]。研究表明, Nrf2 参与介导了脑缺血后 caspase-3 的表达来调控细胞凋亡,在体外 OGD 实验中,蒲公英甾醇可增加细胞核内 Nrf2 的蓄积,显著下调 caspase-3 的表达来抑制 OGD 诱导的海马神经元凋亡^[56]。异槲皮素处理可诱导 Nrf2 由细胞质向细胞核移位,通过 Nrf2 的介导抑制活性氧 (ROS)/NF- κ B 信号通路,下调 caspase-3 的表达,抑制脑缺血后的细胞凋亡及氧化应激,对体内和体外脑缺血损伤模型均具有保护作用^[57]。

2.2 凋亡通路及中药活性成分的调节作用 与自噬通路一致,脑缺血治疗中,药物激活或抑制凋亡信号通路,调控下游凋亡蛋白的表达,发挥神经保护作用。c-Jun 氨基末端激酶(JNK)信号通路、PI3K/Akt/mTOR 信号通路、Janus 激酶/信号转导与转录激活子(JAK/STAT)信号通路为常见凋亡信号通路,这些通路的激活最终都可作用于 Bcl-2 家族成员来调控细胞凋亡。

2.2.1 JNK 信号通路 JNK 是 MAPK 家族中的一员,将信号从细胞表面传递至细胞核进而调控凋亡基因表达的过程中发挥着至关重要的作用^[58]。早期研究^[59]发现, JNK 信号通路因缺血刺激被激活,起到促进细胞凋亡的作用,给予 JNK 特异性抑制剂 SP600125 后, JNK 活性明显降低,下游促凋亡蛋白 Bax、Bim、Fas 的表达被抑制,细胞凋亡减少。实验研究^[60]发现银杏内酯 A、B 均可通过抑制 JNK 信号通路,阻断下游线粒体凋亡途径,降低促凋亡蛋白 Bax 的表达水平;还可上调 Bcl-2 的表达,有效保护受损的神经细胞。银杏内酯上调 Bcl-2 表达作用可能与 JNK 下游 Hrk/Dp5 的转录受到抑制有关, Hrk/Dp5 受到抑制后,促凋亡蛋白的激活被抑制, Bcl-2 的表达增加^[61-62]。此外,有研究^[63]发现载脂蛋白 E(APOE)与脑缺血疾病有关,上调 APOE 表达,可抑制 JNK 通路,从而抑制凋亡。

2.2.2 PI3K/Akt/mTOR 信号通路 PI3K/Akt 既可调节自噬,也是抑制细胞凋亡的重要通路之一。与 JNK 通路相似, PI3K/Akt 最终抑制 Bad 与 Bcl-xl 形成二聚体,使 Bcl-2/Bad 比例升高,从而起到抑制凋亡的作用^[47-49]。银杏黄素与枸杞多糖可激活 PI3K/Akt/

mTOR 信号通路,抑制缺血引起的神经凋亡,发挥神经保护作用^[64-65]。PI3K 被激活后,磷脂酰肌醇-3, 4, 5-三磷酸(PIP3)在膜上聚集,诱导 Akt 向膜上转移,继而促进 Akt 被磷酸化^[66],磷酸化的 Akt 能激活 mTOR,上调下游蛋白 p70 核糖体蛋白 S6 激酶(p70S6K)的表达^[67],磷酸化的 Akt 及 p70S6K 均能抑制 Bad 与 Bcl-xl 形成二聚体,从而抑制凋亡。由于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路还是蛋白质合成的主要途径,在抑制凋亡的同时,还能促进细胞增殖,增加神经细胞的存活率^[68]。在脑缺血小鼠模型中,给予人参皂苷 Rg1 干预可激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,既能促进脑血管生成,也能抑制缺血导致的神经元凋亡,有效地治疗脑缺血^[69]。此外, Akt 的激活还能磷酸化环磷腺苷效应元件结合蛋白(CREB), Akt/CREB 信号通路具有公认的神经元保护作用,通过上调 Bcl-2 的表达,抑制凋亡^[70-71]。值得注意的是,激活 PI3K/Akt 的作用结果之所以与抑制 JNK 通路相似,可能是因为活化的 Akt 与 JNK 相互作用蛋白(JIP1)结合,阻止 JIP1 与 JNK 形成复合体而激活 JNK 的作用导致的^[72-74]。

2.2.3 JAK/STAT 信号通路 JAK/STAT 通路参与调节脑缺血后的炎症反应及氧化应激,与脑缺血后的神经元的增殖分化及凋亡密切相关。有研究^[75]指出,虎杖中的活性物质白藜芦醇可激活 JAK/STAT 信号通路,减少脑缺血后的炎症反应及细胞凋亡来减轻神经损伤。关于 JAK/STAT 家族在脑缺血神经保护中作用研究,以 JAK2/STAT3 信号通路作用较为突出。研究^[58, 76-79]发现银杏内酯激活的 JAK2/STAT3 信号通路,既能减轻缺血带来的炎症反应,也可增加血管内皮生长因子(VEGF)的表达,促进血管生成,增强细胞抗损伤能力,从而减少神经细胞的凋亡。同时也有研究^[80]观察到相反的作用,如烟碱通过抑制 JAK2/STAT3 通路信号转导,下调 caspase-3 和 Bax 的表达来抑制缺血诱导的细胞凋亡。蛇床子素研究中也观察到了同样的作用^[81]。因此, JNK 通路虽能诱导 JAK/STAT 通路的激活,但产生这种激活作用所需的条件及激活后具体生理学作用未见研究,二者在脑缺血中发挥的综合作用有待进一步探讨。

3 自噬与凋亡相关性

有研究发现,脑缺血后, LC3、Beclin-1 与 caspase-3 水平显著升高^[82],这表明在脑缺血后自噬与凋亡都可能被诱导。与凋亡相比,自噬具有更高的生存优势,在缺血后自噬可能在凋亡之前被诱

导,若自噬不能拯救受损细胞,则诱导细胞走向凋亡。这可能意味着,自噬与凋亡中存在某种关联,当整体自噬流异常时,促凋亡蛋白的表达水平发生改变,诱导细胞凋亡。越来越多的证据表明^[83-84],抑制凋亡则相应的促进自噬,但这种自噬不是过度的自噬,而是整体自噬流的激活,从而促进受损细胞器的代谢,减少细胞死亡,实现脑保护。

4 讨论

脑缺血的病理机制复杂,致残、致死率高,缺少有效的治疗药物。现代研究发现中药活性成分可通过调节自噬和凋亡来发挥神经保护作用,减轻脑缺血损伤。其中 Beclin-1、LC3、p62 等自噬蛋白及 PI3K/Akt/mTOR、MAPK 与 AMPK/mTOR 等信号通路是中药活性成分调节自噬的主要的作用靶点及通路;另外,中药活性成分可通过靶向调控 Bcl-2 家族、caspase-3、Nrf2 等作用靶点介导 JNK、PI3K/Akt/mTOR、JAK/STAT 等常见凋亡信号通路,来抑制细胞的过度凋亡,在脑缺血中起到神经保护作用。在中药治疗脑缺血的药效机制研究中,由于中药活性成分多,可将其分为脂溶性及水溶性两大类。中药中脂溶性活性成分可透过血脑屏障调控自噬与凋亡,从而发挥脑保护作用。其中以小分子酚酸、黄酮类及某些益气药中极性小的大分子类(如黄芪多糖、黄芪甲苷、人参多糖、木脂素等)研究较多,且均具有显著疗效,故中药调控自噬与凋亡的作用机制研究可从这几类成分入手。综合观察各类成分在脑缺血后各阶段所发挥的作用,根据不同成分在不同阶段的调控作用制定合理的治疗方案,能更好地发挥中药高效安全的优势。

此外,虽然自噬与凋亡的下游靶点不同,但同一上游信号通路对凋亡与自噬均有调控作用。目前已发现很多药物对自噬及凋亡均具有调控作用,但多数研究只关注单一作用,忽略两者间的相关性。且药物对机体的调控不止作用于单一通路,而是不同通路、多靶点、多系统共同作用的结果。所以,日后研究也可从不同作用环节的相关性入手,如激活 JNK 信号通路既能抑制自噬,又能促进凋亡;而抑制自噬可促进细胞存活,促进凋亡将增加细胞死亡率。观察激活 JNK 信号通路后凋亡与自噬水平的变化即可阐明 JNK 信号通路对缺血后自噬与凋亡的调控作用。这种相关性的证明不仅可以理清靶点-通路间的上下游关系,还有助于阐释药物作用的分子机

制,为药效研究提供更多支撑,也为将来的新药研发提供参考和依据。

参考文献:

- [1] 王陇德,刘建民,杨弋,等.我国脑卒中防治仍面临巨大挑战——《中国脑卒中防治报告2018》概要[J].中国循环杂志,2019,34(2):105-119.
- [2] 彭俊亮,祝美珍.中医药治疗缺血性脑中风的概况[J].湖南中医杂志,2019,35(6):145-147.
- [3] 陈孝男,杨爱琳,赵亚楠,等.缺血性脑中风的发病机制及其常用治疗中药研究进展[J].中国中药杂志,2019,44(3):422-432.
- [4] XIE W, ZHOU P, SUN Y, et al. Protective effects and target network analysis of ginsenoside Rg1 in cerebral ischemia and reperfusion injury: a comprehensive overview of experimental studies [J]. Cells, 2018, 7(12): 270.
- [5] HUANG X P, DING H, LU J D, et al. Autophagy in cerebral ischemia and the effects of traditional Chinese medicine[J]. Journal of Integrative Medicine, 2015, 13(5): 289-296.
- [6] CHEN Q, JIAN K, CAI Y F. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis[J]. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2018, 3: 1-11.
- [7] WOLF M S, BAYIR H, KOCHANKE P M, et al. The role of autophagy in acute brain injury: a state of flux?[J]. Neurobiology of Disease, 2019, 122: 9-15.
- [8] HOU K, XU D, LI F Y, et al. The progress of neuronal autophagy in cerebral ischemia stroke: mechanisms, roles and research methods [J]. Journal of the Neurological Sciences, 2019, 400: 72-82.
- [9] MAEJIMA Y, MITSUKI I, JUNICHI S. Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart[J]. Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2016, 95: 19-25.
- [10] HONG Y H, TAO G, PENG Y Z, et al. Puerarin provides a neuroprotection against transient cerebral ischemia by attenuating autophagy at the ischemic penumbra in neurons but not in astrocytes [J]. Neuroscience Letters, 2017, 643: 45-51.
- [11] MO Z T, LI W N, ZHAI Y R, et al. Icariin attenuates OGD/R-induced autophagy via Bcl-2-dependent cross talk between apoptosis and autophagy in PC12 cells[J]. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2016, 2016: 4343084.
- [12] LEE S, HIRADATE Y, HOSHINO Y, et al. Quantitative analysis in LC3-II protein in vitro maturation of porcine oocyte[J]. Zygote, 2014, 22(3): 404-410.
- [13] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 and autophagy[J]. Methods in Molecular Biology, 2008, 445: 77-88.
- [14] OH S H, CHOI Y B, KIM J H, et al. Quantification of autophagy flux using LC3 ELISA[J]. Analytical Biochemistry, 2017, 530: 57-67.
- [15] WEI H, LI Y, HAN S, et al. cPKCγ-modulated autophagy in neurons alleviates ischemic injury in brain of mice with ischemic stroke through Akt-mTOR pathway[J]. Translational Stroke Research, 2016, 7(6): 497-511.
- [16] HUANG L, CHEN C, ZHANG X, et al. Neuroprotective effect of

- curcumin against cerebral ischemia-reperfusion via mediating autophagy and inflammation[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2018, 64(1): 129-139.
- [17] MOSCAT J, KARIN M, DIAZ-MECO M T. p62 in cancer: signaling adaptor beyond autophagy[J]. *Cell*, 2016, 167(3): 606-609.
- [18] ZHANG Y, ZHANG Y, JIN X F, et al. The role of astragaloside IV against cerebral ischemia/reperfusion injury: suppression of apoptosis via promotion of P62-LC3-autophagy[J]. *Molecules*, 2019, 24(9): 1838.
- [19] FU C, ZHANG X, LU Y, et al. Geniposide inhibits NLRP3 inflammasome activation via autophagy in BV-2 microglial cells exposed to oxygen-glucose deprivation/reoxygenation[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 84: 106547.
- [20] WANG Y, REN Q, ZHANG X, et al. Neuroprotective mechanisms of calycosin against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 45(2): 537-546.
- [21] SUN J, NAN G X. The mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway as a discovery target in stroke[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2016, 59(1): 90-98.
- [22] LIU Y, SONG Y F, ZHU X T. MicroRNA-181a regulates apoptosis and autophagy process in Parkinson's disease by inhibiting p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)/c-Jun N-terminal kinases (JNK) signaling pathways[J]. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 2017, 23: 1597-1606.
- [23] CAO G, JIANG N, HU Y, et al. Ruscogenin attenuates cerebral ischemia-induced blood-brain barrier dysfunction by suppressing TXNIP/NLRP3 inflammasome activation and the MAPK pathway[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, 17(9): 1418.
- [24] YANG S L, WANG H G, YANG L, et al. Baicalein administered in the subacute phase ameliorates ischemia-reperfusion-induced brain injury by reducing neuroinflammation and neuronal damage[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 117: 109102.
- [25] WANG S, XUE H, XU Y, et al. Sevoflurane postconditioning inhibits autophagy through activation of the extracellular signal-regulated kinase cascade, alleviating hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats[J]. *Neurochemical Research*, 2019, 44(2): 347-356.
- [26] YU Y, WU X Q, PU J N, et al. Lycium barbarum polysaccharide protects against oxygen glucose deprivation/reoxygenation-induced apoptosis and autophagic cell death via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in primary cultured hippocampal neurons[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 495(1): 1187-1194.
- [27] ZHU Y C, TANG Q Q, WANG G P, et al. Tanshinone IIA protects hippocampal neuronal cells from reactive oxygen species through changes in autophagy and activation of phosphatidylinositol 3-Kinase, protein kinase B, and mechanistic target of rapamycin pathways[J]. *Current Neurovascular Research*, 2017, 14(2): 132-140.
- [28] PAQUETTE M, EI-HOUJEIRI L, PAVSE A. mTOR pathways in cancer and autophagy[J]. *Cancers*, 2018, 10(1): 18.
- [29] HEI C C, LIU P, YANG X, et al. Inhibition of mTOR signaling confers protection against cerebral ischemic injury in acute hyperglycemic rats[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2017, 13(7): 878.
- [30] HWANG J Y, GERTNER M, PONTARELLI F, et al. Global ischemia induces lysosomal-mediated degradation of mTOR and activation of autophagy in hippocampal neurons destined to die[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(2): 317-329.
- [31] WANG G, WANG T, ZHANG Y, et al. Schizandrin protects against OGD/R-induced neuronal injury by suppressing Autophagy: involvement of the AMPK/mTOR pathway[J]. *Molecules*, 2019, 24(19): 3624.
- [32] YANG H, LI L, ZHOU K, et al. Shengmai injection attenuates the cerebral ischemia/reperfusion induced autophagy via modulation of the AMPK, mTOR and JNK pathways[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2016, 54(10): 2288-2297.
- [33] ZHANG Y, MIAO J M. Ginkgolide K promotes astrocyte proliferation and migration after oxygen-glucose deprivation via inducing protective autophagy through the AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2018, 832: 96-103.
- [34] LUO Y, TANG H, LI H, et al. Recent advances in the development of neuroprotective agents and therapeutic targets in the treatment of cerebral ischemia[J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, 162: 132-146.
- [35] YAIDUJAR L, THAKUR S. Punicalagin attenuated cerebral ischemia-reperfusion insult via inhibition of proinflammatory cytokines, up-regulation of Bcl-2, down-regulation of Bax, and caspase-3[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, 402(1/2): 141-148.
- [36] ERFANI S, MOGHIMI A, ABOUTALEB N, et al. Nesfatin-1 improve spatial memory impairment following transient global cerebral ischemia/reperfusion via inhibiting microglial and caspase-3 activation[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2018, 65(3): 377-384.
- [37] ZHANG W, SONG J, YAN R, et al. Diterpene ginkgolides protect against cerebral ischemia/reperfusion damage in rats by activating Nrf2 and CREB through PI3K/Akt signaling[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2018, 39(8): 1259-1272.
- [38] SIDDIQUI W A, AHAD A, AHSAN H. The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update[J]. *Archives of Toxicology*, 2015, 89(3): 289-317.
- [39] ASHKENAZI A, FAIRBROTHER W J, LEVERSON J D, et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2017, 16(4): 273-284.
- [40] YAIDIKAR L, THAKUR S. Punicalagin attenuated cerebral ischemia-reperfusion insult via inhibition of proinflammatory

- cytokines, up-regulation of Bcl-2, down-regulation of Bax, and caspase-3[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2015, 402(1/2): 141-148.
- [41] HOLLVILLE E, ROMERO S E, DESHMUKH M. Apoptotic cell death regulation in neurons[J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286(17): 3276-3298.
- [42] SINGH R, LETAI A, SAROSIEK K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(3): 175-193.
- [43] LI Y W, SUO L, LIU Y, et al. Protective effects of ginsenoside Rg1 against oxygen-glucose-deprivation-induced apoptosis in neural stem cells[J]. *Journal of the Neurological Sciences*, 2017, 373: 107-112.
- [44] CHENG C Y, TANG N Y, KAO S T, et al. Ferulic acid administered at various time points protects against cerebral infarction by activating p38 MAPK/p90RSK/CREB/Bcl-2 anti-apoptotic signaling in the subacute phase of cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155748.
- [45] ZHANG Q, MA S, LIU B, et al. Chrysin induces cell apoptosis via activation of the p53/Bcl-2/caspase-9 pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2016, 12(1): 469-474.
- [46] LU Z Q, DENG Y J, LU J X. Effect of aloe polysaccharide on caspase-3 expression following cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2012, 6(2): 371-374.
- [47] 杨涛, 费振海, 钟兴明. Caspase家族与细胞凋亡的研究进展[J]. *浙江医学*, 2018, 40(18): 2083-2087, 2091.
- [48] YU Z H, CAI M, XIANG J, et al. PI3K/Akt pathway contributes to neuroprotective effect of Tongxinluo against focal cerebral ischemia and reperfusion injury in rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2016, 181: 8-19.
- [49] ZHU H, ZHANG Y, SHI Z, et al. The neuroprotection of liraglutide against ischaemia-induced apoptosis through the activation of the PI3K/AKT and MAPK pathways[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 26859.
- [50] 罗银利, 黄晓松, 谭李红, 等. 红景天苷对大鼠脑缺血-再灌注损伤后PI3-K、p-Akt及Caspase-3表达的影响[J]. *中医药导报*, 2015, 21(9): 26-28.
- [51] ZHANG M, YAN H, LI S, et al. Rosmarinic acid protects rat hippocampal neurons from cerebral ischemia/reperfusion injury via the Akt/JNK3/caspase-3 signaling pathway[J]. *Brain Research*, 2017, 1657: 9-15.
- [52] TIAN Z, TANG C, WANG Z. Neuroprotective effect of ginkgetin in experimental cerebral ischemia/reperfusion via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway activation[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(10): 18487-18495.
- [53] WANG C P, LI J L, ZHANG L Z, et al. Isoquercetin protects cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-reperfusion induced injury via suppression of TLR4-NF- κ B signal pathway[J]. *Neurochemistry International*, 2013, 63(8): 741-749.
- [54] 高宗桂. 川芎嗪干预大鼠缺血性中风作用及其机制的研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [55] YANG Y, WANG J, LI Y, et al. HO-1 signaling activation by pterostilbene treatment attenuates mitochondrial oxidative damage induced by cerebral ischemia reperfusion injury[J]. *Molecular Neurobiology*, 2016, 53(4): 2339-2353.
- [56] HE Y, JIANG K F, ZHAO X. Taraxasterol protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation-induced injury through activation of Nrf2 signalling pathway[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2020, 48(1): 252-258.
- [57] DAI Y, ZHANG H, ZHANG J, et al. Isoquercetin attenuates oxidative stress and neuronal apoptosis after ischemia/reperfusion injury via Nrf2-mediated inhibition of the NOX4/ROS/NF- κ B pathway[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2018, 284: 32-40.
- [58] JIE P, HONG Z, TIAN Y, et al. Activation of transient receptor potential vanilloid 4 induces apoptosis in hippocampus through downregulating PI3K/Akt and upregulating p38 MAPK signaling pathways[J]. *Cell Death & Disease*, 2015, 6(6): e1775.
- [59] GAO Y, SIGNORE A P, YIN W, et al. Neuroprotection against focal ischemic brain injury by inhibition of c-Jun N-terminal kinase and attenuation of the mitochondrial apoptosis-signaling pathway[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2005, 25(6): 694-712.
- [60] WANG X, JIANG C M, WAN H Y, et al. Neuroprotection against permanent focal cerebral ischemia by ginkgolides A and B is associated with obstruction of the mitochondrial apoptotic pathway via inhibition of c-Jun N-terminal kinase in rats[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2014, 92(2): 232-242.
- [61] YARZA R, VELA S, SOLAS M, et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling as a therapeutic target for Alzheimer's disease[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2016, 6: 321.
- [62] GIMIUS N, DAVIS R J. JNK promotes epithelial cell anoikis by transcriptional and post-translational regulation of BH3-only proteins[J]. *Cell Reports*, 2017, 21(7): 1910-1921.
- [63] LIU H L, LIU S W, TIAN X C, et al. Bexarotene attenuates focal cerebral ischemia-reperfusion injury via the suppression of JNK/Caspase-3 signaling pathway[J]. *Neurochemical Research*, 2019, 44(12): 2809-2820.
- [64] TIAN Z H, TANG C Y, WANG Z G. Neuroprotective effect of ginkgetin in experimental cerebral ischemia/reperfusion via apoptosis inhibition and PI3K/Akt/mTOR signaling pathway activation[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(10): 18487-18495.
- [65] ZHANG H Y, SONG Y M, FENG C. Improvement of cerebral ischemia/reperfusion injury by daucosterol palmitate-induced neuronal apoptosis inhibition via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. *Metabolic Brain Disease*, 2020, 35(6): 1035-1044.
- [66] YANG B, YAN P, GONG H, et al. TWEAK protects cardiomyocyte against apoptosis in a PI3K/AKT pathway dependent manner[J]. *American Journal of Translational Research*, 2016, 8(9): 3848.
- [67] SUN Y, XU Y, XU J, et al. Role of TM4SF1 in regulating breast

- cancer cell migration and apoptosis through PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2015, 8(8): 9081.
- [68] LU D, QIAN J, LI W, et al. β hydroxyisovaleryl shikonin induces human cervical cancer cell apoptosis via PI3K/AKT/mTOR signaling [J]. Oncology Letters, 2015, 10(6): 3434–3442.
- [69] CHEN J M, ZHANG X J, LIU X X, et al. Ginsenoside Rg1 promotes cerebral angiogenesis via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in ischemic mice[J]. European Journal of Pharmacology, 2019, 856: 172418.
- [70] WANG Y, ZHANG J, HAN M, et al. SMND-309 promotes neuron survival through the activation of the PI3K/Akt/CREB- signalling pathway[J]. Pharmaceutical Biology, 2016, 54(10): 1982–1990.
- [71] ZUO D, LIN L, LIU Y, et al. Baicalin attenuates ketamine-induced neurotoxicity in the developing rats: involvement of PI3K/Akt and CREB/BDNF/Bcl-2 pathways[J]. Neurotoxicity Research, 2016, 30(2): 159–172.
- [72] ZHANG Y, FU R, LIU Y, et al. Dephosphorylation and mitochondrial translocation of cofilin sensitizes human leukemia cells to cerulenin-induced apoptosis via the ROCK1/Akt/JNK signaling pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(15): 20655.
- [73] VAISHNAV M, MAC F M, DICHENS M. Disassembly of the JIP1/JNK molecular scaffold by caspase-3-mediated cleavage of JIP1 during apoptosis[J]. Experimental Cell Research, 2011, 317(7): 1028–1039.
- [74] YIN F, JIANG T, CADENAS E. Metabolic triad in brain aging: mitochondria, insulin/IGF-1 signalling and JNK signalling[J]. Biochemical Society Transactions, 2013, 41(1): 101–105.
- [75] CHANG C, ZHAO Y, SONG G, et al. Resveratrol protects hippocampal neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury via modulating JAK/ERK/STAT signaling pathway in rats[J]. Journal of Neuroimmunology, 2018, 315: 9–14.
- [76] 王凯华, 林进光, 王恰如. JAK-STAT信号转导通路与脑卒中关系研究进展[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2013, 16(9): 91–93.
- [77] 彭长铁, 邓礼明, 熊国祚, 等. JAK2-STAT3信号通路在缺血性疾病的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(1): 159–164.
- [78] KACIMI R, RONA G G, MIDORI A Y. Endotoxin-activated microglia injure brain derived endothelial cells via NF- κ B, JAK-STAT and JNK stress kinase pathways[J]. Journal of Inflammation, 2011, 8(1): 7.
- [79] 陈萌. 银杏内酯K通过激活JAK2/STAT3通路发挥脑缺血再灌注后促血管再生作用[D]. 南京: 南京医科大学, 2017.
- [80] HU G, DU X, LI Y, et al. Inhibition of cerebral ischemia/reperfusion injury-induced apoptosis: nicotiflorin and JAK2/STAT3 pathway[J]. Neural Regeneration Research, 2017, 12(1): 96.
- [81] LUO L N, XIE D Q, ZHANG X G, et al. Osthole decreases renal ischemia-reperfusion injury by suppressing JAK2/STAT3 signaling activation[J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2016, 12(4): 2009–2014.
- [82] JIANG X M, HU J H, WNAG L L, et al. Ulinastatin alleviates neurological deficiencies evoked by transient cerebral ischemia via improving autophagy, Nrf-2-ARE and apoptosis signals in hippocampus[J]. Physiological Research, 2018, 67(4): 637–646.
- [83] HUANG X, DING J, LI Y, et al. Exosomes derived from PEDF modified adipose-derived mesenchymal stem cells ameliorate cerebral ischemia-reperfusion injury by regulation of autophagy and apoptosis[J]. Experimental Cell Research, 2018, 371(1): 269–277.
- [84] LIU W J, YE L, HUANG W F. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation[J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2016, 21(1): 29.

(编辑: 沈崇坤, 梁进权)