

自噬在癫痫发生中的作用及 microRNA 调控机制初探*

甘 靖,鲁瑞丰,屈 艺 综述,母得志 审核

(四川大学华西第二医院儿科/出生缺陷与相关妇儿疾病教育部重点实验室,成都 610041)

[关键词] 自噬;癫痫;微小核糖核酸;发病机制

[中图分类号] R725

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)15-2134-03

细胞自噬,又称“自我消化”,是泛素-蛋白酶体系之外,胞质内清除长寿蛋白和衰老或受损细胞器的主要代谢通路^[1]。正常生理情况下,自噬介导清除异常折叠的泛素化的蛋白或细胞器,对于维持细胞稳态、健康起着重要作用;但在病理情况下,异常的自噬则会导致细胞或组织的异常,甚至导致疾病的发生,如癌症、心血管疾病、自身免疫性疾病、神经退行性疾病、癫痫等^[2]。癫痫是一种常见的神经系统功能紊乱,具有较高的发病率和病死率,严重影响患者的身心健康和生活质量。但其发病机制尚未完全阐明,对癫痫发病过程、发病机制的研究及探讨能更好地为临床治疗癫痫提供实验基础。近年国内外的癫痫研究比较集中于新的生物标志物的寻获,如微小核糖核酸(microRNA, miRNA)、长链非编码核糖核酸(LncRNA)、蛋白芯片等,这对于癫痫的发病机制、治疗及预后有良好的提示作用。自噬作为一种新的细胞程序性死亡方式,在癫痫的发生、发展过程中的重要作用也逐渐地被认识到。

1 自噬与癫痫的定义

1.1 自噬 根据包裹物和运输方式不同,细胞自噬被分为 3 种类型,即微自噬、分子伴侣介导的自噬和巨自噬。其中以巨自噬最为多见,后面统称细胞自噬。细胞自噬对饥饿、炎症、氧化等应激信号敏感,对于维持内环境平衡是不可或缺的。自噬分为启动、成熟(与溶酶体融合)及自噬体降解等阶段。(1)启动阶段:在应激状态下,有双层膜的杯状分隔膜开始在降解物的周围形成,该阶段依赖 III 型磷脂酰肌醇-3 激酶和空泡蛋白的活性,其产物磷脂酰肌醇-3 磷酸盐在自噬的启动阶段起着重要作用;(2)延伸阶段:分隔膜逐渐延伸,将要被降解的胞质成分完全包裹隔离形成自噬体,该阶段依赖 2 个泛素样反应,二者分别形成 Atg12-Atg5-Atg16L1 复合物及微管相关蛋白 1 轻链 3 相关产物;(3)成熟阶段:自噬体沿微管逐渐向富含溶酶体的核周区移动,在多种蛋白作用下通过细胞骨架微管网络系统将其包裹的胞质成分运输到溶酶体与溶酶体融合形成自噬溶酶体;(4)降解阶段:自噬体被溶酶体中的水解酶溶解,降解产物在细胞内再循环利用。自噬相关基因(ATGs)及其编码的自噬相关蛋白(Atg1~Atg35)在自噬过程中发挥重要作用。

1.2 癫痫 全球约有 5 000 万癫痫患者,我国约占 1/5,且每年以 40 万例的速度增长。癫痫是小儿神经系统最常见的一种疾病,其中约 3/4 的癫痫患者起病于儿童时期。长期反复的癫痫发作可导致患者认知功能损害、神经精神异常、社会适应能力降低等,严重影响患者的生活、工作和学习。若在儿童或青少年时期就开始出现癫痫发作,患者的智力及身体发育更容易

受到影响,给患者造成巨大的社会经济负担。抗癫痫药物仍是目前的一线治疗,但并未针对潜在的病理生理学问题进行诊治,绝大多数的癫痫发生机制并不清楚,目前的认识程度还仅停留在行为学、细胞或分子水平。虽然癫痫的具体发生机制不甚明确,但涉及的分子机制包括基因转录、翻译、翻译后修饰等遗传信息链中的多个环节,且与神经元死亡、凋亡,海马区神经再生,海马区新生颗粒细胞异位迁徙,新生颗粒细胞树突形态发育异常,轴突损伤,突触重塑,苔藓纤维出芽,神经递质及其受体功能障碍,离子通道基因改变,胶质细胞增生,炎症等有关^[3]。目前国内外关于自噬在癫痫发生中的作用相关研究逐渐增多,但国内还尚未见有相关综述报道;同时,微小核糖核酸对自噬的调控及癫痫的发生也起到十分重要的作用。本文将重点介绍自噬在癫痫发生中的作用及探索 microRNA 对自噬的调控机制。

2 自噬在癫痫发生中的作用

近年来,越来越多的文献研究发现自噬与癫痫的发生密不可分,即自噬可以导致癫痫的发生,如结节性硬化和拉福拉病(LD),其具体的致病机制研究也逐渐被揭示,包括哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)通路、糖元异常聚积。最新的研究还发现 Atg7 的失活而使自噬缺陷足以造成癫痫的发生^[4],尽管 Atg7 对于轴突退行性变的作用存在争议^[5],但至少表明自噬能够调控轴突稳态;自噬还与突触的生长及塑形有关,且自噬还可调控突触前结构与神经传导^[6]。因此,失控的自噬能促进异常轴突塑型、突触重塑及癫痫网络形成。

2.1 mTOR 通路 mTOR 是机体的一个关键蛋白激酶,它参与调节多种重要的细胞和生理功能,如细胞生长、代谢、增殖及蛋白质翻译等。mTOR 是由谷氨酸能神经元传递的,并受细胞的活化状态控制。mTOR 又可以调节多种离子通道、神经突触塑型、神经元的结构和神经递质受体的表达。病理情况下,mTOR 通路的异常已被证实可以导致多种癫痫的发生,包括结节性硬化、癫痫持续状态和症状性癫痫。在遗传性癫痫和获得性癫痫中,mTOR 与自噬的关系得到了进一步证实。mTOR 可以负向调控自噬,并且通过 mTOR 抑制剂,即雷帕霉素可诱导自噬的发生,mTOR 的下游调控机制已经逐渐被揭示清楚。Mcmahon 等^[4]研究发现在小鼠中通过抑制上游的负向调控蛋白[磷酸酶张力蛋白和结节性硬化症(TSC)蛋白]去除对 mTOR 通路的抑制可以导致癫痫的发生。虽然其具体导致癫痫发生的机制仍不甚明了,但考虑可能与神经元兴奋性毒性及轴突稳态改变有关。另有研究发现敲除神经胶质细胞中 TSC1 基因后,星形胶质细胞出现了聚集现象和海马中锥体细

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81330016,81172174,81270724);教育部科研基金资助项目(IRT0935);国家临床重点专科(儿科新生儿专业)建议项目(1311200003303)。 作者简介:甘靖(1982—),主治医师,硕士,主要从事小儿神经系统疾病研究。

胞出现了散在分布现象;磷酸酶张力蛋白基因敲除小鼠的神经脊密度出现了增加和颗粒细胞肥大,可能通过影响细胞的生长来诱发癫痫。雷帕霉素可以通过诱导自噬发生来延迟或抑制癫痫的发展并降低自发性癫痫的发作频率,具体机制可能与抑制苔藓纤维的出芽和增强神经保护作用、维持血脑屏障的完整性有关。除此之外,自噬同样在调控线粒体稳态及线粒体自噬方面也起着重要作用^[7],这同样也是癫痫发生的重要机制之一。Goto 等^[8]研究发现通过抑制 mTOR 可以促进线粒体自噬,进而诱发癫痫的发生。这些文献提示通过 mTOR 通路的调控可以引起自噬的异常进而导致癫痫的发生。

2.2 糖元异常聚积 癫痫通常不会被定义为神经变性疾病,但有一个例外:LD。这是一种较为罕见的、致死性的常染色体隐性遗传的进行性肌阵挛性癫痫。LD 的病因是由于病蛋白(Laforin)或 malin 的基因突变造成大脑皮质丘脑、黑质、苍白球及齿状核等部位的神经细胞胞质内嗜碱性包涵体(Lafora 小体)异常聚积而导致^[9]。Laforin 小体实际上是一种不可溶解的葡萄糖小体异常聚积所形成,受磷酸腺苷(AMP)激活的蛋白激酶通路调控,并且其广泛地沉积于大脑组织中造成神经元凋亡及频繁癫痫发生,在 LD 发病机制中起着重要作用。Laforin 蛋白是一种双重特异性蛋白激酶,它通过 TSC2 抑制 mTOR 的表达从而促进自噬的发生。Laforin 蛋白的缺失会引起 mTOR 被异常激活、自噬被抑制,最终会导致细胞质内糖元异常聚积以致癫痫发生。Singh 等^[10]还发现可以通过抑制血清/糖皮质激素诱导激酶 1 来抑制 mTOR 活性,减少糖元异常聚积从而可能达到治疗 LD 的目的。Malin 蛋白是一种 E3 泛素连接酶,与 Laforin 蛋白一样,对于自噬的调控起着重要作用。Malin 蛋白缺陷小鼠不能合成自噬小体,故存在自噬缺陷,而且与 LD 患者有相同的临床表型。Laforin 与 Malin 基因突变均会引起细胞内糖元清除障碍,二者之间存在着微妙的关系。但与 Laforin 蛋白不同的是,Malin 蛋白缺陷的致病机理不依赖于 mTOR 通路^[11]。Lafora 小体具体的致病机制尚不明确,但研究发现与树突异常及 Lafora 小体周围的胶质细胞增生有关^[12]。

2.3 癫痫发生后对自噬的影响 由上述的介绍不难看出自噬的缺陷足以引起癫痫的发生;另一方面,癫痫的发生也会引起自噬的异常表达。癫痫的发生随之会引起氧化应激、三磷酸苷耗竭、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)升高、离子通道异常,这些都会导致神经元自噬的发生。鉴于自噬与突触传导调控、突触重塑、兴奋性毒性、神经元死亡、神经退行性变、星形胶质细胞凋亡和轴突、突触、线粒体功能有关,异常的自噬可促进癫痫的发生,从而可能形成一种恶性循环,促进癫痫网络的形成;相反,适度的自噬则可以预防癫痫的发生。Benz 等^[13]研究发现,在幼鼠癫痫持续状态模型中,自噬微管相关蛋白轻链 3(LC3),磷酸化雷帕霉素靶蛋白/雷帕霉素靶蛋白比值,重组人 B 淋巴瘤-2 相关永生基因 3 和热休克蛋白 70 表达明显升高。Ni 等^[14]发现新生鼠癫痫模型中自噬指标 LC3-II/LC3-I 比值、Beclin-1 及 cathepsin-B 表达升高,其中 cathepsin-B 与神经兴奋性毒性有关,利用 cathepsin-B 抑制剂可以通过抑制自噬通路起到减轻癫痫所致神经行为缺陷的作用。另外,抗氧化剂如维生素 E 和维生素 C 能抑制氧自由基与自噬,起到神经保护作用,为癫痫的治疗提供了一种全新的方法^[15]。TNF- α 作为一种致病因子可以激活星形细胞,但同时 TNF- α 在癫痫中可以通过介导 p65/RelA-Ser529 引起自噬性星形胶质细胞凋亡^[16]。简言之,某种程度上,自噬就像是一把双刃剑,可以促

进或抑制癫痫的发生。但自噬与癫痫的关系尚不十分清楚,自噬缺陷引起癫痫发生的机制也仍需进一步的探讨,这可为将来癫痫发生机制的研究指明新的方向。

3 miRNA 对自噬的调控机制

自噬的调控机制非常复杂,参与的信号通路众多。miRNA 是一种仅有约 20~25 个核苷酸的序列的内源性非编码蛋白 RNA 片段,通常在转录后水平调控基因表达。已有大量研究显示 miRNA 在癫痫的发生中起着重要的作用^[3],而且近年来 miRNA 调控自噬表达的机制研究也逐渐丰富起来,并且出现一个新的名词“autophagamiRNAs”。

研究发现,在自噬的各个阶段均有相关的 miRNA 对其进行调。例如,在启动阶段,miRNA-885-3p、miRNA-106a、miRNA-290-295、miRNA-20a、miRNA-106b、miRNA-30a、miRNA-519a、miRNA-376a、miRNA-376、miRNA-216b、miRNA-130a、miRNA-17-5p、miRNA-30b、miRNA-30d、miRNA-30d、miRNA-101、miRNA-155、miRNA-99a、miRNA-519、miRNA-18a、miRNA-630、miRNA-374a、miRNA-195、miRNA-34a 等可以分别通过调控非等位 51-like 激酶 2、非等位 51-like 激酶 1、Beclin1 基因、Rab5A 基因、BCL2/腺病毒 E1B 蛋白相互作用蛋白 3、雷帕霉素靶蛋白的复合体 1、hVPS34、紫外辐射抗性相关基因、自噬相关基因(Atg)4、高迁移率族蛋白 1 来影响自噬的表达^[17-19]。同样的,在延长和成熟阶段 miRNA-376a、miRNA-376b、miRNA-101^[20-21]、miRNA-101、miRNA-199a-5p、miRNA-375、miRNA-155、miRNA-290-295、miRNA-17、miRNA-204、miRNA-183、miRNA-30a、miRNA-30d、miRNA-30b、miRNA-181a、miRNA-374a、miRNA-519a、miRNA-142-3p、miRNA-106b、miRNA-23b、miRNA-30c、miRNA-130a、miRNA-93、miRNA-224、miRNA-885-3p、miRNA-630、miRNA-130a、miRNA-34a、miRNA-130a、miRNA-502、miRNA-502 等分别通过影响 LC3、Atg4、Rab5A、Atg7、Atg12-Atg5-Atg16L1 复合物、Atg2B、DICER1、Atg9A、Atg9-Atg2-Atg18 复合物、Rab1B、p53 来调控自噬表达。在降解阶段的 miRNA 调控机制研究相对较少,miRNA-30d^[22] 和 miR-17/20/93/106 家族可以通过 Atg2 和 SQSTM1 来影响自噬溶酶体的降解与回收利用。另有文献报道通过在线软件预测发现 miRNA-130、miRNA-98、miRNA-124、miRNA-204、miRNA-142 可能参与自噬体降解阶段的调控^[23]。除此之外,还有很多 miRNA 通过影响免疫相关鸟苷三磷酸酶基因^[24]、人微管去稳蛋白、表皮生长因子受体、p21、p53、RabB1、缺氧诱导因子-1 α 、p27kip1、Rheb、植物血凝素样氧化低密度脂蛋白受体、FoxO₃ 转录因子、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B、溶酶体相关膜蛋白 3、Rab27A、HATs 和组蛋白去乙酰化酶来调控自噬。另一方面,自噬可以选择性地降解 DICER1-EIF2C 复合物来保持 miRNA 的稳态^[25]。

自噬性 miRNA 的研究多数集中于肿瘤学,但对于癫痫发生过程中调控自噬的 miRNA 研究尚属空白。自噬与 miRNA 均与突触重塑、神经元塑形、增殖、凋亡、炎症等有关^[3],且这些病理生理因素均可导致癫痫的发生,因此推测在癫痫的发生中可能存在某种 miRNA-自噬通路发挥着作用。如 miRNA-155 可以通过 mTOR 诱导自噬发生^[26],并且在幼鼠癫痫持续状态模型中这种作用更为明显,强烈提示在癫痫发生中的存在着这种假说通路。然而,也有部分文献研究的结果与这种假说相悖,研究发现 miRNA-34a 负性地调控自噬表达,但 miRNA-34a 与自噬均为促进癫痫的发生,在癫痫持续状态模型或患者中的表达却与自噬一样是升高的^[27]。但不论怎样,这些结果至少证明在癫痫的发生中,miRNA 与自噬之间存在着十分复

杂的联系。

4 总结与展望

作为当今科学界十大科技突破前两名,自噬与 miRNA 在生命科学领域已得到了广泛而深入的研究,特别是在肿瘤学领域,但在癫痫方面的研究才刚刚起步。通过本文可以了解到自噬、miRNA 与癫痫的发生有着密切的联系,但具体的机制并不明确。虽然 miRNA-自噬通路在其他领域的研究也逐渐成熟,但在癫痫领域尚无相关研究报道。因此,探索 miRNA 调控癫痫发生过程中自噬的作用及机制,是目前亟待解决的问题,miRNA-自噬通路很有可能为癫痫的预防和治疗打开一扇全新的大门。

参考文献

[1] Chen Y, Yu L. Autophagic lysosome reformation[J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(2):142-146.

[2] Frake RR, Menzies FM, Rubinsztein DC. Autophagy and neurodegeneration[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1):65-74.

[3] 甘靖,蔡浅云,母得志. MicroRNA 在癫痫中的研究进展[J]. *中国当代儿科杂志*, 2015, 17(2):201-206.

[4] McMahon J, Huang X, Yang J, et al. Impaired autophagy in neurons after disinhibition of mammalian target of rapamycin and its contribution to epileptogenesis[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(45):15704-15714.

[5] Coupé B, Ishii Y, Dietrich MO, et al. Loss of autophagy in pro-opiomelanocortin neurons perturbs axon growth and causes metabolic dysregulation[J]. *Cell Metab*, 2012, 15(2):247-255.

[6] Hernandez D, Torres CA, Setlik W, et al. Regulation of presynaptic neurotransmission by macroautophagy[J]. *Neuron*, 2012, 74(2):277-284.

[7] Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2012, 8(2):108-117.

[8] Goto J, Talos DM, Klein P, et al. Regulable neural progenitor-specific Tsc1 loss yields giant cells with organellar dysfunction in a model of tuberous sclerosis complex[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(45):E1070-1079.

[9] Duran J, Gruart A, García-Rocha M, et al. Glycogen accumulation underlies neurodegeneration and autophagy impairment in Lafora disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(12):3147-3156.

[10] Singh PK, Singh S, Ganesh S. Activation of serum/glucocorticoid-induced kinase 1 (SGK1) underlies increased glycogen levels, mTOR activation, and autophagy defects in Lafora disease[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(24):3776-3786.

[11] Criado O, Aguado C, Gayarre J, et al. Lafora bodies and neurological defects in malin-deficient mice correlate with impaired autophagy[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(7):1521-1533.

[12] Puri R, Suzuki T, Yamakawa K, et al. Dysfunctions in endosomal-lysosomal and autophagy pathways underlie neuropathology in a mouse model for Lafora disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(1):175-184.

[13] Benz AP, Niquet J, Wasterlain CG, et al. Status epilepticus

in the immature rodent brain alters the dynamics of autophagy[J]. *Curr Neurovasc Res*, 2014, 11(2):125-135.

[14] Ni H, Yan JZ, Zhang LL, et al. Long-term effects of recurrent neonatal seizures on neurobehavioral function and related gene expression and its intervention by inhibitor of cathepsin B[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(1):31-39.

[15] Dong Y, Wang S, Zhang T, et al. Ascorbic acid ameliorates seizures and brain damage in rats through inhibiting autophagy[J]. *Brain Res*, 2013, 1535:115-123.

[16] Ashhab MU, Omran A, Kong H, et al. Expressions of tumor necrosis factor alpha and MicroRNA-155 in immature rat model of status epilepticus and children with mesial temporal lobe epilepsy[J]. *J Mol Neurosci*, 2013, 51(3):950-958.

[17] Xu X, Fu Y, Tong J, et al. MicroRNA-216b/beclin 1 axis regulates autophagy and apoptosis in human tenon's capsule fibroblasts upon hydroxycamptothecin exposure[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 123:43-55.

[18] Chatterjee A, Chattopadhyay D, Chakrabarti G. miR-17-5p downregulation contributes to paclitaxel resistance of lung cancer cells through altering beclin1 expression[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4):e95716.

[19] Wan G, Xie W, Liu Z, et al. Hypoxia-induced MIR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway[J]. *Autophagy*, 2014, 10(1):70-79.

[20] Zhai Z, Wu F, Dong F, et al. Human autophagy gene ATG16L1 is post-transcriptionally regulated by MIR142-3p[J]. *Autophagy*, 2014, 10(3):468-479.

[21] Lu C, Chen J, Xu HG, et al. MIR106B and MIR93 prevent removal of bacteria from epithelial cells by disrupting ATG16L1-mediated autophagy[J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(1):188-199.

[22] Yang X, Zhong X, Tanyi JL, et al. mir-30d regulates multiple genes in the autophagy pathway and impairs autophagy process in human cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(3):617-622.

[23] Jegga AG, Schneider L, Ouyang X, et al. Systems biology of the autophagy-lysosomal pathway[J]. *Autophagy*, 2011, 7(5):477-489.

[24] Pennati M, Lopercolo A, Profumo V, et al. miR-205 impairs the autophagic flux and enhances cisplatin cytotoxicity in castration-resistant prostate cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 87(4):579-597.

[25] Gibbins D, Mostowy S, Jay F, et al. Selective autophagy degrades DICER and AGO2 and regulates miRNA activity[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(12):1314-1321.

[26] Wan G, Xie W, Liu Z, et al. Hypoxia-induced MIR155 is a potent autophagy inducer by targeting multiple players in the MTOR pathway[J]. *Autophagy*, 2014, 10(1):70-79.

[27] Hu K, Zhang C, Long L, et al. Expression profile of MicroRNAs in rat hippocampus following lithium-pilocarpine-induced status epilepticus[J]. *Neurosci Lett*, 2011, 488(3):252-257.