

· 综述 ·

B 淋巴细胞瘤-2/腺病毒 E1B 19kDa 相互作用蛋白 3 介导的线粒体自噬机制及其调控肌源性挛缩发生的研究进展

王锋¹ 张全兵¹ 周云¹ 王华²

¹安徽医科大学第二附属医院康复医学科,合肥 230601; ²安徽医科大学公共卫生学院毒理医学系,合肥 230032

通信作者:周云,Email:zhouyue@163.com

【摘要】 线粒体自噬是一种自噬的形式,是目前已知的选择性清除线粒体的途径。近年来,B 淋巴细胞瘤-2/腺病毒 E1B 19kDa 相互作用蛋白 3 (BNIP3) 因其在线粒体自噬中的潜在作用而备受关注。尽管对 BNIP3 在线粒体自噬中的调控机制认识不断增加,但在肌源性挛缩的发生过程中,BNIP3 介导的线粒体自噬的作用及其机制仍知之甚少。在肌源性挛缩发生过程中,典型的病理特征表现为骨骼肌萎缩和纤维化。因此,本文对 BNIP3 及其在线粒体自噬中的调控机制进行了系统回顾,并对 BNIP3 介导的线粒体自噬影响骨骼肌萎缩和纤维化的研究进行了综述,以期对肌源性挛缩的治疗提供新的思路。

【关键词】 线粒体自噬; B 淋巴细胞瘤-2/腺病毒 E1B 19kDa 相互作用蛋白 3; 肌源性挛缩; 骨骼肌萎缩; 骨骼肌纤维化

基金项目:安徽省重点研究和开发计划项目(人口健康领域)(201904a07020067);安徽医科大学 2021 年临床医学学科建设项目(2021 lcxk 031);安徽医科大学 2022 年临床医学学科建设项目(2022 lcxkEFY010);安徽省 2020 年高等学校省级质量工程项目(2020jyxm0903)

Funding: Anhui Key Research and Development Program-Population Health (201904a07020067); Clinical Medicine Discipline Construction Project of Anhui Medical University in 2021 (2021 lcxk 031); Clinical Medicine Discipline Construction Project of Anhui Medical University in 2022 (2022 lcxkEFY010); Provincial Quality Project of Higher Education in Anhui Province (2020jyxm0903)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2022.10.017

自噬是一种应激性适应性反应,是一个高度调控的过程,通过溶酶体系统降解细胞中大量的细胞质大分子和细胞器维持细胞稳态^[1]。线粒体自噬是一种自噬的形式,是目前已知选择性清除线粒体的途径。线粒体自噬是指在活性氧(reactive oxygen species, ROS)、营养缺乏、细胞衰老等应激作用下,细胞内的线粒体出现去极化损伤,损伤的线粒体被特异性包裹进入自噬体中并与溶酶体融合,完成受损线粒体的降解,从而维持细胞内环境稳定^[2]。近年来,B 淋巴细胞瘤-2/腺病毒 E1B 19kDa 相互作用蛋白 3 (B-cell lymphoma-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3, BNIP3) 因其在线粒体自噬中的潜在作用而备受关注。关节挛缩是临床上十分常见的病症,严重影响患者的日常生活活动,对社会的医疗资源分配带来诸多不利影响。根据限制关节活动的解剖学因素可以分为肌源性因素和关节源性因素,在肌源性挛缩发生过程中,典型的病理特征表现为骨骼肌萎缩和纤维化^[3]。尽管对 BNIP3 在线粒体自噬中调控机制的认识不断增加,但在肌源性挛缩的发生过程中,BNIP3 介导的线粒体自噬的作用及其机制仍知之甚少。因此,本文对 BNIP3 在线粒体自噬中的调控机制进行了系统回顾,并对 BNIP3 介导的线粒体自噬影响骨骼肌萎缩和纤维化的研究进行了综述,以期对肌源性挛缩的治疗提供新的思路。

BNIP3 在线粒体自噬中的调控机制

BNIP3 由人类 10q26.3 染色体上的 BNIP3 基因编码,属于

细胞死亡调节因子 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 家族,是一个非典型的只包含 Bcl-2 家族蛋白的 BH3 结构域^[4]。BNIP3 在多种细胞中广泛表达,并通过参与多种细胞信号通路参与多种细胞功能,包括细胞凋亡、线粒体功能障碍以及线粒体自噬等。BNIP3 作为响应特异性线粒体功能障碍的转录靶点,主要通过和微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 及其相关分子受体的相互作用来调控线粒体自噬^[5]。众所周知,线粒体自噬的异常发展是许多疾病的关键因素,对线粒体自噬异常的多项研究进一步证实了 BNIP3 在线粒体功能障碍中的活性。此外,越来越多的证据支持 BNIP3 与线粒体自噬的过程有关。当自噬刺激后,BNIP3 通过触发线粒体去极化,并将线粒体隔离到自噬体中,从而引起线粒体的自噬^[6]。

一、BNIP3 的表达调控因素

相关研究表明,多种分子蛋白可以在转录或翻译水平调控 BNIP3 的表达,已得到证实的分子蛋白包括缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 alpha, HIF-1 α)、叉头盒转录因子 3a (forkhead box transcription factor 3a, FOXO3a) 细胞周期相关转录因子-1 (E2F transcription factor-1, E2F-1) 以及核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 等可以在转录水平对其进行调控(图 1a)。在翻译水平上,BNIP3 通过 N-端半胱氨酸残端和 C-端跨膜区协调合作,形成二聚体及激活 BNIP3;BNIP3 还包含数个潜在的磷酸化位点,其功能受磷酸化调节。

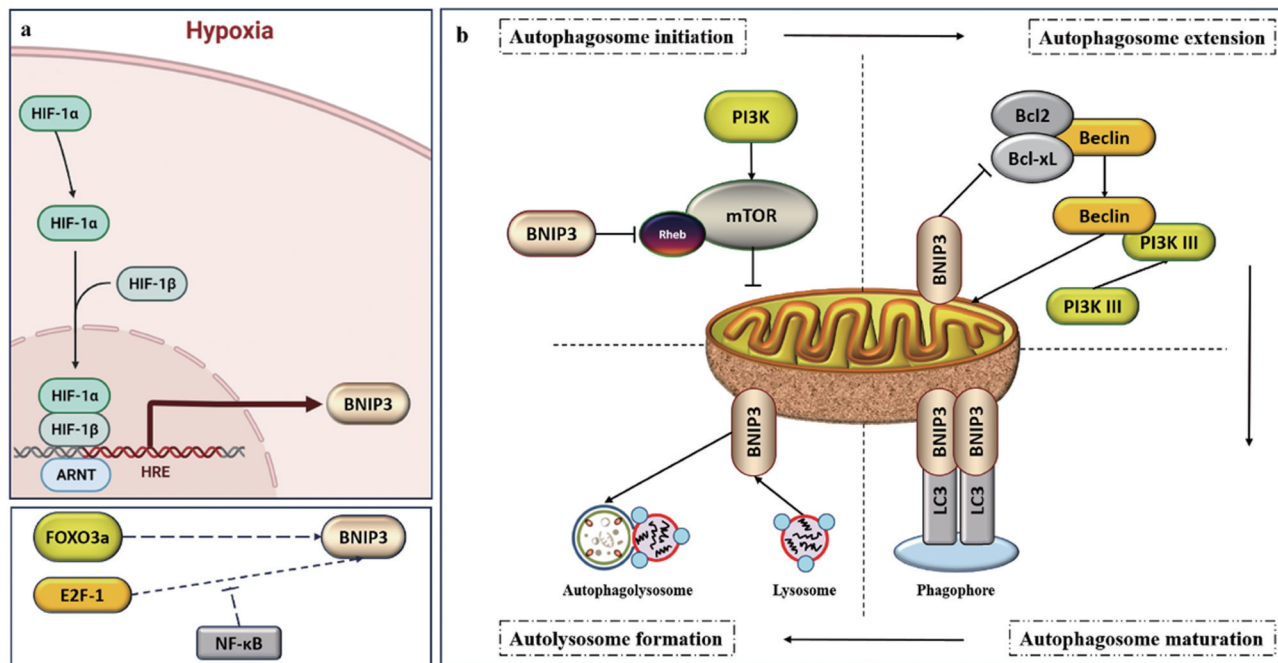


图1 BNIP3 介导的线粒体自噬机制

(一) HIF-1α 调控 BNIP3 表达

HIF-1α 的启动子存在两个缺氧反应元件 (hypoxia response element, HRE), 作为响应细胞缺氧的主要转录因子, 响应缺氧后激活的 HIF-1α 易位至细胞核并启动靶基因转录^[7]。长期暴露于缺氧环境后, BNIP3 作为 HIF-1α 下游的靶基因, 稳定表达的 HIF-1α 可以直接与 HRE 结合, 促进 BNIP3 的表达, 进而诱导线粒体自噬^[8]。Zhang 等^[9] 在一项 HIF-1α/BNIP3 信号通路诱导的线粒体自噬在心肌缺血期间的保护作用的研究中发现, 在缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤的 SD 大鼠和氧葡萄糖剥夺再恢复 (oxygen-glucose deprivation/recovery, OGD/R) 损伤的心源性 H9C2 细胞中, HIF-1α 的表达水平上调, 并激活了下游的 BNIP3, 随后触发了线粒体自噬; 而下调 HIF-1α 或 BNIP3 的表达会降低 OGD/R 损伤下 H9C2 细胞的线粒体自噬, 也进一步验证了 HIF-1α 对 BNIP3 表达调控作用。Jin 等^[10] 在一项脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 介导的线粒体自噬减轻高糖诱导的脑微血管内皮细胞损伤的研究中发现, BDNF 通过 HIF-1α/BNIP3 信号通路激活线粒体自噬, LC3-II、p62 和 TOMM20 的蛋白印迹分析, 以及对自噬流的 mRFP-GFP-LC3 腺病毒的检测均可表明, 自噬流增强。Lu 等^[11] 在缺氧预处理 (hypoxic preconditioning, HPC) 对神经母细胞瘤细胞中 OGD/R 诱导的细胞凋亡和自噬的影响的研究中表明, HPC 增强了神经母细胞瘤细胞的 HIF-1α 表达, 进而上调其下游分子 BNIP3、膜突蛋白样 Bcl-2 作用蛋白-1 (moesin-like Bcl2-interacting protein-1, Beclin-1) 的表达和 LC3-II/LC3-I 比率, 并降低了 p62 的表达水平, 从而增强自噬并发挥神经的保护作用。Madhu 等^[12] 的研究发现, 缺氧和 HIF-1α 通过受体介导的线粒体自噬诱导剂 BNIP3 的线粒体易位触发髓核细胞中的线粒体自噬, HIF-1α 的稳定沉默可消除 BNIP3 向线粒体的易位, 该结果表明, HIF-1α 与 BNIP3 存在直接关系; 然而, 沉默 HIF-1α 的 NP 细胞体外研究和特异性 HIF-1α 敲除小鼠体内研究并

未显示髓核细胞中线粒体自噬通量的减少, 而是 Nip 样蛋白 X (Nip-like protein X, NIX) 和磷酸酯酶与张力蛋白同源物诱导激酶 1 (phosphatase and tensin homolog induced putative kinase 1, PINK1)-Parkin 相关通路的激活以补偿 BNIP3 介导的线粒体自噬。Fu 等^[13] 应用 HIF-1α 敲除显著减弱了 I/R 诱导的人肾小管细胞系 HK2 细胞线粒体自噬, 加剧了缺氧/复氧诱导的细胞凋亡, 并增加了 ROS 的产生。该研究还发现, I/R 诱导 HK2 细胞 BNIP3 的表达显著增加, 而 BNIP3 过表达逆转了 HIF-1α 敲除对 I/R 诱导的线粒体自噬的抑制作用, 并阻止了 HIF-1α 敲除对 I/R 诱导的细胞凋亡和 ROS 产生的增强作用。同时, 该研究还建立了特异性 HIF-1α 敲除小鼠, 结果发现, HIF-1α 敲除显著抑制 I/R 诱导的肾小管细胞线粒体自噬, 并加重 I/R 诱导的肾小管凋亡和肾脏损伤; 相比之下, 转染 BNIP3 过表达质粒后, BNIP3 的过表达显著逆转了减少的肾小管细胞线粒体自噬, 并防止了肾小管 HIF-1α 敲除小鼠 I/R 损伤增强的肾损伤。因此, HIF-1α/BNIP3 介导的肾小管细胞线粒体自噬通过抑制急性肾损伤中的细胞凋亡和 ROS 产生发挥保护作用。以上研究均表明, 在缺氧条件下, BNIP3 介导的线粒体自噬依赖 HIF-1α 的调控, 通过调节组织/细胞氧浓度以及对 HIF-1α 的靶向干预可能是一种有吸引力的治疗策略, 可以预防或逆转 BNIP3 介导的线粒体自噬不足或过度激活。

(二) FOXO3a 调控 BNIP3 的表达

叉头盒转录因子 (forkhead transcription factor, FOXO) 蛋白家族是动物细胞内的一类转录因子, FOXO3a 是 FOXO 转录家族的一员, 具有调节细胞增殖、分化、侵袭迁移和细胞死亡等多种细胞功能。Bozi 等^[14] 在一项内质网应激通过上调 BNIP3 损害心肌细胞收缩力的研究中发现, 在大鼠心肌梗死模型中心肌细胞发生内质网应激时, c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 以 FOXO3a 依赖性方式上调 BNIP3。此外, 相关研究表明, 在线粒体自噬过程中 BNIP3 的表达同样受到 FOXO3a

的调控。He 等^[15]在一项 FOXO3a 通过促进 BNIP3 介导的线粒体自噬保护神经胶质瘤细胞免受替莫唑胺诱导的 DNA 双链断裂研究中发现,替莫唑胺诱导 DNA 双链断裂和细胞凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF) 的核易位,伴随着 FOXO3a 在细胞核中的积累;除此以外,替莫唑胺还上调 BNIP3 表达,并可促使 BNIP3 易位到线粒体以加强 BNIP3 与 LC3B-II 的相互作用来触发线粒体自噬;而 FOXO3a 敲低可抑制替莫唑胺诱导的 BNIP3 上调和线粒体自噬激活,加剧 DNA 双链断裂、线粒体损伤以及神经胶质瘤细胞死亡。上述研究提示,FOXO 家族,尤其是 FOXO3a,可作为信号途径参与多种细胞的生物过程,包括凋亡、自噬以及线粒体自噬,但目前 FOXO 家族参与的自噬调控过程报道较少,尚未完全明确。

(三) E2F-1 和 NF- κ B 调控 BNIP3 的表达

细胞因子 E2F-1 是一个转录因子家族的原型成员,该家族的特征是可激活 G1 exit 和 DNA 合成所需的基因,E2F-1 与其他 E2F 蛋白的独特区别在于其诱导凋亡的倾向^[16]。常氧下 BNIP3 启动子是被抑制的,在缺氧时 E2F-1 可以诱导 BNIP3 启动子的活化^[17]。Yurkova 等^[18]首次从机制上提出,缺氧诱导的 BNIP3 是 E2F-1 的直接转录靶标,它是 E2F-1 诱导的细胞死亡所必需的。该研究发现,E2F-1 可通过直接影响内在线粒体死亡途径的机制引起 SD 大鼠心肌细胞的死亡,对心肌细胞 E2F-1 的基因敲低可抑制 BNIP3 的基因转录,而针对 BNIP3 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 的应用能够抑制 E2F-1 引发的细胞死亡信号。Shaw 等^[19]的研究也发现,在 SD 大鼠心肌细胞中,NF- κ B 可与 E2F-1 竞争 BNIP3 的启动子结合,从而沉默 BNIP3 的基因在转录水平;而在缺乏 NF- κ B 信号的心肌细胞中,E2F-1 与 BNIP3 启动子的无限制结合可以激活基础 BNIP3 基因转录。在线粒体自噬相关研究中,E2F-1 和 NF- κ B 对 BNIP3 表达的调控尚未报道。然而,BNIP3 将线粒体自噬与凋亡贯穿于细胞变化及转归的整个过程中,其介导的线粒体自噬和细胞凋亡功能是相互关联的,即在刺激轻微时,BNIP3 介导的线粒体自噬对细胞的生存是有益的;而刺激较重时,过度的激活的线粒体自噬会促进细胞凋亡^[20-22]。除此以外,BNIP3 介导的线粒体自噬与凋亡的共同机制是线粒体去极化,因此这可能是 BNIP3 诱导细胞死亡中的同一环节^[22]。

(四) BNIP3 的翻译水平调控

BNIP3 在不同细胞和不同环境中的表达不同,即 BNIP3 的表达存在翻译后调控^[23]。BNIP3 的 C-端包含一跨膜区,N-端包含一保守的半胱氨酸残端,BNIP3 通过 N-端半胱氨酸残端和 C-端跨膜区协调合作,形成二聚体及激活 BNIP3。Diwan 等^[23]的研究发现,在转基因小鼠中,尽管 BNIP3 表达水平增加,其细胞凋亡水平却仍然很低。其原因可能是 C-端跨膜区对 BNIP3 线粒体定位的作用是必需的,当缺乏此跨膜区将不能形成二聚体和定位于线粒体。此外,BNIP3 还包含数个潜在的磷酸化位点,其功能受磷酸化调节。Graham 等^[24]的研究发现,缺氧-复氧可使 BNIP3 磷酸化增加,且其磷酸化水平的增加与细胞死亡的增加相关。同样,Mellor 等^[25]也发现,用微管抑制剂处理细胞可导致 BNIP3 磷酸化增加。目前,针对线粒体自噬过程中 BNIP3 翻译水平调控的研究较少,其调控方式尚未完全明确。

二、BNIP3 诱导线粒体自噬过程

线粒体自噬的异常发展是许多疾病的关键因素已被证实,

多项关于线粒体自噬异常的研究进一步证实了 BNIP3 在线粒体功能障碍中的作用。自噬刺激后,BNIP3 可通过触发线粒体去极化和随后将线粒体隔离成自噬体而引起线粒体吞噬^[26]。BNIP3 贯穿于线粒体自噬过程的每个阶段,在线粒体自噬的起始阶段,当低氧应激或营养缺乏时,BNIP3 可以通过抑制脑 Ras 同源蛋白 (ras homolog enriched in brain, Rheb),进而抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的功能,激活线粒体自噬^[27-28]。在自噬体的延展阶段,BNIP3 的 BH3 结构域与 Beclin-1 竞争结合 Bcl-2 或 Bcl-xL,从而导致 Beclin-1 与 Bcl-2 或 Bcl-xL 解离,并将其结合到线粒体上^[29]。Beclin-1 可与 III 型磷脂酰肌醇-3 激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 形成复合物,激活线粒体自噬^[30-31]。在自噬体成熟阶段,BNIP3 可以招募自噬相关蛋白 LC3 至线粒体上,促进自噬体的形成,并积极参与消除受损的线粒体^[32]。BNIP3 对 LC3 有很强的亲和力,并可以与 LC3 形成二聚体,当受到刺激时可将其结合在线粒体上,最终形成线粒体-BNIP3-LC3-自噬小体复合物^[33]。Jin 等^[34]的研究表明,双特异性蛋白磷酸酶 1 (dual-specificity protein phosphatase 1, DUSP1) 通过 JNK 放大了 BNIP3 的磷酸化,使其更易与 LC3 结合导致线粒体自噬激活。此外,在自噬溶酶体形成阶段,BNIP3 可能在调节自噬体-溶酶体融合中发挥重要作用^[35] (图 1b)。

BNIP3 介导的线粒体自噬对肌源性挛缩发生的调控机制

Trudel 等^[36]首次以 SD 大鼠为载体,将单侧膝关节固定于屈曲位置,在不同固定时间点对膝关节挛缩的肌源性和关节源性成分进行了区分和定量。该研究表明,在固定时间为两周以内,肌源性挛缩在膝关节伸展活动受限中占主导地位;随着时间推移,关节源性挛缩的占比增高。类似地,本课题组利用管型石膏将单侧膝关节固定于伸直位置,建立了新西兰白兔膝关节伸直型挛缩模型^[37]。相关的系列研究显示,固定时间小于 4 周,肌源性成分为限制膝关节屈曲活动的主要因素,固定四周时其占比约 50.3%;固定时间超过 4 周,肌源性挛缩维持稳定,而关节源性挛缩进一步发展并成为限制膝关节屈曲活动的另一原因,固定达 8 周时,其占比约 59.6%^[38-39]。除此以外,本课题组近期利用铝制支具固定单侧膝关节建立了 SD 大鼠膝关节伸直型挛缩模型,同样发现,固定 2 周后,膝关节发生了严重的肌源性挛缩^[40]。

在肌源性挛缩发生过程中,关节周围的骨骼肌组织发生萎缩性改变,其病理特征主要表现为肌纤维横截面积减小、肌纤维长度缩短;此外,骨骼肌组织出现蛋白合成代谢减弱,而分解代谢却增强^[39]。另一方面,骨骼肌组织出现纤维化改变,主要病理特征为肌内和肌间的结缔组织过度堆积,细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 蛋白的沉积导致生理结构的破坏、肌纤维重塑,最终导致骨骼肌延展性下降引起关节活动度 (range of motion, ROM) 降低^[41]。在骨骼肌稳态调节过程中,线粒体自噬可以完成对损伤的线粒体降解,维持细胞内环境稳定,防止骨骼肌细胞中因 ROS 等造成的线粒体内容物的释放和线粒体途径的细胞凋亡或坏死,对于维持骨骼肌质量具有重要作用;然而,过度激活的线粒体自噬可使线粒体过度丢失,从而导致细胞生物能量不足和细胞死亡,不利于骨骼肌质量的维持。

一、BNIP3 介导的线粒体自噬对骨骼肌萎缩的调控

固定期间骨骼肌质量的损失主要是由肌肉蛋白周转的改变驱动的,这种废用已被广泛研究,这是由于蛋白的合成率和分解率之间以及细胞死亡和再生过程之间的不平衡所造成的^[42]。有研究表明,骨骼肌蛋白周转主要受泛素-蛋白酶体系统激活的调节^[43-44]。然而,越来越多的研究表明,自噬-溶酶体途径诱导的蛋白降解在固定过程中的骨骼肌萎缩中起着关键作用^[45-46]。早期的研究表明,悬吊小鼠后肢并用石膏固定可通过刺激自噬来加重骨骼肌萎缩^[47]。除此之外,还有研究发现,自噬特异性抑制剂氯喹可以减少转化生长因子(transforming growth factor,TGF)- β 1 介导的骨骼肌萎缩^[48]。重要的是,自噬相关基因(包括 p62、LC3B、Beclin-1、Atg12 和 BNIP3)的 mRNA 表达水平在 Donjoy 夹板固定期间显著增加^[49]。骨骼肌是一类富含线粒体的组织,正常的线粒体功能对于维持骨骼肌能量代谢和质量至关重要^[50];而作为一种特殊的选择性自噬形式,线粒体自噬在骨骼肌质量的调控中同样发挥不可或缺的作用。

Oost 等^[51]在一项成纤维细胞生长因子 21(fibroblast growth factor 21, FGF21)对骨骼肌线粒体自噬和骨骼肌质量的作用研究中表明,FGF21 是调节肌肉质量的新参与者,需要线粒体自噬蛋白 BNIP3 参与。该研究应用肌肉特异性 FGF21 敲除小鼠,在禁食期间骨骼肌质量损失受到显著保护,其机制在于调节线粒体蛋白 BNIP3 显著降低线粒体自噬通量使骨骼肌蛋白合成率保持正常。Leermakers 等^[52]对 C57BL/6J 小鼠给予 3 d 的后肢悬吊,对人的单侧下肢则给予 7 d 固定,结果发现,小鼠腓肠肌和人股外侧肌均可发现线粒体自噬相关蛋白[如 BNIP3、BNIP3L、LC3B 和含 FUN14 域蛋白 1(FUN14 domain-containing protein 1, FUNDC1)等]的表达上调,而线粒体含量则明显减少。Deval 等^[53]的研究也发现,在踝关节跖屈位固定 1 周后,胫前肌和腓肠肌发生萎缩性改变,重新活动 1 周后,胫前肌和腓肠肌萎缩加剧,固定和重新活动期间,两者均伴随有线粒体自噬水平上调。此外,固定上调了腓肠肌中 BNIP3 的 mRNA 表达,而 Parkin 的蛋白表达水平无明显变化,重新活动后 BNIP3 的 mRNA 表达恢复至基线;固定对胫前肌中 BNIP3 的 mRNA 和 Parkin 的蛋白表达水平无明显影响,但重新活动却会上调 BNIP3 的 mRNA 和 Parkin 的蛋白表达。该研究结果表明,固定期间,BNIP3 介导的线粒体自噬在腓肠肌萎缩中发挥了主要作用,而在重新活动期间,BNIP3 和 Parkin 介导的线粒体自噬在胫前肌萎缩加剧中均发挥着重要作用,这可能与骨骼肌的性质包括肌纤维的类型、解剖位置以及被固定的位置相关。Deval 等^[53]的研究还发现,骨骼肌废用导致线粒体自噬相关蛋白表达水平上调,然而基因或蛋白水平的改变并不能直接表明线粒体的活性状态,因为线粒体自噬相关的基因或蛋白除了诱导线粒体自噬外还有其他功能。最近,Yamashita 等^[54]建立了一个线粒体自噬报告小鼠系,该系允许直接分析体内线粒体自噬活性,并验证了固定增强了骨骼肌中 BNIP3 介导的线粒体自噬的假设。该研究表明,小鼠后肢固定 14 d 后,其比目鱼肌中表现出 BNIP3 介导的线粒体自噬活性的增强,以及 ROS 的产生增加。该研究直接证明了,固定会增强骨骼肌中的线粒体自噬活性和 ROS 的产生,并表明线粒体自噬是固定后骨骼肌萎缩的潜在治疗靶点。

肌肉细胞产生的能量 90%以上来自有氧途径,氧利用度减少将挑战骨骼肌蛋白合成与分解的稳态^[55]。既往研究表明,

HIF-1 α 的过表达和骨骼肌缺氧是固定诱导骨骼肌萎缩的生物学过程^[39]。结合 HIF-1 α 在调控 BNIP3 表达中具有重要作用,因此本课题组推测,HIF-1 α /BNIP3 信号轴介导的线粒体自噬的过度激活可能是骨骼肌在固定后发生萎缩的原因之一,而通过改善骨骼肌组织氧浓度进而抑制 HIF-1 α 过度表达可能是对固定后骨骼肌萎缩的潜在治疗方法。

二、BNIP3 介导的线粒体自噬对骨骼肌纤维化的调控

线粒体自噬与各类纤维化相关疾病之间的联系目前尚未完全阐明,在不同的组织类型中其发挥的作用机制各不相同。在纤维化疾病的发生机制中,最终的结局是相似的,即功能细胞向成纤维细胞尤其是肌成纤维细胞分化,以及成纤维细胞分泌大量细胞外基质并沉积^[56]。因此,借鉴其他组织纤维化发生过程中线粒体自噬调控机制,这对于探索线粒体自噬与骨骼肌纤维化之间的联系是必要的。多数研究表明在纤维化相关疾病的发病过程中,适度激活的线粒体自噬有助于抑制 ROS 的产生或线粒体凋亡,从而延缓组织纤维化进展。如受损的线粒体若不能及时经自噬途径清除而过度累积,可导致心肌重塑,促进心肌纤维化^[57-58]。线粒体自噬不足也可导致 ROS 增加,促进肺成纤维细胞分化、增殖,加重特发性肺纤维化疾病进展^[59]。此外,通过某些药物如褪黑素、线粒体靶向泛醌等,可有效减轻肝纤维化,其机制为通过上调线粒体自噬和线粒体生物生成^[60,61]。然而,Qiu 等^[62]在一项细颗粒物(particulate matter, PM)2.5 诱导肝纤维化的研究中发现,PM2.5 可能通过增加 ROS 激活 PINK1/Parkin 信号通路诱导线粒体损伤和线粒体自噬,从而激活肝星状细胞并引起肝纤维化。因此,线粒体自噬在纤维化相关疾病似乎是一把“双刃剑”,适度激活的线粒体自噬有利于清除受损的线粒体,发挥减轻组织纤维化的作用;而过度激活的线粒体自噬可进一步加重线粒体自噬,导致组织纤维化加重。木胸综合征(wooden breast syndrome, WB)是肉鸡胸大肌病变,其特征是骨骼肌纤维肥大和变性,并伴有严重的纤维化现象。Hosotani 等^[63]在一项肉鸡木胸综合征发病机制研究中发现,肉鸡的胸大肌拥有生理性清除因缺氧而受损的线粒体的机制,而慢性缺氧引起的线粒体自噬的减少和受损线粒体的积累可能是木胸综合征严重病理特征的基础。骨骼肌纤维化作为肌源性挛缩的另一病理表现,了解 BNIP3 介导的线粒体自噬如何影响骨骼肌纤维化对于寻找肌源性挛缩的治疗靶点具有重要意义,但现阶段关于这类研究较为局限,尚需进一步探索。

展望

BNIP3 介导的线粒体自噬机制广泛存在于真核生物稳态维持的过程中,其对机体正常生命活动的有序进行有着显著意义。适度激活的线粒体自噬有助于维持线粒体功能并适应压力,发挥保护作用;然而,过度激活的线粒体自噬会导致线粒体过度丢失,蛋白周转失衡,引起各类疾病的进展。多种因素可在转录或翻译水平调控 BNIP3 介导的线粒体自噬,但其具体调控机制仍需进一步探索。对于骨骼肌组织线粒体自噬的机制研究,有利于更好地认识肌源性挛缩的发生机制,从而为今后关节挛缩中肌源性成分的治疗提供理论依据。本课题组认为,针对关节挛缩中肌源性成分,通过改善骨骼肌组织氧浓度减少 HIF-1 α 过度表达,从而抑制 BNIP3 介导的线粒体自噬可能是今后潜在的治疗靶点。

参 考 文 献

- [1] Zhou GX, Zhu HL, Shi XT, et al. Autophagy in Sertoli cell protects against environmental cadmium-induced germ cell apoptosis in mouse testes[J]. *Environ Pollut*, 2021, 270: 116241. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.116241.
- [2] Zhu HL, Shi XT, Xu XF, et al. Melatonin protects against environmental stress-induced fetal growth restriction via suppressing ROS-mediated GCN2/ATF4/BNIP3-dependent mitophagy in placental trophoblasts[J]. *Redox Biol*, 2021, 40: 101854. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101854.
- [3] Wang F, Zhang QB, Zhou Y, et al. Effect of ultrashort wave treatment on joint dysfunction and muscle atrophy in a rabbit model of extending knee joint contracture: Enhanced expression of myogenic differentiation[J]. *Knee*, 2020, 27(3): 795-802. DOI: 10.1016/j.knee.2020.02.013.
- [4] Peng Y, Fang Z, Liu M, et al. Testosterone induces renal tubular epithelial cell death through the HIF-1 α / BNIP3 pathway[J]. *J Trans Med*, 2019, 17(1): 62. DOI: 10.1186/s12967-019-1821-7.
- [5] Zhou Y, Long Q, Wu H, et al. Topology-dependent, bifurcated mitochondrial quality control under starvation[J]. *Autophagy*, 2020, 16(3): 562-574. DOI: 10.1080/15548627.2019.1634944.
- [6] Zhang YN, Pang YX, Liu DW, et al. JMJD5 attenuates oxygen-glucose deprivation and reperfusion-induced injury in cardiomyocytes through regulation of HIF-1 α -BNIP3[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2022, 38(1): 38-48. DOI: 10.1002/kjm2.12434.
- [7] Wagatsuma A. Effect of hindlimb unweighting on expression of hypoxia-inducible factor-1 α vascular endothelial growth factor, angiopoietin, and their receptors in mouse skeletal muscle[J]. *Physiol Res*, 2008, 57(4): 613-620. DOI: 10.33549/physiolres.931288.
- [8] Yang L, Xie P, Wu J, et al. Deferoxamine treatment combined with sevoflurane postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by restoring HIF-1/BNIP3-mediated mitochondrial autophagy in GK rats [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 6. DOI: 10.3389/fphar.2020.00006.
- [9] Zhang Y, Liu D, Hu H, et al. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120: 109464. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109464.
- [10] Jin H, Zhu Y, Li Y, et al. BDNF-mediated mitophagy alleviates high-glucose-induced brain microvascular endothelial cell injury[J]. *Apoptosis*, 2019, 24(5-6): 511-528. DOI: 10.1007/s10495-019-01535-x.
- [11] Lu N, Li X, Tan R, et al. HIF-1 α /Beclin-1-mediated autophagy is involved in neuroprotection induced by hypoxic preconditioning[J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 66(2): 238-250. DOI: 10.1007/s12031-018-1162-7.
- [12] Madhu V, Boneski PK, Silagi E, et al. Hypoxic regulation of mitochondrial metabolism and mitophagy in nucleus pulposus cells is dependent on HIF-1 α -BNIP3 axis[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2022, 38(1): 38-48. DOI: 10.1002/jbmr.4019.
- [13] Fu ZJ, Wang ZY, Xu L, et al. HIF-1 α -BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101671. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101671.
- [14] Bozi LHM, Takano APC, Campos JC, et al. Endoplasmic reticulum stress impairs cardiomyocyte contractility through JNK-dependent up-regulation of BNIP3[J]. *Int J Cardiol*, 2018, 272: 194-201. DOI: 10.1016/j.ijcard.2018.08.070.
- [15] He C, Lu S, Wang XZ, et al. FOXO3a protects glioma cells against temozolomide-induced DNA double strand breaks via promotion of BNIP3-mediated mitophagy[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(8): 1324-1337. DOI: 10.1038/s41401-021-00663-y.
- [16] Engelmann D, Mayoli-Nüssle D, Mayrhofer C, et al. E2F1 promotes angiogenesis through the VEGF-C/VEGFR-3 axis in a feedback loop for cooperative induction of PDGF-B[J]. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5(6): 391-403. DOI: 10.1093/jmcb/mjt035.
- [17] Gang H, Dhingra R, Wang Y, et al. Epigenetic regulation of E2F-1-dependent Bnip3 transcription and cell death by nuclear factor-kappa B and histone deacetylase-1[J]. *Pediatr Cardiol*, 2011, 32(3): 263-266. DOI: 10.1007/s00246-011-9893-z.
- [18] Yurkova N, Shaw J, Blackie K, et al. The cell cycle factor E2F-1 activates Bnip3 and the intrinsic death pathway in ventricular myocytes [J]. *Circ Res*, 2008, 102(4): 472-479. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.164731.
- [19] Shaw J, Yurkova N, Zhang T, et al. Antagonism of E2F-1 regulated Bnip3 transcription by NF-kappaB is essential for basal cell survival [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(52): 20734-20739. DOI: 10.1073/pnas.0807735105.
- [20] Lin Q, Li S, Jiang N, Jin H, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1A and BNIP3-mediated mitophagy[J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 2975-2990. DOI: 10.1080/15548627.2020.1848971.
- [21] Zhu Y, Han XQ, Sun XJ, et al. Lactate accelerates vascular calcification through NR4A1-regulated mitochondrial fission and BNIP3-related mitophagy[J]. *Apoptosis*, 2020, 25(5-6): 321-340. DOI: 10.1007/s10495-020-01592-7.
- [22] Chen Y, Chen HN, Wang K, et al. Ketoconazole exacerbates mitophagy to induce apoptosis by downregulating cyclooxygenase-2 in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*, 2019, 70(1): 66-77. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.09.022.
- [23] Diwan A, Krenz M, Syed FM, et al. Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice[J]. *J Clin Invest*. 2007, 117(10): 2825-2833. DOI: 10.1172/JCI32490.
- [24] Graham RM, Thompson JW, Wei J, et al. Regulation of Bnip3 death pathways by calcium, phosphorylation, and hypoxia-reoxygenation[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(9): 1309-1315. DOI: 10.1089/ars.2007.1726.
- [25] Mellor HR, Rouschop KM, Wigfield SM, et al. Synchronised phosphorylation of BNIP3, Bcl-2 and Bcl-xL in response to microtubule-active drugs is JNK-independent and requires a mitotic kinase[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(11): 1562-1572. DOI: 10.1016/j.bep.2010.01.019.
- [26] Li Y, Wang Y, Kim E, et al. Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(49): 35803-35813. DOI: 10.1074/jbc.M705231200.
- [27] Gong LL, Yang S, Zhang W, et al. Akebia saponin D alleviates hepatic steatosis through BNIP3 induced mitophagy[J]. *J Pharmacol Sci*,

- 2018, 136(4): 189-195. DOI: 10.1016/j.jphys.2017.11.007.
- [28] Huang C, Zhang Y, Kelly DJ, et al. Thioredoxin interacting protein (TXNIP) regulates tubular autophagy and mitophagy in diabetic nephropathy through the mTOR signaling pathway[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 29196. DOI: 10.1038/srep29196.
- [29] Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, et al. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains[J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(10): 2570-2581. DOI: 10.1128/MCB.00166-09.
- [30] Lin YF, Chiu IJ, Cheng FY, et al. The role of hypoxia-inducible factor-1 α in zinc oxide nanoparticle-induced nephrotoxicity in vitro and in vivo[J]. *Part Fibre Toxicol*, 2016, 13(1): 52. DOI: 10.1186/s12989-016-0163-3.
- [31] Chen JL, Wang XX, Chen L, et al. A sphingosine kinase 2-mimicking TAT-peptide protects neurons against ischemia-reperfusion injury by activating BNIP3-mediated mitophagy[J]. *Neuropharmacology*, 2020, 181: 108326. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2020.108326.
- [32] Shi RY, Zhu SH, Li V, et al. BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke[J]. *CNS Neurol Ther*, 2014, 20(12): 1045-1055. DOI: 10.1111/cns.12325.
- [33] Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, et al. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(23): 19094-19104. DOI: 10.1074/jbc.M111.322933.
- [34] Jin Q, Li R, Hu N, et al. DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways[J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 576-587. DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.004.
- [35] Ma X, Godar RJ, Liu H, et al. Enhancing lysosome biogenesis attenuates BNIP3-induced cardiomyocyte death[J]. *Autophagy*, 2012, 8: 297-309. DOI: 10.4161/auto.18658.
- [36] Trudel G, Uthoff HK. Contractures secondary to immobility: is the restriction articular or muscular? An experimental longitudinal study in the rat knee[J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2000, 81(1): 6-13. DOI: 10.1016/s0003-9993(00)90213-2.
- [37] 周云, 王锋, 张全兵, 等. 兔膝关节伸直挛缩模型的建立[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2019(7): 488-493. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2019.07.002.
- [38] 杨帆, 黄鹏鹏, 周云, 等. 兔伸直型膝关节挛缩模型中肌源性挛缩的病理特征及其机制研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(7): 1042-1046. DOI: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.008.
- [39] Wang F, Li W, Zhou Y, et al. Radial extracorporeal shock wave reduces myogenic contracture and muscle atrophy via inhibiting NF- κ B/HIF-1 α signaling pathway in rabbit[J]. *Connect Tissue Res*, 2022, 63(3): 298-307. DOI: 10.1080/03008207.2021.1920934.
- [40] Wang F, Zhou CX, Zheng Z, et al. Metformin reduces myogenic contracture and myofibrosis induced by rat knee joint immobilization via AMPK-mediated inhibition of TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. *Connect Tissue Res*, 2022; 1-14. DOI: 10.1080/03008207.2022.2088365.
- [41] Huang PP, Zhang QB, Zhou Y, et al. Effect of radial extracorporeal shock wave combined with ultrashort wave diathermy on fibrosis and contracture of muscle[J]. *Am J Phys Med Rehabil*, 2021, 100(7): 643-650. DOI: 10.1097/PHM.0000000000001599.
- [42] Howard EE, Pasiakos SM, Fussell MA, et al. Skeletal muscle disuse atrophy and the rehabilitative role of protein in recovery from musculoskeletal injury[J]. *Adv Nutr*, 2020, 11(4): 989-1001. DOI: 10.1093/advances/nmaa015.
- [43] Cardaci TD, Machek SB, Wilburn DT, et al. Ubiquitin proteasome system activity is suppressed by curcumin following exercise-induced muscle damage in human skeletal muscle[J]. *J Am Coll Nutr*, 2021, 40(5): 401-411. DOI: 10.1080/07315724.2020.1783721.
- [44] Wang F, Zhang QB, Zhou Y, et al. The mechanisms and treatments of muscular pathological changes in immobilization-induced joint contracture: a literature review[J]. *Chin J Traumatol*, 2019, 22: 93-98. DOI: 10.1016/j.cjtee.2019.02.001.
- [45] Milan G, Romanello V, Pescatore F. Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6670. DOI: 10.1038/ncomms7670.
- [46] Park S, Shin MG, Kim JR, et al. Beta-lapachone attenuates immobilization-induced skeletal muscle atrophy in mice[J]. *Exp Gerontol*, 2019, 126: 110711. DOI: 10.1016/j.exger.2019.110711.
- [47] Speacht TL, Krause AR, Steiner JL, et al. Combination of hindlimb suspension and immobilization by casting exaggerates sarcopenia by stimulating autophagy but does not worsen osteopenia[J]. *Bone*, 2018, 110: 29-37. DOI: 10.1016/j.bone.2018.01.026.
- [48] Yang X, Xue P, Liu X, et al. HMGB1/autophagy pathway mediates the atrophic effect of TGF- β 1 in denervated skeletal muscle[J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 97. DOI: 10.1186/s12964-018-0310-6.
- [49] Møller AB, Vendelbo MH, Schjerling P, et al. Immobilization decreases FOXO3a phosphorylation and increases autophagy-related gene and protein expression in human skeletal muscle[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 736. DOI: 10.3389/fphys.2019.00736.
- [50] Wang D, Chen W, Bi Q, et al. Baoyuan Jiedu decoction alleviates cancer-induced myotube atrophy by regulating mitochondrial dynamics through p38 MAPK/PGC-1 α signaling pathway[J]. *Front Oncol*, 2020, 10: 523577. DOI: 10.3389/fonc.2020.523577.
- [51] Oost LJ, Kustermann M, Armani A, et al. Fibroblast growth factor 21 controls mitophagy and muscle mass[J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2019, 10(3): 630-642. DOI: 10.1002/jcsm.12409.
- [52] Leermakers PA, Kneppers AEM, Schols AMWJ, et al. Skeletal muscle unloading results in increased mitophagy and decreased mitochondrial biogenesis regulation[J]. *Muscle Nerve*, 2019, 60(6): 769-778. DOI: 10.1002/mus.26702.
- [53] Deval C, Calonne J, Coudy-Gandilhon C, et al. Mitophagy and mitochondria biogenesis are differentially induced in rat skeletal muscles during immobilization and/or remobilization[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(10): 3691. DOI: 10.3390/ijms21103691.
- [54] Yamashita SI, Kyuuma M, Inoue K, et al. Mitophagy reporter mouse analysis reveals increased mitophagy activity in disuse-induced muscle atrophy[J]. *J Cell Physiol*, 2021, 236(11): 7612-7624. DOI: 10.1002/jcp.30404.
- [55] Favier FB, Britto FA, Freysenet DG, et al. HIF-1-driven skeletal muscle adaptations to chronic hypoxia: molecular insights into muscle physiology[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, 72(24): 4681-4696. DOI: 10.1007/s00018-015-2025-9.

- [56] Maria ATJ, Bourquier C, Martinaud C, et al. From fibrogenesis towards fibrosis: Pathophysiological mechanisms and clinical presentations[J]. Rev Med Interne, 2020, 41(5): 325-329. DOI: 10.1016/j.revmed.2020.01.002.
- [57] Jin Q, Li R, Hu N, et al. DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways[J]. Redox Biol, 2018, 14: 576-587. DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.004.
- [58] Li E, Li X, Huang J, et al. BMAL1 regulates mitochondrial fission and mitophagy through mitochondrial protein BNIP3 and is critical in the development of dilated cardiomyopathy[J]. Protein Cell, 2020, 11(9): 661-679. DOI: 10.1007/s13238-020-00713-x.
- [59] Larson-Casey JL, Deshane JS, Ryan AJ, et al. Macrophage Akt1 kinase-mediated mitophagy modulates apoptosis resistance and pulmonary fibrosis[J]. Immunity, 2016, 44(3): 582-596. DOI: 10.1016/j.immuni.2016.01.001.
- [60] Kang JW, Hong JM, Lee SM. Melatonin enhances mitophagy and mitochondrial biogenesis in rats with carbon tetrachloride-induced liver fibrosis[J]. J Pineal Res, 2016, 60(4): 383-393. DOI: 10.1111/jpi.12319.
- [61] Dou SD, Zhang JN, Xie XL, et al. MitoQ inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrosis by enhancing PINK1/parkin-mediated mitophagy[J]. Open Med, 2021, 16(1): 1718-1727. DOI: 10.1515/med-2021-0394.
- [62] Qiu YN, Wang GH, Zhou F, et al. PM2.5 induces liver fibrosis via triggering ROS-mediated mitophagy [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 167: 178-187. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.050.
- [63] Hosotani M, Kawasaki T, Hasegawa Y, et al. Physiological and pathological mitochondrial clearance is related to pectoralis major muscle pathogenesis in broilers with wooden breast syndrome [J]. Front Physiol, 2020, 11: 579. DOI: 10.3389/fphys.2020.00579.

(修回日期:2022-09-23)

(本文编辑:阮仕衡)

• 外刊撷英 •

Repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) modulates thyroid hormones level and cognition in the recovery stage of stroke patients with cognitive dysfunction

【Li H, Ma J, Zhang J, et al. Med Sci Monit, 2021, 27: e931914.】

Objective This single-center study aimed to investigate the effects of repetitive transcranial magnetic stimulation (rTMS) on modulation of thyroid hormone levels and cognition in the recovery stage of patients with cognitive dysfunction following stroke.

Methods Seventy post-stroke patients who had cognitive impairment were randomly assigned to either the rTMS group or the control (sham) group. Both groups were administered basic treatment, with the rTMS group receiving rTMS (1 Hz, 90% MT, 1000 pulse/20 min, once a day for 5 days, for a total of 20 times), the stimulation site was the contralateral dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC), and the sham group receiving sham stimulation which had the same stimulation parameters and site, except that the coil plane was placed perpendicular to the surface of the scalp. Cognitive function assessment and thyroid function tests were performed before and after 4 weeks of treatment.

Results Serum levels of triiodothyronine (T3), free triiodothyronine (FT3), and thyroid stimulating hormone (TSH) showed a positive correlation with Montreal Cognitive Assessment (MoCA) scale score of stroke patients in the recovery phase. The post-treatment change in the scores of MoCA and Modified Barthel Index (MBI) and scores of 3 cognitive domains (visuospatial function, memory, and attention), as well as serum T3, FT3, and TSH levels, were improved more significantly in the rTMS group, and T3 and FT3 levels significantly affected the MoCA scores within the reference range.

Conclusions Serum T3, FT3, and TSH levels of stroke patients in the recovery phase were positively correlated with MoCA score. rTMS increased T3, FT3, and TSH levels and also improved MoCA and MBI of patients in the recovery phase of stroke.