

综述

缺血性脑卒中后神经元自噬流障碍的病理机制研究进展

刘继宇¹, 何红云^{1,2,*}, 邓仪昊^{1,*}

¹昆明理工大学基础医学院人体解剖学教研室, 昆明 650500; ²昆明理工大学附属安宁市第一人民医院, 昆明 650399

摘要: 自噬是一个将损伤细胞器、陈旧蛋白、多余胞质组分甚至病原体等通过自噬体呈递给溶酶体进行降解的细胞内代谢过程。它包括自噬启动、自噬体形成、自噬体-溶酶体融合和自噬底物在自噬溶酶体内降解和清除4个步骤。当这些过程呈连续通畅状态则可称为自噬流, 自噬/溶酶体信号通路中某一或某些步骤发生阻滞均可导致自噬流障碍。众多研究表明, 脑卒中后自噬流障碍是导致脑卒中后缺血半影区神经元损伤的重要原因。本文总结了缺血性脑卒中后神经元自噬流障碍的病理机制研究进展, 并介绍了目前改善神经元自噬流障碍方法的研究进展, 为深入探究脑卒中病理损伤机制提供参考。

关键词: 自噬; 缺血性脑卒中; 自噬溶酶体; 自噬流障碍; 病理机制

Pathogenic mechanisms of impaired neuronal autophagy flux after ischemic stroke

LIU Ji-Yu¹, HE Hong-Yun^{1,2,*}, DENG Yi-Hao^{1,*}

¹Department of Human Anatomy, Faculty of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

²Anning First People's Hospital Affiliated to Kunming University of Science and Technology, Kunming 650399, China

Abstract: Autophagy is a metabolic process in which damaged organelles, obsolete proteins, excess cytoplasmic components, and even pathogens are presented to lysosomes for degradation via autophagosomes. It includes 4 processes: the initiation of autophagy, the formation of autophagosomes, the fusion of autophagosomes with lysosomes, and the degradation and removal of autophagic substrates within autophagic lysosomes. When these processes are continuous, it is called autophagy flux. Blockage of one or certain steps in the autophagy/lysosome signaling pathway can lead to impaired autophagy flux. Numerous studies have shown that impaired autophagy flux is an important cause of neuronal damage in the ischemic penumbra after stroke. This paper summarized research progress in the pathological mechanisms that cause impaired neuronal autophagy flux after ischemic stroke and discusses methods to improve neuronal autophagy flux, in order to provide a reference for an in-depth investigation of the pathological injury mechanisms after stroke.

Key words: autophagy; ischemic stroke; autophagic lysosomes; autophagic flow disorders; pathological mechanisms

缺血性脑卒中是由多种原因导致脑动脉血流中断、局部脑组织缺氧、缺血性坏死, 并进一步出现相应神经功能障碍的脑血管疾病, 是当前全球三大致死疾病之一^[1]。在我国, 脑卒中是成人致死、致残的首要原因, 我国卒中患病人数占世界首位, 其中大部分为缺血性脑卒中^[2,3]。目前临床上针对缺

缺血性脑卒中治疗的策略是通过注射血栓溶解剂、抗血栓形成和抗血小板聚集类药物以恢复受损区域的血流, 进而实现血流再灌注^[4]。但是使用这些药物需要在严格的3~4.5个小时治疗时间窗内, 且有导致高风险的出血并发症的副作用^[5]。

脑缺血主要引起3种细胞死亡: 自噬、凋亡和

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82160241, 82160240, 81960418), and the “Xingdian Talents” Support Program of Yunnan Province, China (No. YNWR-QNBJ-2018-034).

*Corresponding authors. HE Hong-Yun: E-mail: 20130211@kust.edu.cn; DENG Yi-Hao: 20130117@kust.edu.cn

坏死。其中, 缺血核心区神经元发生不可逆的坏死, 而半影区同时存在自噬与凋亡^[6]; 自噬和凋亡广泛参与缺血性脑卒中的病理生理进程, 并对半影区神经元的存活产生显著影响^[7]; 缺血半影区神经元自噬与凋亡之间存在相互转换, 凋亡向自噬转换有利于细胞存活, 自噬向凋亡转换则会造成细胞损伤^[8]。脑缺血后凋亡抑制自噬, 加速细胞死亡; 而适度自噬抑制凋亡, 促进细胞存活, 过度自噬则发挥促凋亡作用, 导致细胞死亡^[6-8]。

自噬在生理或病理条件下被激活, 将自噬底物募集并用双层膜包裹, 形成自噬体; 随后自噬体与溶酶体发生融合, 形成自噬溶酶体, 自噬底物从自噬体呈递至溶酶体并最终在自噬溶酶体内降解和清除, 该过程称为自噬/溶酶体信号通路。这个动态过程完整通畅地进行时被称为自噬流 (autophagy flux), 缺血性脑卒中后神经元的自噬/溶酶体信号通路各步骤发生阻滞, 产生显著的自噬流障碍, 导致神经损伤加剧^[9]。因此, 探究缺血性脑卒中病理机制、研究缺血性脑卒中发生后神经细胞死亡机制对脑卒中病理损伤的减轻与康复有重要意义。本文就自噬/溶酶体信号通路发生阻滞引发自噬流障碍的病理机制进行讨论, 并介绍了目前改善神经元自噬流障碍方法的研究进展, 为研究自噬在缺血性脑卒中病理进程中的作用提供参考, 并探觅深入研究的线索。

1 过度自噬或自噬不足致神经元自噬流障碍

细胞自噬在缺血性脑卒中的发病和治疗中起着至关重要的作用。由于神经元是不可再生细胞, 不能通过细胞分裂去除错误折叠的蛋白质和受损的细胞器, 因此自噬对于清除神经元中的有害物质、维持内稳态是非常必要的^[10]。

自噬活性被过度激活将导致大量自噬底物产生, 超过自噬溶酶体的水解代谢能力, 引发自噬底物大量堆积, 最终引起自噬流障碍。研究发现, 离体的氧-葡萄糖剥夺 (oxygen and glucose deprivation, OGD) 和复氧复糖 (reperfusion, R) 处理的神经元出现自噬上调现象, 同时伴随自噬性细胞死亡增加^[11]。还有研究发现, 暴露于 OGD 的原代培养皮质神经元和 SH-SY5Y 神经元的自噬性死亡增加, 而自噬抑制剂 3-甲基腺苷 (3-methyladenine, 3-MA) 可以减轻这一现象, 力证了自噬被过度激活导致神经元的死亡^[11, 12]。此外, 缺血性脑卒中后组蛋白 H4 上赖

氨酸 16 乙酰化 (H4K16ac) 增加, 过度上调半影区神经元自噬活性, 加重了自噬/溶酶体功能障碍^[9]。

脑缺血显著激活神经元自噬活性, 但由于自噬体形成障碍, 导致大量自噬底物不能被有效呈递给溶酶体进行降解, 同样引发自噬底物堆积, 产生自噬流障碍^[13]。微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 是自噬体成熟所必需的, 自噬体形成过程中 LC3-I 向 LC3-II 转化^[14, 15]。研究发现, 在 OGD/R 处理的 HT22 细胞和大鼠大脑中动脉栓塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型中, 自噬不足时 LC3-II/LC3-I 比值降低, 细胞凋亡增加, 脑损伤加重^[14]。脑卒中后自噬活性被激活, 但自噬水平不足以将需要代谢更新的损伤细胞器、多余的胞质组分甚至毒性产物通过自噬/溶酶体信号机制进行清除, 进而引发自噬流障碍。还有研究发现 AMPK/mTOR 信号通路障碍会导致自噬水平不足, 丁香酚 (Eugenol) 预处理可以缓解这种自噬不足障碍并减轻缺血/再灌注损伤^[16]。

因此, 适度自噬有助于恢复神经元内环境稳态, 增强细胞存活水平, 而过度自噬或自噬不足都会导致神经元自噬流障碍, 并造成神经细胞死亡。

2 自噬体-溶酶体融合障碍致神经元自噬流阻滞

自噬溶酶体形成是自噬/溶酶体信号通路中的关键阶段, 此过程主要包括膜泡转运、锚定和生物膜的介导融合。多种可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors, SNARE)、衔接蛋白参与自噬体与溶酶体膜泡间的锚定与融合; LC3 蛋白、小 GTP 酶 Rab7 (Ras-related protein 7)、动力蛋白等分子则有招募并转运参与融合的细胞器及 SNARE 单体、提供能量等作用 (图 1)。

2.1 自噬体形成和与溶酶体融合的主要分子机制

自噬相关蛋白 (autophagy related gene, ATG) 成员 ATG4、ATG7、ATG3 等推动 LC3 蛋白向 LC3-I、LC3-II 转化, 调控自噬体的形成与成熟^[14], 此外, 突触融合蛋白 17 (syntaxin 17, STX17)、膜突触相关蛋白 29 (synaptosome associated protein 29, SNAP29)、囊泡相关膜蛋白 8 (vesicle-associated membrane protein 8, VAMP8)、Ykt6 和 STX7 是 SNARE 单体蛋白, 参与自噬体与溶酶体的融合, 同时该融合过程又受到小 GTP 酶 Rab7 等分子的调节^[10, 17]。

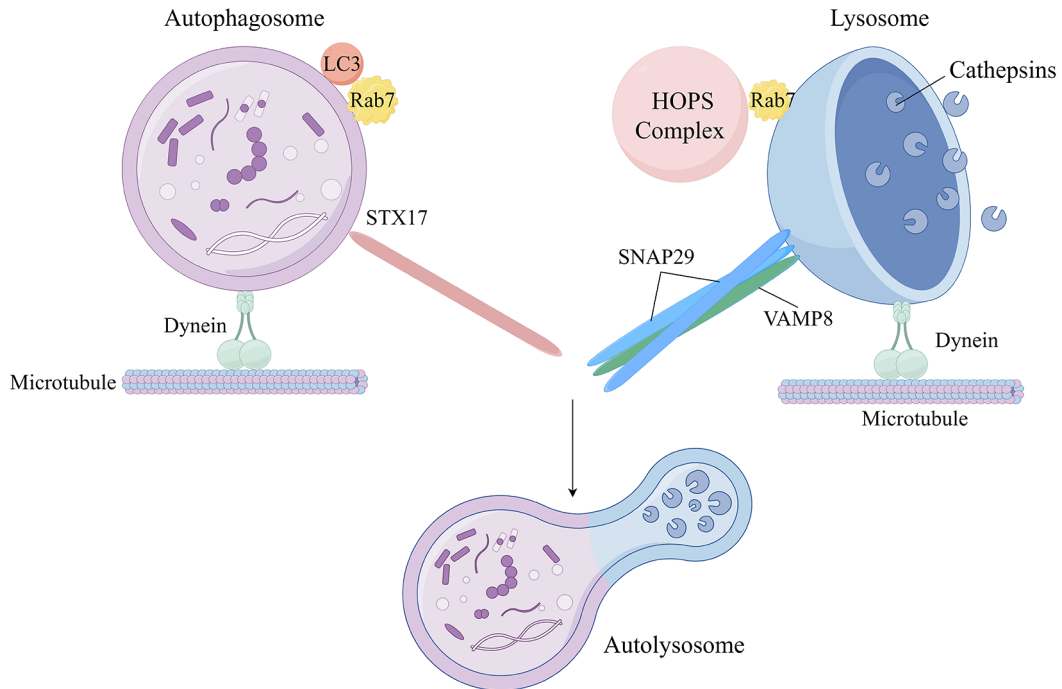


图 1. 参与自噬溶酶体形成过程的主要细胞器和分子示意图(本图由Figdraw绘制)

Fig. 1. Schematic diagram of the main organelles and molecules involved in the formation of autophagic lysosomes (i.e. autolysosome). The autophagosomes and lysosomes are transported through microtubule and dynamin systems, and membrane fusion is mediated by a variety of molecules to form autophagic lysosomes. LC3: microtubule-associated protein light chain 3; Rab7: Ras-related protein 7 GTPase; STX17: syntaxin 17; SNAP29: synaptosome associated protein 29; VAMP8: vesicle-associated membrane protein 8; HOPS: homotypic fusion and protein sorting. By Figdraw (www.figdraw.com).

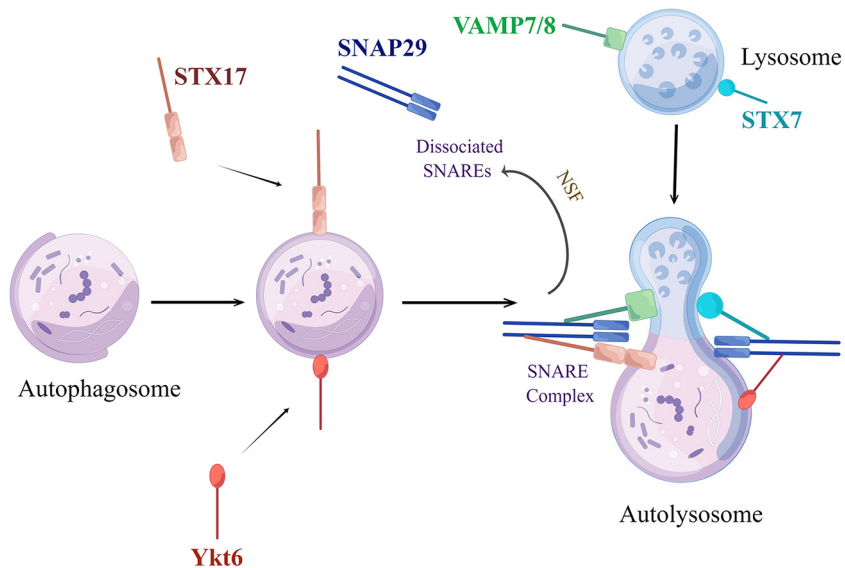


图 2. 介导自噬体与溶酶体融合的STX17-SNAP29-VAMP8与Ykt6-SNAP29-STX7通路示意图(本图由Figdraw绘制)

Fig. 2. Schematic diagram of the STX17-SNAP29-VAMP8 and Ykt6-SNAP29-STX7 pathways mediating the fusion of autophagosomes with lysosomes. Different localized SNARE monomers (STX17, Ykt6, SNAP29, VAMP7/8, STX7) were recruited and bound to form two SNARE complexes, STX17-SNAP29-VAMP8 and Ykt6-SNAP29-STX7, which mediated membrane fusion, after that the SNARE complexes were catalyzed by NSF ATPase to dissociate into SNARE monomers. STX17: syntaxin 17; SNAP29: synaptosome associated protein 29; VAMP7/8: vesicle-associated membrane protein 7/8; STX7: syntaxin 7; SNARE: soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors; NSF: N-ethylmaleimide-sensitive factor. By Figdraw (www.figdraw.com).

研究发现, 介导自噬体与溶酶体融合的分子机制包括 STX17-SNAP29-VAMP8、Ykt6-SNAP29-STX7 等信号通路 (图 2)。哺乳动物细胞内膜包被小泡相互融合由特异性 SNARE 之间相互作用, 形成非共价键反式复合体来实现^[17]。此外, 融合完成后 SNARE 复合体构象转变为一种稳定的顺式复合体, 需要由一种可溶性的胞质融合蛋白 N-乙基马来酰亚胺敏感因子 (N-ethylmaleimide-sensitive factor, NSF) 利用 ATP 水解释放的能量将 SNARE 复合体从融合后的膜上解离, 释放单个 SNARE 亚基, 以供下次膜融合所用^[18]。

膜融合需由定位在不同膜上的 Qa-SNARE、Qb-SNARE、Qc-SNARE 和 R-SNARE 蛋白单体互补形成一个四螺旋束 SNARE 复合体驱动^[19]。研究表明, 哺乳动物神经元中的 SNARE 家族成员有 STX17、SNAP29 和 VAMP8 等, 这些蛋白通过形成 SNARE 复合体来介导自噬体与溶酶体的融合^[20]。自噬体上的 STX17 (Qa-SNARE) 与溶酶体膜上的 VAMP8 (R-SNARE) 从胞质中招募到 SNAP29 (提供 Qbc-SNARE 两个 SNARE 结构域, 图 1), 组装成 STX17-SNAP29-VAMP8 反式 SNARE 复合体, 从而介导自噬体 - 溶酶体融合^[21, 22]。

Ykt6 也是 SNARE 家族成员, 是一种 R-SNARE 蛋白, 定位于自噬体膜上, 可与 SNAP29 和 STX7 形成类似的 SNARE 四股螺旋束复合体发挥作用^[23, 24]。两条信号通路的区别在于, STX17 是一个 Qa-SNARE 蛋白, 而 Ykt6 是一个 R-SNARE 蛋白, 它们与溶酶体上不同的 SNARE 蛋白相互作用; 即 STX17 和 Ykt6 分别与 VAMP7/8 (R-SNARE) 和 STX7 (Qa-SNARE) 相互作用^[25]。

SNARE 复合体的组装受到小 GTP 酶 Rab7 和衔接蛋白的时空控制^[19]。Rab7 蛋白定位于自噬体膜, 可水解 GTP 提供能量, 招募同型融合和蛋白质分类 (homotypic fusion and protein sorting, HOPS) 复合体等充当桥梁的衔接蛋白连接融合的分隔区, 同时这些复合体帮助 SNARE 蛋白驱动对应脂质双分子层的融合^[26]。

2.2 缺血性脑卒中致自噬体-溶酶体融合障碍

脑缺血后, 自噬体 - 溶酶体融合机制中相关蛋白表达异常, 导致自噬溶酶体形成障碍, 自噬产物堆积, 引发自噬流障碍。

研究发现, 脑缺血后电镜下观察到成熟自噬体聚集在扩大的内溶酶体隔室附近, 表明自噬体 - 溶

酶体的融合步骤被阻断, 导致自噬流发生中断^[18]。还有研究发现脑缺血 20 min 后, 神经元中 NSF ATP 酶大量失活, 导致神经元内自噬体 - 溶酶体转运中断^[27], 进而使得胞内高尔基体片段、囊泡和包裹自噬底物的晚期核内体大量积累, 组织蛋白酶 B (cathepsin B, CTSB) 从晚期核内体中释放到胞质内, 神经元线粒体外膜通透性改变, 引起神经元死亡^[28]。同时, 免疫荧光染色可见局灶性脑缺血后自噬体在 CTSB 阳性定位的内溶酶体间室附近, 表明两者未能相互融合^[29]。以上研究证实了缺血性脑卒中导致自噬体 - 溶酶体融合受阻, 引发自噬流障碍。此外, STX17 是介导自噬体 - 溶酶体融合的关键蛋白^[30], STX17 敲低小鼠原代神经元经 OGD/R 处理后观察到自噬小体和功能障碍溶酶体的积累, 自噬流阻断, 缺血 / 再灌注所致的神经元损伤加重^[31], 说明 SNARE 蛋白水平与自噬体 - 溶酶体融合和自噬流稳态密切相关。

3 溶酶体功能失活致神经元自噬流损伤

溶酶体蛋白水解酶生产不足可导致溶酶体功能障碍。研究发现, 缺血性脑卒中导致神经元溶酶体内一种称为组织蛋白酶 D (cathepsin D, CTSD) 的天冬氨酸蛋白酶水平下降, 溶酶体内泛素化蛋白积累, 导致自噬溶酶体内底物清除受阻, 而 shRNA 介导的 CTSD 基因过表达则表现出了很好的神经保护效果, 因此 CTSD 水平决定了神经元内的溶酶体功能, 控制着神经元自噬流的稳定^[32, 33]。CTSD 水平恢复基于修复自噬流障碍对缺血性脑卒中后神经保护中具有重要的治疗意义。

溶酶体蛋白水解酶活性抑制导致其不能高效降解和清除自噬底物, 使其大量在胞内堆积, 引发自噬流障碍。研究发现, 自噬溶酶体功能首先在缺血过程的早期阶段增强, 特别是在皮质神经元中, 这伴随着转录因子 EB (transcription factor EB, TFEB) 表达增加和向核的转位; 但在缺血后期, 核 TFEB 水平逐渐下降, 溶酶体活性逐渐下降, 自噬体和自噬底物积累, 缺血损伤加剧^[34]。此外, CTSD 活性也显著影响溶酶体的形态和功能, 溶酶体体积异常增大和溶酶体功能障碍是由 CTSD 活性降低引起的^[13]。

缺血损伤引发的自噬流障碍最终破坏溶酶体结构, 导致溶酶体破裂 / 渗透, 释放水解酶, 触发细胞质酸化和组织蛋白酶介导的细胞死亡, 最终造成脑损伤^[35]。

4 改善神经元自噬流障碍的方法

4.1 基于自噬流表达水平的调控方法

自噬活性被过度激活或自噬不足都会导致自噬流障碍, 调控自噬流在一个适度的水平是减轻自噬性损伤的有效方法。

对于自噬过度, 研究人员在大鼠脑室内注射 3-MA 和另一种自噬抑制剂巴弗洛霉素 A1 (bafilomycin A1, BFA) 后, 可抑制神经元自噬进程, 显著减少 MCAO 模型大鼠脑梗死体积、脑水肿和运动缺陷^[36]。此外, 2,6-二异丙基苯酚可通过降低体外和体内自噬相关蛋白的表达显著减少自噬发生, 提高细胞存活率^[37, 38]。新近研究发现, 姜黄素 (Curcumin)、五味子素 A (Schizandrin A)、抗坏血酸 (Ascorbic acid) 等天然化合物也被证实对缺血/再灌注损伤具有抑制过度自噬的神经保护作用^[39-43]。

对于自噬不足, 研究发现泊洛沙姆 188 (Poloxamer 188, P188) 可诱导 mTOR 磷酸化, 并逆转 MCAO 后 mTOR 水平的下降, 防止线粒体膜完整性损伤和激活自噬, 从而实现神经保护作用^[44]; P188 具有较低的毒性, 它可能成为一种潜在的缺血性损伤的新疗法。体内和体外实验均表明, 亚精胺 (Spermidine) 可通过 AMPK/mTOR 信号通路诱导自噬, 有效减轻神经元损伤, 并抑制 caspase 3 介导的 Beclin-1 裂解, 恢复 Beclin-1 依赖性自噬, 促进细胞生存^[45, 46]。还有研究发现, 花青素 (Anthocyanidin) 可以激活自噬, 减少氧化应激, 保护受 OGD 影响的胶质细胞, 但是 ATG5 的缺失会使花青素的神经保护作用失效^[47], 未来或可研究花青素靶向 ATG5 作用机制治疗缺血性损伤; 黄芪甲苷 IV (Astragaloside IV) 可通过下调 SQSTM1 (Sequestosome 1) 促进自噬流, 对大鼠脑缺血/再灌注损伤具有神经保护作用^[14, 48]。

4.2 基于改善自噬溶酶体形成障碍的调控方法

通过多种途径调控细胞内参与 SNARE 复合体形成的相关组分含量和修饰可以改善自噬流障碍。例如, 利用外源性手段过表达 STX17 可以改善大鼠海马神经元自噬体晚期核内体与溶酶体融合缺陷^[49, 50]。此外, 海藻糖 (Trehalose) 可通过在一定程度上减轻由于内质网应激和 STX17 水平不足引起的自噬体-溶酶体融合障碍, 缓解自噬流损伤, 发挥神经保护作用^[31, 51, 52]; 伪人参皂苷 F11 (pseudoginsenoside-F11, PF11) 能够通过增加 VAMP7 水平改善永久性 MCAO 后的自噬体-溶酶体融合障碍^[53]。研究发现, 定位于晚期核内体和溶酶体的

DIPK2A 可通过与 VAMP7B 结合, 抑制 VAMP7B 与 STX17 的相互作用, 进而增强 STX17 与 VAMP7A 的结合, 从而增强自噬体-溶酶体融合^[54], 因此上调 DIPK2A 的表达可能对脑缺血后自噬溶酶体形成障碍起到调控作用。还有研究发现, STX17 的去乙酰化促进了 STX17 和 SNAP29 之间的相互作用以及 STX17-SNAP29-VAMP8 SNARE 复合物的形成, 也增强了 STX17 与 HOPS 复合体之间的相互作用, 从而进一步促进自噬体-溶酶体融合^[30, 55], 而组蛋白乙酰转移酶 CREBBP/CBP (CREB binding protein) 和去乙酰化酶 HDAC2 特异性地调节 STX17 的乙酰化, 故调控 CREBBP/CBP 和 HDAC2 可能是一个改善缺血性脑卒中自噬流障碍的潜在方法。

4.3 基于增强溶酶体水解代谢能力的调控方法

通过增强溶酶体内水解酶含量与活性以增强溶酶体水解代谢能力, 也可缓解自噬流障碍。研究发现, 蜜二糖 (Melibiose) 可通过诱导 TFEB 核转位提升溶酶体活性, 改善缺血半影区神经元的自噬流障碍^[56]。此外, 番茄碱 (tomatidine) 在 OGD/R 损伤模型中可上调溶酶体数量与蛋白水解活性、增强 CTSD 表达、促进 TFEB 表达和核转位, 改善溶酶体功能, 预防缺血性神经元损伤^[30]。研究人员在哺乳动物表达系统中产生的重组人 pro-CTSD 可被各种细胞模型有效地吸收, 正确地靶向至溶酶体, 并顺利加工成活性成熟形式^[33], 揭示了用外源重组蛋白替换有缺陷的水解酶 (酶替代疗法), 以改善溶酶体水解代谢能力不足引起的自噬流障碍的可能。

5 展望

本文分析了脑卒中后缺血半影区神经元自噬流障碍机制的研究进展, 并介绍了改善自噬流的药物治疗、基因修饰及物理手段等方面的研究进展。若脑卒中后缺血半影区神经元自噬流障碍的病理机制得到完全阐明, 则可有效减轻脑卒中神经损伤, 为改善脑卒中患者生活质量、缓解疾病带来的经济和社会负担奠定重要的基础, 也为深入研究脑卒中病理机制提供参考。

参考文献

- 1 Esenwa C, Gutierrez J. Secondary stroke prevention: challenges and solutions. *Vasc Health Risk Manag* 2015; 11: 437-450.
- 2 Peng B (彭斌), Wu B. Guidelines for diagnosis and treatment of acute ischemic stroke in China. *Chin J Neurol* (中华

- 神经科杂志) 2018; 51(9): 666–682 (in Chinese).
- 3 Wang YN (王亚楠), Wu SM, Liu M. 15-year trends and characteristics of stroke in China. *West Chin Med J (华西医学)* 2021; 36(6): 803–807 (in Chinese).
 - 4 Zhao Y, Zhang X, Chen X, Wei Y. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: From mechanisms to treatment (Review). *Int J Mol Med* 2022; 49(2): 15.
 - 5 Herpich F, Rincon F. Management of acute ischemic stroke. *Crit Care Med* 2020; 48(11): 1654–1663.
 - 6 Deng YH, He HY, Yang LQ, Zhang PY. Dynamic changes in neuronal autophagy and apoptosis in the ischemic penumbra following permanent ischemic stroke. *Neural Regen Res* 2016; 11(7): 1108–1114.
 - 7 Mukhopadhyay S, Panda PK, Sinha N, Das DN, Bhutia SK. Autophagy and apoptosis: where do they meet? *Apoptosis* 2014; 19(4): 555–566.
 - 8 Tuo QZ, Zhang ST, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. *Med Res Rev* 2022; 42(1): 259–305.
 - 9 Dong LL, Qiu MM, Liu YL, He HH, Deng YH. Attenuation of histone H4 lysine 16 acetylation (H4K16ac) elicits a neuroprotection against ischemic stroke by alleviating the autophagic/lysosomal dysfunction in neurons at the penumbra. *Brain Res Bull* 2022; 184: 24–33.
 - 10 Zhang Y, Han X, Tang Y, Zhang J, Hu Z, Xu W, Yao P, Niu Q. Weakened interaction of ATG14 and the SNARE complex blocks autophagosome-lysosome fusion contributes to fluoride-induced developmental neurotoxicity. *Ecotoxicol Environ Saf* 2021; 230: 113108.
 - 11 Shi R, Weng J, Zhao L, Li XM, Gao TM, Kong J. Excessive autophagy contributes to neuron death in cerebral ischemia. *CNS Neurosci Ther* 2012; 18(3): 250–260.
 - 12 Uchiyama Y. Autophagic cell death and its execution by lysosomal cathepsins. *Arch Histol Cytol* 2001; 64(3): 233–246.
 - 13 Zhang X, Wei M, Fan J, Yan W, Zha X, Song H, Wan R, Yin Y, Wang W. Ischemia-induced upregulation of autophagy preludes dysfunctional lysosomal storage and associated synaptic impairments in neurons. *Autophagy* 2021; 17(6): 1519–1542.
 - 14 Zhang Y, Zhang Y, Jin XF, Zhou XH, Dong XH, Yu WT, Gao WJ. The role of astragaloside IV against cerebral ischemia/reperfusion injury: suppression of apoptosis via promotion of P62-LC3-autophagy. *Molecules* 2019; 24(9): 1838.
 - 15 Lamark T, Svenning S, Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm. *Essays Biochem* 2017; 61(6): 609–624.
 - 16 Sun X, Wang D, Zhang T, Lu X, Duan F, Ju L, Zhuang X, Jiang X. Eugenol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy via AMPK-mTOR-P70S6K pathway. *Front Pharmacol* 2020; 11: 84.
 - 17 Yoon TY, Munson M. SNARE complex assembly and disassembly. *Curr Biol* 2018; 28(8): R397–R401.
 - 18 Abada A, Levin-Zaidman S, Porat Z, Dadosh T, Elazar Z. SNARE priming is essential for maturation of autophagosomes but not for their formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017; 114(48): 12749–12754.
 - 19 Sudhof TC, Rothman JE. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 2009; 323(5913): 474–477.
 - 20 Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 2012; 151(6): 1256–1269.
 - 21 Takats S, Nagy P, Varga A, Pircs K, Karpati M, Varga K, Kovacs AL, Hegedus K, Juhasz G. Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *J Cell Biol* 2013; 201(4): 531–539.
 - 22 Tian X, Teng J, Chen J. New insights regarding SNARE proteins in autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 2021; 17(10): 2680–2688.
 - 23 Bas L, Papinski D, Kraft C. Ykt6 mediates autophagosome-vacuole fusion. *Mol Cell Oncol* 2018; 5(6): e1526006.
 - 24 Matsui T, Jiang P, Nakano S, Sakamaki Y, Yamamoto H, Mizushima N. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *J Cell Biol* 2018; 217(8): 2633–2645.
 - 25 Mizushima N, Matsui T, Yamamoto H. YKT6 as a second SNARE protein of mammalian autophagosomes. *Autophagy* 2019; 15(1): 176–177.
 - 26 Nakamura S, Yoshimori T. New insights into autophagosome-lysosome fusion. *J Cell Sci* 2017; 130(7): 1209–1216.
 - 27 Yuan D, Liu C, Wu J, Hu B. Inactivation of NSF ATPase leads to cathepsin B release after transient cerebral ischemia. *Transl Stroke Res* 2018; 9(3): 201–213.
 - 28 Yuan D, Liu C, Hu B. Dysfunction of membrane trafficking leads to ischemia-reperfusion injury after transient cerebral ischemia. *Transl Stroke Res* 2018; 9(3): 215–222.
 - 29 Hu K, Gaire BP, Subedi L, Arya A, Teramoto H, Liu C, Hu B. Interruption of endolysosomal trafficking after focal brain ischemia. *Front Mol Neurosci* 2021; 14: 719100.
 - 30 Shen Q, Shi Y, Liu J, Su H, Huang J, Zhang Y, Peng C, Zhou T, Sun Q, Wan W, Liu W. Acetylation of STX17 (syntaxin 17) controls autophagosome maturation. *Autophagy* 2021; 17(5): 1157–1169.
 - 31 Chen L, Xia YF, Shen SF, Tang J, Chen JL, Qian K, Chen Z, Qin ZH, Sheng R. Syntaxin 17 inhibits ischemic neuronal injury by resuming autophagy flux and ameliorating endo-

- plasmic reticulum stress. *Free Radic Biol Med* 2020; 160: 319–333.
- 32 Hossain MI, Marcus JM, Lee JH, Garcia PL, Singh V, Shacka JJ, Zhang J, Gropen TI, Falany CN, Andrabi SA. Restoration of CTSD (cathepsin D) and lysosomal function in stroke is neuroprotective. *Autophagy* 2021; 17(6): 1330–1348.
- 33 Marques ARA, Di Spiezio A, Thiessen N, Schmidt L, Grotzinger J, Lullmann-Rauch R, Damme M, Storck SE, Pietrzik CU, Fogh J, Bar J, Mikhaylova M, Glatzel M, Bassal M, Bartsch U, Saftig P. Enzyme replacement therapy with recombinant pro-CTSD (cathepsin D) corrects defective proteolysis and autophagy in neuronal ceroid lipofuscinosis. *Autophagy* 2020; 16(5): 811–825.
- 34 Liu Y, Xue X, Zhang H, Che X, Luo J, Wang P, Xu J, Xing Z, Yuan L, Liu Y, Fu X, Su D, Sun S, Zhang H, Wu C, Yang J. Neuronal-targeted TFEB rescues dysfunction of the autophagy-lysosomal pathway and alleviates ischemic injury in permanent cerebral ischemia. *Autophagy* 2019; 15(3): 493–509.
- 35 Sambri I, D'Alessio R, Ezhova Y, Giuliano T, Sorrentino NC, Cacace V, De Risi M, Cataldi M, Annunziato L, De Leonibus E, Fraldi A. Lysosomal dysfunction disrupts presynaptic maintenance and restoration of presynaptic function prevents neurodegeneration in lysosomal storage diseases. *EMBO Mol Med* 2017; 9(1): 112–132.
- 36 Wen YD, Sheng R, Zhang LS, Han R, Zhang X, Zhang XD, Han F, Fukunaga K, Qin ZH. Neuronal injury in rat model of permanent focal cerebral ischemia is associated with activation of autophagic and lysosomal pathways. *Autophagy* 2008; 4(6): 762–769.
- 37 Cui D, Wang L, Qi A, Zhou Q, Zhang X, Jiang W. Propofol prevents autophagic cell death following oxygen and glucose deprivation in PC12 cells and cerebral ischemia-reperfusion injury in rats. *PLoS One* 2012; 7(4): e35324.
- 38 Cui DR, Wang L, Jiang W, Qi AH, Zhou QH, Zhang XL. Propofol prevents cerebral ischemia-triggered autophagy activation and cell death in the rat hippocampus through the NF-kappaB/p53 signaling pathway. *Neuroscience* 2013; 246: 117–132.
- 39 Miao Y, Zhao S, Gao Y, Wang R, Wu Q, Wu H, Luo T. Curcumin pretreatment attenuates inflammation and mitochondrial dysfunction in experimental stroke: The possible role of Sirt1 signaling. *Brain Res Bull* 2016; 121: 9–15.
- 40 Zhang Y, Fang M, Sun Y, Zhang T, Shi N, Li J, Jin L, Liu K, Fu J. Curcumin attenuates cerebral ischemia injury in Sprague-Dawley rats and PC12 cells by suppressing overactivated autophagy. *J Photochem Photobiol B* 2018; 184: 1–6.
- 41 Guo Z, Cao G, Yang H, Zhou H, Li L, Cao Z, Yu B, Kou J. A combination of four active compounds alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury in correlation with inhibition of autophagy and modulation of AMPK/mTOR and JNK pathways. *J Neurosci Res* 2014; 92(10): 1295–1306.
- 42 Wang G, Wang T, Zhang Y, Li F, Yu B, Kou J. Schizandrin protects against OGD/R-induced neuronal injury by suppressing autophagy: involvement of the AMPK/mTOR pathway. *Molecules* 2019; 24(19): 3624.
- 43 Chang CY, Chen JY, Wu MH, Hu ML. Therapeutic treatment with vitamin C reduces focal cerebral ischemia-induced brain infarction in rats by attenuating disruptions of blood brain barrier and cerebral neuronal apoptosis. *Free Radic Biol Med* 2020; 155: 29–36.
- 44 Luo C, Li Q, Gao Y, Shen X, Ma L, Wu Q, Wang Z, Zhang M, Zhao Z, Chen X, Tao L. Poloxamer 188 attenuates cerebral hypoxia/ischemia injury in parallel with preventing mitochondrial membrane permeabilization and autophagic activation. *J Mol Neurosci* 2015; 56(4): 988–998.
- 45 Yan J, Yan JY, Wang YX, Ling YN, Song XD, Wang SY, Liu HQ, Liu QC, Zhang Y, Yang PZ, Wang XB, Chen AH. Spermidine-enhanced autophagic flux improves cardiac dysfunction following myocardial infarction by targeting the AMPK/mTOR signalling pathway. *Br J Pharmacol* 2019; 176(17): 3126–3142.
- 46 Yang Y, Chen S, Zhang Y, Lin X, Song Y, Xue Z, Qian H, Wang S, Wan G, Zheng X, Zhang L. Induction of autophagy by spermidine is neuroprotective via inhibition of caspase 3-mediated Beclin 1 cleavage. *Cell Death Dis* 2017; 8(4): e2738.
- 47 Kim YK, Yoon HH, Lee YD, Youn DY, Ha TJ, Kim HS, Lee JH. Anthocyanin extracts from black soybean (*Glycine max* L.) protect human glial cells against oxygen-glucose deprivation by promoting autophagy. *Biomol Ther (Seoul)* 2012; 20(1): 68–74.
- 48 Li L, Hou X, Xu R, Liu C, Tu M. Research review on the pharmacological effects of astragaloside IV. *Fundam Clin Pharmacol* 2017; 31(1): 17–36.
- 49 Xu H, Zhu Y, Chen X, Yang T, Wang X, Song X, Xie X, Hu M, Jiang L, Cheng J, Gao R, Wang J. Mystery of methamphetamine-induced autophagosome accumulation in hippocampal neurons: loss of syntaxin 17 in defects of dynein-dynactin driving and autophagosome-late endosome/lysosome fusion. *Arch Toxicol* 2021; 95(10): 3263–3284.
- 50 Sun L, Lian Y, Ding J, Meng Y, Li C, Chen L, Qiu P. The role of chaperone-mediated autophagy in neurotoxicity induced by alpha-synuclein after methamphetamine exposure. *Brain Behav* 2019; 9(8): e01352.
- 51 Wang XY, Yang H, Wang MG, Yang DB, Wang ZY, Wang L. Trehalose protects against cadmium-induced cytotoxicity in primary rat proximal tubular cells via inhibiting apoptosis and restoring autophagic flux. *Cell Death Dis* 2017; 8(10):

- e3099.
- 52 Tang Q, Zheng G, Feng Z, Chen Y, Lou Y, Wang C, Zhang X, Zhang Y, Xu H, Shang P, Liu H. Trehalose ameliorates oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction and ER stress via selective autophagy stimulation and autophagic flux restoration in osteoarthritis development. *Cell Death Dis* 2017; 8(10): e3081.
- 53 Liu YY, Zhang TY, Xue X, Liu DM, Zhang HT, Yuan LL, Liu YL, Yang HL, Sun SB, Zhang C, Xu HS, Wu CF, Yang JY. Pseudoginsenoside-F11 attenuates cerebral ischemic injury by alleviating autophagic/lysosomal defects. *CNS Neurosci Ther* 2017; 23(7): 567–579.
- 54 Tian X, Zheng P, Zhou C, Wang X, Ma H, Ma W, Zhou X, Teng J, Chen J. DIPK2A promotes STX17- and VAMP7-mediated autophagosome-lysosome fusion by binding to VAMP7B. *Autophagy* 2020; 16(5): 797–810.
- 55 Xu Y, Wan W. Acetylation in the regulation of autophagy. *Autophagy* 2023; 19(2): 379–387.
- 56 Wu Z, Zhang Y, Liu Y, Chen X, Huang Z, Zhao X, He H, Deng Y. Melibiose confers a neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by ameliorating autophagy flux via facilitation of TFEB nuclear translocation in neurons. *Life (Basel)* 2021; 11(9): 948.