PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2024, 51(5): 1034~1042
www.pibb.ac.cn

脑缺血后N-乙基马来酰亚胺敏感因子ATP酶失活致神经元自噬流障碍的病理机制*

雷 倩[1)] 邓仪昊[1)**] 何红云[1,2)**]
([1)] 昆明理工大学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 缺血性脑卒中是由脑血管梗塞引起的急性脑血管病，具有较高的发病率、致残率和致死率。研究发现，过度自噬或自噬不足均可导致细胞损伤。自噬包括自噬体的形成和成熟、自噬体与溶酶体融合、自噬底物在自噬溶酶体内的降解和清除，这些过程呈连续状态则称为自噬流。研究发现，脑缺血可导致自噬体与溶酶体间发生融合障碍，从而引发自噬流损伤。细胞内膜融合由3种核心组分介导，即N-乙基马来酰亚胺敏感因子（N-ethylmaleimide sensitive factor，NSF）ATP酶、可溶性NSF黏附蛋白（soluble NSF attachment protein，SNAP）及可溶性NSF黏附蛋白受体（soluble NSF attachment protein receptors，SNAREs）。当SNAREs介导自噬体与溶酶体融合后以非活性的复合体形式存留于自噬溶酶体膜，须被NSF再激活为单体后方可发挥新一轮的膜融合介导作用，而NSF是唯一可再激活SNAREs的ATP酶。新近研究表明，脑缺血可显著抑制NSF ATP酶活性，导致其对SNAREs再激活减少，这可能是自噬体与溶酶体间发生融合障碍并导致神经元自噬流损伤的病理机制。本文就NSF ATP酶失活导致SNAREs互作失调、自噬体与溶酶体融合障碍，以及蛋白水解酶向溶酶体的转运不足引发神经元自噬流障碍的病理机制进行阐述，并针对NSF ATP酶失活改善神经元自噬流的方法进行探讨，为提高脑卒中治疗提供参考并指明深入研究方向。

关键词 缺血性脑卒中，N-乙基马来酰亚胺敏感因子ATP酶，自噬，神经元，自噬流障碍
中图分类号 R743.31，R364.1 **DOI**：10.16476/j.pibb.2023.0180

脑卒中主要分为缺血性和出血性卒中，该疾病是导致死亡和永久性残疾的主要原因之一，其中缺血性脑卒中的原发性病变是脑梗死[1-2]。现阶段对脑梗死的治疗主要是通过时间窗内的静脉溶栓和血管介入手术来实现快速再灌注，但缺血再灌注往往会导致神经元损伤[3-4]。研究发现，在卒中事件中，神经元迫切需要神经保护干预。目前尚不清楚缺血性卒中引起神经元死亡的确切机制，药物开发能力仍然有限[5]。因此，寻找新的研究方向，为脑缺血后提供更多可行性药物治疗显得尤为关键。

自噬是细胞内成分和功能失调的细胞器被递送到溶酶体进行降解和回收的过程，以保证正常条件下机体代谢稳态并促进细胞在压力下存活[6]。它包含一系列连续的过程：自噬起始、自噬体形成和成熟、自噬体与溶酶体融合以及自噬底物在自溶体中降解[7]。这些连续过程和整体状态又称为“自噬流”，而神经元自噬流障碍是导致缺血性脑卒中后神经损伤的重要原因。引发自噬流障碍的原因包括：自噬底物异常增多、自噬底物不能通过自噬体有效呈递给溶酶体（自噬体-溶酶体融合障碍）[8]、溶酶体不能有效代谢自噬底物（溶酶体功能障碍）[9]，这些因素均可导致自噬底物大量堆积引发神经元自噬流障碍，并最终导致神经元自噬性损伤或死亡。因此，维持自噬流通路的畅通是提高缺血性卒中后神经元活性的关键。

脑卒中后不同细胞器及细胞间的膜融合最终形成成熟的自噬溶酶体，以降解自噬底物继而减轻神经元损伤。细胞内膜系统是由结构和功能上相互关

* 国家自然科学基金（82160240，82160241，81960418）和云南省“兴滇英才支持计划”青年项目（YNWR-QNBJ-2018-034）资助。
** 通讯联系人。
邓仪昊 Tel：18487174860，E-mail：deng13032871868@163.com
何红云 Tel：18487158200，E-mail：511869324@qq.com
收稿日期：2023-05-08，接受日期：2023-09-13

联且具有膜包被的细胞器或细胞结构组成。在细胞内膜转运系统中，膜融合由N-乙基马来酰亚胺敏感因子（N-ethylmaleimide sensitive factor，NSF）ATP酶-可溶性NSF黏附蛋白（soluble NSF attachment protein，SNAP）-可溶性NSF黏附蛋白受体（soluble NSF attachment protein receptors，SNAREs）介导[10]。两个膜上的SNARE相互作用直接介导膜融合形成可逆复合物，融合后需要SNAP富集NSF ATP酶重新激活无活性SNARE复合物。其中NSF是大多数真核生物中唯一能为SNARE复合物解聚提供动力的ATP酶[11-12]，且只有游离在胞质中的活性NSF ATP酶才能将无活性SNARE复合物解离为活性SNAREs，使之继续介导膜融合[13]。大量研究表明，NSF ATP酶失活会导致明显的发育或退行性缺陷[13-14]。研究发现，脑缺血后ATP生成不足，导致胞质活性NSF ATP酶在缺血半影区神经元中发生沉积后失活[15]。NSF ATP酶失活又会使SNARE复合物再激活受到抑制，引发SNAREs间互作失调，加重膜融合障碍[16]，进而导致新合成的溶酶体蛋白水解酶转运不足，使得溶酶体功能减弱，自噬溶酶体生成不足[11, 17]，自噬流发生严重障碍，神经元损伤加剧（图1）。

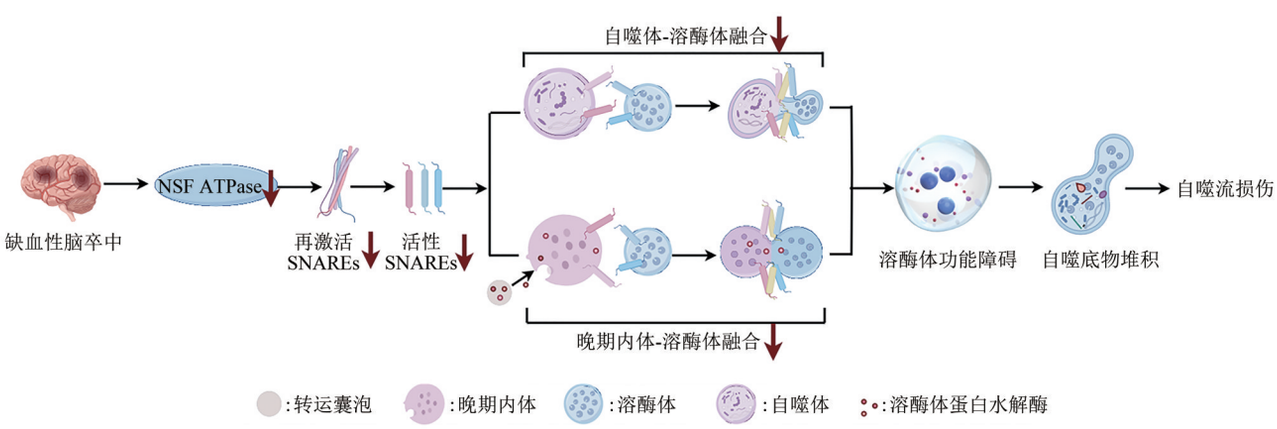


Fig. 1　Pathological mechanism of autophagy flow injury induced by NSF ATPase inactivation after stroke （created by Figdraw）

图1　脑卒中后NSF ATPase失活致神经元自噬流损伤的病理机制（本图使用Figdraw绘制）

缺血性脑卒中后，NSF ATP酶失活，SNARE复合物解离形成活性SNAREs减少，导致自噬流障碍，加重神经元损伤。根据现阶段研究，绘制出缺血性卒中后NSF ATP酶失活导致神经元自噬流障碍的病理机制图。

由此推测，NSF ATP酶失活可导致自噬流通路各环节发生障碍，可能是引发脑缺血后神经元损伤的重要因素。因此，维持缺血性脑卒中后NSF ATP酶活性，对于调控自噬流，缓解神经元损伤具有重要意义。故本文重点对脑缺血后NSF ATP酶失活所引发的神经元自噬流障碍致病机制，以及针对该机制调节神经元自噬流障碍，继而减轻神经元损伤的有效措施进行详细阐述，以此探寻治疗缺血性脑卒中的新途径。

1　脑缺血后NSF ATP酶失活致SNAREs再激活不足引发神经元自噬流障碍

膜融合过程由SNAREs蛋白驱动发生[18]，SNAREs蛋白间相互作用及调配对减轻缺血性脑卒中后神经元自噬流障碍有着重要作用。

1.1　囊泡膜SNARE与靶膜SNARE间的相互作用促进膜融合增强自噬流

SNAREs在功能上分为囊泡膜SNARE（vesicle-anchored SNARE，v-SNARE）与靶膜SNARE（target membrane-anchored SNARE，t-SNARE）[19]。在膜融合过程中，不同膜上的v-SNARE和t-SNARE相互作用形成SNARE复合物[20]。有研究发现，NSF ATP酶在突触活动期间维持活性区t-SNARE在体内的功能，而NSF ATP酶失活导致t-SNARE功能减弱，继而引发v-SNARE和t-SNARE互作减少，进一步影响SNARE复合物形成[21]。

1.2 NSF ATP酶失活致SNAREs间互作受损引发自噬流障碍

SNAP有两种SNAREs蛋白结合结构域，能够结合v-SNARE和t-SNARE形成SNARE复合物[22]。其中膜突触相关蛋白29（synaptosome associated protein 29，SNAP29）是SNAP家族的成员之一，越来越多的证据表明，SNAP29在胞内运输过程中（如胞吞和再循环）多个细胞定位处调节膜融合[23]。研究发现，SNAP29将含有突触融合蛋白17（syntaxin17，STX17）的自噬体桥接到携带囊泡相关膜蛋白8（vesicle-associated membrane protein 8，VAMP8）的溶酶体，介导囊泡融合[24]。而脑缺血后的神经元中SNAP29蛋白水平会持续降低，破坏突触稳态和神经回路，使认知功能发生障碍[25]。因此，通过基因工程技术调节SNAP29蛋白水平增强SNAREs互作有着重要意义，也许能够改善脑缺血后引发的自噬流障碍。新近研究发现，SNAP105磷酸化对SNAP29的膜定位至关重要，有丝分裂A基因相关激酶3（NIMA related kinase 3，NEK3）通过介导SNAP105磷酸化，进而参与细胞膜融合过程，以及高尔基体结构、黏附组织和细胞内循环的损伤和衰减[26]。因此，调控SNAP29的膜定位也将是治疗脑缺血后神经元损伤有希望的靶点。

综上，通过多种途径调控SNAREs，对减轻自噬流障碍，进而缓解缺血性卒中后神经元损伤具有重要意义。

2 脑缺血后NSF ATP酶活性抑制导致自噬体与溶酶体融合障碍引发神经元自噬流损伤

自噬体与溶酶体的融合是自噬的关键步骤，该过程需要SNAREs的协调。当发生融合障碍时会使神经元出现严重损伤，研究表明，缺血性卒中后NSF ATP酶失活会导致SNAREs介导的自噬体与溶酶体融合发生障碍，进而出现自噬体、溶酶体异常堆积等现象[27]。

2.1 NSF ATP酶失活致STX17–SNAP29–VAMP8介导的自噬体与溶酶体融合障碍引发自噬流损伤

研究发现，NSF ATP酶不是直接合并两个膜上的融合蛋白，而是作为分子伴侣改变融合蛋白SNAREs的构象[28]。其中，STX17是介导自噬体成熟的关键自噬体SNARE蛋白，晚期募集到自噬体中可以防止溶酶体与未闭合的吞噬细胞过早融合[29-30]。SNAP29存在于细胞内膜上，在自噬体和溶酶体融合中发挥作用[23]。VAMP8是溶酶体定位的SNARE蛋白，其有助于溶酶体在单个自噬体周围形成预融合状态，从而为膜融合奠定基础[27, 31]。研究表明，STX17敲低会阻断神经元中的自噬流并损害溶酶体功能[32]。将神经元中SNAP29敲低后，也会引发严重的自噬流障碍[33]。还有研究发现，VAMP8的敲低能减少自噬-溶酶体的形成[34]。故维持该途径SNAREs蛋白水平对膜融合至关重要。新近研究发现，全脑缺血20 min会导致神经元中NSF ATP酶完全失活，使得活性SNARE再生减少，导致自噬溶酶体融合障碍发生[16]。因此，NSF活性对调控缺血性卒中后STX17、SNAP29和VAMP8蛋白量以及减轻自噬流障碍显得十分重要。故NSF失活后，如何维持该途径所介导的膜融合通路流畅，进而减轻脑卒中后神经元损伤还需进一步研究。

2.2 NSF ATP酶失活致Ykt6–SNAP29–STX7介导的膜融合障碍导致自噬流损伤

研究发现，在哺乳动物细胞中，STX17耗尽后，仍然能观察到部分自噬体-溶酶体融合现象，这表明除了STX17-SNAP29-VAMP8之外，还有第二种SNARE复合物调控融合过程[35]。这种复合物由突触小泡蛋白同源物YKT6（YKT6 v-SNARE homolog，Ykt6）-SNAP29-突触融合蛋白7（syntaxin-7，STX7）组成[6, 36]。其中Ykt6是一种R-SNARE蛋白（SNARE结构域中间的氨基酸是精氨酸（R）），在多种分泌、内吞和自噬等囊泡运输途径中发挥作用，尤其在自噬体和溶酶体融合中发挥重要作用。研究表明，Ykt6与囊泡膜的结合以及构象从封闭到开放的改变是其发挥功能的关键[37]。而Ykt6缺失主要阻碍自噬体-溶酶体融合，并不影响溶酶体功能[35]。还有研究发现，Ykt6敲除后导致细胞中部分自噬流发生缺陷，且并没有因为STX7的同时敲除而加重缺陷，但Ykt6和STX17的同时敲除却表现出累加效应，这表明Ykt6和STX7在相同的通路中发挥作用，该通路与STX17所介导的膜融合通路有所不同[36]。新近研究表明，NSF ATP酶失活后会抑制SNARE复合物解离[16]，故认为Ykt6-SNAP29-STX7介导的膜融合也可能受到NSF ATP酶的影响。因此，该通路的发现为改善缺血性脑卒中后神经元自噬流障碍提供新的治疗方向。

3　脑缺血后NSF ATP酶介导的膜融合障碍引起蛋白水解酶向溶酶体转运不足致神经元自噬流障碍

内溶酶体（endolysosomal）运输途径的功能障碍几乎发生在所有神经退行性疾病中[38]。该途径相关膜融合功能在脑缺血后相关产物的生物降解中起着至关重要的作用[13]。溶酶体强大的降解功能对于维持蛋白质和细胞环境稳态至关重要，溶酶体功能障碍会导致细胞内废物积累，甚至细胞死亡[39]。溶酶体中发挥关键作用的蛋白水解酶主要包含组织蛋白酶B（cathepsin B，CTSB）、组织蛋白酶L（cathepsin L，CTSL）、组织蛋白酶D（cathepsin D，CTSD）。这些溶酶体蛋白水解酶由内质网合成后转至高尔基体进行修饰并包装至网格蛋白的转运囊泡中，最终被运送至溶酶体，发挥水解作用。脑缺血发生后，NSF ATP酶失活、高尔基体完全断裂，使SNAREs介导的晚期内体-溶酶体融合、自噬体-内溶酶体融合以及内溶酶体转化为溶酶体的过程发生不可逆中断，导致酶转运不足，继而影响溶酶体功能，最终阻断内吞和自噬途径[11]。

研究发现，溶酶体酶不足会导致自噬底物不能被有效降解而堆积，引发自噬流障碍，加重细胞损伤[40]。在神经元中CTSD是参与调节溶酶体蛋白水解活性的必需蛋白酶。敲低CTSD引起CTSD转运不足继而导致溶酶体功能障碍以及神经退行性疾病相关蛋白质蓄积[39]。CTSB是另一种主要的溶酶体蛋白水解酶，其过度释放是导致内溶酶体膜损伤的直接原因[41]。大量研究表明，短暂脑缺血后，NSF ATP酶失活导致CTSB从受损的高尔基体片段中释放到细胞质，使其从高尔基体到溶酶体的转运过程中止，而释放的CTSB又进一步破坏高尔基体和内溶酶体结构，造成CTSB释放过度，引起神经元损伤，且CTSB的过度释放将不加选择地消化细胞蛋白质，最终诱导细胞死亡[15-16]。

因此，脑缺血后保证NSF ATP酶活性是调控溶酶体蛋白水解酶的转运，进而维持溶酶体功能，挽救神经元损伤的关键。

4　针对脑缺血后NSF ATP酶失活减轻神经元自噬流损伤的可能方法

缺血性脑卒中发生后，如何改善神经元自噬流障碍以减轻神经损伤受到广泛关注。近年来，许多研究以NSF ATP酶失活后引起的病理机制作为研究靶点，寻求更多减轻神经元损伤的有效治疗途径。

4.1　增强NSF ATP酶活性

增强NSF ATP酶活性，可使晚期内体和末端溶酶体之间的融合以及脂质、水解酶和结构蛋白从高尔基体到内溶酶体的输送得以恢复，进而减轻内溶酶体损伤[17]。有研究发现，NSF ATP酶及其调配蛋白α-SNAP以协同的方式识别和分解SNARE复合物[42]。NSF ATP酶活性依赖于α-SNAP浓度和溶液离子强度，两者降低均会引起NSF ATP酶活性降低[43-44]。研究发现，敲低α-SNAP阻碍SNARE启动，进而抑制自噬[45]。因此，寻求更多增强α-SNAP浓度和溶液离子强度的方法，可为缺血性脑卒中后增强NSF ATP酶活性，恢复自噬流，提供更多线索。一项关于阿尔茨海默病的研究发现，微管相关蛋白Tau能够抑制NSF ATP酶活性，且抑制强度随Tau蛋白水平增加[46]。研究发现，缺血性脑卒中发生后Tau蛋白水平没有显著变化，但其磷酸化状态发生改变[47-48]。同时一项在帕金森病中的研究表明，富含亮氨酸的重复激酶2（leucine-rich repeat kinase 2，LRRK2）磷酸化NSF ATP酶，继而增强NSF ATP酶活性和SNARE复合物拆解速率[49]。LRRK2通过激活糖原合酶激酶3β（glycogen synthase kinase-3β，GSK-3β）直接或间接磷酸化Tau[50]。故未来需进一步探明LRRK2在脑缺血后的潜在功能，并探索Tau蛋白磷酸化水平与NSF ATP酶活性之间的联系为减轻该疾病所引起的神经元损伤提供新的研究思路。

4.2　促进自噬体与溶酶体融合代偿NSF ATP酶失活引发的自噬流障碍

脑卒中后SNAREs蛋白含量降低，提高SNAREs的表达，可以减轻缺血性卒中后NSF ATP酶失活所带来的严重影响。有研究发现，干扰素基因刺激因子（stimulator ofinterferon genes，STING）通过与STX17互作，阻止STX17向成熟自噬体易位，使自噬体与溶酶体融合发生障碍。当STING敲除后，小鼠表现出自噬流增加、运动耐力和葡萄糖代谢改变的现象[51]。所以，通过调控STING表达增加STX17向自噬体的转位，可能会达到减轻缺血性卒中后神经元损伤的目的。一项关于癫痫的研究发现过表达STX7能够降低癫痫发作的易感性并减轻癫痫活动[52]。这为脑缺血后STX7

表达降低，缓解神经元损伤提供潜在研究方向。

调控SNAREs蛋白修饰在自噬中发挥重要作用。有研究报道，STX17的乙酰化能控制自噬体的成熟，STX17在其SNARE结构域脱乙酰化能够促进STX17和SNAP29之间的相互作用以及STX17-SNAP29-VAMP8复合物的形成，从而介导自噬体-溶酶体融合发生[53]。还有研究发现，VAMP8的磷酸化修饰也会阻碍自噬体和溶酶体自发融合，抑制自噬流[34]。雷帕霉素靶标复合物1（mechanistic target of rapamycin complex 1，mTORC1）通过磷酸化VAMP8抑制SNARE复合物形成，从而阻断自噬体-溶酶体融合[54]。所以，调控VAMP8磷酸化水平可为治疗缺血性卒中提供潜在方案。新近研究报道，在帕金森病模型中Ykt6 S174位点磷酸化抑制SNAREs结合并阻碍自噬体的形成，通过钙调磷酸酶去磷酸化后Ykt6蛋白构象改变，使之与SNAREs相互作用增加从而促进膜融合[55]。同时钙调磷酸酶是唯一与Ykt6作用的磷酸酶[56]。因此，调控钙调磷酸酶含量进而调控Ykt6磷酸化水平为缺血性脑卒中后改善膜融合障碍继而减轻神经元损伤提供更多研究思路。

4.3 促进溶酶体蛋白水解酶的转运抵消NSF ATP酶失活所致自噬流障碍

通过增强溶酶体功能，也可减弱NSF ATP酶失活后所造成的神经损伤。CTSD的成熟双链形式在溶酶体的极酸性pH值（3.5~4.5）下具有活性，其酶功能受周围环境pH的影响[57]。研究发现，跨膜蛋白175（transmembrane protein 175，TMEM175）是溶酶体膜上的钾离子通道，当其缺乏时，会导致溶酶体pH发生改变，使蛋白酶活性降低从而抑制溶酶体水解功能[58]。因此，通过增加TMEM175的表达，对调节溶酶体内pH值进而维持溶酶体酶活性至关重要。还有研究发现，热休克蛋白B8过表达后，会引起CTSB和LAMP-1表达增加，促进脑缺血再灌注损伤后自噬流，防止血脑屏障破坏[59]。故改善溶酶体功能为治疗该疾病提供更多潜在途径。

4.4 针对NSF ATP酶失活改善自噬流障碍的其他方法

寻求更多针对NSF ATP酶失活后可行的方法，为缓解脑缺血后神经元自噬流障碍提供更多可能的治疗方向。有研究发现，NSF ATP酶高表达能够在脑缺血ATP缺失期间克服NSF ATP酶失活，从而维持其正常功能[15]。但其具体作用机制仍未被阐明。所以，未来还需进一步研究NSF ATP酶过表达缓解脑缺血后自噬流障碍具体机制为该疾病的研究提供更多思路。新近研究发现，NSF ATP酶突变能够激活mTORC1通路，引发自噬流障碍进而导致神经损伤[12]。因此，mTOR抑制剂以及过表达NSF ATP酶能够改善NSF ATP酶突变所引起的神经损伤。有研究发现，雷帕霉素能够抑制mTOR的活性，促进自噬体与溶酶体的融合继而恢复自噬流[60]。故今后还需探索雷帕霉素作用于mTOR通路时是否影响NSF ATP酶突变继而缓解自噬流障碍。同时雷帕霉素已在临床上用于多种疾病的治疗[61-64]，且已有研究报道雷帕霉素能够缓解缺血性脑卒中后神经损伤[65]。所以，接下来还需进一步阐明缺血性脑卒中后NSF ATP酶与mTOR通路之间的具体相互作用机制以及雷帕霉素是否可以作为一种激活NSF ATP酶的药物用于临床研究。还有研究发现，在帕金森病模型中，海藻糖能有效清除细胞中NSF ATP酶聚集体继而减少细胞死亡[66]。因此，海藻糖及其类似物在脑缺血后能否有效清除细胞中NSF ATP酶聚集体，继而减轻神经元损伤为该疾病提供新的治疗方法。同时雷帕霉素和海藻糖联合给药对缓解脑缺血后自噬流障碍提供新的临床治疗方法。

5 展　望

本文详细阐述了缺血性脑卒中后NSF ATP酶失活引发的神经元自噬流障碍等严重后果，并聚焦于NSF ATP酶失活后通过众多靶点恢复自噬流，缓解神经元损伤的研究现状。减轻自噬流障碍是挽救自噬神经元的重要方法，探清其病理机制是改善自噬流的关键。所以，在今后的研究中，还应对缺血性卒中后神经元自噬流障碍机制进行更为全面、整体的研究，探索更多潜在治疗方案以减轻缺血性卒中后引起的神经元损伤。通过本文综述，可根据致神经元自噬流障碍的特异性环节，采取对应的方法以减轻脑缺血损伤，并为众多自噬流的相关研究提供重要参考。

参　考　文　献

[1] Li J, Qiu Y, Zhang C, *et al*. The role of protein glycosylation in the occurrence and outcome of acute ischemic stroke. Pharmacol Res, 2023, **191**: 106726

[2] Lu X, Zhang J, Ding Y, *et al*. Novel therapeutic strategies for ischemic stroke: recent insights into autophagy. Oxid Med Cell Longev, 2022, **2022**: 3450207

[3] Guo J, Tuo Q Z, Lei P. Iron, ferroptosis, and ischemic stroke. J Neurochem, 2023, **165**(4): 487-520

[4] Haupt M, Gerner S T, Bähr M, *et al*. Neuroprotective strategies for ischemic stroke-future perspectives. Int J Mol Sci, 2023, **24**(5): 4334

[5] Tuo Q Z, Zhang S T, Lei P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications. Med Res Rev, 2022, **42**(1): 259-305

[6] Yamamoto H, Zhang S, Mizushima N. Autophagy genes in biology and disease. Nat Rev Genet, 2023, **24**(6): 382-400

[7] Mo Y, Sun Y Y, Liu K Y. Autophagy and inflammation in ischemic stroke. Neural Regen Res, 2020, **15**(8): 1388-1396

[8] Zhang Y, Han X, Tang Y, *et al*. Weakened interaction of ATG14 and the SNARE complex blocks autophagosome-lysosome fusion contributes to fluoride-induced developmental neurotoxicity. Ecotoxicol Environ Saf, 2021, **230**: 113108

[9] Lingling D, Miaomiao Q, Yili L, *et al*. 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] Rizo J. Molecular mechanisms underlying neurotransmitter release. Annu Rev Biophys, 2022, **51**: 377-408

[11] Yuan D, Hu K, Loke C M, *et al*. Interruption of endolysosomal trafficking leads to stroke brain injury. Exp Neurol, 2021, **345**: 113827

[12] Hayashi T, Yano N, Kora K, *et al*. Involvement of mTOR pathway in neurodegeneration in NSF-related developmental and epileptic encephalopathy. Hum Mol Genet, 2023, **32**(10): 1683-1697

[13] Zhang H Y, Tian Y, Shi H Y, *et al*. The critical role of the endolysosomal system in cerebral ischemia. Neural Regen Res, 2023, **18**(5): 983-990

[14] Gao Y, Khan Y A, Mo W, *et al*. Sensory deficit screen identifies nsf mutation that differentially affects SNARE recycling and quality control. Cell Rep, 2023, **42**(4): 112345

[15] 袁冬 . NSF ATP 酶失活导致脑缺血再灌注后神经元损伤机制的研究[D]. 长春:吉林大学, 2018
Yuan D. Study on The Mechanism of Neuronal Injury Caused by NSF ATPase Inactivation After Cerebral Ischemia and Reperfusion [D]. Changchun: Jilin University, 2018

[16] Yuan D, Liu C, Wu J, *et al*. Inactivation of NSF ATPase leads to cathepsin B release after transient cerebral ischemia. Transl Stroke Res, 2018, **9**(3): 201-213

[17] 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

[18] Khan Y A, White K I, Brunger A T. The AAA+ superfamily: a review of the structural and mechanistic principles of these molecular machines. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2022, **57**(2): 156-187

[19] Khvotchev M, Soloviev M. SNARE modulators and SNARE mimetic peptides. Biomolecules, 2022, **12**(12): 1779

[20] Zhang Y, Ma L, Bao H. Energetics, kinetics, and pathways of SNARE assembly in membrane fusion. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2022, **57**(4): 443-460

[21] Kawasaki F, Ordway R W. Molecular mechanisms determining conserved properties of short-term synaptic depression revealed in NSF and SNAP-25 conditional mutants. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, **106**(34): 14658-14663

[22] Lou X, Shin Y K. SNARE zippering. Biosci Rep, 2016, **36**(3): e00327

[23] Kádková A, Radecke J, Sørensen J B. The SNAP-25 protein family. Neuroscience, 2019, **420**: 50-71

[24] Morelli E, Speranza E A, Pellegrino E, *et al*. Activity of the SNARE protein SNAP29 at the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Front Cell Dev Biol, 2021, **9**: 637565

[25] Yan W, Fan J, Zhang X, *et al*. Decreased neuronal synaptosome associated protein 29 contributes to poststroke cognitive impairment by disrupting presynaptic maintenance. Theranostics, 2021, **11**(10): 4616-4636

[26] Rapaport D, Fichtman B, Weidberg H, *et al*. NEK3-mediated SNAP29 phosphorylation modulates its membrane association and SNARE fusion dependent processes. Biochem Biophys Res Commun, 2018, **497**(2): 605-611

[27] Tian X, Teng J, Chen J. New insights regarding SNARE proteins in autophagosome-lysosome fusion. Autophagy, 2021, **17**(10): 2680-2688

[28] Liu C, Hu B. Alterations of N-ethylmaleimide-sensitive atpase following transient cerebral ischemia. Neuroscience, 2004, **128**(4): 767-774

[29] Itakura E, Mizushima N. Syntaxin 17: the autophagosomal SNARE. Autophagy, 2013, **9**(6): 917-919

[30] Koyama-Honda I, Mizushima N. Transient visit of STX17 (syntaxin 17) to autophagosomes. Autophagy, 2022, **18**(6): 1213-1215

[31] Wang L, Diao J. VAMP8 phosphorylation regulates lysosome dynamics during autophagy. Autophagy Rep, 2022, **1**(1): 79-82

[32] Chen L, Xia Y F, Shen S F, *et al*. Syntaxin 17 inhibits ischemic neuronal injury by resuming autophagy flux and ameliorating endoplasmic reticulum stress. Free Radic Biol Med, 2020, **160**: 319-333

[33] Tang Q, Gao P, Arzberger T, *et al*. Alpha-synuclein defects autophagy by impairing SNAP29-mediated autophagosome-lysosome fusion. Cell Death Dis, 2021, **12**(10): 854

[34] Chen Q, Hao M, Wang L, *et al*. Prefused lysosomes cluster on autophagosomes regulated by VAMP8. Cell Death Dis, 2021, **12**(10): 939

[35] Kriegenburg F, Bas L, Gao J, *et al*. The multi-functional SNARE protein Ykt6 in autophagosomal fusion processes. Cell Cycle, 2019, **18**(6-7): 639-651

[36] Matsui T, Jiang P, Nakano S, *et al*. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. J Cell Biol, 2018, **217**(8): 2633-2645

[37] Rikitake Y. Regulation of the SNARE protein Ykt6 function by

diprenylation and phosphorylation. J Biochem, 2022, **172**(6): 337-340

[38] Hu K, Gaire B P, Subedi L, *et al*. Interruption of endolysosomal trafficking after focal brain ischemia. Front Mol Neurosci, 2021, **14**: 719100

[39] Hossain M I, Marcus J M, Lee J H, *et al*. Restoration of CTSD (cathepsin D) and lysosomal function in stroke is neuroprotective. Autophagy, 2021, **17**(6): 1330-1348

[40] Zhuang Q, Zhang Y, Zhu Y, *et al*. Maintenance of cathepsin D-dependent autophagy-lysosomal function protects against cardiac ischemia/reperfusion injury. Biochem Biophys Res Commun, 2023, **667**: 1-9

[41] Wang F, Gómez-Sintes R, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death. Traffic, 2018, **19**(12): 918-931

[42] Vivona S, Cipriano D J, O'leary S, *et al*. Disassembly of all SNARE complexes by N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF) is initiated by a conserved 1:1 interaction between α-soluble NSF attachment protein (SNAP) and SNARE complex. J Biol Chem, 2013, **288**(34): 24984-24991

[43] Choi U B, Zhao M, White K I, *et al*. NSF-mediated disassembly of on- and off-pathway SNARE complexes and inhibition by complexin. Elife, 2018, **7**: e36497

[44] Clary D O, Griff I C, Rothman J E. SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. Cell, 1990, **61**(4): 709-721

[45] Abada A, Levin-Zaidman S, Porat Z, *et al*. SNARE priming is essential for maturation of autophagosomes but not for their formation. Proc Natl Acad Sci USA, 2017, **114**(48): 12749-12754

[46] Prikas E, Paric E, Asih P R, *et al*. Tau target identification reveals NSF-dependent effects on AMPA receptor trafficking and memory formation. EMBO J, 2022, **41**(18): e10242

[47] Mehta S L, Kim T, Chelluboina B, *et al*. Tau and GSK-3β are critical contributors to α-synuclein-mediated post-stroke brain damage. Neuromolecular Med, 2023, **25**(1): 94-101

[48] Cardozo C F, Vera A, Quintana-Peña V, *et al*. Regulation of Tau protein phosphorylation by glucosamine-induced O-GlcNAcylation as a neuroprotective mechanism in a brain ischemia-reperfusion model. Int J Neurosci, 2023, **133**(2): 194-200

[49] Belluzzi E, Gonnelli A, Cirnaru M D, *et al*. LRRK2 phosphorylates pre-synaptic N-ethylmaleimide sensitive fusion (NSF) protein enhancing its ATPase activity and SNARE complex disassembling rate. Mol Neurodegener, 2016, **11**: 1

[50] Kim T, Vemuganti R. Mechanisms of Parkinson's disease-related proteins in mediating secondary brain damage after cerebral ischemia. J Cereb Blood Flow Metab, 2017, **37**(6): 1910-1926

[51] Rong Y, Zhang S, Nandi N, *et al*. STING controls energy stress-induced autophagy and energy metabolism *via* STX17. J Cell Biol, 2022, **221**(7): e202202060

[52] Wu J, Zhang H, Yang L, *et al*. Syntaxin 7 modulates seizure activity in epilepsy. Neurobiol Dis, 2023, **181**: 106118

[53] Shen Q, Shi Y, Liu J, *et al*. Acetylation of STX17 (syntaxin 17) controls autophagosome maturation. Autophagy, 2021, **17**(5): 1157-1169

[54] Huang H, Ouyang Q, Zhu M, *et al*. mTOR-mediated phosphorylation of VAMP8 and SCFD1 regulates autophagosome maturation. Nat Commun, 2021, **12**(1): 6622

[55] Mcgrath K, Agarwal S, Tonelli M, *et al*. A conformational switch driven by phosphorylation regulates the activity of the evolutionarily conserved SNARE Ykt6. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, **118**(12): e2016730118

[56] Sánchez-Martín P, Kriegenburg F, Alves L, *et al*. ULK1-mediated phosphorylation regulates the conserved role of YKT6 in autophagy. J Cell Sci, 2023, **136**(3): jcs260546

[57] Di Y Q, Han X L, Kang X L, *et al*. Autophagy triggers CTSD (cathepsin D) maturation and localization inside cells to promote apoptosis. Autophagy, 2021, **17**(5): 1170-1192

[58] Zhang M, Lu H, Xie X, *et al*. TMEM175 mediates lysosomal function and participates in neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion. Mol Brain, 2020, **13**(1): 113

[59] Li F, Yang B, Li T, *et al*. HSPB8 over-expression prevents disruption of blood-brain barrier by promoting autophagic flux after cerebral ischemia/reperfusion injury. J Neurochem, 2019, **148**(1): 97-113

[60] Zhang Y, Zhang J, Wang S. The role of rapamycin in healthspan extension *via* the delay of organ aging. Ageing Res Rev, 2021, **70**: 101376

[61] Slagboom T, Toelg R, Witzenbichler B, *et al*. Sirolimus-eluting or everolimus-eluting stents for coronary artery disease: 5-year outcomes of the randomised BIOFLOW-IV trial. EuroIntervention, 2023, **18**(14): 1197-1200

[62] Maruani A, Tavernier E, Boccara O, *et al*. Sirolimus (rapamycin) for slow-flow malformations in children: the observational-phase randomized clinical PERFORMUS trial. JAMA Dermatol, 2021, **157**(11): 1289-1298

[63] Stähli B E, Klingenberg R, Heg D, *et al*. Mammalian target of rapamycin inhibition in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. J Am Coll Cardiol, 2022, **80**(19): 1802-1814

[64] Caza T, Wijewardena C, Al-Rabadi L, *et al*. Cell type-specific mechanistic target of rapamycin-dependent distortion of autophagy pathways in lupus nephritis. Transl Res, 2022, **245**: 55-81

[65] 吴致远, 邓仪昊, 张永杰, 等. 雷帕霉素促进缺血性脑卒中后神经血管单位修复. 中国病理生理杂志, 2020, **36**(9): 1709-1714
Wu Z Y, Deng Y H, Zhang Y J, *et al*. Chin J Pathophys, 2020, **36**(9): 1709-1714

[66] Pischedda F, Cirnaru M D, Ponzoni L, *et al*. LRRK2 G2019S kinase activity triggers neurotoxic NSF aggregation. Brain, 2021, **144**(5): 1509-1525

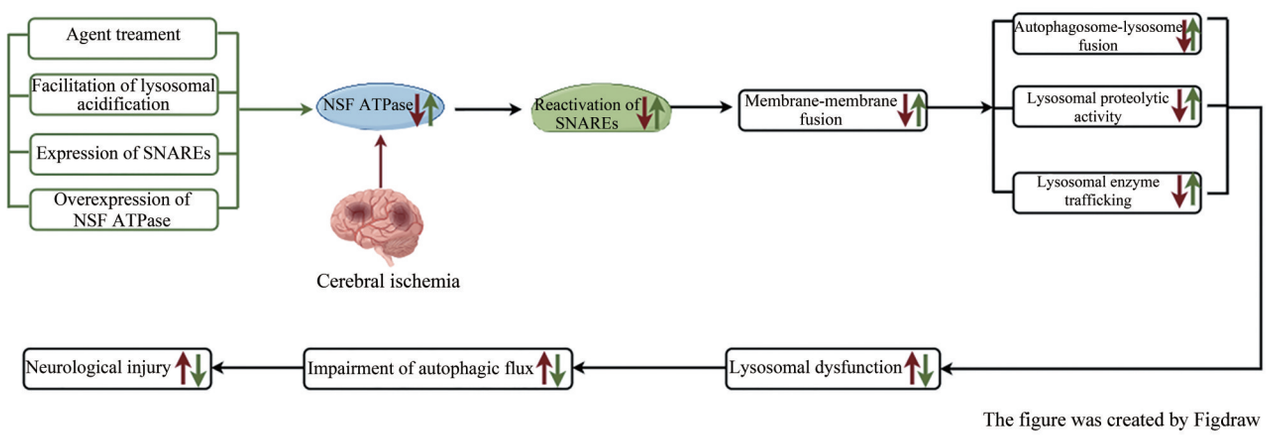
Pathological Mechanism of Neuronal Autophagy Flow Disturbance Caused by NSF ATPase Inactivation After Cerebral Ischemia*

LEI Qian[1)], DENG Yi-Hao[1)**], HE Hong-Yun[1,2)**]

([1)]*Department of Human Anatomy, Faculty of Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming* 650500, China;

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

Graphical abstract



The figure was created by Figdraw

Abstract Cerebral ischemic stroke is an acute cerebrovascular disease caused by cerebral vascular occlusion, and it is associated with high incidence, disability, and mortality rates. Studies have found that excessive or insufficient autophagy can lead to cellular damage. Autophagy consists of autophagosome formation and maturation, autophagosome-lysosome fusion, degradation and clearance of autophagic substrates within autolysosomes, and these processes collectively constitute autophagic flux. Research has revealed that cerebral ischemia can induce impaired fusion between autophagosomes and lysosomes, resulting in autophagic flux impairment. Intracellular membrane fusion is mediated by three core components: N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) ATPase, soluble NSF attachment protein (SNAP), and soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs). SNAREs, after mediating fusion between autophagosomes and lysosomes, remain in an inactive complex state on the autolysosomal membrane, requiring NSF reactivation into monomers to perform subsequent rounds of membrane fusion-mediated functions. NSF is the sole ATPase capable of reactivating SNAREs. Recent studies have shown that cerebral ischemia significantly inhibits NSF ATPase activity, reducing its reactivation of

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (82160240, 82160241, 81960418) and The youth project of "Xingdian Talent Support Plan" in Yunnan Province (YNWR-QNBJ-2018-034).

** Corresponding author.

DENG Yi-Hao. Tel：86-18487174860，E-mail：deng13032871868@163.com

HE Hong-Yun. Tel：86-18487158200，E-mail：511869324@qq.com

Received：May 8，2023 Accepted：September 13，2023

SNAREs. This may be a pathological mechanism for impaired fusion between autophagosomes and lysosomes, leading to neuronal autophagic flux impairment. This article discusses the pathological mechanisms of NSF ATPase inactivation, including SNAREs dysregulation, impaired fusion between autophagosomes and lysosomes, and insufficient transport of proteolytic enzymes to lysosomes, and explores approaches to improve neuronal autophagic flux through NSF ATPase reactivation. It provides references for stroke treatment improvement and points out directions for further research.

Key words ischemic stroke, NSF ATPase, autophagy, neuron, autophagy flow disorder
DOI：10.16476/j.pibb.2023.0180