

腺苷酸激活蛋白酶介导糖尿病大鼠心肌线粒体自噬的机制与 TSC2 的关系研究

宋春晖¹, 纪云西², 龚志刚³

(1. 江西师范大学生命科学学院, 南昌 330022; 2. 浙江中医药大学附属浙江省中医院中医内科, 杭州 310006;

3. 江西师范大学体育学院, 南昌 330022)

【摘要】目的:探讨腺苷酸激活蛋白酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)介导糖尿病大鼠心肌线粒体自噬的机制与结节性硬化复合物-2(tuberous sclerosis complex-2, TSC2)的关系。**方法:**成年雄性 SD 大鼠 30 只, 随机分为对照组、模型组、模型+AMPK 激动剂 AICAR 组(AICAR 组)。采用腹腔注射链脲佐菌素建立大鼠糖尿病大鼠模型。AICAR 组大鼠连续皮下注射 AICAR 12 周。采用超声诊断仪检测所有大鼠的心功能:左室舒张末期容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左室收缩末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、心率(heart rate, HR)、舒张早期血流峰值速度(peak velocity of early diastolic flow, E)、舒张晚期血流峰值速度(peak velocity of late diastolic flow, A)、E/A。取心肌组织, 采用免疫共沉淀法检测 AMPK 和 TSC2 的结合水平; Western blot 检测 AMPK、TSC2、p-TSC2、LC3-II、LC3-I、Beclin-1 和 P62 蛋白的表达水平。**结果:**AICAR 组 LVEDV、LVEF、E 和 E/A 均高于模型组, 而 A 低于模型组($P=0.004$, $P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.011$, $P=0.027$); AICAR 组 AMPK 和 TSC2 蛋白表达水平高于模型组(0.71 ± 0.06 vs. 0.36 ± 0.09 , $P=0.003$; 0.80 ± 0.02 vs. 0.40 ± 0.05 , $P=0.017$); AICAR 组结合水平高于模型组(0.49 ± 0.09 vs. 0.23 ± 0.03 , $P=0.002$); AICAR 组 p-TSC2 蛋白水平高于模型组(1.48 ± 0.07 vs. 0.92 ± 0.07 , $P=0.029$); AICAR 组 LC3-II/LC3-I、Beclin-1 和 P62 均高于模型组($P<0.05$)。**结论:**AMPK 介导糖尿病大鼠心肌线粒体自噬的机制可能与其对 TSC2 的磷酸化作用有关。

【关键词】糖尿病大鼠; 线粒体自噬; 腺苷酸激活蛋白酶; 结节性硬化复合物-2; 心功能

【中图分类号】R587.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-03-19

Relationship between the mechanism of AMPK-mediated myocardial mitochondrial autophagy and TSC2 in diabetic rats

Song Chunhui¹, Ji Yunxi², Gong Zhigang³

(1. College of Life Science, Jiangxi Normal University; 2. Department of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine;

3. College of Physical Education, Jiangxi Normal University)

【Abstract】Objective: To investigate the relationship between the mechanism of AMP-activated-protein-kinase (AMPK)-mediated myocardial mitochondrial autophagy and tuberous sclerosis complex-2 (TSC2) in diabetic rats. **Methods:** Thirty adult male SD rats were randomly divided into control group, model group, and model group + AMPK agonist AICAR group (AICAR group). The diabetic rat model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin. Rats in the AICAR group were subcutaneously injected with AICAR for 12 weeks. Cardiac function of all rats was measured by echocardiography, including left ventricular end-diastolic volume (LVEDV), left ventricular end-systolic volume (LVESV), left ventricular ejection fraction (LVEF), heart rate (HR), peak velocity of early diastolic flow (E), peak velocity of late diastolic flow (A), and E/A. The myocardial tissue was taken to detect the binding levels of AMPK and TSC2 by immunoprecipitation and the expression levels of AMPK, TSC2, p-TSC2, LC3-II, LC3-I, Beclin-1 and P62 were detected by Western blot. **Results:** The levels of LVEDV, LVEF, E and E/A in AICAR group were higher than those in the model

作者介绍: 宋春晖, Email: 30826411@qq.com,

研究方向: 糖尿病及其慢性并发症的防治研究。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81560766, 81360537)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190917.1132.046.html>

(2019-09-18)

group, but A was lower than that in the model group ($P=0.004$, $P=0.001$, $P=0.000$, $P=0.011$, $P=0.027$). The levels of AMPK and TSC2 protein in AICAR group were higher than those in the model group (0.71 ± 0.06 vs. 0.36 ± 0.09 , $P=0.003$; 0.80 ± 0.02

vs. 0.40 ± 0.05 , $P=0.017$). The binding level of AICAR group was higher than that in the model group (0.49 ± 0.09 vs. 0.23 ± 0.03 , $P=0.002$), and the level of p-TSC2 protein in AICAR group was higher than that in the model group (1.48 ± 0.07 vs. 0.92 ± 0.07 , $P=0.029$). The levels of LC3-II/LC3-I, Beclin-1 and P62 in AICAR group were higher than those in model group ($P<0.05$).

Conclusion: The mechanism of AMPK-mediated myocardial mitochondrial autophagy in diabetic rats may be related to its phosphorylation to TSC2.

[Key words] diabetic rats; mitochondrial autophagy; AMP-activated protein kinase; nodular sclerosis complex-2 (TSC2); cardiac function

近年来,随着人口老龄化及饮食结构的变化,糖尿病的患病率呈逐渐上升趋势。目前全世界糖尿病患病人数约 4.2 亿,推测到 2040 年可达 6.42 亿^[1]。临床上,一半以上的糖尿病患者死于糖尿病心血管并发症,其中以糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)多见,可导致患者因心衰致死^[2]。DCM 的发病机制目前尚未明了。已有研究表明,糖脂代谢异常、自主神经病变、胰岛素抵抗、氧化应激、免疫炎症和线粒体损伤等均参与了 DCM 的发生发展^[3-4]。近年来,越多的研究证实,糖尿病患者心肌中线粒体结构和功能出现异常,导致线粒体糖脂代谢紊乱、氧化应激损伤、线粒体依赖性凋亡途径激活等,进而引起心肌损伤^[5]。腺苷酸激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是一种蛋白激酶,激活后可以增加心肌组织对葡萄糖的摄取,并增强脂肪酸的氧化。既往研究发现,AMPK 在增加 ATP 合成及减少 ATP 消耗的同时,也能调节线粒体的功能和生物合成,通过多种途径参与缺氧心肌的保护。AMPK 信号通路在 DCM 的发生发展中起到重要作用^[6]。Wu 等^[7]发现,高血糖可以通过促进线粒体相关内质网膜抑制 AMPK,以诱导 DCM 的发生。AMPK 也能促进自噬的发生,当细胞发生氧化应激时促进细胞存活。目前关于 AMPK 对 DCM 心肌线粒体自噬的影响鲜有报道。结节性硬化复合体-2(tuberous sclerosis complex-2, TSC2)是细胞蛋白质合成相关信号通路的一个重要信号分子,在自噬过程中发挥正调节作用。Liu 等^[8]发现,高压氧可以通过调控蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/TSC2/雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路诱导自噬,进而减轻神经性疼痛。本研究观察了 AMPK 在 DCM 线粒体自噬中的作用,并且探讨了 AMPK 与 TSC2 的关系,旨在寻找 DCM 发病的新机制,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性 SD 大鼠 30 只,体质量(300 ± 20) g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,在温度为(21 ± 1) °C、湿度为(50 ± 5)%、明暗周期为 12 h/12 h 的环境中饲养,允许自由摄食和饮水。

1.2 动物模型的建立及干预

所有大鼠适应性喂养 1 周后,随机分为对照组、模型组、模型+AMPK 激动剂 AICAR 组(AICAR 组),每组各 10 只。对照组用基础饲料进行喂养,模型组的建立参考既往相关文献^[9]:喂食高脂饮食诱导胰岛素抵抗,1 周后采用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ; 30 mg/kg 溶于 0.1 mol/L 的枸橼酸钠缓冲液)进行腹腔注射,破坏大鼠部分胰岛 β 细胞功能。STZ 购于上海萌芽生物科技有限公司,注射完成 72 h 后采用尾静脉取血方式,用血糖仪测量血糖,以空腹血糖 >7.1 mmol/L 和餐后血糖 ≥ 11.1 mmol/L 者为 2 型糖尿病造模成功。模型建好后,连续对 AICAR 组大鼠皮下注射 AICAR[0.5 mg/(kg·d),美国 GLP BIO]12 周^[10]。

1.3 方法

1.3.1 心功能指标检测 采用美国 GE VIXID 高分辨率成像系统超声诊断仪检测所有大鼠的心功能。将超声探头(15 MHz)置于胸骨左缘,与胸骨中线成 30°角,电脑屏幕显示大鼠左室长轴切面,将探头顺时针旋转 90°,显示左室短轴切面。观察左室舒张末期容积(left ventricular end-diastolic volume, LVEDV)、左室收缩末期容积(left ventricular end-systolic volume, LVESV)、左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、心率(heart rate, HR)、舒张早期血流峰值速度(peak velocity of early diastolic flow, E)、舒张晚期血流峰值速度(peak velocity of late diastolic flow, A)、E/A。

1.3.2 心肌组织 AMPK 和 TSC2 蛋白表达水平的检测 心功能检测结束后,采用颈椎脱臼法处死大鼠,取新鲜心肌组织,组织匀浆中加入蛋白裂解液,冰上裂解 25 min 后,15 000 r/min 离心 15 min,将上清液转移至 EP 管中。样品中加入 SDS 缓冲液煮沸 5 min 使蛋白变性。经凝胶电泳(SDS-PAGE)后将

蛋白转移至 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭 1 h,孵育一抗,4 ℃过夜,弃去一抗,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。室温孵育二抗 2 h,弃去二抗,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min。ECL 显色,以 actin 作为内参,计算目的蛋白条带与 actin 的灰度比值。

1.3.3 AMPK 和 TSC2 结合水平的检测 采用免疫共沉淀法检测 AMPK 与 TSC2 结合水平^[11],采用碧云天 Protein A+G Agarose 试剂盒,向样品中加入 1 μg AMPK 一抗,4 ℃缓慢摇动过夜,加入 25 μL Protein A+G,摇动 3 h,捕获蛋白复合物。2 500 r/min 离心 5 min,去上清液。500 μL PBS 洗沉淀 5 次。最后 1 次洗后去除上清液,加入 30 μL SDS-PAGE 缓冲液,瞬时离心。沸水浴 5 min 后,用 8%SDS-PAGE 分离 AMPK 和 TSC2。随后步骤同 Western blot,AMPK 和 TSC2 蛋白以灰度比值表示。

1.3.4 TSC2 磷酸化水平的检测 采用 Western blot 检测 p-TSC2,步骤同 1.3.2。

1.3.5 自噬相关蛋白的检测 采用 Western blot 检测心肌组织微管相关蛋白 1 轻链 3 II (microtubule-associated protein 1 light chain 3 II,LC3-II)、LC3-I、Beclin-1 和 P62 蛋白的表达水平,步骤同 1.3.2。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据分析。正态计量数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组资料间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

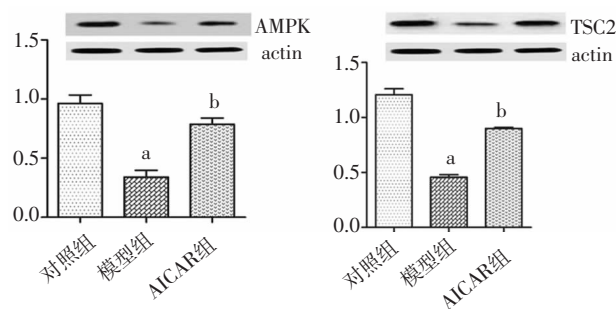
2 结果

2.1 心功能指标的比较

模型组 LVEDV、LVEF、HR、E 和 E/A 均低于对照组 (均 $P=0.000$),而 A 高于对照组 ($P=0.000$)。AICAR 组 LVEDV ($P=0.004$)、LVEF ($P=0.001$)、E ($P=0.000$) 和 E/A ($P=0.011$) 均高于模型组,而 A 低于模型组 ($P=0.027$)。见表 1。

2.2 心肌组织 AMPK 和 TSC2 蛋白表达水平

模型组心肌 AMPK 和 TSC2 蛋白表达水平明显低于对照组 (0.36 ± 0.09 vs. 0.86 ± 0.10 , $F=10.380$, $P=0.000$; 0.40 ± 0.05 vs. 1.27 ± 0.11 , $F=18.321$, $P=0.000$),AICAR 组 AMPK 和 TSC2 蛋白表达水平高于模型组 (0.71 ± 0.06 vs. 0.36 ± 0.09 , $P=0.003$; 0.80 ± 0.02 vs. 0.40 ± 0.05 , $P=0.017$)。如图 1 所示。



A. 心肌组织 AMPK

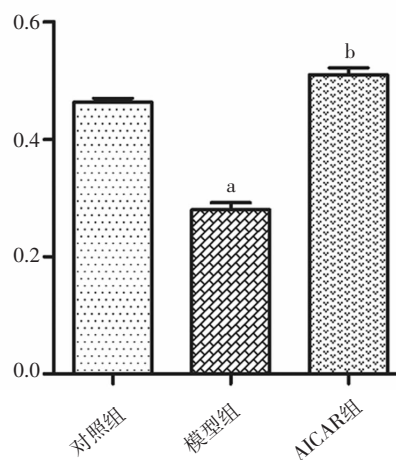
B. 心肌组织 TSC2

注:a,与对照组比, $P<0.05$;b,与模型组比, $P<0.05$

图 1 蛋白表达水平的比较 ($n=5$)

2.3 AMPK 和 TSC2 结合水平

模型组 AMPK 和 TSC2 结合水平明显低于对照组 (0.23 ± 0.03 vs. 0.42 ± 0.01 , $F=4.280$, $P=0.021$),AICAR 组结合水平高于模型组 ($P=0.002$)。如图 2 所示。



注:a,与对照组比, $P<0.05$;b,与模型组比, $P<0.05$

图 2 免疫共沉淀法检测 AMPK 和 TSC2 结合水平 ($n=5$)

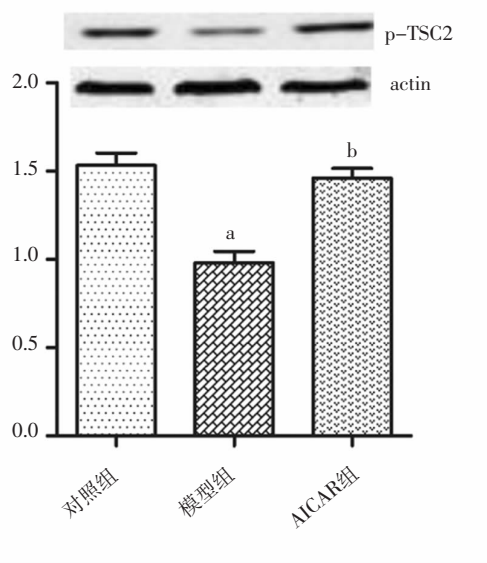
2.4 TSC2 磷酸化水平的检测

模型组 p-TSC2 蛋白水平明显低于对照组 (0.92 ± 0.07 vs. 1.53 ± 0.08 , $F=3.312$, $P=0.041$),AICAR 组 p-TSC2 蛋白水平高于模型组 ($P=0.029$)。如图 3 所示。

表 1 3 组心功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LVEDV(μL)	LVESV(μL)	LVEF(%)	HR(次/min)	E(cm/s)	A(cm/s)	E/A
对照组	326.35 ± 26.35	106.24 ± 14.35	75.24 ± 5.34	345.26 ± 32.51	1335.24 ± 32.01	912.36 ± 27.31	1.42 ± 0.15
模型组	300.24 ± 34.25 ^a	118.37 ± 11.57	63.24 ± 8.34 ^a	251.39 ± 24.67 ^a	1140.27 ± 26.42 ^a	1002.38 ± 20.00 ^a	1.11 ± 0.10 ^a
AICAR组	333.24 ± 28.64 ^b	113.27 ± 20.01	74.21 ± 4.00 ^b	258.34 ± 22.37	1304.36 ± 22.41 ^b	934.58 ± 24.25 ^b	1.35 ± 0.08 ^b
F 值	10.236	8.642	7.264	9.364	20.364	19.368	9.945
P 值	0.002	0.024	0.038	0.019	0.000	0.000	0.018

注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b,与模型组比较, $P<0.05$



注:a,与对照组比, $P<0.05$;b,与模型组比, $P<0.05$

图3 TSC2 磷酸化水平的比较 ($n=5$)

2.5 自噬相关蛋白表达水平

模型组 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ($P=0.013$)、Beclin-1 ($P=0.037$) 和 P62 ($P=0.010$) 均低于对照组, AICAR 组 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ ($P=0.000$)、Beclin-1 ($P=0.000$) 和 P62 ($P=0.022$) 均高于模型组 (表2, 图4)。

表2 3组自噬相关蛋白表达水平的比较

组别	LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ	Beclin-1	P62
对照组	0.68 ± 0.15	0.98 ± 0.14	0.85 ± 0.11
模型组	0.42 ± 0.14^a	0.68 ± 0.25^a	1.58 ± 0.27^a
AICAR组	0.81 ± 0.21^b	1.21 ± 0.24^b	1.01 ± 0.17^b
F 值	6.012	6.994	5.003
P 值	0.021	0.010	0.036

注:a,与对照组比较, $P<0.05$;b,与模型组比较, $P<0.05$

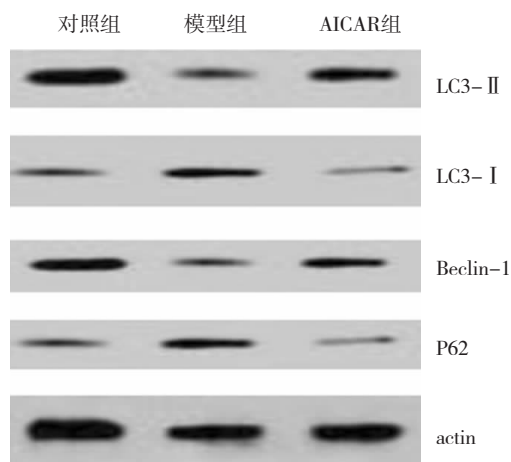


图4 3组自噬相关蛋白表达水平的比较 ($n=5$)

3 讨论

DCM 是糖尿病常见的心血管并发症之一,可表现为心肌细胞肥大、心肌间质纤维化、舒张功能障碍。如果不能积极治疗,最终可能发展为充血性心力衰竭^[4]。血糖水平异常升高可导致微血管内皮功能异常、心肌代谢紊乱和胰岛素信号传导障碍,是糖尿病心肌重构和心脏功能异常的使动环节^[4,12]。心肌细胞氧化应激、凋亡、炎症、纤维化和能量代谢障碍是 DCM 发生发展的重要机制^[4,13]。线粒体是大部分真核生物的细胞器,可介导凋亡过程。线粒体自噬指细胞通过自噬程序,特异性地选择降解受损的线粒体^[14]。近年来,越来越多的研究证实线粒体自噬与 DCM 的发病有关^[15]。

本研究中,模型组 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 和 Beclin-1 降低, P62 升高,说明糖尿病大鼠心肌发生自噬现象。而心肌 AMPK 表达下降,说明糖尿病大鼠心肌线粒体自噬导致的心功能下降可能与 AMPK 表达下调有关。既往研究发现,线粒体功能障碍时可以通过选择性自噬清除受损的线粒体,这一过程可被 AMPK 正向调节^[16]。Xie 等^[17]发现,糖尿病小鼠心脏自噬程度降低,二甲双胍可以通过恢复 AMPK 活性增强自噬。本研究采用超声检查证实大鼠心功能明显下降。LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ、Beclin-1 和 P62 是检测自噬水平的常用指标^[18]。AMPK 可以通过抑制 mTOR1 或磷酸化 ULK1 诱导自噬,表现为 LC3-Ⅱ/LC3-Ⅰ 明显升高^[19]。Beclin-1 参与自噬体形成的早期阶段,当自噬发生时其表达水平明显升高;P62 与细胞质中 LC3-Ⅱ 形成复合物,可被自噬溶酶体降解,进而使 P62 表达水平下降^[20-21]。本研究发现,采用 AMPK 激动剂 AICAR 对糖尿病大鼠进行干预,随后心肌线粒体自噬水平升高,说明 AMPK 在大鼠心肌线粒体自噬中发挥重要作用,这与鞠胜杰等^[22]报道一致。

既往关于 AMPK 介导线粒体自噬机制的研究较少。TSC2 是细胞蛋白质合成相关信号通路的一个重要信号分子,在自噬过程中发挥正调节作用。Liu 等^[8]发现,高压氧可以通过调控 Akt/TSC2/mTOR 通路诱导自噬,进而减轻神经性疼痛。既往研究发现, TSC2 与神经细胞线粒体自噬的发生有关^[23]。而 TSC2 与心肌线粒体自噬的关系鲜有报道。磷酸化是 TSC2 的活性形式, p-TSC2 表达水平的高低伴随

着自噬水平的降低或者紊乱^[24]。本研究采用免疫共沉淀法检测 AMPK 和 TSC2 结合水平,以反映 TSC2 磷酸化水平。本研究发现,模型组糖尿病大鼠 AMPK 和 TSC2 表达水平下降,且 TSC2 磷酸化水平同样降低。而给予 AMPK 激动剂 AICAR 后,TSC2 和 p-TSC2 表达水平升高,并且大鼠心功能明显改善,自噬蛋白表达水平的紊乱也随之逆转。这就表明 AMPK 介导糖尿病大鼠心肌线粒体自噬的机制与 TSC2 磷酸化作用有关。但是本研究未采用 AMPK 抑制剂进行干预,因此 AMPK 调控自噬与 TSC2 磷酸化的关系需要进一步研究来证实。

综上所述,AMPK 介导糖尿病大鼠心肌线粒体自噬的机制可能与其对 TSC2 的磷酸化作用有关。

参 考 文 献

- [1] Ogurtsova K, da Rocha Fernandes JD, Huang Y, et al. IDF diabetes atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 128(1): 40–50.
- [2] Hegyi B, Bers DM, Bossuyt J. CaMKII signaling in heart diseases: emerging role in diabetic cardiomyopathy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2019, 127: 246–259.
- [3] Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia- and insulin-resistance-induced heart disease[J]. *Diabetologia*, 2018, 61(1): 21–28.
- [4] Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity[J]. *Circ Res*, 2018, 122(4): 624–638.
- [5] Zhou H, Yue Y, Wang J, et al. Melatonin therapy for diabetic cardiomyopathy: a mechanism involving Syk-mitochondrial complex I-SERCA pathway[J]. *Cell Signal*, 2018, 47: 88–100.
- [6] 张景怡, 鲍翠玉, 李 晶. AMPK 信号通路在糖尿病心脏病中的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2017, 33(11): 1496–1499.
- [7] Wu S, Lu Q, Ding Y, et al. Hyperglycemia-driven inhibition of amp-activated protein kinase $\alpha 2$ induces diabetic cardiomyopathy by promoting mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes in vivo[J]. *Circulation*, 2019, 139(16): 1913–1936.
- [8] Liu YD, Wang ZB, Han G, et al. Hyperbaric oxygen relieves neuropathic pain through AKT/TSC2/mTOR pathway activity to induce autophagy[J]. *J Pain Res*, 2019, 12: 443–451.
- [9] Guo S, Meng XW, Yang XS, et al. Curcumin administration suppresses collagen synthesis in the hearts of rats with experimental diabetes[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2018, 39(2): 195–204.
- [10] Jiang SJ, Dong H, Li JB, et al. Berberine inhibits hepatic gluconeogenesis via the LKB1-AMPK-TORC2 signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(25): 7777–7785.
- [11] Booth L, Roberts JL, Poklepovic A, et al. PDE5 inhibitors enhance the lethality of pemetrexed through inhibition of multiple chaperone proteins and via the actions of cyclic GMP and nitric oxide[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1449–1468.
- [12] Gimenes R, Gimenes C, Rosa CM, et al. Influence of apocynin on cardiac remodeling in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2018, 17(1): 15.
- [13] 刘 涛, 李 晶, 鲍翠玉. 线粒体损伤与糖尿病心脏病发病关系的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(4): 456–458.
- [14] Rodger CE, McWilliams TG, Ganley IG. Mammalian mitophagy—from *in vitro* molecules to *in vivo* models[J]. *FEBS J*, 2018, 285(7): 1185–1202.
- [15] Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852(2): 252–261.
- [16] Zhao H, Chen S, Gao K, et al. Resveratrol protects against spinal cord injury by activating autophagy and inhibiting apoptosis mediated by the SIRT1/AMPK signaling pathway[J]. *Neuroscience*, 2017, 348: 241–251.
- [17] Xie Z, Lau K, Eby B, et al. Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice[J]. *Diabetes*, 2011, 60(6): 1770–1778.
- [18] Hou Z, Zhou Y, Yang H, et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor activation protects against myocardial reperfusion injury through modulation of autophagy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500(2): 357–364.
- [19] Wang J, Qi Q, Feng Z, et al. Berberine induces autophagy in glioblastoma by targeting the AMPK/mTOR/ULK1-pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(41): 66944–66958.
- [20] Huang R, Liu W. Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy[J]. *Autophagy*, 2015, 11(5): 852–853.
- [21] Ebrahimi-Fakhari D, Saffari A, Wahlster L, et al. Using tuberous sclerosis complex to understand the impact of mTORC1 signaling on mitochondrial dynamics and mitophagy in neurons[J]. *Autophagy*, 2017, 13(4): 754–756.
- [22] 鞠胜杰, 李焱波, 蹇 朝, 等. NEDD4 调控 AMPK 活性参与心肌细胞慢性缺氧适应的研究[J]. *第三军医大学学报*, 2015, 37(9): 891–895.
- [23] Yu J, Parkhitko A, Henske EP. Autophagy: an ‘Achilles’ heel of tumorigenesis in TSC and LAM[J]. *Autophagy*, 2011, 7(11): 1400–1401.
- [24] Di Nardo A, Wertz MH, Kwiatkowski E, et al. Neuronal Tsc1/2 complex controls autophagy through AMPK-dependent regulation of ULK1[J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(14): 3865–3874.

(责任编辑: 冉明会)