

自噬对再生中肌肉干细胞的作用

陈伟^{1, 2, 3, 4} 陈雨诗^{1, 2, 3, 4} 刘禹熙^{1, 2, 3, 4} 王新霞^{1, 2, 3, 4*}

(¹浙江大学动物科学学院, 杭州 310058; ²浙江大学教育部“动物分子营养学”重点实验室, 杭州 310058; ³农业农村部(华东)动物营养与饲料重点实验室, 杭州 310058; ⁴浙江省饲料与动物营养重点实验室, 杭州 310058)

摘要 各种遗传缺陷、实质性组织损伤或外源性信号的改变均可引起骨骼肌肌肉组织的损伤, 并导致各种原发性或继发性肌病。因此, 了解肌肉再生中的生理过程和相关分子机制将有助于更有效的组合治疗策略。自噬最初被认为是营养物质分解的机制, 随后的研究进一步发现自噬也是一种降解细胞质成分、蛋白质聚集体和细胞器的生理过程, 是细胞结构的调节器, 广泛参与细胞应激和分化过程。对自噬抑制的研究表明了自噬对成功的肌肉再生是必不可少的, 其中一个关键机制是影响肌肉干细胞(muscle stem cells, MuSCs)的分化命运。因此, 了解自噬在其中的作用将有助于更有效的临床治疗。在此, 该文回顾了近年来有关自噬对肌肉再生中的MuSCs作用的文献, 为通过调节自噬治疗再生缺陷性肌病提供相关参考。

关键词 自噬; 肌肉干细胞; 再生; 分化

The Role of Autophagy on Muscle Stem Cells during Regeneration

CHEN Wei^{1,2,3,4}, CHEN Yushi^{1,2,3,4}, LIU Yuxi^{1,2,3,4}, WANG Xinxia^{1,2,3,4*}

(¹College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

²Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition (Zhejiang University), Ministry of Education, Hangzhou 310058, China;

³Key Laboratory of Animal Nutrition and Feed Science (Eastern of China), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Hangzhou 310058, China; ⁴Key Laboratory of Animal Feed and Nutrition of Zhejiang Province, Hangzhou 310058, China)

Abstract Various hereditary defects, substantial tissue damage, or alterations in extrinsic signalling could impair the regeneration of muscle tissue and lead to various primary or secondary myopathies. Therefore, understanding the physiological processes and related molecular mechanisms in muscle regeneration will contribute to more effective combined treatment strategies. Autophagy was initially considered as the mechanism of nutrient decomposition. Subsequent studies further find that autophagy is also a physiological process of degrading cytoplasmic components, protein aggregates and organelles, which is a regulator of cell structure and widely participates in the process of cell stress and differentiation. The studies of autophagy inhibition show that autophagy is essential for successful muscle regeneration, and one of the key mechanisms is to affect the differentiation fate of MuSCs (muscle stem cells). Therefore, understanding the role of autophagy will contribute to more effective clinical treatment. Here, this article reviews the literature on the role of MuSCs in muscle regeneration by autophagy in recent years, so as to provide relevant references for the treatment of regeneration deficient myopathy by regulating autophagy.

Keywords autophagy; muscle stem cells; regeneration; differentiation

收稿日期: 2021-10-19

接受日期: 2021-12-15

国家重点研发计划(批准号: 2018YFD0500405)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0571-88982128, E-mail: xinxiawang@zju.edu.cn

Received: October 19, 2021

Accepted: December 15, 2021

This work was supported by the the National Key Research and Development Program (Grant No.2018YFD0500405)

*Corresponding author. Tel: +86-571-88982128, E-mail: xinxiawang@zju.edu.cn

骨骼肌占全身重量的30%~40%, 是人体比例最大的器官^[1]。然而, 各种遗传缺陷、实质性组织损伤或外源性信号改变都会导致肌肉组织的损伤和随后的再生修复。肌肉不能正常再生会对机体产生严重影响, 这在一些肌病中尤其明显, 如Duchenne肌营养不良症^[2]。在这个过程中, 肌肉干细胞(muscle stem cells, MuSCs)获得了最多的关注。因此, 肌肉再生中的MuSCs分化过程一直是一个值得深入研究的领域。

自噬(mitophagy)是指一系列严格调控的分解代谢过程, 所有这些过程都将细胞质成分运输到溶酶体进行降解。作为一种受环境、激素和其他因素影响的高度可诱导的动态代谢过程, 自噬能够在代谢应激等条件下驱动细胞快速反应^[3]。最近的研究表明, 自噬在肌肉损伤后被激活, 并在肌肉再生中起着关键作用^[2-3]。此外, 药物激活的自噬已被证明可以改善某些再生缺陷性肌病, 这表明自噬在调节肌肉再生方面具有巨大的临床潜力^[2]。

1 自噬生物学过程和机制

经典的降解性自噬(又称巨自噬, macroautophagy)通常会由各种应激条件如饥饿、缺氧、氧化应激、蛋白质聚集、内质网应激等引起。这些应激条件的共同目标是Unc-51样激酶1(Unc-51-like kinase 1, ULK1)复合物, 其激活后通过磷酸化III类磷脂酰肌醇激酶复合物(phosphorylating components of the class III PI3K, PI3KC3)来触发吞噬囊泡的初始成核(nucleation)过程^[3]。随后, PI3KC3复合物磷酸化磷脂酰肌醇, 并在粗面内质网中生成磷脂酰肌醇-3-磷酸(phosphatidylinositol-3-phosphate, PI3P), 这是自噬启动的重要早期事件^[4]。最新研究表明, 这种吞噬囊泡的成核过程还需要自噬相关蛋白9A(autophagy-related protein 9A, ATG9A)作为一种膜形成的种子^[5]。ATG8家族成员负责随后的吞噬囊泡的膜扩张过程, 新生的微管相关蛋白1A/1B-轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3, 酵母ATG8的哺乳动物同源物)在其C-端被半胱氨酸蛋白酶ATG4处理, 形成细胞质LC3-I。LC3-I暴露出的甘氨酸残基有助于其与磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)的结合, 并进一步将LC3-I转化为LC3-II(自噬膜的特征信号)^[3]。ATG8不仅可以进一步募集含有LC3相互作用区的自噬机制成分, 而且对吞噬细胞膜的密封也是必需的^[6]。此外, ATG9A还参与自噬体形成

过程中的脂质紊乱和维持质膜完整性, 以促进膜扩张^[7]。随着吞噬囊泡的扩张和封闭, 自噬体经历成熟和融合, 包括从新生自噬体外膜逐渐清除ATG并与溶酶体融合形成自噬溶酶体。这种融合过程需要多种膜动力学调节器的协同作用, 包括SNAREs复合物(soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)、束缚蛋白和RAB GTPases, 以及自噬体和晚期内体/溶酶体的相互转运^[8]。最后, 溶酶体中的酸性水解酶降解自噬物质, 回收的营养物质被释放回细胞质, 在细胞质中被细胞再次利用并发挥多种生物学功能。

2 MuSCs在肌肉再生中的作用

骨骼肌纤维的初始形成发生在胚胎期和新生儿期, 而成年后的肌发生是一种受损后的再生反应。作为主要的运动器官, 骨骼肌主要由肌原纤维组成, 肌原纤维束进一步形成肌纤维。MuSCs则位于肌纤维内膜和肌膜之间, 其对肌肉内稳态和再生至关重要^[9]。

在稳态肌肉中, MuSCs通常处于具有可逆细胞周期抑制的休眠状态。在轻微(如拉伤、拉伸或运动)或严重(如创伤或退行性肌肉疾病)的肌肉损伤后, 成熟肌纤维往往会由于机械损伤或组织微环境的改变而发生降解, 此时生态位信号的改变会激活MuSCs并促进其重新进入细胞周期进而产生肌活动。激活的MuSCs会经历能量代谢模式的转变, 以增加生物合成活性和细胞增殖, 从而提供足够的后代来支持肌肉再生^[9]。在此期间MuSCs的肌源性转录因子MyoD1和Myf5的表达量也会增加, 这些激活的MuSCs经历增殖部分分化形成成肌细胞, 并与现有纤维融合, 与其他单核肌细胞融合形成新的再生肌纤维^[10]。此外, 损伤部位的信号会引发再生生态位微环境的改变, 这会影响MuSCs在不同再生阶段的功能。例如, MuSCs的激活不仅受其自身的内源性基因表达调控, 还会受到损伤过程中组织间的其他支持细胞, 包括巨噬细胞、成纤维成脂祖细胞、内皮细胞等的影响^[11]。这些支持细胞在再生过程中被有序调控, 程序性增殖和退化。而一旦组织再生完成, 骨骼肌恢复稳态, MuSCs重新进入静止状态, 并重新建立在损伤之前运作的机制。因此, MuSCs作为肌肉再生的核心因素, 深入解析其在肌肉损伤后的功能和分子机制是十分必要的。

3 自噬对肌肉再生的影响

第一个将自噬与肌肉再生联系起来的证据来自于运动后对骨骼肌纤维创伤和修复的研究。1984年, SALMINEN等^[12]首次发现, 在剧烈运动后, 坏死肌纤维附近和再生肌纤维中心都产生了许多自噬空泡。因此, 他们提出一个假设: 肌肉损伤后自噬活性的增加可能与肌纤维的再生密切相关^[12]。在随后的几十年中, 自噬已被证明是骨骼肌及时再生的一个必要细胞过程。其中, 最直接的证据是抑制自噬后, 骨骼肌损伤后的再生延迟。作为PI3KC3复合物的抑制剂——3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)可以特异性阻断自噬体的形成。用3-MA治疗肌毒损伤小鼠会导致小鼠肌肉力量恢复受损和线粒体酶活性降低^[13]。氯喹(chloroquine, CQ)可抑制溶酶体的酸化, 从而阻断自噬通量。与3-MA的结果类似, 用CQ阻断自噬的后期过程导致了肌损伤后肌节和肌核碎片的过度积聚, 并延缓了损伤后的再生速率^[14]。肌肉再生中自噬必要性的另一个证据是对自噬基因的敲除小鼠研究。例如, 骨骼肌特异性敲除*ULK1*会减弱肌肉损伤后小鼠线粒体网络和肌肉强度的恢复^[15]。此外, *ATG5*、*Becn1*和*ATG16l*的基因缺失都会导致肌肉损伤后自噬减弱, 并损害肌肉再生^[14,16]。

4 肌肉再生过程中MuSCs的自噬

4.1 MuSCs的静息状态的维持

在正常情况下, 骨骼肌由呈现稳定特性的细胞组成, 细胞更新较少, 此时MuSCs处于一种静止的稳态^[17]。当肌肉受到损伤或暴露于外界刺激时, 静止的MuSCs可以及时作出反应, 然后被激活重新进入细胞周期。活化的MuSCs开始表达肌生成因子MyoD1, 并迁移到损伤部位。激活的MuSCs在增殖后会经历对称分裂产生定向分化能力更强的成肌细胞(myoblasts), 或经历不对称分裂生成肌细胞和MuSCs。成肌细胞进一步分化形成新的肌纤维, 或者与受损的肌纤维融合; 部分新生的MuSCs则重新进入静息状态并补充肌肉组织干细胞库^[18-19]。由于骨骼肌再生的这种特点, 静止状态似乎是MuSCs在没有再生需求的情况下维持低活性干细胞特性的合理方式, 同时在功能上随时为未来的再生需求做好准备。

自噬对于维持各种干细胞的静止状态和正常

功能至关重要^[20]。静态MuSCs中也存在基础的自噬活性, 进一步研究发现, 静态MuSCs通过自噬积极维持细胞器和蛋白质的更新, 这对维持干细胞的静态十分重要^[21]。最近的文献表明, 老化的骨骼肌无法保持MuSCs的静止, MuSCs的数量和功能随着老化而下降^[22-23]。在老年小鼠中, p16^{INK4a}(也称为*Cdkn2a*)的去抑制通过抑制视网膜母细胞瘤(Rb)蛋白/E2F信号轴靶基因(如细胞周期相关基因*Cyclin A*、*Cyclin E*、*Mcm3*、*Lmnbl*和*Cdc6*等)的表达, 使静止的MuSCs转变为不可逆的衰老状态, 从而使其失去可逆的静止状态^[23]。生理衰老的MuSCs中的基础自噬失败或年轻肌肉中自噬的遗传损伤(*ATG7*基因敲除)会导致受损线粒体的积累, 并增加氧化应激, 从而导致更高水平的活性氧(reactive oxygen species, ROS)、Parkin(标记受损线粒体并通过自噬途径降解)和DNA损伤标记物。p16^{INK4a}可由自噬受损的肌肉中的ROS诱导, 这从而可导致MuSCs的老化和静息状态的破坏, 而自噬激活剂雷帕霉素可逆转这一过程。因此, ROS诱导的p16^{INK4a}-Rb/E2F信号轴与衰老肌肉中自噬受损和MuSCs的静息有关^[24]。

AMPK信号通路已被证明是细胞自噬或凋亡的有效调节器, 并在营养应激期间促进细胞存活^[25-26]。在衰老的肌肉细胞中, AMPK表达水平及其下游靶点p27^{Kip1}的磷酸化水平均降低, 由此产生的自噬抑制应激使肌肉细胞更容易发生凋亡。因此, AMPK/p27^{Kip1}通路可能调节肌肉细胞自噬和凋亡之间的平衡, 从而使它们保持稳定的静息状态^[27]。除了诱导自噬体外, 肌肉静止状态的维持也取决于最终的自噬体清除, 下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)参与了这一过程。HPG轴通过启动性类固醇激素的释放来控制发育、生殖和器官老化^[28-29]。最近的研究表明, 青春期内分泌的生理性增加促使MuSCs从增殖转化为静止, 而下丘脑老化会导致MuSCs的功能下降^[30]。在消除性激素信号后, 自噬体形成所必需的ATG5-12复合物没有显示任何差异, 而LC3、p62和多泛素化蛋白则会过度积累, 双荧光LC3报告质粒也显示出自噬体清除异常^[31]。自噬体的过度积累通常会导致ROS的积累, 从而使肌肉细胞获得类似于衰老的静止破坏状态。在机制上, 雄激素受体被招募到MuSCs *TFEB*(transcription factor EB)启动子中的雄激素反应元件, 从而激活*TFEB*及其靶基因的转录^[31]。作为调控溶酶体生物

发生的主要基因, *TFEB*是自溶酶体生物合成和自噬体降解所必需的^[32]。因此, HPG轴通过*TFEB*系统性地控制MuSCs中的自噬体清除, 从而减少ROS的积累, 并最终通过缓解ROS诱导的衰老来维持MuSCs的静止^[31]。

总之, 这些发现表明, 自噬通过诱导和清除自噬体来阻止MuSCs的衰老并维持静息状态, 从而维持MuSCs的再生干性。

4.2 MuSCs的激活和增殖

骨骼肌损伤后, MuSCs从静息状态中被激活重新进入细胞周期并开始增殖; 一些子细胞继续分化, 而另一些则恢复到静止状态以完成MuSCs的自我更新。随着肌源性转录因子表达水平的变化, 分化的肌细胞形成多核肌管, 并经历以终末分化和融合为主的再生阶段^[33]。从静止期激活的干细胞通过增殖产生后代, 这些后代将分化或自我更新, 并在每个阶段会有不同的生物能量需求^[34]。对多种干细胞类型的研究已经证实, 自噬在干细胞的静止、激活、分化和自我更新中起着关键作用^[35]。以往的研究表明, 自噬是在肌肉损伤后MuSCs激活过程中发挥诱导作用的。在体内和体外, MuSCs从静止状态激活后, 自噬通量增加, 并在增殖阶段增加更多^[36-37]。在自噬相关蛋白*ATG16L1*突变的小鼠中, 自噬通量减少但仍存在, 骨骼肌表现出再生受损。进一步研究发现, *ATG16L1*小鼠中未激活的MuSCs(*Pax7*⁺/*MyoD*⁻)比例较高, 而处于激活状态的MuSCs(*Pax7*⁺/*MyoD*⁺)和增殖状态的成肌细胞(*Pax7*⁺/*MyoD*⁺)的比例则较低, 这表明, 在*ATG16L1*突变小鼠中由于减弱的自噬会影响MuSCs的激活, 从而抑制肌肉的再生^[16]。

与处于G₀期的静息MuSCs相比, 激活的MuSCs和增殖的MuSCs含有更高水平的ATP含量和线粒体活性^[36,38]。因此, 自噬通量的增加可能有助于支持MuSCs激活和增殖过程中大量细胞能量的需求。自噬抑制剂(CQ或3-MA)对自噬的抑制作用或小干扰RNA处理(*ATG5*或*ATG7*)显著减少了MuSCs激活后重新进入细胞周期的数量, 并降低了ATP的产生水平和线粒体活性, 而这可以通过外源补充能量代谢物丙酮酸钠来部分回补^[36]。进一步的研究发现, 沉默调节信息因子1(*sirtuin1*, *SIRT1*)可能在MuSCs激活过程中介导了*ATG7*蛋白的脱乙酰化和AMPK磷酸化, 从而激活自噬和MuSCs。这些数据表明, *SIRT1*可能通过在从静止到激活的关键转变过程中

激活自噬, 以满足必要的生物能量需求^[36]。

4.3 MuSCs的分化和融合

先前的研究已经报道, 在体内和体外成肌细胞的分化过程中, 自噬信号(例如*SQSTM1/p62*表达水平降低和*ATG7*、*BECN1*、*ULK1*、*LC3B*表达水平升高)进一步被激活^[15,36,39-40]。在体外C2C12成肌细胞分化过程中, *JON*等^[41]发现, 尽管*ATG5-ATG12*复合物的表达量在肌源性分化过程中逐渐增加, 但*LC3*显示的自噬通量仅在分化早期(分化第1天)被激活。因此, 他们认为自噬是一种短暂的现象, 只有在分化的早期阶段自噬才被显著上调^[41]。然而, 更多的证据表明, 在体外成肌细胞的整个分化周期中, 自噬水平都是上调的^[15,39-40]。此外, *LC3-GFP*小鼠的活体数据也证实, 在体内肌损伤后的MuSCs激活和分化过程中, 自噬持续被激活, 并且在分化的再生肌纤维中显示出更高的自噬水平(肌纤维中心包含细胞核), 这表明自噬在成肌分化后期也被上调^[36]。随着研究的深入, 肌源性分化过程中自噬的必要性已被充分证明。自噬的破坏, 无论是在起始阶段、货物运输阶段还是溶酶体融合阶段, 都会抑制肌源性分化并损害肌肉损伤后的力量恢复。例如, 通过3-MA治疗或*ATG5*和*ATG7*基因敲除抑制自噬体的形成会损害成肌细胞分化, 并伴有线粒体功能障碍^[41]。当用*Baf-A1*(一种自噬抑制剂, 可以干扰自噬体和溶酶体的融合)处理成肌细胞时, 人们也可以观察到类似的效果^[40-41]。总之, 这些发现表明自噬对于肌源性分化是必要的, 其在成肌细胞分化和融合中的调节作用总结如下。

4.3.1 分化与融合中的线粒体重塑 成肌细胞主要依赖糖酵解来满足其静态代谢需要, 因此线粒体数量更为稀少。与成肌细胞相反, 成熟的肌管是一种代谢活跃的细胞类型, 严重依赖于氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)^[42]。为了满足这种高能量需求, 肌管包含大量排列成复杂网络的线粒体。因此, 原始成肌细胞分化为成熟肌管需要代谢转化, 以支持骨骼肌收缩增加的能量需求^[43]。自噬已被证明对细胞能量代谢模式的转变至关重要。肌源性分化过程中的线粒体更新已被证明是一个必要的过程。例如, 在体外诱导C2C12细胞的肌源性分化时, 线粒体生物发生途径如mTOR-过氧化物酶体增殖物激活受体γ辅激活因子1α(*peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α*,

PGC1 α)被激活^[44]。通过向小鼠骨骼肌注射肌肉诱导药物,成肌细胞分化的途径被激活,肌肉再生的过程往往伴随着线粒体生物发生的显著激活^[45-46]。这些事件导致线粒体蛋白质数量和线粒体DNA拷贝数在分化期间的增加。

目前的研究发现,成肌细胞不是简单地再生出偏向OXPHOS的线粒体,而是首先通过线粒体自噬清除原有糖酵解代谢模式的线粒体,然后再生出OXPHOS能力更强的线粒体^[41]。线粒体自噬作为一种选择性去除多余或受损线粒体的保守机制,已被证明在线粒体功能和生物发生中起着重要作用^[47]。在早期肌源性分化期间,自噬进一步上调,这与线粒体裂变关键蛋白1(dynamin 1 like, DNM1L)介导的线粒体网络断裂、线粒体蛋白含量下降和线粒体LC3B-II共定位增加等结果一致^[41]。自噬体和线粒体之间的高度共定位将有助于消除旧的线粒体网络^[48]。随着分化的进行,自噬通量逐渐降低,伴随着线粒体融合蛋白1(optic atrophy 1, OPA1)和线粒体生成关键因子PGC1 α 的表达上调。此时,线粒体含量显著增加,致密的线粒体网络形成OXPHOS^[41]。当自噬受到抑制时,例如通过干扰ATG7,线粒体和自噬体的共定位减少,这损害了线粒体网络的重建并抑制成肌细胞的分化。与在干扰ATG7的成肌细胞中观察到的效果一致,当线粒体自噬的关键调节因子BNIP3被敲除时,也会出现类似的现象^[40]。经Baf-A1处理的成肌细胞在分化早期也经历线粒体断裂,但未能重建其网络,并且大量自噬体一直堆积到分化后期。与对照组相比, Baf-A1处理组的线粒体再生的情况很少。总之,这些数据表明,在早期分化过程中诱导自噬和完整的自噬通量似乎是线粒体网络重建和肌管形成所必需的^[41]。

除了线粒体重塑之外, ULK1在肌肉再生过程中也被激活^[13,15,49]。在PINK1/Parkin介导的线粒体自噬的初始阶段, ULK1复合物被招募到去极化线粒体上^[50]。鉴于ULK1在自噬体诱导和线粒体自噬中的关键作用^[51], CALL等^[15]和NICHENKO^[49]深入探讨了ULK1介导的线粒体自噬在肌肉再生中的作用和机制。使用骨骼肌特异性ULK1基因敲除小鼠, 他们发现ULK1介导的自噬是骨骼肌再生过程中线粒体网络重建所必需的。在哺乳动物骨骼肌中, 调节线粒体自噬的另一个关键因素是蛋白激酶CSNK2/CK2。CSNK2/CK2对TOMM22(线粒体外膜转位酶

的中心成分)的磷酸化促使了PINK1进入线粒体的内膜,并被蛋白酶降解。然而,磷酸化TOMM22的缺乏促进了PINK1在线粒体外膜上的积累,并诱导了随后的线粒体自噬^[52]。

虽然线粒体自噬介导的线粒体重塑在成肌细胞分化和肌肉再生中是必要的,但各种类型的线粒体自噬在肌肉再生中的作用尚不清楚。此外,成肌细胞线粒体自噬的诱导机制还需要进一步研究,以期靶向自噬能促进肌肉再生过程中的线粒体功能恢复。

4.3.2 分化和融合中的应激和凋亡信号 成肌细胞分化伴随着细胞应激和凋亡,包括ROS水平升高和凋亡信号增强^[53]。骨骼肌发育需要适度的应激信号和半胱氨酸蛋白酶(caspase, CASP)的激活^[54]。ROS也是骨骼肌发育的一种重要介质,抑制线粒体ROS的产生则会导致成肌细胞的分化失败^[55]。作为成肌细胞分化中的决定性肌源性转录因子, MyoD1也是caspase-3和凋亡信号的激活剂,这也表明凋亡信号在成肌细胞分化中可能发挥重要作用^[56]。然而由于生理功能的障碍,成肌细胞中ROS或凋亡信号相关蛋白的过度表达也会导致成肌细胞分化失败并诱导细胞死亡^[57-58]。因此,在肌源性分化阶段,将ROS和CASP的激活水平维持在成肌分化和凋亡间的平衡水平是很重要的。

最近的研究发现,自噬参与调节骨骼肌分化过程中的相关应激信号,并有助于细胞分化而不是细胞死亡^[59]。成肌细胞分化过程中的自噬缺陷增强了凋亡信号、内质网应激反应,并且诱导了细胞死亡。ATG7的敲除增加了成肌细胞的短暂的caspase-3激活时间、DNA断裂比例和凋亡率。类似地,除了抑制自噬通量外,分化过程中的3-MA处理也增加了成肌细胞凋亡^[60]。此外,在线粒体介导的凋亡信号被诱导之前,线粒体自噬在清除受损线粒体方面起着重要作用,从而缓解细胞应激和死亡^[59]。先前的研究发现,线粒体通透性转换孔的开放和线粒体膜完整性的丧失可通过细胞色素c(cytochrome C, CYCS)和AIFM1/AIF(凋亡诱导因子)等因子导致CASP依赖性和非依赖性凋亡信号产生^[61-62]。而在分化过程中,干扰ATG7后,成肌细胞中的细胞质CYCS和AIFM1水平显著升高。此外,干扰ATG7的成肌细胞在分化过程中也显示出CASP9的激活^[40]。上述结果表明,自噬调节成肌细胞分化过程中线粒体介导的凋亡信

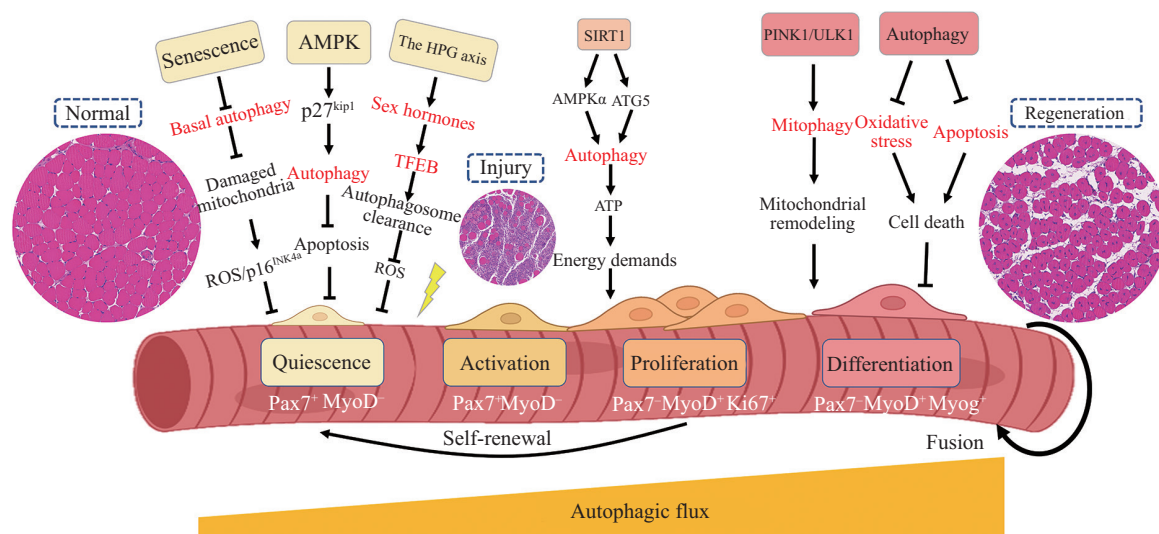


图1 自噬对再生中肌肉干细胞的作用

Fig.1 The role of autophagy on MuSCs during regeneration

号, 并且自噬保护分化中的成肌细胞免于凋亡。

5 结语与展望

通过对组织特异性自噬相关基因敲除小鼠的分析, 肌肉再生中MuSCs的自噬功能已被逐渐解析(图1)。然而, 目前研究主要偏向于巨自噬和线粒体自噬, 其他的蛋白/细胞器选择性自噬是否在其中发挥作用, 以及其机制有待进一步验证。已有资料证明, 在MuSCs活化、增殖和分化的过程中, 自噬通量逐渐上调。这让我们提出一个假设: 自噬通量是否可以作为判断MuSCs状态的指标? 然而, 目前缺乏对MuSCs自噬流量的绝对量化, 这需要我们进一步的研究。当一些增殖后产生的MuSCs恢复到静止期并补充干细胞池时, 增加的自噬流量也恢复到静止时期的低水平。细胞内自噬的失活是如何有序调节的? 此外, 肌肉细胞的不对称分裂是补充干细胞库的必要条件。激活MuSCs和静止MuSCs之间自噬水平的差异是否发生在不对称分裂期间并决定细胞的分化命运也是一个值得考虑的问题。

单细胞测序(scRNA-seq)分析了骨骼肌再生过程中细胞群的时间动态和异质性^[63]。除了MuSCs外, 其他支持细胞如巨噬细胞、内皮细胞也参与骨骼肌的再生。这些非肌源性细胞在骨骼肌中的出现符合严格的程序化阶段, 一旦这些支持细胞的生长模式发生改变, 骨骼肌的正常再生将被破坏^[11]。这些研究强调了细胞间通讯网络对于成功肌肉再生的重要

性。自噬已被证明可以调节多种干细胞的分化并影响细胞的命运, 自噬的缺陷可能导致有序分化的失败。自噬是否能调节骨骼肌发育和再生过程中支持细胞的命运尚需进一步研究来证实。自噬可能通过影响肌肉组织的微环境来调节骨骼肌代谢, 而不仅仅是在MuSCs中发挥作用, 这是一个值得思考的问题。

此外, 由于自噬缺陷引起的肌病具有复杂性, 因此靶向自噬很少用于临床治疗。自噬过程的每个阶段(从自噬体诱导到自噬溶酶体的降解)的缺陷都会影响骨骼肌的正常功能。然而, 不同类型的自噬缺陷往往会导致不同的自噬表型。鉴于在不同的骨骼肌病中观察到不同的自噬缺陷, 需要进一步了解各种肌病中自噬的发病机制, 以逐个评估疾病自噬修饰疗法的益处。

总之, 深入了解不同肌病中自噬的发病机制, 并结合scRNA-seq检测自噬对骨骼肌微环境的影响, 将有助于自噬缺陷性肌病的临床治疗。

参考文献 (References)

- [1] JANSSEN I, HEYMSFIELD S B, WANG Z M, et al. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr [J]. *J Appl Physiol*, 2000, 89(1): 81-8.
- [2] FIACCO E, CASTAGNETTI F, BIANCONI V, et al. Autophagy regulates satellite cell ability to regenerate normal and dystrophic muscles [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(11): 1839-49.
- [3] DIKIC I, ELAZAR Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6):

- 349-64.
- [4] NASCIMBENI A C, GIORDANO F, DUPONT N, et al. ER-plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis [J]. *EMBO J*, 2017, 36(14): 2018-33.
- [5] SAWA-MAKARSKA J, BAUMANN V, COUDEVYLLE N, et al. Reconstitution of autophagosome nucleation defines Atg9 vesicles as seeds for membrane formation [J]. *Science*, 2020, 369(6508): eaaz7714.
- [6] WEIDBERG H, SHPILKA T, SHVETS E, et al. LC3 and GATE-16 N termini mediate membrane fusion processes required for autophagosome biogenesis [J]. *Dev Cell*, 2011, 20(4): 444-54.
- [7] MAEDA S, YAMAMOTO H, KINCH L N, et al. Structure, lipid scrambling activity and role in autophagosome formation of ATG9A [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27(12): 1194-201.
- [8] ZHAO Y G, CODOGNO P, ZHANG H. Machinery, regulation and pathophysiological implications of autophagosome maturation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(11): 733-50.
- [9] SOUSA-VICTOR P, GARCIA-PRAT L, MUNOZ-CANOVES P. Control of satellite cell function in muscle regeneration and its disruption in ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, doi: 10.1038/s41580-021-00421-2.
- [10] TIDBALL J G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration [J]. *Compr Physiol*, 2011, 1(4): 2029-62.
- [11] WOSCZYNA M N, RANDO T A. A muscle stem cell support group: coordinated cellular responses in muscle regeneration [J]. *Dev Cell*, 2018, 46(2): 135-43.
- [12] SALMINEN A, VIHKO V. Autophagic response to strenuous exercise in mouse skeletal muscle fibers [J]. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 1984, 45(1): 97-106.
- [13] NICHENKO A S, SOUTHERN W M, ATUAN M, et al. Mitochondrial maintenance via autophagy contributes to functional skeletal muscle regeneration and remodeling [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 311(2): C190-200.
- [14] SAERA-VILA A, KISH P E, LOUIE K W, et al. Autophagy regulates cytoplasmic remodeling during cell reprogramming in a zebrafish model of muscle regeneration [J]. *Autophagy*, 2016, 12(10): 1864-75.
- [15] CALL J A, WILSON R J, LAKER R C, et al. Ulk1-mediated autophagy plays an essential role in mitochondrial remodeling and functional regeneration of skeletal muscle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 312(6): C724-32.
- [16] PAOLINI A, OMAIRI S, MITCHELL R, et al. Attenuation of autophagy impacts on muscle fibre development, starvation induced stress and fibre regeneration following acute injury [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 9062.
- [17] SOUZA J, GOTTFRIED C. Muscle injury: review of experimental models [J]. *J Electromyogr Kinesiol*, 2013, 23(6): 1253-60.
- [18] RAYAGIRI S S, RANALDI D, RAVEN A, et al. Basal lamina remodeling at the skeletal muscle stem cell niche mediates stem cell self-renewal [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 1075.
- [19] SCHMIDT M, SCHULER S C, HUTTNER S S, et al. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(13): 2559-70.
- [20] HO T T, WARR M R, ADELMAN E R, et al. Autophagy maintains the metabolism and function of young and old stem cells [J]. *Nature*, 2017, 543(7644): 205-10.
- [21] GARCIA-PRAT L, MARTINEZ-VICENTE M, PERDIGUERO E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence [J]. *Nature*, 2016, 529(7584): 37-42.
- [22] BORJA-GONZALEZ M, CASAS-MARTINEZ J C, MCDONAGH B, et al. Inflammation-miR-21 negatively regulates myogenesis during ageing [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(4): 345.
- [23] SOUSA-VICTOR P, GUTARRA S, GARCIA-PRAT L, et al. Geriatric muscle stem cells switch reversible quiescence into senescence [J]. *Nature*, 2014, 506(7488): 316.
- [24] GARCIA-PRAT L, MARTINEZ-VICENTE M, PERDIGUERO E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence [J]. *Nature*, 2016, 529(7584): 37-42.
- [25] LIU Y, NGUYEN P T, WANG X, et al. TLR9 and beclin 1 cross-talk regulates muscle AMPK activation in exercise [J]. *Nature*, 2020.
- [26] YAN J, YAN J Y, WANG Y X, et al. Spermidine-enhanced autophagic flux improves cardiac dysfunction following myocardial infarction by targeting the AMPK/mTOR signalling pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(17): 3126-42.
- [27] WHITE J P, BILLIN A N, CAMPBELL M E, et al. The AMPK/p27(Kip1) axis regulates autophagy/apoptosis decisions in aged skeletal muscle stem cells [J]. *Stem Cell Rep*, 2018, 11(2): 425-39.
- [28] ABREU A P, KAISER U B. Pubertal development and regulation [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2016, 4(3): 254-64.
- [29] HERBISON A E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2016, 12(8): 452-66.
- [30] KIM J H, HAN G C, SEO J Y, et al. Sex hormones establish a reserve pool of adult muscle stem cells [J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(9): 930-40.
- [31] KIM J H, PARK I, SHIN H R, et al. The hypothalamic-pituitary-gonadal axis controls muscle stem cell senescence through autophagosome clearance [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2021, 12(1): 177-91.
- [32] SETTEMBRE C, DI MALTA C, POLITO V A, et al. TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis [J]. *Science*, 2011, 332(6036): 1429-33.
- [33] FEIGE P, BRUN C E, RITSO M, et al. Orienting muscle stem cells for regeneration in homeostasis, aging, and disease [J]. *Cell Stem Cell*, 2018, 23(5): 653-64.
- [34] FOLMES C D, DZEJA P P, NELSON T J, et al. Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation [J]. *Cell Stem Cell*, 2012, 11(5): 596-606.
- [35] CHANG N C. Autophagy and stem cells: self-eating for self-renewal [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 138.
- [36] TANG A H, RANDO T A. Induction of autophagy supports the bioenergetic demands of quiescent muscle stem cell activation [J]. *EMBO J*, 2014, 33(23): 2782-97.
- [37] CAMPANARIO S, RAMIREZ-PARDO I, HONG X, et al. Assessing autophagy in muscle stem cells [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 620409.
- [38] RODGERS J T, KING K Y, BRETT J O, et al. mTORC1 controls the adaptive transition of quiescent stem cells from G(0) to G(Alert) [J]. *Nature*, 2014, 510(7505): 393-6.
- [39] FORTINI P, FERRETTI C, IORIO E, et al. The fine tuning of metabolism, autophagy and differentiation during *in vitro* myo-

- genesis [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2168.
- [40] BAECHLER B L, BLOEMBERG D, QUADRILATERO J. Mitophagy regulates mitochondrial network signaling, oxidative stress, and apoptosis during myoblast differentiation [J]. *Autophagy*, 2019, 15(9): 1606-19.
- [41] SIN J, ANDRES A M, TAYLOR D J R, et al. Mitophagy is required for mitochondrial biogenesis and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts [J]. *Autophagy*, 2016, 12(2): 369-80.
- [42] REMELS A H, LANGEN R C, SCHRAUWEN P, et al. Regulation of mitochondrial biogenesis during myogenesis [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 315(1/2): 113-20.
- [43] PAASUKE R, EIMRE M, PIIRSOO A, et al. Proliferation of human primary myoblasts is associated with altered energy metabolism in dependence on ageing *in vivo* and *in vitro* [J]. *Oxid Med Cel Longev*, 2016, 2016: 8296150.
- [44] WANG X, HUANG N, YANG M, et al. FTO is required for myogenesis by positively regulating mTOR-PGC-1 α pathway-mediated mitochondria biogenesis [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(3): e2702.
- [45] DUGUEZ S, FEASSON L, DENIS C, et al. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(4): E802-9.
- [46] LIN Y F, XIAO M H, CHEN H X, et al. A novel mitochondrial micropeptide MPM enhances mitochondrial respiratory activity and promotes myogenic differentiation [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 528.
- [47] PALIKARAS K, LIONAKI E, TAVERNARAKIS N. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans* [J]. *Nature*, 2015, 521(7553): 525-8.
- [48] PALIKARAS K, LIONAKI E, TAVERNARAKIS N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology [J]. *Nat Cell Biol*, 2018, 20(9): 1013-22.
- [49] NICHENKO A S, SOUTHERN W M, TEHRANI K F, et al. Mitochondrial-specific autophagy linked to mitochondrial dysfunction following traumatic freeze injury in mice [J]. *Am J Physiol-Cell Ph*, 2020, 318(2): C242-52.
- [50] LAZAROU M, SLITER D A, KANE L A, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy [J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 309-14.
- [51] EGAN D F, SHACKELFORD D B, MIHAYLOVA M M, et al. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy [J]. *Science*, 2011, 331(6016): 456-61.
- [52] KRAVIC B, HARBAUER A B, ROMANELLO V, et al. In mammalian skeletal muscle, phosphorylation of TOMM22 by protein kinase CSNK2/CK2 controls mitophagy [J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 311-35.
- [53] YU T Z, DOHL J, ELENBERG F, et al. Curcumin induces concentration-dependent alterations in mitochondrial function through ROS in C2C12 mouse myoblasts [J]. *J Cel Physiol*, 2019, 234(5): 6371-81.
- [54] LE MOAL E, PIALOUX V, JUBAN G, et al. Redox control of skeletal muscle regeneration [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 27(5): 276-310.
- [55] YIN W X, YANG L, KONG D L, et al. Guanine-rich RNA binding protein GRSF1 inhibits myoblast differentiation through repressing mitochondrial ROS production [J]. *Exp Cell Res*, 2019, 381(1): 139-49.
- [56] HIRAI H, VERMA M, WATANABE S, et al. MyoD regulates apoptosis of myoblasts through microRNA-mediated down-regulation of Pax3 [J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(2): 347-65.
- [57] WANG F, WEI Z L, SUN X R, et al. Apoptosis inducing factor is involved in stretch-induced apoptosis of myoblast via a caspase-9 independent pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2017, 118(4): 829-38.
- [58] SONG J, WANG Y, YUAN X, et al. Stretching magnitude-dependent inactivation of AKT by ROS led to enhanced p53 mitochondrial translocation and myoblast apoptosis [J]. *Mol Biol Cell*, 2019, 30(10): 1182-97.
- [59] KUBLI D A, GUSTAFSSON A B. Mitochondria and mitophagy the Yin and Yang of cell death control [J]. *Circ Res*, 2012, 111(9): 1208-21.
- [60] MCMILLAN E M, QUADRILATERO J. Autophagy is required and protects against apoptosis during myoblast differentiation [J]. *Biochem J*, 2014, 462: 267-77.
- [61] GOLDSTEIN J C, WATERHOUSE N J, JUIN P, et al. The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(3): 156-62.
- [62] SUSIN S A, LORENZO H K, ZAMZAMI N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor [J]. *Nature*, 1999, 397(6718): 441-6.
- [63] OPRESCU S N, YUE F, QIU J, et al. Temporal dynamics and heterogeneity of cell populations during skeletal muscle regeneration [J]. *iScience*, 2020, 23(4): 100993.