

FOXO3在脑缺血中的作用

储晓娇^{1,2} 王锦坤^{1,2} 章帆^{1,2} 尚文豆^{1,2} 刘苏亚^{1,2} 何治^{1,2*}

(¹三峡大学国家中医药管理局中药药理科研三级实验室, 宜昌 443002; ²三峡大学基础医学院, 宜昌 443002)

摘要 脑缺血是导致死亡和长期残疾的主要原因, 是一个全球性的健康问题, 其病因复杂, 发病机制尚不明确。转录因子叉头盒蛋白O3(Forkhead box protein O3, FOXO3)经翻译后修饰(post-translational modifications, PTMs)后, 自身活性发生改变, 通过对靶基因的调控, 参与调节脑缺血后的凋亡、炎症、氧化应激、自噬及血脑屏障损伤。值得注意的是, FOXO3对缺血性脑损伤不但有促进作用, 还具有保护作用。该文就FOXO3的结构及翻译后修饰进行简单介绍, 阐述其在脑缺血中的作用, 旨在为该疾病的研究提供新思路。

关键词 FOXO3; 脑缺血; 翻译后修饰

The Role of FOXO3 in Cerebral Ischemia

CHU Xiaojiao^{1,2}, WANG Jinkun^{1,2}, ZHANG Fan^{1,2}, SHANG Wendou^{1,2}, LIU Suyu^{1,2}, HE Zhi^{1,2*}

(¹Third Grade Pharmacological Laboratory on Traditional Chinese Medicine, State Administration of Traditional Chinese Medicine, China Three Gorges University, Yichang 443002, China; ²Basic Medical Science, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract Cerebral ischemia is a major cause of death and long-term disability, which is a global health problem with complex etiology and unclear pathogenesis. The transcriptional factor FOXO3 (Forkhead box protein O3) changes its activity after PTMs (post-translation modifications), and it is involved in the regulation of apoptosis, inflammation, oxidative stress, autophagy and blood-brain barrier after cerebral ischemia through the regulations of target genes. It is noteworthy that FOXO3 not only promotes but also protects ischemic brain injury. In this paper, the structure and post-translational modification of FOXO3 are briefly introduced, and its role in cerebral ischemia is expounded, in order to provide new ideas for the study of this disease.

Keywords FOXO3; cerebral ischemia; post-translational modification

脑卒中是目前全球大于60岁人群的第二大死因以及永久性残疾的主要原因^[1]。随着人口增加和预期寿命延长, 脑卒中的患病率进一步增加, 这给个人和社会带来沉重负担。脑动脉严重狭窄或闭塞引起的缺血性卒中是最常见的卒中类型^[2]。尽管在过去的30年, 对于缺血性卒中的治疗取得了进展, 但静脉溶栓和机械取栓仍是恢复缺血后脑血流的主要治

疗方法, 由于溶栓时间窗窄和禁忌症, 使得缺血性脑卒中的治疗在实际临床工作中受到限制^[3]。因此, 迫切需要更好地了解缺血性脑损伤的机制, 促进神经保护药物的开发。

FOXO蛋白是普遍表达的转录因子, 可以识别含有序列5'-TTGTTTAC-3'的启动子激活基因转录, 通过激活相关信号通路, 抵消氧化应激、代谢应激和生

收稿日期: 2023-02-21 接受日期: 2023-04-03

湖北省卫健委联合基金重点项目(批准号: WJ2019H526)、天然产物研究与利用湖北省重点实验室开放基金(批准号: NPRD-2018001)和国家自然科学基金(批准号: 82073824)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15391904967, E-mail: 1273248106@qq.com

Received: February 21, 2023

Accepted: April 3, 2023

This work was supported by the Hubei Provincial Health Commission Joint Fund Key Project (Grant No.WJ2019H526), the Hubei Provincial Key Laboratory of Natural Products Research and Utilization Open Fund (Grant No.NPRD-2018001), and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82073824)

*Corresponding author. Tel: +86-15391904967, E-mail: 1273248106@qq.com

长因子缺失等造成的不利影响,维持细胞稳态^[4]。在人类中,FOXO家族包括FOXO1、FOXO3、FOXO4和FOXO6,其中FOXO3的分布和功能最为广泛^[5]。FOXO3最初作为长寿因子被发现,后来研究发现其参与缺血性脑卒中的病理过程^[6]。研究表明,脑缺血涉及多种神经元死亡机制,而磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase-B, PI3K/AKT)信号通路是细胞重要的生存通路之一,对缺血性脑损伤具有保护作用^[7]。FOXO3是PI3K/AKT信号通路下游关键的负调控转录因子^[8],因此认为在脑缺血的发展过程中,下调FOXO3对神经功能恢复起积极作用。同时,有研究结果显示抑制FOXO3表达促发了脑缺血后的炎症反应,加剧了脑损伤^[9]。由此可见,FOXO3作用复杂,仍需深入研究,本文结合现有研究,探究FOXO3的结构、PTMs及其在脑缺血中的作用,为临床药物开发提供新方向。

1 FOXO3的结构与分布

人类FOXO3基因位于6号染色体上,其编码的蛋白质由673个氨基酸组成,相对分子量约为71 kDa,包括五个结构域(图1):叉头DNA结合结构域(fork-head DNA-binding domain, DBD)、两个核定位信号(nuclear localization signal, NLS)、核输出序列(nuclear export sequence, NES)和C-端反式激活结构域(C-terminal transactivation domain, TAD)^[10]。DBD结构域大约由110个氨基酸组成,表现为折叠良好的“有翼螺旋”,具有3个 α 螺旋和2个类似于蝴蝶翅膀的大无序环,能与DNA直接相互作用^[11]。NLS结构域介导FOXO3在细胞质与细胞核之间穿梭^[10]。NES与NLS共同参与FOXO3从细胞核的输出, TAD结构域(FOXO3⁶⁰⁶⁻⁶⁴⁴)对FOXO3靶基因的反式激活至关重要^[12]。FOXO3多达75%的序列包含内在无序区域(intrinsically disordered region, IDR),其在结构上是一种高度保守的内在无序蛋白,能够与其他蛋白质相互作用以响应不同的细胞信号^[13]。

FOXO3在脑中高度表达,广泛存在于海马体、

皮层和小脑等脑区,表明这种FOXO蛋白能够协控制认知和运动功能^[14]。利用基因检测技术,发现在成年小鼠大脑中,FOXO3 mRNA存在于所有海马区域,即齿状回、CA1、CA2和CA3区域,并且其在海马体背侧和腹侧的分布没有差异;此外,在几个新皮质区域和小脑的颗粒神经元中也检测到了FOXO3的表达^[15]。在生理状态下,FOXO3主要存在于细胞核中,与DNA结合并调节多个细胞事件的基因表达^[10]。

2 FOXO3翻译后修饰的调控

翻译后修饰是调节蛋白质功能、控制生理过程的重要途径。FOXO3的活性受到磷酸化、乙酰化、泛素化、甲基化和糖基化等PTMs的调控(图2),这些PTMs可能会影响FOXO3的亚细胞分布和DNA结合亲和力,从而对靶基因进行特异性调控^[16]。

2.1 磷酸化

FOXO3活性主要受其在细胞核和细胞质之间的易位调控,磷酸化是调节FOXO3活性的关键PTM。当PI3K/AKT信号通路被激活时,FOXO3在苏氨酸Thr 32和丝氨酸Ser 253、Ser 315三个保守位点被磷酸化,随后与伴侣蛋白14-3-3结合,并从细胞核转移到细胞质中^[17]。同时,FOXO3上的核定位信号将被隐藏,阻止其重新进入细胞核而富集在细胞质中,并且其转录活性受到抑制。此外,磷酸化的FOXO3可以与E3泛素连接酶相互作用并经历多次泛素化,导致FOXO3蛋白的降解^[8]。DENG等^[18]在大鼠大脑中脉栓塞模型的研究中发现,使用PI3K的激动剂后,FOXO3的磷酸化水平升高,并从细胞核移出,同时其转录功能减弱。大多数激酶也能磷酸化FOXO3,但是磷酸化位点不同,作用也不一样。如血清和糖皮质激素调节激酶(glucocorticoid-regulated kinase, SGK)、细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、I κ B激酶 β 、核因子 κ -B激酶亚基 ϵ 抑制剂以及细胞周期蛋白依赖性激酶1/2等可使FOXO3发生磷酸化,抑制其活性。其中,

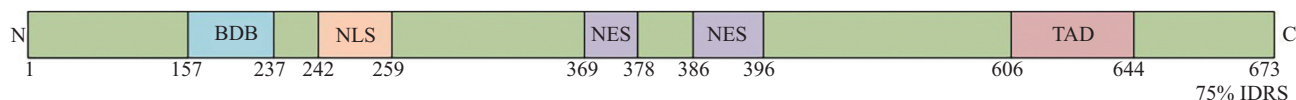


图1 FOXO3结构(根据参考文献[10,13]修改)

Fig.1 The structure of FOXO3 (modified from the references [10,13])

SGK与AKT识别的磷酸化位点重叠, 都能磷酸化Thr 32, 但SGK表现出对Ser 315的偏好, 而AKT磷酸化Ser 253的效率更高^[19]。相比之下, c-Jun N末端激酶(Jun N-terminal kinase, JNK)、哺乳动物SET20样激酶1和AMP活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)通过磷酸化激活FOXO3在细胞核中的转录^[5]。如AMPK可以通过磷酸化不同的残基(Thr 179、Ser 399、Ser 413、Ser 555、Ser 588和Ser 626)直接调节FOXO3, 但不影响其亚细胞定位^[19]。JNK介导FOXO3在Ser 574处的磷酸化, 促进FOXO3核输入和转录。此外, JNK可以通过抑制PI3K-AKT活性间接激活FOXO3, 导致FOXO3核易位^[19]。

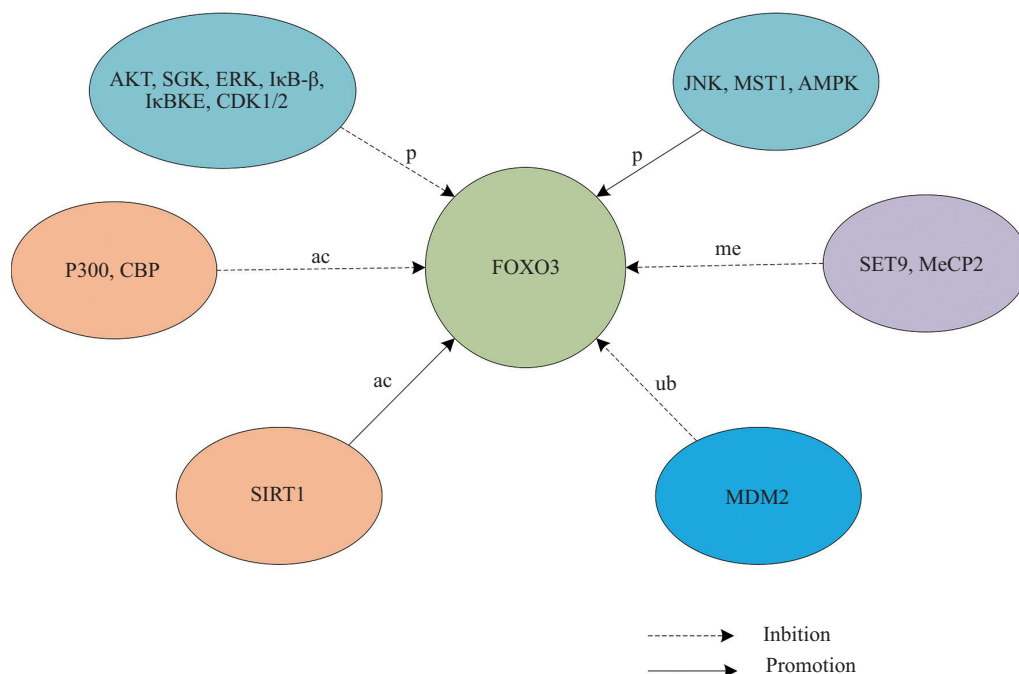
2.2 乙酰化

与磷酸化/去磷酸化类似, 乙酰化/去乙酰化也影响FOXO3的转录活性。AMPK对FOXO3 Ser 626的磷酸化增强了其对转录激活物CREB结合蛋白(CREB binding protein, CBP)及其旁系物p300(CBP/p300)的亲和力, 后者可以在Lys 242和Lys 245位点乙酰化FOXO3蛋白的赖氨酸, 减弱其与DNA的结合能力, 使得FOXO3的转录功能下降^[19]。值得注意的是, 乙酰化的作用受到组蛋白脱乙酰酶(histone deacetylase, HDAC)的负调节, HDAC通过酶促反应从组蛋

白和非组蛋白中去除乙酰基。例如, Sirtuin家族是具有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸依赖性脱乙酰活性的HDAC亚类, 据报道, 原代神经元OGD诱导FOXO3乙酰化水平上调, 适量的SIRT1激动剂或SIRT1过表达均能够导致FOXO3去乙酰化, 增强FOXO3活性和提高随后的神经元凋亡水平^[20]。

2.3 其他翻译后修饰的调节

泛素化和甲基化也被报道在调节FOXO3活性方面起着至关重要的作用^[21]。例如, ERK在残基Ser 294、Ser 344和Ser 425处与FOXO3相互作用使其磷酸化, 并通过MDM2依赖性泛素-蛋白酶体途径加速了FOXO3的降解^[22]。而且FOXO3上相同的赖氨酸残基可能发生不同的PTMs, 例如SIRT1去乙酰化的赖氨酸残基可发生泛素化, 从而降解FOXO3^[5]。此外, 研究发现含有SET结构域的赖氨酸甲基转移酶9(SET domain containing lysine methyltransferase 9, SET9)在Lys 270和Lys 271处对FOXO3进行甲基化, 导致FOXO3的DNA结合力降低和反式活化^[23]。甲基化CpG结合蛋白2(methyl-CpG-binding domain protein 2, MeCP2)是一种表观遗传因子, 能特异性识别并结合细胞核中的DNA, 可被募集到FOXO3的启动子区域, 使其启动子甲基化并抑制FOXO3的转录,



P: 磷酸化; ac: 乙酰化; ub: 泛素化; me: 甲基化。

P: phosphorylation; ac: acetylation; ub: ubiquitination; me: methylation.

图2 FOXO3的翻译后修饰(根据参考文献[21]修改)

Fig.2 The post-translational modification of FOXO3 (modified from the reference [21])

从而抑制自噬和细胞凋亡。在小鼠脑缺血再灌注损伤中, MeCP2通过抑制FOXO3的表达, 减少神经元凋亡和缩小脑梗死体积^[24]。

3 FOXO3在脑缺血中的作用

在沙土鼠全脑短暂性缺血/再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R)模型中, 海马CA1区免疫反应性和蛋白水平明显改变, 其蛋白水平在I/R后12小时略有下降, 在I/R后3天最高, 在I/R后5天再次显著下降, 同时在星形胶质细胞和 γ -氨基丁酸能中间神经元中检测到FOXO3免疫反应增强, FOXO3的这种变化可能与缺血诱导的迟发性神经元死亡有关^[25]。体外实验也发现FOXO3表达改变, 将原代皮层神经元分别经过氧糖剥夺处理3小时、6小时、9小时后, 再复氧复糖培养24小时, 发现FOXO3 mRNA和蛋白表达呈时间依赖性下降^[26]。缺血诱导的FOXO3表达变化并不局限于体内和体外卒中模型, 一项临床研究发现, 脑缺血患者外周血中FOXO3 mRNA表达水平显著升高^[6]。以上研究表明, FOXO3参与了缺血性脑损伤的发展, 下文将详细描述其在凋亡、炎症、氧化应激、自噬及血脑屏障损伤等方面的作用。

3.1 凋亡

脑缺血伴有广泛的神经元凋亡, 表现为细胞起泡、皱缩和核碎裂^[27], 防止细胞过度凋亡是治疗脑缺血的有效策略。细胞凋亡包括早期的膜磷脂酰丝氨酸残基的外化和后期的核DNA破坏, 而FOXO3是控制早期和晚期细胞凋亡损伤程序中一个必要的元件, 瞬时敲除FOXO3的小胶质细胞, 可以在氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD)暴露后24小时保持存活^[28]。然而, 在发生凋亡损伤之前, FOXO3在OGD暴露后3小时就促进了小胶质细胞的激活和增殖, 同时发生了非磷酸化活性形式的FOXO3从细胞质到细胞核的运输。FOXO3还可以调节小胶质细胞的线粒体凋亡信号转导通路, 因为FOXO3的瞬时敲除抑制了OGD诱导的线粒体膜去极化和细胞色素C的释放^[28]。FOXO3对凋亡级联的控制也延伸到半胱天冬酶(caspase)的激活, FOXO3的存在是活性caspase 3、8、9表达所必需的, 因为FOXO3的缺失会抑制caspase活性, 有趣的是, 与caspase 3和8活性相比, 敲除FOXO3降低caspase 9活性的程度较小, 这表明FOXO3与caspase 9的关系可能不同于caspase 3和8的信号转导途径^[28]。作为转录因子, FOXO3能

够与细胞凋亡诱导基因的启动子(如*Bim*、*FasL*、*Bax*和*PUMA*)结合诱导内皮细胞凋亡^[29]。在小鼠脑I/R后, FOXO3基因敲低的脑组织中, Bax的mRNA和蛋白质表达水平降低, 神经功能缺损减少^[30]。太白橐吾皂苷(Saponins from *Aralia taibaiensis*, sAT)是太白橐吾皂苷的主要活性成分, 对脑缺血引起的神经损伤具有保护作用。在sAT处理的体外培养的OGD/R海马神经元中, 细胞核内FOXO3的磷酸化水平升高、乙酰化水平降低, 转录功能减弱, 抑制了细胞凋亡^[31], 采用si-RNA干扰技术抑制FOXO3表达, 逆转了上述变化, 说明sAT通过调控FOXO3发挥保护作用。这一系列研究结果表明, 转录因子FOXO3能够调节多个途径参与脑缺血后的细胞凋亡, 因此深入了解与FOXO3相关的凋亡分子机制对治疗脑缺血具有重要意义。

3.2 炎症

炎症反应是缺血性脑卒中的另一个重要因素。脑缺血性损伤和血流再灌注均可引起炎症级联反应, 包括氧化应激、兴奋性毒性、炎症细胞浸润和有毒炎症介质的释放, 进一步导致神经组织损伤和细胞死亡^[32]。核因子- κ B(nuclear factor-KappaB, NF- κ B)是炎症反应的中枢调节因子, 转录激活后, 诱导白介素-1 β 、白介素-6和肿瘤坏死因子- α 等促炎因子产生, 导致炎症反应^[33]。鞘氨醇激酶1(sphingosine kinase 1, SPHK1)在I/R期间激活NF- κ B信号转导, 诱导促炎因子分泌^[34]。在人神经母细胞瘤细胞OGD/R模型中, ZHOU等^[35]研究发现, 敲低FOXO3与SPHK1具有相似的效果, 均能降低NF- κ B和促炎因子水平, 减少细胞死亡, 说明OGD/R诱导的SPHK1上调是依赖FOXO3的转录激活的。另外, TAN等^[36]实验证明, 大鼠脑缺血再灌注后, 丁香苷通过阻止脑组织中FOXO3易位到细胞核, 并抑制NF- κ B的上调, 降低炎症反应水平, 从而产生神经保护作用, FOXO3敲低能显著提高NF- κ B及下游炎症因子的表达水平, 并逆转丁香苷对这些因子的抑制作用, 表明FOXO3参与了丁香苷对NF- κ B的调节。总之, 脑缺血后FOXO3可增强NF- κ B活性, 促进炎症因子的释放, 但是尚不清楚FOXO3能否直接转录调节NF- κ B, 还需进一步研究两者之间的关系。

焦亡是一种依赖于炎症caspase(主要是caspase 1、4、5、11)激活的程序性细胞死亡形式^[37]。尽管FOXO3能促进脑缺血后的炎症反应, 但在某些情况

下,其也能通过抑制焦亡及其介导的炎症反应来发挥保护作用。例如,间充质干细胞衍生的外泌体就能上调OGD/R诱导的BV-2小胶质细胞中FOXO3的表达,进而抑制细胞焦亡^[9]。

3.3 氧化应激

氧化应激是缺血性脑卒中的标志^[38]。当发生氧化应激时,ROS可通过脂质、蛋白质和核酸的氧化损伤导致细胞毒性,对脑组织的结构和功能造成有害后果^[39]。在正常生理条件下ROS生成量较低,且可以被内源性抗氧化剂清除,而脑缺血引起ROS过度生成,使内源性抗氧化系统超负荷^[40]。谷胱甘肽是细胞抗氧化防御的主要内源性成分,能够直接清除各种ROS,减轻缺血性脑损伤。利用谷胱甘肽对OGD/R的细胞进行干预,在共聚焦显微镜下发现,与对照组比较,谷胱甘肽治疗组的FOXO3核易位较少^[41]。这说明,脑缺血后的氧化应激会激活FOXO3。FOXO3同样是抗氧化酶的转录因子,参与抗应激反应基因(如过氧化氢酶基因和锰超氧化物歧化酶基因)的激活^[29]。段佳林^[31]发现,sAT能促进FOXO3下游蛋白过氧化氢酶表达,抵御氧化应激,抑制OGD/R造成的细胞损伤,细胞转染*si-FOXO3*后,sAT对过氧化氢酶的上调作用和对ROS的抑制作用均被减弱。这说明,FOXO3在sAT对抗氧化应激的过程中起重要作用。

过量的ROS会导致内质网无法正确合成蛋白质,造成大量未折叠或错误折叠蛋白的累积,引发内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS),破坏内质网稳态,导致细胞死亡^[42-43]。在体外细胞OGD/R模型中,下调FOXO3能够抑制氧化应激和ERS,缓解细胞损伤。一方面,敲低FOXO3直接减少细胞总ROS生成量;另一方面,FOXO3过表达可以增加ERS水平^[44]。可见脑缺血后不仅ROS能调节FOXO3活性,反过来FOXO3也能靶向调控氧化应激,FOXO3不仅能通过增加ROS生成量以及ROS依赖的ERS加重脑损伤,同时也能清除ROS发挥抗氧化作用。

3.4 自噬

自噬是一种高度保守的自我消化过程,受损的细胞器和多余的蛋白质被细胞器包裹后形成自噬体,随后自噬体被运送至溶酶体降解。自噬相关蛋白(autophagy related protein, ATG)在自噬中发挥重要作用,其中自噬体的形成就需要微管相关蛋白质轻链3(microtubule-associated protein light chain-3, LC3, ATG8

的哺乳动物同系物)和ATG12泛素样偶联系统的协同作用,而ATG7处于这两个泛素样系统的中心^[45]。ATG12在ATG7和ATG10的作用下与ATG5偶联形成复合物,后与ATG16相互作用,参与自噬体的扩增。另外,LC3被ATG4切割产生LC3-I,LC3-I通过ATG7和ATG3与磷脂酰乙醇胺偶联,转化为脂溶性LC3-II并锚定在自噬体膜上,介导自噬体和溶酶体融合。因此LC3-II经常被用作自噬体的标志物^[46]。

ZHOU等^[47]研究发现,在大鼠急性脑I/R模型中,FOXO3的磷酸化水平下调,LC3-II/LC3-I值升高,使用慢病毒介导FOXO3过表达进一步加深上述变化,同时减小脑梗死体积。这表明FOXO3活性增加可以上调脑缺血后的自噬水平并改善脑损伤。ATG7是自噬中不可或缺分子,敲除ATG7基因的小鼠在脑I/R后,神经功能障碍明显改善^[48]。而FOXO3直接调控ATG7,并且在小鼠I/R的脑组织中,FOXO3与ATG7均明显增加且存在正相关关系^[49]。进一步实验发现,FOXO3过表达的神经细胞经OGD/R处理后,ATG7和LC3-II表达水平增加,细胞活力降低,FOXO3沉默则消除了这种效应。而且,染色质免疫共沉淀显示,FOXO3能直接与ATG7启动子结合,表明FOXO3作为转录因子促进ATG7表达,激活I/R损伤中的自噬^[49]。因此,I/R后FOXO3促进了自噬发生,但是FOXO3活性增强对于I/R引起的损伤究竟起何种作用存在争议,这可能与不同的脑缺血模型有关,其在人体中的作用也需进一步探究。

3.5 血脑屏障损伤

血脑屏障(blood brain barrier, BBB)是血液和大脑之间的解剖学和功能屏障,能保护中枢神经系统的内部环境免受循环有害物质的侵害。脑内皮细胞间的紧密连接(tight junction, TJ)是BBB的主要结构和功能成分,TJ损伤会导致BBB受损^[50]。缺血性损伤激活内皮细胞中的信号转导,导致TJ蛋白发生磷酸化、易位和降解,破坏BBB完整性,使病情恶化并极大地影响临床预后^[51]。在人微血管内皮细胞OGD 3分钟后就可检测到FOXO3在细胞核中的积累,TJ蛋白中闭合蛋白-5降解增加,使得BBB通透性增高,*siFOXO3*转染则相反^[52]。研究表明,缺血性卒中期间,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)通过降解TJ蛋白直接损害BBB^[53]。为进一步探索FOXO3在脑I/R后BBB损伤中的作用,HYUN等^[52]检测了转染*siFOXO3*的细胞中MMP3/9 mRNA水平,

发现FOXO3敲低抑制了OGD诱导的MMP3 mRNA水平的增加,但没有抑制MMP9的转录。提示FOXO3在OGD期间通过MMP3间接调控MMP9的活性,破坏BBB。后来有学者进一步研究发现,FOXO3/MMP是通过参与ROS信号转导途径,破坏TJ影响BBB完整性的,因为微血管内皮细胞OGD/R诱导的FOXO3/MMP介导的闭合蛋白-5降解,能被抗氧化剂Trolox和N-乙酰半胱氨酸阻断^[54]。

4 小结与展望

脑缺血因老龄人口的快速增长而急剧增加,虽然目前医疗技术日益进步,但是仍无法降低其高患病率和致残率,因此亟需有效的治疗措施。目前发现,FOXO3表达在脑缺血后发生变化,并广泛参与缺血性脑损伤的发生发展,推测FOXO3可能是连接各种机制的一个关键蛋白。此外,FOXO3还能延缓血管老化,降低血管衰老相关疾病的发生率,减少脑缺血的高危因素,因此探索其与脑缺血的关系具有重要意义。

尽管针对FOXO3的研究似乎很有吸引力,但仍存在以下困难:①FOXO3在脑缺血损伤中表现出双向作用,如何精准干预来减轻缺血性脑损伤还有待探究;②FOXO3与其他DNA、RNA和蛋白质相互作用,直接调节其基因表达可能无法达到预期效果并出现副作用;③作为长寿相关蛋白,FOXO3激活能延长寿命,但可能引发肿瘤和加剧脑梗死。

参考文献 (References)

- [1] DONG P, LI Q, HAN H. HIF-1 α in cerebral ischemia [J]. Mol Med Rep, 2022, 25(2): 41.
- [2] LIU S, LIN F, WANG J, et al. Polyphenols for the treatment of ischemic stroke: new applications and insights [J]. Molecules, 2022, 27(13): 4181.
- [3] TUO Q Z, ZHANG S T, LEI P. Mechanisms of neuronal cell death in ischemic stroke and their therapeutic implications [J]. Med Res Rev, 2022, 42(1): 259-305.
- [4] LIN F. Molecular regulation and function of FoxO3 in chronic kidney disease [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2020, 29(4): 439-45.
- [5] ZHAO Y, LIU Y S. Longevity factor FOXO3: a key regulator in aging-related vascular diseases [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 778674.
- [6] 李梅. 磷酸二酯酶4D及其相关基因在缺血性脑卒中的表达研究[D]. 昆明: 昆明理工大学, 2014.
- [7] 陈海, 王建. PI3K/AKT信号通路在缺血性脑卒中后细胞程序性死亡中的研究进展[J]. 中药药理与临床(CHEN H, WANG J. Research progress on PI3K/AKT signaling pathway in programmed cell death after ischemic stroke [J]. Pharmacology and Clinics of Chinese Materia, 2022, 38(2): 247-52.
- [8] XU S, MA Y, CHEN Y, et al. Role of Forkhead box O3a transcription factor in autoimmune diseases [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 92: 107338.
- [9] HU Z, YUAN Y, ZHANG X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced microglial pyroptosis by promoting FOXO3a-dependent mitophagy [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6219715.
- [10] HABROWSKA-GORCZYNSKA D E, KOZIEL M J, KOWALSKA K, et al. FOXO3a and its regulators in prostate cancer [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(22): 12530.
- [11] LIU Y, AO X, DING W, et al. Critical role of FOXO3a in carcinogenesis [J]. Mol Cancer, 2018, 17(1): 104.
- [12] WEINZIERL R. Molecular dynamics simulations of human FOXO3 reveal intrinsically disordered regions spread spatially by intramolecular electrostatic repulsion [J]. Biomolecules, 2021, 11(6): 856.
- [13] WANG F, MARSHALL C B, IKURA M. Forkhead followed by disordered tail: the intrinsically disordered regions of FOXO3a [J]. Intrinsically Disord Proteins, 2015, 3(1): e1056906.
- [14] MAIESE K, CHONG Z Z, HOU J, et al. Oxidative stress: biomarkers and novel therapeutic pathways [J]. Exp Gerontol, 2010, 45(3): 217-34.
- [15] HOEKMAN M F, JACOBS F M, SMIDT M P, et al. Spatial and temporal expression of FoxO transcription factors in the developing and adult murine brain [J]. Gene Expr Patterns, 2006, 6(2): 134-40.
- [16] 李超, 郑洪. FOXO3a在肿瘤发生发展中作用的研究进展[J]. 山东医药(LI C, ZHENG H. Research progress on the role of FOXO3a in tumor development [J]. Shandong Medical Journal), 2019, 59(4): 92-5.
- [17] BERNARDO V S, TORRES F F, DA S D. FoxO3 and oxidative stress: a multifaceted role in cellular adaptation [J]. J Mol Med, 2023, 101(1/2): 83-99.
- [18] DENG A, MA L, JI Q, et al. Activation of the Akt/FoxO3 signaling pathway enhances oxidative stress-induced autophagy and alleviates brain damage in a rat model of ischemic stroke [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2022, 101(1): 18-26.
- [19] FASANO C, DISCIGLIO V, BERTORA S, et al. FOXO3a from the nucleus to the mitochondria: a round trip in cellular stress response [J]. Cells, 2019, 8(9): 1110.
- [20] WANG S, CHONG Z Z, SHANG Y C, et al. WISP1 neuroprotection requires FoxO3a post-translational modulation with autoregulatory control of SIRT1 [J]. Curr Neurovasc Res, 2013, 10(1): 54-69.
- [21] 张仙宏, 魏萌萌, 袁冬冬, 等. 转录因子FOXOs家族调控肿瘤生物学功能的研究进展[J]. 生理学报(ZHANG X H, WEI M M, YUAN D D, et al. Research progress on the role of FOXOs in cancer [J]. Acta Physiologica Sinica), 2022, 74(5): 843-55.
- [22] YANG S, PANG L, DAI W, et al. Role of forkhead box O proteins in hepatocellular carcinoma biology and progression (Review) [J]. Front Oncol, 2021, 11: 667730.
- [23] CALNAN D R, WEBB A E, WHITE J L, et al. Methylation by Set9 modulates FoxO3 stability and transcriptional activity [J].

- Aging, 2012, 4(7): 462-79.
- [24] MENG L, FENG B, LUAN L, et al. MeCP2 inhibits ischemic neuronal injury by enhancing methylation of the FOXO3a promoter to repress the SPRY2-ZEB1 axis [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54(8): 1076-85.
- [25] YOO K Y, KWON S H, LEE C H, et al. FoxO3a changes in pyramidal neurons and expresses in non-pyramidal neurons and astrocytes in the gerbil hippocampal CA1 region after transient cerebral ischemia [J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(3): 588-95.
- [26] 吴嘉. 缺血性脑血管疾病特异血清microRNAs的临床价值及其作用机制研究[D]. 南京: 南京大学, 2018.
- [27] CHENG X, HU J, LIU X, et al. Therapeutic targets by traditional Chinese medicine for ischemia-reperfusion injury induced apoptosis on cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 934256.
- [28] SHANG Y C, CHONG Z Z, HOU J, et al. FoxO3a governs early microglial proliferation and employs mitochondrial depolarization with caspase 3, 8, and 9 cleavage during oxidant induced apoptosis [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2009, 6(4): 223-38.
- [29] 张亚楠, 陈保民, 高阳, 等. FoxO3a转录因子与机体氧化应激损伤的研究进展[J]. *医学研究生学报*(ZHANG Y N, CHEN B M, GAO Y, et al. Role of FoxO3a transcription factor in oxidative stress [J]. *Journal of Medical Postgraduates*), 2016, 29(3): 327-31.
- [30] ZHANG H, XIA J, HU Q, et al. Long noncoding RNA XIST promotes cerebral ischemia/reperfusion injury by modulating miR-27a3p/FOXO3 signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(2): 566.
- [31] 段佳林. 太白橐吾总皂苷及其单体成分对脑卒中的作用及机制研究[D]. 西安: 西北大学, 2020.
- [32] MO Y, SUN Y Y, LIU K Y. Autophagy and inflammation in ischemic stroke [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(8): 1388-96.
- [33] YU H, LIN L, ZHANG Z, et al. Targeting NF-kappaB pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209.
- [34] SU D, CHENG Y, LI S, et al. Sphk1 mediates neuroinflammation and neuronal injury via TRAF2/NF-kappaB pathways in activated microglia in cerebral ischemia reperfusion [J]. *J Neuroimmunol*, 2017, 305: 35-41.
- [35] ZHOU F, WANG Y K, ZHANG C G, et al. miR-19a/b-3p promotes inflammation during cerebral ischemia/reperfusion injury via SIRT1/FoxO3/SPHK1 pathway [J]. *J Neuroinflammation*, 2021, 18(1): 122.
- [36] TAN J, LUO J, MENG C, et al. Syringin exerts neuroprotective effects in a rat model of cerebral ischemia through the FOXO3a/NF-kappaB pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107268.
- [37] GOU X, XU D, LI F, et al. Pyroptosis in stroke-new insights into disease mechanisms and therapeutic strategies [J]. *J Physiol Biochem*, 2021, 77(4): 511-29.
- [38] SU X T, WANG L, MA S M, et al. Mechanisms of acupuncture in the regulation of oxidative stress in treating ischemic stroke [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 7875396.
- [39] LI P, STETLER R A, LEAK R K, et al. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery [J]. *Neuropharmacology*, 2018, 134(Pt B): 208-17.
- [40] HIGASHI Y, ARATAKE T, SHIMIZU T, et al. Protective role of glutathione in the hippocampus after brain ischemia [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 7765.
- [41] SONG J, PARK J, OH Y, et al. Glutathione suppresses cerebral infarct volume and cell death after ischemic injury: involvement of FOXO3 inactivation and Bcl2 expression [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 426069.
- [42] WANG H, CHEN J, BAI G, et al. mTOR modulates the endoplasmic reticulum stress-induced CD4⁺ T cell apoptosis mediated by ROS in septic immunosuppression [J]. *Mediators Inflamm*, 2022, 2022: 6077570.
- [43] WANG L, LIU Y, ZHANG X, et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Front Cell Neurosci*, 2022, 16: 864426.
- [44] SHI W Z, TIAN Y, LI J. GCN2 suppression attenuates cerebral ischemia in mice by reducing apoptosis and endoplasmic reticulum (ER) stress through the blockage of FoxO3a-regulated ROS production [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(1): 285-92.
- [45] TOWERS C G, THORBURN A. Circumventing autophagy inhibition [J]. *Cell Cycle*, 2019, 18(24): 3421-31.
- [46] URBANSKA K, ORZECOWSKI A. The secrets of alternative autophagy [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 3241.
- [47] ZHOU H, WANG X, MA L, et al. FoxO3 transcription factor promotes autophagy after transient cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Int J Neurosci*, 2019, 129(8): 738-45.
- [48] WANG H J, WEI J Y, LIU D X, et al. Endothelial Atg7 deficiency ameliorates acute cerebral injury induced by ischemia/reperfusion [J]. *Front Neurol*, 2018, 9: 998.
- [49] YU S, YU M, HE X, et al. KCNQ10T1 promotes autophagy by regulating miR-200a/FOXO3/ATG7 pathway in cerebral ischemic stroke [J]. *Aging Cell*, 2019, 18(3): e12940.
- [50] KAPLAN L, CHOW B W, GU C. Neuronal regulation of the blood-brain barrier and neurovascular coupling [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2020, 21(8): 416-32.
- [51] HU X, DE SILVA T M, CHEN J, et al. Cerebral vascular disease and neurovascular injury in ischemic stroke [J]. *Circ Res*, 2017, 120(3): 449-71.
- [52] HYUN S W, JUNG Y S. Hypoxia induces FoxO3a-mediated dysfunction of blood-brain barrier [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450(4): 1638-42.
- [53] ABDULLAHI W, TRIPATHI D, RONALDSON P T. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315(3): C343-C56.
- [54] LEE B K, HYUN S W, JUNG Y S. Yuzu and hesperidin ameliorate blood-brain barrier disruption during hypoxia via antioxidant activity [J]. *Antioxidants*, 2020, 9(9): 843.