

# Caspase 与神经系统疾病

宋英, 魏尔清, 陈忠\*

(浙江大学医学院药理教研室, 浙江大学脑与智能交叉研究中心, 杭州 310006)

**摘要:** 近年来, 细胞凋亡发生机制的研究已取得众多进展。研究表明, 许多神经系统疾病与 caspase 家族有着密切联系。现将细胞凋亡的最新研究结果及其与神经系统疾病的关系, 尤其是 caspase 家族在神经系统疾病中的主导地位作简单综述, 希望由此了解神经元细胞凋亡的内在机制并达到治疗目的。

**关键词:** 凋亡; 神经变性疾病; caspase

**中图分类号:** Q25 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-9977(2004)03-227-04

20世纪90年代开始, 细胞凋亡的研究倍受关注。细胞凋亡正、负向精确调控失误都与许多疾病有关。细胞过度凋亡, 则引起退行性疾病, 如阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD), 反之, 细胞凋亡过度抑制时, 细胞无限制生长, 则引起肿瘤和自身免疫性疾病。大量研究表明, 脑缺血、脑外伤、神经退行性疾病都与细胞凋亡有着密切联系<sup>[1]</sup>。而在细胞凋亡的过程中, caspase 起着关键作用, 细胞凋亡各个阶段都可以监测到不同程度的 caspase 的增高。Caspase 在组织中含量的改变直接调控着凋亡发生的整个动态过程, 决定了细胞凋亡的进展方向及细胞的最后归宿<sup>[2]</sup>。基于 caspase 在神经元细胞凋亡中的重要性, 在此对这一领域最新的研究成果以及它与中枢系统疾病的相关性作一综述, 阐述 caspase 家族相关药物的开发对于治疗神经系统疾病的重要性, 同时提出相关问题及今后的研究方向。

## 1 Caspase 与细胞凋亡

Caspase 家族的 14 个成员已被证明存在于哺乳动物体内, caspase 的分类方法有许多种。迄今为止, 在脑内组织中发现至少有 7 种不同的 caspase: caspase-1, -2, -3, -6, -8, -9, -12, 在诱导神经细胞凋亡过程中各自担负着不同的使命<sup>[3]</sup>。Caspase 激活调节的模式有两种, 内源性和外源性。如图 1 显示, 外源损伤激活 caspase-8, 随后信息传递至 caspase-3, 诱导 caspase 介导的蛋白质变性、DNA 降解, 染色质凝聚细胞凋亡的过程<sup>[4]</sup>。内源性

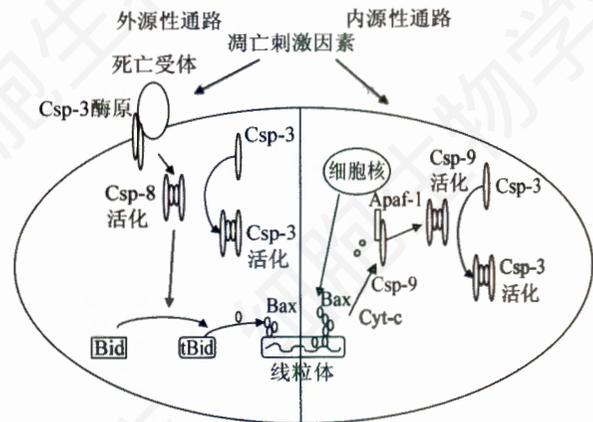


图 1 Caspase 的激活途径

的激活则激活细胞核内基因组 DNA, 促使 Bax 基因过度表达, Bax 蛋白结构改变, 导致 Bax 转位至线粒体, 依赖细胞线粒体凋亡过程开始运行, 其中线粒体释放的细胞色素 c 与凋亡激活蛋白因子(Apaf-1)和 caspase-9 形成凋亡体, 介导 ATP- 依赖 caspase-9 活化的通路。以上是两条经典的 caspase 激活通路, 还有少数是依赖于线粒体, 而 caspase 不参与的凋亡激活途径<sup>[5,6]</sup>。

## 2 神经系统疾病与 caspase

众所周知, 神经系统疾病由于发病机理复杂, 相比外周疾患难治。我们通常把神经疾病分为两大类(表 1): (1)急性神经疾病。如脑缺血、脑脊髓损

收稿日期: 2003-08-21; 修回日期: 2003-10-28

国家自然科学基金(No.30000019, No.30371638)项目资助

\* 通讯作者, E-mail: chenzhong@zju.edu.cn

表1 Caspase与神经系统疾病的关系

疾病	病例	发病方式	相关caspase	数据来源
脑血管疾病	脑出血	急性	1,2,3,8,9	动物(鼠)
	脑缺血	急性	1,2,3,8,9	动物(鼠,狗)
中枢神经感染	病毒	急性	3	动物,细胞实验
	细菌	急性	3	动物,人体尸解
	真菌	急性	3	动物
外伤性疾病	脑外伤	急性	1,3,9	动物实验
	脊髓外伤	急性	1,3,9	动物实验
神经退行性疾病	AD	慢性	3,9,12	动物,人体尸解,细胞实验
	PD	慢性	3	动物,人体尸解
	ALS	慢性	1,3	动物

伤,虽然急性损伤多数引起神经元细胞坏死,但缺血的周边区(即半暗区)的神经细胞随即发生凋亡。

(2)慢性神经退行性疾病。如AD,帕金森病(Parkinson's disease, PD)。研究发现,无论是急性还是慢性神经疾病的发生都与caspase家族有关。

### 2.1 脑血管疾病

中脑梗塞是最典型的脑缺血模型,由于中脑供血的血管变窄或者完全闭塞,引起该血管所供血区域的中枢神经组织处于缺血状态,最终导致中心区域的神经元细胞坏死,而周边区的神经元细胞发生迟发性细胞凋亡。在小鼠与狗的脑缺血模型中,细胞凋亡出现前,缺血周边区细胞色素c释放,caspase-2, -3, -8, -9等上升,尤其是caspase-3。在大鼠缺血后迟发性神经元凋亡模型中,如果将caspase-3的蛋白水解酶特异性阻断剂z-YVAD-FMK注射到大鼠脑室内,caspase-3活性明显下降,同时海马CA1区的细胞凋亡也明显减少<sup>[7]</sup>。Caspase-1在脑缺血也同样重要,在caspase-1基因敲除鼠脑内,不仅观察到脑梗塞的面积缩小,脑水肿也明显缓解。

在脑出血动物实验中也有类似情况。100  $\mu$ l大鼠自体鲜血注射至大脑基底节,与注射生理盐水的对照组相比,Western印迹显示:caspase在6h开始上升,3天达到高峰,2周后下降<sup>[8]</sup>,说明caspase的含量改变具有时间阶段性,且与预后相关。

### 2.2 中枢神经系统感染

脑炎或脑膜炎的致病菌主要是细菌、病毒、真菌,其神经元细胞凋亡与caspase也有关(表1)。有报道,在小儿脑炎脑组织病理检查、双重免疫组织化学染色中,caspase-3阳性的细胞明显增加。除神经元细胞以外,caspase-3在巨噬细胞、小神经胶质细胞也升高。另外有趣的是,在患脑膜炎的兔

子体内注入z-VDA-FMK可以显著抑制脑炎引起的神经元细胞凋亡,同时脑脊液中的白细胞数明显减少,脑部炎症减轻,实验结果提示可以通过抑制炎症因子来抑制细胞凋亡过程<sup>[9,10]</sup>。Desforges等在研究病毒感染与细胞凋亡过程中发现,神经元细胞在疱疹病毒持续感染120天后细胞发生凋亡,而caspase的抑制剂z-VAD-FWK可以使细胞的存活率上升达80%<sup>[11]</sup>。

### 2.3 外伤性神经损伤

因交通事故或者运动性外伤等引起的脑、脊髓严重损伤病例逐年增加,有许多病例预后不良,留下严重的后遗症。在使用大鼠和猴子的外伤动物模型中,采用病理学组织的TUNEL、免疫组织化学染色以及脑脊液生化检查都可以发现神经元细胞和病变部位周边区有caspase-3和caspase-9的活性上升。Cernak等在研究不同时间段,不同脑区在脑外伤后的表现时发现,caspase-3升高都继发在脑外伤以后,细胞凋亡多发生在外伤周边区,在外伤发生3天后达高峰<sup>[12]</sup>,用液压引起的脑外伤的模型中发现神经元caspase-3明显升高,而caspase-8在外伤后1, 12h均未见上升,48h后才略微提高,但相对于caspase-3,其含量几乎可以忽略不计<sup>[13]</sup>。进一步证实了caspase在诱导凋亡过程中存在着上下游关系。

而且在小鼠脑外伤实验中,z-YVAD-CMK的注射可以减少自由基的产生、减少病变损伤的面积,提示了caspase-1家族与该病的密切相关性。

### 2.4 神经退行性疾病

2.4.1 阿尔茨海默病 AD AD,又称早老性痴呆,其主要病理特征是大脑皮层及其他脑区出现 $\beta$ 淀粉样物质沉积、神经纤维缠结等。临床表现为认知功能障碍及人格改变等。研究人员在原代神经细胞培养、动物模型以及AD患者的尸解中,都发现Ab的蓄积。 $A\beta$ 片段是细胞膜上的前体( $\beta$ APP)从细胞外到细胞膜贯通那部位被 $\beta\gamma$ -分泌酶所切割脱落形成的。研究表明,caspase家族可以直接参与 $\beta$ 淀粉蛋白的切割,如caspase-3切割了靠近胞浆侧的C末端的720位的天冬氨酸,被caspase-3剪接后的这种C末端异常的 $A\beta$ 对细胞有毒性作用,可诱导细胞凋亡<sup>[14,15]</sup>。以往的实验均证实AD患者神经元细胞凋亡主要是通过caspase激活的经典内外两条途径,即在细胞凋亡过程中可发现caspase-3的激活和线粒体损伤<sup>[16,17]</sup>。另外,Presenilin-1(PS-1)基因突变是家族

性 AD 早期发病的主要诱发因素, 编码 PS-1 蛋白是一种定位于内质网的膜整合蛋白。在神经元细胞培养基因转染和基因敲除的小鼠中均发现内质网的钙池异常动员, 持续升高的钙离子诱导细胞凋亡<sup>[18,19]</sup>。而有关实验提示 caspase-12 可以介导既不依赖 caspase-3, 也与线粒体损伤无关的神经元凋亡途径, 其作用的靶位点是在细胞的内质网, 主要作用是促使内质网膜上的蛋白积聚, 影响内质网的钙离子代谢, 最终神经元内质网破碎, 细胞走向凋亡<sup>[20,21]</sup>。但是 caspase 所引起的细胞凋亡和 AD 病发病之间究竟有什么必然联系, 目前尚无定论。最新的研究发现, 从 caspase-3, caspase-12 基因剔除小鼠中分离得到的神经细胞有耐受 Ab 毒性作用, 由此可见, AD 神经元凋亡过程中 caspase 的重要性, 其详细的机制还有待于进一步研究。

**2.4.2 帕金森病 PD** PD 发病率在神经退行性疾病中居第二位, 是黑质-纹状体通路的多巴胺神经细胞脱落和变性, 神经纤维的电传导破坏而引起的疾病。细胞实验结果显示, caspase 抑制剂可以改善神经毒诱发的凋亡。在 PD 患者的脑内的黑质脑区观察到 caspase-3 显著增加的现象, 有趣的是, 往小鼠脑内注射神经毒 MPTP 也有同样的发现。通过电镜观察细胞的形态学变化, 发现没有发生凋亡的细胞中, 活化的 caspase-3 主要存在于线粒体膜上, 而在染色质已经发生凝聚的细胞中检测不到有活性的 caspase-3<sup>[22]</sup>。Mochisuki 等先用表达 caspase 的质粒转染多巴胺神经元细胞, 诱导细胞凋亡, 随后再用抑制 caspase 表达的腺病毒载体阻止 caspase 的表达, 则多巴胺神经元细胞内 caspase 下降, 细胞凋亡被抑制<sup>[23]</sup>。由此可见, caspase 是在神经元细胞死亡实行之前就已经达到活化程度。这些结果暗示了多巴胺神经细胞凋亡与 caspase 家族具有相关性。但是迄今为止, 尚不清楚 caspase 对 PD 的发病以及发病过程的作用机制。

**2.4.3 肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)** ALS 是渐进性大脑、脑干、脊髓神经元细胞死亡诱发的疑难中枢神经疾病。临床主要表现为肌肉萎缩, 愈后极差而且死亡率很高。目前为止尚无特别有效的药物可以治疗。有 10% 家族性 ALS 主要是由于编码超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase 1, SOD 1) 基因突变而引起<sup>[24]</sup>。脑内注射 caspase 的阻断剂的 ALS 小鼠, 能够推迟发病年龄和降低死亡率。转基因小鼠脑中有活性的 caspase 上

升, 且 caspase 长期处于活化状态, 尤其是 caspase-1, 随着 ALS 鼠年龄增加, caspase-1 mRNA 转录水平上调, 接着 RT-PCR 可测得 caspase-3 mRNA 转录水平也随之上调。这个结果与临床发现相符。在 ALS 发病早期, 临床尚无出现肌萎缩前, 就可以在病变的脊髓前角检测到 caspase-1 含量开始上升, 出现明显临床症状后, 脊髓前角 caspase-1 和 caspase-3 含量均明显增加<sup>[25]</sup>。人们设想可以通过调节 caspase 的变化来延缓病程发展, 并最终治疗该病, 但是首先还需进一步深入探讨 caspase 家族在肌萎缩性侧索硬化症中详细作用机制。

### 3 研究问题与应用前景

大量实验表明, 神经系统疾病如脑缺血、脑外伤、HD, AD, ALS 等疾病的发生都与 caspase 家族具有密切关系。为了有效治疗神经退行性疾病, 许多药物开发研究都着重于 caspase 的抑制剂, 但目前研究主要局限在动物或细胞水平。综合起来, 调节疗法有两种策略。一方面, 选择性地激活凋亡, 如设计 Bcl-2 反义核酸, 封闭 Bcl-2 的过度表达, 用于治疗由于凋亡不足引起的肿瘤<sup>[26]</sup>。这是目前研究最多的靶分子之一, 现已进入临床第 I / II a 阶段的研究。另一方面, 开发 caspase 的抑制剂, 多数药物是模拟肽酮活化位点, 如 z-VAD-FMK, z-YVAD-FMK/EMK, z-DEVD-FMK/CMK, z-D-CMK 等。但是这些都是相对无选择性的 caspase 抑制剂, 特异性很差。因此, 从理论上说, 阐明 caspase 的激活途径, 可以开发一些选择性和特异性较高的阻断剂用以治疗这类疾病。

虽然 caspase 研究已取得了很大进展, 但临床治疗仍存在着一些问题。Caspase 抑制剂的使用阻止了神经元的凋亡, 但如何帮助已凋亡的神经元恢复, 至今还是一个未解决的问题。其次如何安全使用 caspase 的抑制剂也是急需解决。在设计治疗这些疾病的方案中, 能否可以通过 caspase 的生物靶向治疗<sup>[27]</sup>, 将 caspase 直接引导到所要治疗的单个细胞上去, 抑制凋亡的同时辅以神经营养因子等药物, 不但抑制细胞凋亡, 而且将细胞引导到正常生长的途径等。目前, 所有的方法都尚在探索中。

### 参 考 文 献

- [1] YUANG J, YANKNER B A. Apoptosis in the nervous system[J]. *Nature*, 2000, **407**: 802 - 809.
- [2] KANDUC D, MITTELMAN A, SERPICO R. Cell death:

- apoptosis versus necrosis[J]. *Int J Oncol*, 2002, **21**: 165 — 170.
- [3] TROY C M, SALVESEN G S. Caspase on the brain [J]. *J Neurosci Res*, 2002, **69**: 145 — 150.
- [4] RANGER A M, MALYNN B A, KORSMEYER S J. Mouse models of cell death [J]. *Nat Genet*, 2001, **28**: 113 — 118.
- [5] ROBERT M, FRIEDLANDER M D. Apoptosis and caspases in neurodegenerative disease [J]. *J England Medicine*, 2003, **348**: 1365 — 1375.
- [6] CHEN J, NAGAYAMA T, JIN K, *et al.* Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia [J]. *J Neurosci*, 1998, **18**: 4914 — 4928.
- [7] LI Y, CHOPP M, JIANG N, *et al.* In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia in mice [J]. *Brain Res Mol*, 1995, **28**: 164 — 168.
- [8] Gong C, Boulis N, Qian J, *et al.* Intracerebral hemorrhage-induced neuronal death [J]. *Neurosurgery*, 2001, **48**: 875-882
- [9] GARDEN G A, BUDD S L, TSAI E. Caspase cascades in human immunodeficiency virus-associated neurodegeneration [J]. *J Neurosci*, 2002, **22**: 4015 — 4024.
- [10] BRAUN J S, NOVAK R, HERZOG K H, *et al.* Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis [J]. *Nat Med*, 1999, **5**: 298 — 302.
- [11] DESFERGER M, DESPARS G, BERARDS S, *et al.* Matrix X protein mutations contribute to inefficient induction of apoptosis leading to persistent infection of human neuro cells by vesicular stomatitis virus [J]. *Vivology*, 2000, **295**: 65 — 73.
- [12] CERNAK I, CHAPMAN S M, HAML I G P, *et al.* Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats [J]. *J Clin Neurosci*, 2002, **9**: 56 — 72.
- [13] KNOBLACH S M, NIKOLAEVA M, Huang K, *et al.* Multiple caspases are activated after traumatic brain injury: evidence for involvement in functional outcome [J]. *J Neurotrauma*, 2002, **19**: 1155 — 1170.
- [14] GERVAIS F G, XU D, ROBERTSON G S. Involvement of caspases in proteolytic cleavage of Alzheimer's amyloid-beta precursor protein and amyloidogenic A beta peptide formation [J]. *Cell*, 1999, **97**: 395 — 406.
- [15] AYALA-GROSSO C, NG G, ROY S, *et al.* Caspase-cleaved amyloid precursor protein in Alzheimer's disease [J]. *Brain Path*, 2002, **12**: 430 — 441.
- [16] YAMAZAKI Y, TSURUGA M, ZHOU P, *et al.* Cytoskeletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis [J]. *Exp Cell Res*, 2000, **259**: 64 — 78.
- [17] ROHN T T, RISSMAN R A, DAVIS M C, *et al.* Caspase-9 activation and caspase cleavage of tau in the Alzheimer's disease brain [J]. *Neurobiol Dis*, 2002, **15**: 341 — 354.
- [18] CHAN S L, CULMSEE C, HANGHOY N, *et al.* Presenilin-1 mutations sensitise neurons to DNA damage-induced death by a mechanism involving perturbed calcium homeostasis and activation of calpains and caspase-12 [J]. *Neurobiol Dis*, 2002, **11**: 2 — 19.
- [19] MORISHIMA N, NAKANISHI K, TAKENOUCHE H, *et al.* An endoplasmic reticulum stree-specific caspase in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12[J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 34287 — 34294.
- [20] NAKAGAWA T, ZHU H, MORISHIMA N, *et al.* Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum- specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta [J]. *Nature*, 6, **403**: 98 — 103.
- [21] MCNEISH I A, BELL S, MCKAY T, *et al.* Expression of Smac/DIABLO in ovarian carcinoma cells induces apoptosis via a caspase-9-mediated pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2003, **286**: 186 — 198.
- [22] HARTMANN A, HUNOT S, MICHEL P P, *et al.* Caspase-3: A vulnerability factor and final effector in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**: 2875 — 2880.
- [23] MOCHIZUKI H, Mizuno Y. Gene therapy for Parkinson's disease [J]. *J Neurol Transm Suppl*, 2003, **65**: 205 — 213.
- [24] ROSEN D R, SIDDIQUE T, PATTERSON D. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *Nature*, 1993, **362**: 59 — 62.
- [25] FRIEDLANDER R M, BROWN R H, GAGLIARDINI V, *et al.* Inhibition of ICE slows ALS in mice [J]. *Nature*, 1997, **388**: 31 — 31.
- [26] NICHOLSON D W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents [J]. *Nature*, 2000, **407**: 810 — 816.
- [27] GLEAVE M E, MIAGAKE H, GOLDIE J, *et al.* Trageting bcl-2 gene to delay androgen-independent progression and enhance chemosensitivity in prostate cancer using antisense bcl-2 oligocleotides [J]. *Urology*, 1999, **54**: 36 — 46.

## Caspase and Central Nervous System Disease

SONG Ying, WEI Er Qing, CHEN Zhong\*

(Department of Pharmacology, Reasearch Centre for Brain and Intelligence, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**Abstract:** In recent years, considerable progress has been made in understanding the process of cell death. A character of many central nervous system (CNS) diseases is correlation with caspase. In this paper, we reviewed the important of caspase and the mechanisms of neuronal-cell death in CNS diseases. Meantime, we summarized the evidence concerned with apoptosis, and discussed the knowledge of therapeutic strategies.

**Key words:** apoptosis; central nervous system disease; caspase

This work was supported by the National Natual Science Foundation of China (No.30000019, No.30371638)

\*Corresponding author, E-mail: chenzhong@zju.edu.cn