

- 852.
- [23] 孙国凤译,1996,日经生物技术,3月11日,2页.
- [24] Bode J, et al., 1988, *Biochemistry*, **27**(13):4706-4711.
- [25] 薛京伦等,1998,生物技术通报, **3**:17-20.
- [26] Wall RJ, 1996, *Theriogenology*, **45**:57.
- [27] Steven H, 1998, *BioEssays*, **20**:532-535.
- [28] Garrick D, et al., 1998, *Nat. Genet.*, **18**:56-59.
- [29] Baruch A, 1998, *Transgenic-Res.*, **7**(1):15-27.
- [30] 刘森等,生物工程学报,2000, **16**(4):421-424.
- [31] 岳军明,1998,中国生物化学与分子生物学报, **14**(2):140-143.
- [32] 陈红星等,2001,生物工程学报, **17**(2):135-139.
- [33] 卢一凡等,1999,中国生物化学与分子生物学报, **15**(1):15-18.
- [34] 黄淑娟等,1998,科学通报, **43**(7):783-784.
- [35] 张靖涛等,1997,生物工程学报, **13**(2):154-159.
- [36] 李宁等,2001,生物技术通报, **2**:46-47.

## 缺血再灌注诱发神经元凋亡的机制和影响因素

陈中军 徐志伟

(上海第二医科大学新华医院小儿心胸外科 上海 200092)

细胞凋亡(apoptosis)是由许多生理及病理刺激引发的细胞自杀过程,它是个主动的、按照一定程序进行的细胞死亡。机体通过凋亡可将发育不良、畸变及衰老的细胞从体内清除。因而凋亡在机体的生长发育、疾病、衰老的过程中有着重要的地位。缺血缺氧是一种导致细胞凋亡的病理环境。缺血再灌注是在缺血缺氧的基础上加上再灌注损伤。神经元在这种环境中损伤十分明显,凋亡在其中扮演重要的角色。这种凋亡常发生在海马的齿状回,新皮质的第2层,内嗅皮质的第2、3、5层和基底节<sup>[1]</sup>。其中以海马齿状回处的凋亡最明显,也最易被定量检测<sup>[2]</sup>。神经系统表现为学习与记忆受损、智力受损等。其中智力受损与海马受损有关<sup>[3]</sup>,识别记忆受损与新皮层和内嗅皮质有关<sup>[4]</sup>。现在对缺血再灌注所引起的神经元凋亡已日益重视,对其中机理和影响因素的研究也不断深入。

### 一、神经元凋亡的途径

与其他细胞一样,神经细胞凋亡有三条途径:外源性途径、内源性途径和不依赖 Caspase 的凋亡诱导因子(AIF)途径。外源性途径是通过细胞膜上的 Fas 等受体,激活 Caspase-8 再剪切激活 Caspase-3 导致凋亡<sup>[5]</sup>。内源性途径是由于线粒体释出的细胞色素 C 在胞浆中与 Apaf-1、dADP、Caspase-9 形成凋亡复合体(aposome)活化 Caspase-9 再激活 Caspase-3 导致凋亡<sup>[6]</sup>。凋亡诱导因子(AIF)在细胞正常状态时位于线粒体内。在细胞凋亡时,凋亡诱导因子失去其线粒体定位序列片段并释出线粒体,导致线粒体膜电位消失,细胞色素 C 释放,DNA 断裂,核染色体浓聚<sup>[7,8]</sup>。凋亡诱导因子的作用不通过 Caspase,也不受抗凋亡蛋白 Bcl-2 影响<sup>[7]</sup>。

在三条凋亡途径中,内源性途径和凋亡诱导因子途径与线粒体直接相关。外源性途径实际上也与线粒体有联系。在细胞膜受体活化 Caspase-8 后, Caspase-8 还可剪切作用于 bcl-2 家族的 Bid 蛋白, Bid 蛋白再作用于线粒体,使细胞色素 C 释出,发动凋亡的内源性途径。因此线粒体在细胞凋亡中起重要作用。中枢神经系统的细胞代谢消耗较大,所以对缺血缺氧的刺激十分敏感。线粒体作为能量代谢的重要细胞器,在缺血缺氧条件下处于能量缺乏状态。在随后的再灌注的过程中,线粒体又受到进一步的损害,使线粒体的通透性改变,通透转运孔(permeability transition pore)开放<sup>[9]</sup>。由于通透转运孔的开放,使线粒体基质与胞浆内离子流动,破坏了线粒体内膜的跨膜电位,影响了呼吸链运行,使能量代谢进一步受损<sup>[10,11]</sup>。更重要的是,线粒体受损,释出了许多与凋亡相关的活性物质,包括细胞色素 C<sup>[12,13]</sup>。它们可直接启动凋亡的内源性途径和凋亡诱导因子途径。因此 Caspase-3 蛋白酶活性在缺血再灌注后的神经元中明显升高<sup>[14]</sup>。Bcl-2 家族中的 Bax 在缺血再灌注损伤的神经元中也迅速移动到线粒体,并与线粒体膜上的电压依赖性阴离子通道(voltage-dependent anion channel, VDAC)和腺嘌呤核苷转运体(adenine nucleotide translocator, ANT)发生作用<sup>[15]</sup>,使线粒体通透性改变,释出细胞色素 C 和 Caspase-9。两者又使缺血再灌注所致的神经元凋亡进一步加重<sup>[16]</sup>。

### 二、神经元凋亡的特点

神经元在缺血再灌注过程中出现的凋亡有一些特点。神经元细胞受损的表现和机制与典型的凋亡有所不同。在典型的凋亡中, Caspase 活化的 DNA

酶(CAD)是 Caspase-3 特异性激活的核酸内切酶,它能剪切 DNA 成 180 到 200 个碱基对的片段<sup>[17]</sup>。而在脑缺血损伤后形成的 DNA 片段与这种典型的凋亡表现有区别。这些片段中包含一些高分子量的 DNA 片段,片段中含有达 10K 至 50K 的碱基对<sup>[18]</sup>。所以,CAD 的作用在缺血损伤后的神经元凋亡中不是唯一损伤核酸 DNA 的机制。Chen 等认为在神经元凋亡中还有 CAD 以外的依赖 Caspase 的途径造成 DNA 损伤<sup>[19]</sup>。中枢神经系统在缺血和再灌注的双重打击下会产生许多氧自由基等氧化物质。氧化所致的 DNA 损伤在脑缺血特别是恢复灌注时十分明显<sup>[20]</sup>。这种 DNA 的氧化损伤不限于组蛋白,而是在核酸上的任意部位都可发生。因而在电泳时会产生零乱的点状分布图象。这种表现与核酸内切酶介导的 DNA 损伤的表现不同<sup>[21]</sup>。所以在考虑核酸内切酶作用的同时,不能忽视氧自由基对核酸 DNA 的直接损伤。凋亡诱导因子(AIF)在凋亡中也可起到核酸内切酶的作用,形成高分子量 DNA 片段<sup>[7]</sup>。但它在缺血再灌注的神经元凋亡中的作用尚需进一步证实。

在脑缺血再灌注的损伤中,缺血损伤还能激活 bcl-2 家族中起凋亡抑制作用的蛋白的表达,形成神经保护作用。例如,Bcl-2 和 Bcl-XL 在脑缺血损伤后存活的神经元中有表达<sup>[22]</sup>。Bcl-2 的减少也会使缺血损伤后脑梗死的区域扩大<sup>[23]</sup>。而且在缺血再灌注的过程中,起凋亡抑制作用的 Bcl-w 蛋白能作用于线粒体膜,减少由 Bax 或钙超载所诱发的细胞色素 C 的释放,起到内源性神经保护作用<sup>[24]</sup>。

### 三、神经元凋亡的影响因素

神经元所处的环境较为特殊,有许多因素影响到神经元的生存。在缺血再灌注的情况下,有许多物质产生与作用发生变化,其中最引人注意的是一氧化氮(NO)和兴奋性氨基酸。

#### 1. 一氧化氮(NO)与神经元凋亡

NO 的前体是精氨酸,其代谢途径是鸟苷酸循环,主要是通过一氧化氮合酶生成。一氧化氮合酶(NOS)有三种类型:神经元型 NOS(nNOS),内皮细胞型 NOS(eNOS)和免疫型 NOS(iNOS)。神经元型 NOS 与内皮细胞型 NOS 都依赖钙离子或钙调蛋白;免疫型 NOS 不依赖钙离子或钙调蛋白,会在免疫反应和神经损伤时表达<sup>[25]</sup>。nNOS 主要在神经系统的一部分神经元和全身其他一些器官组织内表达。在神经系统产生的 NO 与介导突触和神经信号

有关,同时在缺血损伤时也产生神经毒性。由 nNOS 产生的 NO 是神经毒性 NO 的主要来源,而且在脑缺血造成的损伤早期起重要作用。iNOS 一般在健康组织中难发现有表达,它常在病理情况下表达,部位包括神经元、星形细胞和内皮细胞。eNOS 主要在内皮细胞表达,由于 NO 是血管血流动力学的主要调节因子和介导血管松弛的信息分子,所以由 eNOS 介导产生的 NO 可以通过维持局部脑血流起到保护脑组织的作用<sup>[25]</sup>。

缺血再灌注会带来不可避免的脑损伤,NO 在其中有重要的作用。现在认为,NO 可以直接激活 Caspase-3 产生凋亡<sup>[26]</sup>。Brock 等使用 L-[<sup>14</sup>C]-精氨酸作为 NO 生成的指标进行实验,发现 nNOS 在脑缺血早期就有明显表达,使脑内 NO 广泛增多<sup>[27]</sup>。随着时间推移,NOS 的活性渐下降至正常,NO 也逐渐减少。但在恢复循环再灌注时,NO 的生成又增加,从而加重脑损伤<sup>[1,4]</sup>。在实验中,针对 NO 作用的药物已取得了一定的神经保护效果<sup>[28]</sup>。目前已发现选择性 nNOS 阻断剂 7-nitroindazole 和 17477AR 都能明显减少 NO 生成和神经元凋亡。其中 7-nitroindazole 可明显改善实验动物手术后的种属特异行为评分(species-specific behavioral scale)<sup>[29]</sup>。这些药物的保护效果也从反面证明了 NO 是一个重要的神经毒性物质。

#### 2. 兴奋性毒性与神经元凋亡

由于许多神经损伤因素最终都将通过兴奋性毒性这一最终通路造成神经元变性和死亡,所以对兴奋性毒性物质在神经元凋亡中的作用也日益重视。哺乳动物的中枢神经系统中较常见的兴奋性氨基酸有谷氨酸、天冬氨酸和甘氨酸。谷氨酸是脑中基本的神经递质,主要分布在大脑皮质、小脑和纹状体,与许多神经生理功能有关,如认知、记忆、运动和感觉。但在病理情况下,细胞外过多的兴奋性氨基酸,包括谷氨酸和天冬氨酸,将活化谷氨酸受体。谷氨酸受体分两类:一类是与 G 蛋白相关的代谢型受体,另一类是与离子通道有关的离子型受体;离子型受体又分三种类型:NMDA 受体、AMDA( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionate)受体和 KA(kainic acid)受体。活化这些受体将导致细胞膜去极化。NMDA 受体过度激活,Ca<sup>2+</sup>大量内流造成神经元钙超载,激活与细胞毒性有关的酶,如蛋白激酶 C、磷脂酶、蛋白酶、NOS 等。磷脂酶 A<sub>2</sub> 激活后产生大量花生四烯酸和血小板活化因子。血小板活化因子可提高细胞内 Ca<sup>2+</sup>浓度,刺激谷氨酸释放,

形成谷氨酸的正反馈;花生四烯酸代谢中生成大量氧自由基,氧自由基又导致更多的磷脂酶 A<sub>2</sub>,形成氧自由基的正反馈<sup>[30]</sup>。这两个正反馈能产生大量有害物质,造成并加重神经元细胞受损。

兴奋性毒性物质谷氨酸,在细胞外浓度增高,是神经元受损的主要因素。脑部处于缺血缺氧时,由于神经元细胞 ATP 不足,细胞能量代谢受损,Na<sup>+</sup>浓度梯度无法维持,造成谷氨酸转运系统失效,细胞外谷氨酸堆积;能量不足,ATP 短缺,又可使星形细胞内的谷氨酰胺合成酶无法将谷氨酸转化为谷氨酰胺,使细胞内谷氨酸堆积;能量缺乏还使 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶活性下降,使得细胞内 Na<sup>+</sup>增多,导致神经元除极,突触释出谷氨酸。这些细胞内外的兴奋性毒性物质使神经元严重受损,从而释出更多谷氨酸加重损伤更多神经元。从受体来说,NMDA 受体的离子通道正常时受到电压和配体的双重控制;但在膜电位被破坏的情况下,这两者都受到影响,NMDA 受体的活性明显升高,容易受到谷氨酸的激活<sup>[30]</sup>。作为离子型通道的 NMDA 受体能让 Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>和 K<sup>+</sup>通过,其中 Na<sup>+</sup>和 Ca<sup>2+</sup>内流与突触传递有关;而 NMDA 受体介导的 K<sup>+</sup>外流与神经元凋亡有关。Yu 等通过增加细胞外 K<sup>+</sup>浓度减少 K<sup>+</sup>外流而减轻神经元凋亡并分离出 NMDA 受体介导的外向 K<sup>+</sup>电流<sup>[31]</sup>。实验中使用选择性 NMDA 受体阻断剂 dizocilpine(MK-801)也取得了神经保护效果<sup>[3]</sup>。低温在临床脑保护中的应用早已得到了肯定<sup>[32]</sup>。现在认为其机理是在神经元水平阻止了兴奋性毒性物质的释放,包括兴奋性氨基酸<sup>[33]</sup>。其途径是通过减少 NMDA 和 AMDA 受体的表达,防止不正常的钙内流对神经元的损害<sup>[34]</sup>。

由于中枢神经系统中的神经元凋亡在生长发育、各种损伤、退行性疾患中都占有重要的地位,所以现在大家正在研究它的机理,以及它与一般细胞凋亡机理的共性,并努力找出它的特性,从而针对其机理提出更好的治疗方法,达到脑保护的目。

## 摘 要

缺血再灌注引起的神经元凋亡对中枢神经系统有一定的损伤。本文对神经元凋亡的途径特点和影响因素如一氧化氮、兴奋性氨基酸进行分析和总结,旨在对这种损伤的基础研究和治疗提供可能的目标。

## 参 考 文 献

[ 1 ] Tseng,EE. et al. ,1997, *Ann Thorac Surg*, **64**: 1639 -

1647.

[ 2 ] Tseng,EE. et al. ,1999, *Ann Thorac Surg*, **67**:771 - 776.

[ 3 ] Redmond, JM. , et al. ,1994, *J Thorac Cardiovasc Surg*, **107**:776 - 787.

[ 4 ] Tseng,EE. et al. ,1999, *Ann Thorac Surg*, **67**:65 - 71.

[ 5 ] Thornberry NA, et al. ,1998, *Science*, **281**:1312 - 1316.

[ 6 ] Li, P. et al. ,1997, *Cell*, **91**:479 - 489.

[ 7 ] Susin, SA. et al. ,1999, *Nature*, **397**:441 - 446.

[ 8 ] Ferri, KF. et al. ,2000, *J. Exp Med*, **192**:1081 - 1092.

[ 9 ] Reed, JC. et al. ,1998, *Biochem Biophys Acta*, **1366**:127 - 137.

[ 10 ] Mignotte, A. et al. ,1998, *Eur J Biochem*, **252**:1 - 15.

[ 11 ] Green, DR. et al. ,1998, *Science*, **281**:1309 - 1312.

[ 12 ] Miguel, A. et al. ,1999, *J Cereb Blood Flow Metab*, **19**: 34 - 43.

[ 13 ] Fujimura, M. et al. ,1998, *J Cereb Blood Flow Metab*, **18**: 1239 - 1247.

[ 14 ] Namura, S. et al. ,1998, *J Neurosci*, **18**:3659 - 3668.

[ 15 ] Shimizu, S. et al. ,1999, *Nature*, **399**:483 - 487.

[ 16 ] Krajewski, S. et al. ,1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**: 5752 - 5757.

[ 17 ] Enari, M. et al. ,1998, *Nature*, **391**:43 - 50.

[ 18 ] Macmanus, JP. et al. ,1999, *J Cereb blood Flow Metab*, **19**:502 - 510.

[ 19 ] Chen, D. et al. ,2000, *J Biol Chem*, **275**:38508 - 38517.

[ 20 ] Nagayama, T. et al. ,2000, *J Neurochem*, **75**:1716 - 1728.

[ 21 ] Du, C. et al. ,1996, *J Cereb Blood Flow Metab*, **16**:195 - 201.

[ 22 ] Chen, J. et al. ,1997, *J Cereb Blood Flow Metab*, **17**:2 - 10.

[ 23 ] Chen, J. et al. ,2000, *J Cereb Blood Flow Metab*, **20**: 1033 - 1039.

[ 24 ] Yan, C. et al. ,2000, *J Cereb blood Flow metab*, **20**:620 - 630.

[ 25 ] Samdani, AF. et al. ,1997, *Stroke*, **28**:1283 - 1288.

[ 26 ] Maiese, K. et al. ,1999, *Neurosci Lett*, **264**:17 - 20.

[ 27 ] Brock, MV. et al. ,1996, *Ann Thorac Surg*, **62**:1313 - 1320.

[ 28 ] Lin, SH. et al. ,2000, *J Cereb Blood Flow Metab*, **20**:1380 - 1391.

[ 29 ] Baumgartner, NA. et al. ,1997, *Ann Thorac Surg*, **67**:1871 - 1873.

[ 30 ] Lipton, SA. et al. ,1994, *N Engl J Med*, **330**:613 - 2231.

[ 31 ] Yu, SP. et al. ,1999, *Science*, **284**:336 - 339.

[ 32 ] 徐志伟等,1997, *中华胸心血管外科杂志*, **13**:359 - 362.

[ 33 ] Tymianski, M. et al. ,1998, *J cereb Blood Flow metab*, **18**: 848 - 867.

[ 34 ] Friedman, LK. et al. ,2001, *Brain Res (Molecular Brain Res)*, **86**:34 - 47.