

· 综述 ·

脑缺血再灌注损伤中细胞凋亡的研究进展

李琳 张志强

在近些年的研究中,发现脑缺血后有相当部分的血管能自然再通或经溶栓治疗后血流恢复再通,但随之而来的是出现再灌注损伤。脑缺血再灌注损伤中的神经细胞凋亡现象受到人们的关注,本文就其研究进展作一综述。

细胞凋亡概述

细胞有两种死亡形式,即细胞坏死和细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡与细胞坏死的本质区别在于前者是一种主动的死亡过程,并伴随基因的转录和蛋白质的合成,特征性的变化是 DNA 的寡核小体间裂解,在凝胶电泳时呈现特征性的“DNA”梯。有研究表明 DNA 修复蛋白 Ku70 和 Ku86 可以减少再灌注后缺血带 DNA 碎片和凋亡的表达^[1]。细胞凋亡形态学表现为核固缩、胞膜发泡和凋亡小体形成。细胞凋亡是由特定的基因调控,无明显的细胞溶解的过程。

细胞凋亡广泛地参与了很多疾病的病理过程,如病毒性疾病、脏器移植时的免疫排斥反应、自身免疫性疾病、组织变性等。近年来发现,缺血再灌注损伤与细胞凋亡有密切的联系。实验证明,分别在局灶性脑缺血动物模型和全脑缺血动物模型中观察神经细胞凋亡现象及细胞凋亡的时间表达,缺血再灌注后 0.5 h 可出现凋亡细胞,24 ~ 48 h 达高峰,最长可持续到 28 d。凋亡细胞的数量随缺血时间的延长而增多,凋亡细胞出现在梗死周围的内缘,即所谓的“半影区”,免疫组化方法证实凋亡细胞大部分为神经细胞(90% ~ 95%)。细胞凋亡时有多种基因转录和蛋白质合成的增加。c-fos, c-jun, c-mac, P53 及与 bcl-2 相关的 bcl-X 蛋白基因表达均能诱导凋亡的发生,而 bcl-2 和 bcl-X1 能抑制大多数凋亡的过程。

脑缺血再灌注损伤细胞凋亡机制

一、自由基

氧自由基是细胞正常代谢的副产物。在有氧呼吸过程中,从线粒体呼吸链中可渗漏一些还原不完全的氧分子,以致产生大量的 O_2 和 H_2O_2 。其产生来源有中性粒细胞、线粒体、 Ca^{2+} 超载。脑缺血时,神经元能表达环氧合酶-2(cyclooxygenase-2, Cox-2)和诱导型一氧化氮(iNOS),激活小胶质细胞产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)。ROS 以线粒体为靶点致脑缺血损伤,ROS 攻击线粒体使细胞色素 C(cytochrome c, Cyt-C)从线粒体释放到胞浆中,Cyt-C 能激活 caspase 基因,诱导细胞凋亡。ROS 通过上调 NF- κ B 使 Cox-2, iNOS, CKs 等表达增高^[2]。有研究表明,缺氧应激对缺血再灌注的脑内皮细胞有基因毒性(genotoxin)和细胞毒性(cytotoxin)的作用,其表现为染色体畸变、细胞凋亡等^[3]。脑缺血时,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)表达下调,清除 ROS 的能力下降,ROS 的生成增多,损伤脑组织,而上调 SOD 基因的表达能明显减轻脑缺血损伤。

DNA 是细胞内氧自由基最主要的攻击目标。自由基,主要是羟自由基,能通过直接和间接的机制损伤 DNA。另外,氧自由基的脂质氧化毒性产物可间接损伤 DNA。最常见的 DNA 氧化损伤包括 DNA 碱基损伤、单链断裂、双链断裂、DNA 间、DNA 链间及 DNA 与蛋白间的交叉连接。在这些损伤中,碱基损伤和链的断裂最为常见。目前已经鉴定出多种 DNA 碱基损伤,包括 8-羟基氧化鸟嘌呤、8-羟基氧化腺嘌呤、乙二醇胸腺嘧啶、乙二醇胸苷、AP 位点等等。其他常见的氧化碱基损伤还包括 5-羟基-2'-脱氧胸腺嘧啶(5-OHC)和 5-羟基脱氧胸腺嘧啶(5-OJU)等。Lan 等^[4]在脑缺血后数分钟内检测到 DNA 单链断裂和 8-羟基氧化鸟嘌呤的表达。

因为自由基及自由基介导的自由基连锁反应在脑缺血再灌注中的损害作用,故抗自由基治疗成为近年来研究的焦点。在离体细胞培养实验和活体脑缺血实验中,抗氧化治疗显示出明显的保护神经和减轻脑缺血再灌注损伤的作用,如脂质连接铜锌超氧化物歧化酶(SOD_1)或 NOS 抑制剂可显著缩小脑梗死体积,而且此保护作用还可见于 SOD_1 过度表达的或 NOS 剔除的转基因鼠^[5]。Huang 等^[6]通过研究大鼠 MCAO 模型得出 SOD_1 过度表达可以削弱 NF- κ B 的活性,防止有害基因(如 c-myc)引发的瀑布样改变。但是 Fujimura 等^[5]用大鼠永久性脑梗死模型进行研究,发现 SOD_1 并不影响脑水肿和脑梗死体积, SOD_1 可能通过减少线粒体 Cyt-C 的释放来防止细胞凋亡的产生。这其中的机制有待于进一步的研究。也有研究表明,骨形态生成蛋白-6(BMP-6)可以通过削弱脑缺血再灌注中由 H_2O_2 导致 LDH 的活性,减少缺血导致的 caspase-3 免疫反应及 caspase-3 酶活性,减少脑缺血皮质中的 TUNEL 染色凋亡细胞数量^[7]。因为自由基在细胞凋亡中的作用,近年来有许多抗氧化剂产生,减轻缺血再灌注损伤中的细胞凋亡,如 Vit E、绿茶萃取物及银杏叶萃取物等^[8]。

二、一氧化氮

以往研究表明,一氧化氮(NO)在脑缺血的病理生理机制中有双重作用,即参与脑缺血急性脑损伤与迟发神经元死亡过程,并具有一定的神经保护作用。NO 诱导神经细胞凋亡的机制有:损伤 DNA,形成过氧亚硝酸根离子(peroxynitrite, ONOO⁻)和羟自由基($\cdot OH$)导致 DNA 氧化;抑制 DNA 修复酶的作用,激活聚腺苷二磷酸核糖合成酶[poly(ADP ribose) synthetase, PARS],使细胞能量衰竭。NO 可影响基因的表达,在星形胶质细胞中可下调 bcl-2 和上调 bax,激活 caspase 诱导细胞凋亡,并且能降低细胞线粒体跨膜电位,导致神经元凋亡。

NO 是以 L-精氨酸为底物,在一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)催化下产生的。NOS 可分为结构型(cNOS)和诱导型(iNOS),cNOS 包括内皮源性 NOS(eNOS)和神经源性 NOS(nNOS)。实验证明,eNOS 上调具有神经保护作用,nNOS 介导产生的 NO 参与缺血早期的脑损伤,具有神经毒性作用^[9],iNOS 可诱导谷氨酸兴奋毒性,加重缺血再灌注损伤。在鼠局灶性脑梗死模型中,缺血后 12 h 可检测到 iNOS 蛋白和催化活性增高。

脑缺血后 24 h 应用 iNOS 抑制剂氨基胍,与对照组相比,能显著减少梗死灶体积,用氨基胍产生的神经保护作用可被过多的 L-精氨酸逆转,而不为 D-精氨酸所影响。应用转基因技术,将 iNOS 表达基因缺失小鼠和野生小鼠相比,局灶性脑缺血后梗死体积明显缩小。NOS 产生过量的 NO,能与超氧阴离子形成 ONOO⁻和 ·OH,损伤线粒体膜,使线粒体形成漏道,开放线粒体转换孔,致使离子平衡紊乱。大量的 Na⁺和 Cl⁻进入细胞内,水被动进入胞内引起细胞肿胀,ATP 能量合成终止,诱导细胞坏死和凋亡^[10]。

三、兴奋性氨基酸

在局部脑缺血过程中,兴奋性氨基酸(excitatory amino acids, EAA)的神经毒性作用是损伤脑组织的启动者和执行者。该机制不仅直接导致细胞坏死,同时也可诱导细胞凋亡。EAA 主要有谷氨酸(glutamate, Glu)、天冬氨酸(aspartate, Asp)及甘氨酸(glycine, Gly)。Glu 是缺血后最早释放的氨基酸,近年对其研究也较多。通常情况下,脑缺血发生时 ATP 含量减少,ATP/ADP 比率下降,Na⁺-K⁺-ATP 酶活性下降,细胞内 Na⁺增加,膜去极化引起 Glu 释放。同时细胞内 Na⁺的增多引起细胞肿胀,也可以激活膜阴离子通道引起 Glu 释放;ATP 的减少使细胞再次摄取 Glu 发生障碍,也使细胞间隙中的 Glu 含量增多。有实验表明,增强 K-ATP 通道(对 ATP 敏感的 K⁺通道)药物的应用,可以减少心脏和脑中由缺血导致的细胞死亡^[11]。缺血发生后, Glu 的细胞外浓度开始升高,在缺血结束时达到高峰,然后逐渐下降。在永久性缺血模型中,在动脉堵塞 20 min 内显著上升,约 60 min 达最大值,持续到缺血发生后至少 80 min。有研究表明,在缺血再灌注损伤中谷胱甘肽过氧化物酶过度表达,反应为细胞水肿、中性粒细胞游走,导致细胞结构损伤和炎症发生。谷胱甘肽过氧化物酶可以激活 ROS,但它们的具体作用机理不清^[12]。

Glu 受体主要有 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体、红藻氨酸(KA)受体、α-氨基-3-羟基-5-甲基-4-异戊丙酸(AMPA)受体和亲代谢受体(metabotropic receptor)。在确立脑和脊髓兴奋性突触的亚群过程中,基于氨基酸丁酸(AP₄)拮抗作用,有人推论有另外的抗体存在,但对此尚有争论。受体中最重要的是 NMDA 受体,它对 Ca²⁺通道有高通透性,激活时使 Ca²⁺内流,启动神经细胞损伤的一系列病理反应,并可激活 Ca²⁺依赖性蛋白酶(如蛋白溶解酶、核酸内切酶、磷脂酶、NOS 等),激活蛋白溶解酶能降解细胞骨架,激活磷脂酶 A₂和环氧化酶产生氧自由基。同时 NMDA 受体的激活还可以引起细胞膜产生花生四烯酸,这一过程是钙离子激活磷脂酶 A₂的结果。花生四烯酸可以引起血小板聚集、血栓形成及血管收缩,加重缺血损伤。磷脂酶 A₂的激活还可以引起细胞膜系统的损伤,引起炎症反应和细胞凋亡^[13]。

四、钙超载

脑缺血再灌注中兴奋性氨基酸递质的释放,使膜去极化和细胞内 Ca²⁺增加,引起活性氧自由基和 NO 的产生。另外, Ca²⁺增多激活的磷脂酶 A₂也可以引起活性氧自由基的产生。活性氧自由基产生的另一个途径是钙调蛋白依赖性 NOS 的激活,同时生成 NO, NO 可与 ·O⁻²反应生成 ONOO⁻。活性氧自由基, NO, ONOO⁻均可引起细胞损伤。活性氧自由基可通过氧化蛋白和磷脂的方法调控 Ca²⁺进出细胞的通道,可以引起细胞膜对

Ca²⁺的进出调控混乱,使细胞内 Ca²⁺逐渐增多,形成恶性循环。

钙超载可激发作为第二信使的一系列酶反应对细胞产生损害。激活蛋白激酶 C(PKC)促进 Glu 释放,增加突触传递,激活磷脂酶 C(PLC)产生 IP₃和 DA。IP₃作用于受体触发胞内储存 Ca²⁺的释放,DA 激活 PKC,增加 Glu 释放,引起细胞凋亡,如激活磷脂酶 A₂,促进自由基生成,活化磷酸化核转录因子等^[14]。近年来已有大量的资料支持在再灌注时 Na⁺/Ca²⁺交换是引起钙超载的途径。缺血期,由于 ATP 浓度下降、pH 值降低,严重抑制了 Na⁺/Ca²⁺交换蛋白的活性,所以缺血期钙超载不太明显。在此期间, Na⁺/H⁺交换在钙超载中也起了很重要的作用。无氧代谢使 H⁺生成增多,使组织间液和细胞内 pH 值明显降低;血液再灌注使组织间液 H⁺浓度迅速下降,形成跨膜 H⁺浓度梯度,激活 Na⁺/H⁺交换蛋白,促进细胞内 H⁺排出,而细胞外 Na⁺内流;细胞内高 Na⁺又继发激活 Na⁺/Ca²⁺交换蛋白,导致钙超载。

脑缺血时能量缺乏,钙泵功能失调,线粒体损伤,细胞膜去极化,大量的 Glu 释放,激活 NMDA 受体,导致 Ca²⁺内流,激活 Ca²⁺依赖性蛋白酶。NMDA 受体对神经元产生兴奋性毒性,兴奋性毒性导致 Ca²⁺流入量增加,激活细胞内的细胞溶解途径。在局部缺氧缺血模型中,兴奋性氨基酸受体拮抗剂和 Ca²⁺通道阻断剂都可以提供神经的保护作用^[15]。Ca²⁺能激活蛋白酶 NOS 产生自由基,损伤线粒体,激活由钙激活的中性蛋白酶(calpain),进而破坏细胞骨架^[16]。大量研究证明,许多细胞在凋亡初期胞浆内游离 Ca²⁺浓度迅速出现持续性升高。Ca²⁺的拮抗剂尼莫地平 and citicoline 可能产生缺血再灌注损伤区域神经保护作用、介导 bcl-2 表达增加和梗死区凋亡细胞的减少^[17]。

细胞凋亡的调控基因

一、Caspase 基因

目前至少已发现两种不同的 caspase 激活途径,有些 caspase 作为一系列蛋白酶解级联反应中的下游分子,被其它 caspase 或具有相同切割活性的非 caspase 蛋白酶激活。另一些 caspase 则通过胞内中间分子自身激活进而发挥效应。caspase 基因的作用机理为:①内源性途径, Cyt-C 从线粒体释放到胞浆后与 dATP、凋亡蛋白酶激活因子(apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)结合成复合物,激活 caspase-9, caspase-9 切割后激活 caspase-3, caspase-3 被认为是凋亡的最终执行蛋白;②外源性途径, Fas 膜受体系统激活 caspase-8, caspase-8 直接激活 caspase-3,这条途径绕过了线粒体导致细胞凋亡^[18];③caspase 非依赖性途径, AIF 从线粒体释放到胞浆后进入核内,失去其线粒体定位序列结构域,表达凋亡效应。近来评估 caspase-3 的活性及在脑缺血再灌注中的表达时间的研究显示,在 SD 大鼠的 MCAO 再灌注模型中,在缺血 20 min 再灌注和缺血 2 h 再灌注两组中的 caspase-3 表达无明显差异,均在 24 ~ 72 h 中 caspase-3 表达提高,并在 24 h 时达到峰值^[19]。

二、bcl-2 基因

bcl-2 是重要的抗细胞凋亡基因,在缺血再灌注损伤中表现得尤为突出。bcl-2 抗细胞凋亡的作用机理为抑制 Ca²⁺的释放,通过阻止促细胞凋亡基因信号传递,或阻止这些诱导基因产物发挥作用以及细胞内的抗氧化作用。bcl-2 过度表达不能影响

bax 的表达,但是可以抑制细胞质中的 cyt-c 的蓄积和 caspase-3 的活性,进而促进神经元的存活^[20]。bcl-2 可通过抑制氧自由基而发挥抗细胞凋亡作用。bcl-2 家族能调节线粒体膜的通透性,下调 bcl-2 或过度表达 bcl-2 家族中促凋亡基因 bax 均能增加线粒体膜的通透性。bax 是强有力的促凋亡分子,能与抑制凋亡的蛋白 bcl-2, bcl-X1 形成异源二聚体,阻断它们抑制凋亡。Choi 等^[21]研究 MCAO 大鼠模型时发现应用 Cilostazol 清除羟氧基和氧自由基,可以减少缺血半暗带的 bax 蛋白表达水平,相应的提高 bcl-2 蛋白表达和抑制细胞色素 C 的释放,减少缺血脑组织梗死体积,抑制细胞凋亡和氧化。

三、早期即刻反应基因

早期即刻反应基因(immediate early genes, IEGs)是脑缺血后快速而短暂表达的一簇基因的统称,现研究较多的有 c-fos 和 c-jun 家族。c-fos 和 c-jun 表达的蛋白是转录调控因子,通过形成二聚体的形式结合在靶基因的 DNA 相关序列,即 AP-1 位点,影响靶基因的表达,参与信号转导。有实验表明,N-乙酰基-O-甲基多巴胺(N-acetyl-O-methyldopamine, NAMD)在缺血刺激下能上调 c-fos 的表达,CA₁ 神经元 c-fos 的早期表达增加能上调存活基因的表达而产生神经保护作用^[22]。IEGs 基因的表达在神经元的可塑性、迟发性神经元坏死、梗死灶远隔部位神经元损害、神经元的缺血耐受性等方面都有重要意义^[23]。

综上所述,近几年来脑缺血后再灌注损伤受到人们广泛关注,缺血半暗带的脑保护治疗也是治疗再灌注损伤的重点,其中细胞凋亡更是研究的热点问题。本文从自由基的形成、NO 的作用、兴奋性氨基酸的释放及钙离子稳态失调等方面阐述细胞凋亡的发生机制,并且探讨了与细胞凋亡相关的 Caspase 基因、bcl-2 基因、早期即刻反应基因在细胞凋亡中的调控作用。这些机制作用于多种生理、病理过程的不同环节,对脑功能演变和细胞凋亡给予调节,同时也受到多种基因的调节和制约,构成一种复杂的相互调节与制约的网络关系。

参 考 文 献

- Kim GW, Nobuo N, Sugawara TK, et al. Early decrease in DNA repair proteins, Ku70 and Ku86, and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 2001, 32:1401-1407.
- Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 1:2-14.
- Bresgen N, Karlhuber G, Krizbai I, et al. Oxidative stress in cultured cerebral endothelial cells induces chromosomal aberrations, micronuclei, and apoptosis. *J Neurosci Res*, 2003, 72:327-333.
- Lan J, Henshall DC, Simon RP. Formation of the base modification 8-hydroxyl-2'-deoxyguanosine and DNA fragmentation following seizures induced by systemic kainic acid in the rat. *J Neurochem*, 2000, 74:3022-3030.
- Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Copin J, et al. Reduction of copper, zinc-superoxide dismutase in knockout mice does not affect edema or infarction volumes and the early release of mitochondrial cytochrome c after permanent focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 2001, 889:208-213.
- Huang CY, Fujimura M, Noshita N, et al. SOD1 down-regulates NF-kappa β and c-Myc expression in mice after transient focal cerebral ischemia. *Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21:163-173.
- Wang Y, Chang CF, Morales M, et al. Bone Morphogenetic protein-6 reduces ischemia-induced brain damage in rats. *Stroke*, 2001, 32:2170.
- Ikeda K, Negishi H, Yamori Y. Antioxidant nutrients and hypoxia/ischemia brain injury in rodents. *Toxicology*, 2003, 189:55-61.
- Peeters Scholte C, Koster J, Veldhuis W, et al. Neuroprotection by selective nitric oxide synthase inhibition at 24 hours after perinatal hypoxia-ischemia. *Stroke*, 2002, 33:2304-2310.
- Niwa M, Inao S, Takayasu M, et al. Time course of expression of the three nitric oxide synthase isoforms after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2001, 41:63-72.
- Wei L, Yu SP, Gottron F, et al. Potassium channel blockers attenuate hypoxia and ischemia-induced neuronal death in vitro and in vivo. *Stroke*, 2003, 34:1281.
- Ishibashi N, Prokopenko O, Weisbrot-Lefkowitz M, et al. Glutathione peroxidase inhibits cell death and glial activation following experimental stroke. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002, 109:34-44.
- Rodrigo J, Alonso D, Bentura ML, et al. Physiology and pathophysiology of nitric oxide in the nervous system, with special mention of the islands of Calleja and the circumventricular organs. *Histol Histopathol*, 2002, 17:973-1003.
- Xie J, Guo Q, Zhu H, et al. Protein kinase C ι protect neural cell against apoptosis induced by amyloid beta-peptide. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 82:107-113.
- Mahura IS. Cerebral ischemia-hypoxia and biophysical mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection effects. *Fiziol Zh*, 2003, 49:7-12.
- Sobrado M, Lopez MG, Carceller F, et al. Combined nimodipine and citicoline reduce infarct size, attenuate apoptosis and increase bcl-2 expression after focal cerebral ischemia. *Neuroscience*, 2003, 118:107-113.
- Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Noshita N, et al. The cytosolic antioxidant copper/zinc-superoxide dismutase prevents the early release of mitochondrial cytochrome C in ischemic brain after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci*, 2000, 20:2817-2824.
- Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, et al. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2003, 29:472-481.
- Lee SH, Kim M, Kim YJ, et al. Ischemic intensity influences the distribution of delayed infarction and apoptotic cell death following transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res*, 2002, 956:14-23.
- Zhao H, Yenari MA, Cheng D, et al. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity. *Neurochem*, 2003, 85:1026-1036.
- Choi JM, Shin HK, Kim KY, et al. Neuroprotective effect of cilostazol against focal cerebral ischemia via antiapoptotic action in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 300:787-793.
- Cho S, Park EM, Kim Y, et al. Early c-fos induction after cerebral ischemia: a possible neuroprotective role. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21:550-556.
- Hou ST, MacManus JP. Molecular mechanisms of cerebral ischemia-induced neuronal death. *Int Rev Cytol*, 2002, 221:93-148.

(修回日期:2004-05-28)

(本文编辑:郭正成)