

凋亡与缺血性脑血管病

王荫华 周炯

[关键词] 凋亡;脑缺血;基因;分子机制;综述

中图分类号:R318.5,R749.1 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2003)09-0518-03

1 概述

神经系统的细胞通过凋亡或坏死发生死亡,分别涉及主动和被动细胞机制。研究证实,在缺血性脑损伤的急性期,不仅出现细胞坏死,同时出现大量细胞凋亡,细胞坏死位于缺血中心区,而凋亡主要在缺血半暗带,但在缺血后迟发性神经元死亡期(delayed neuronal death, DND)则以凋亡为主^[1]。

1.1 凋亡(apoptosis) 源自希腊语,是秋天树叶凋落的意思。20 世纪 60 年代,人们就注意到细胞自发死亡与消失的现象。1972 年,Kerr 首先将这种细胞死亡命名为凋亡,也称程序性细胞死亡(programmed cell death, PCD),即为一连串连续性细胞变化,最终导致细胞死亡,而不引起炎症反应。

凋亡分 3 个过程:①染色质压缩从而呈致密碱性;②核离散;③细胞体积缩小,密度增大,此时胞浆细胞器压缩但线粒体形态仍保持正常,随后细胞膜与细胞核分离,形成含有一定比例核糖体、细胞器和核物质的凋亡小体。此小体可以从上皮表面脱落或被巨噬细胞吞噬,也可被周围细胞或邻近瘤细胞吞噬而清除^[2]。

1.2 凋亡和坏死的区别 凋亡不引起炎症反应,而坏死引起炎症反应,两者发生过程及诱因也不同^[3]。

凋亡是细胞的一种主动死亡过程,不伴炎症反应,不伴细胞内容物的释放,溶酶体不参与。以特异的形态学和生化学表现、特异性基因程序的参与和无炎症反应为特征。

坏死是一种被动死亡过程,发生于严重和突然损伤时,其形态学特点是细胞膜通透性增加、细胞肿胀、细胞器如线粒体、内质网肿胀、溶酶破裂,进一步造成细胞膜破裂和细胞结构崩解。以细胞肿胀和裂解为特征。细胞坏死可激发细胞因子介导的炎症反应,坏死时伴有细胞浆外溢和周围组织炎症反应。

凋亡早期 DNA 被 Ca^{2+}/Mg^{2+} 依赖性核酸内切酶

裂解而形成末端为 3'-OH,含 180—200 碱基对的不同倍数的核苷酸片段,其凝胶电泳后呈 DNA 梯带;而坏死产生随机的 DNA 裂解片段,电泳呈一连续的涂片状 DNA 条带,这是两者的生化特征。

2 缺血性神经元凋亡的特征

研究表明,全脑或局部脑梗塞均激活细胞凋亡过程。脑梗死 5h 脑细胞开始凋亡,48h 达高峰,且一直持续到血管再通后 4 周^[3]。自由基、一氧化氮、兴奋性毒性和钙超载因素等与脑缺血凋亡关系比较密切^[4]。

2.1 生化学特征 大鼠和沙土鼠全脑缺血 24h 和 48h 后,皮质和纹状体神经元 DNA 断裂成寡核小体大小片段,电泳成典型梯带。全脑和局灶缺血再灌注晚期,在寡核小体 DNA 断裂以后也可表现为涂片状随机的 DNA 降解。

2.2 形态学特征 缺血后极短时间内,高倍镜下可见濒死神经元核周染色质浓缩形成环状、斑片状或新月状,并有许多凋亡小体附于胞核。大鼠大脑中动脉(MCA)闭塞后,脑纹状体神经元电镜可见,胞核呈不规则形状并有致密染色质团块,核质浓缩。MCA 闭塞 2h 再灌注 22h 后,凋亡早期的超微结构为染色质聚集成明显致密的团块,胞浆浓缩和凋亡小体形成。

2.3 TUNEL 染色特征 Gavrieli 等报道了光源原位识别凋亡细胞的新方法—TUNEL 法,即用末端转移酶标记双股 DNA 断裂末端来特异标记核 DNA 片段。标记核被特异地染成棕色,普通光学显微镜很容易观察,如用苏木素复染则可见胞核皱缩、裂解及凋亡小体形成,其重复性和分辨率都较高^[1]。用 TUNEL 染色的形态学标准对凋亡和坏死细胞核进行的定量研究表明,绝大多数表现为染色质浓染和 DNA 裂解的细胞位于梗死组织半暗区,而表现为坏死性细胞死亡的神经元绝大多数位于缺血中心区,提示凋亡的机制可能是损伤向周边扩展所致。此外,脑缺血导致细胞凋亡,从缺血的中心部位向梗塞灶周边的缺血半暗区发展,提示较温和的脑缺血损伤以诱发细胞凋亡为主,剧烈的脑缺血损伤则以细胞坏死为主^[5]。

3 凋亡的分子机制

脑缺血后,凋亡的发生既是凋亡相关基因如 bcl-2、P53、Caspase、fas 等表达的结果^[6],又受许多内外因

作者单位:100034 北京市,北京大学第一医院神经内科。作者简介:王荫华(1942-),女,北京市人,硕士,教授,博士生导师,中国阿尔茨海默病协会副主席,中国老年性痴呆科学家协会理事,中国药理学学会抗衰老与老年痴呆专业委员会理事。主要研究方向:临床神经心理学、认知神经心理学、老年痴呆的临床与基础研究。

素如谷氨酸等兴奋性氨基酸和自由基、细胞内钙超载、神经元生存环境变化的调节。

3.1 Caspase 家族 凋亡是一个复杂的、由 Caspase 家族成员介导的蛋白级联反应。人类白介素-1 的分子结构属半胱氨酸蛋白酶,1996 年定名为 Caspase,其中 C 代表半胱氨酸,aspase 代表天门冬氨酸。意指 Caspase 本身保留一定的氨基酸顺序,能与底物蛋白的氨基酸结合。目前所发现的 13 种 Caspase 功能各不相同,根据 Caspase 在这一级联反应中的作用位置可以分为在上游调控其他 Caspase 活化的启动者(Caspase-2、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10)和下游直接介导凋亡实施的效应者(Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7)。启动者通过其酶切作用激活下游的 Caspase,而效应者直接酶解细胞的结构蛋白和功能蛋白,与细胞解体直接相关。Caspase 在凋亡的执行过程中以一种非常程序化的方式对细胞进行解体,切断凋亡细胞与周围细胞之间的联系,关闭 DNA 的复制与修复,阻断 RNA 的剪接,降解 DNA,破坏核的结构,诱导细胞向外发出信号以便被周围的细胞吞噬,最终将细胞解体并包裹形成凋亡小体。因此,Caspase 家族是直接导致凋亡细胞解体的蛋白酶系统,在细胞凋亡的分子机制网络中居中心地位,其活化是细胞凋亡通路的中心环节^[7]。

在 Caspase 家族中最关键的是 Caspase-3,又称半胱氨酸蛋白酶 32(cysteine protease P32, CPP32),也叫作 Yama 或 apopain^[7]。近来的研究普遍认为,Caspase-3 是哺乳动物细胞凋亡中的关键蛋白酶,处于凋亡级联反应通路的核心位置,发挥非常重要的作用,被称为死亡蛋白酶^[8]。

Caspase 家族还与信号通路有关。Harrison 等使用一定数量的反转录和多聚酶联反应来研究 Caspase-3 mRNA 的表达,并用同样的方法来研究另外 3 个不同的 Caspase 亚型的表达,Caspase-8 与 Fas-m 介导的凋亡有关,在缺血大鼠的皮层有 Caspase-8 的表达增加;Caspase-11 与白细胞介素-1 β 的合成有关,亦有表达增加;相反 Caspase-9 通过线粒体形成部分信号通路,实验显示其表达减少。Caspase 表达是在精确转录控制下的整体。脑缺血反应中,生物学的通路是受调制的^[9]。

3.2 原癌基因(IECs) IECs 包括 c-fos, c-jun, jun-B 等。IECs 参与神经细胞的信息传递,生长分化和损伤修复。c-fos 基因可在数分钟内对外界刺激作出反应,对外界刺激转录的信使起着核内第三信使的重要作用,并与编码的蛋白质结合成二聚体,以形成 API 复合物结合到 DNA 上影响转录,同时调节许多迟发基因的表达。Jun 家族(c-jun, jun-B, jun-D 等)可形成同源和异源二聚体,API 复合物的功效受二聚体结合的其他

蛋白质亚单位成份的影响,二聚体的构成成分也决定迟发反应基因的功。短暂缺血再灌注 3h 后即发现 c-fos, c-jun 蛋白在脑组织海马等结构有强阳性表达,并在海马的各区均有表达,尤以缺血敏感区 CA1 和齿状回表达明显。研究表明,缺血时间越短,两基因表达的高峰时间越快,因而在一定程度上反映了缺血性脑损害的严重程度。沙土鼠短暂缺血 34 天后,在海马 CA1 区观察到 TUNEL 阳性细胞,同时 c-jun 阳性神经元也在该区大量出现。缺血后 IECs 的延迟表达可能意味着触发神经元死亡,机理可能是 IECs 通过诱导、调控触发凋亡的转录因子来实现的^[10]。

3.3 P53 与细胞周期蛋白激酶(CDK) P53 并不是细胞凋亡必不可少的基因,它的表达仅是一些细胞凋亡所需要的,但对因 DNA 损伤而诱发的凋亡反应来说,却是必不可少的。当 DNA 受损时,野生型诱导细胞进入 G1 静止期,抑制细胞增殖,直到损伤 DNA 修复。如果损伤不被修复,即活化那些诱导细胞凋亡的基因转录,使细胞进入凋亡。损伤诱导细胞凋亡与 P53 基因拷贝数呈正相关。当 P53 基因缺失或发生异常时,P53 失去对细胞的“监视作用”,带着损伤的 DNA 进入 S 期,结果细胞因遗传的不稳定性而产生突变和染色体畸变,最后使细胞癌变。Morris 在研究中发现一种可引起 DNA 损伤的物质喜树碱(camptothecin),可引起胚胎皮层神经元的死亡,该过程可以通过抑制 P53 和 CDK,使细胞生存的周期延长。增加 P53 蛋白的活性,引发核定位和 DNA 结合,造成 DNA 损伤,该过程不受 CDK 活性抑制剂的影响。相反,对于 P53 缺乏的视网膜母细胞瘤神经元在用喜树碱处理后,其蛋白磷酸化过程并不减少。P53 缺乏和 CDK 抑制剂均可单独抑制 Bax 易位,引起细胞色素 C 和类似 Caspase-3 样物质的释放。Morris 的结果显示 P53 和 CDK 是独立激活因素,均可对 Bax 介导的凋亡起作用^[11]。

3.4 Par-4 又称前列腺凋亡反应素-4。有学者发现,前脑缺血的大鼠,其海马和纹状体神经元中 Par-4 水平升高。Par-4 在再灌注的 6h 内升高,并在此后神经元凋亡的 3 天内持续升高。在短暂局灶性缺血的小鼠脑中,再灌注 6-12h 期间,梗塞边缘的皮质和纹状体中 Par-4 升高。一个由 Par-4 反义寡核苷酸保护的培养基能抵御由化学因素或缺氧引起的凋亡,并且显著减少小鼠的缺血损伤。近来的资料表明,早期 Par-4 上调在动物的缺血中风模型和缺血神经元的死亡中起了关键性的作用^[12]。

3.5 细胞周期蛋白(Cycline) 中枢神经系统的正常发育中存在有 Cycline 的表达,并且通过有丝分裂的各个时期调控着细胞的发育。Cycline 也与成人大脑的

神经元变性及凋亡有关。特别是 Cyclin D1 是细胞周期的主要调控因子。全脑缺血后, Cyclin D1 mRNA 在海马 CA1 区锥体细胞中明显增多(10%),而在 CA3 区轻微且短暂升高, Cyclin D1 表达的峰值在核浓缩与 DNA 片段出现前,因而认为 Cyclin D1 高水平表达可能是凋亡的一种调控因子。对此结论目前尚存争议^[13]。

此外,参与脑缺血后神经细胞凋亡的基因和蛋白还有很多,如 bcl-2 高表达可以抑制非凋亡细胞的死亡, Bax 在细胞内高表达时,可形成 Bax-Bax 同源二聚体,从而促使细胞凋亡等等。凋亡的复杂机制还远未被完全阐明,但随着研究的深入,认为凋亡一旦发生便不可逆转的观点已被打破,凋亡发生的分子基础决定它是可干预的,未来的药物将从分子水平防止和减少凋亡,为脑血管病的防治提供帮助。

4 对缺血性脑血管病治疗的启示

兴奋性氨基酸、氧自由基、神经元生存环境的变化和凋亡基因的调控等对脑缺血细胞凋亡过程起调节作用,表明可选择合适的神经保护剂进行干预治疗。缺血性脑损伤的神经保护因素有:神经营养因子(NTF)、雌激素、Ca²⁺拮抗剂、一氧化氮合酶(NOS)抑制剂、细胞膜稳定剂(胞二磷胆碱)、兴奋性氨基酸受体拮抗剂等。

从缺血性损伤的起始到不可逆性凋亡形成,存在着一个 DNA 可修复的时间窗,这不仅表明对急性缺血性脑卒中存在生物学治疗的可能性,而且促使人们更深入地研究其分子机制,寻求通过对这些分子机制进行干预而达到治疗脑血管病的目的。

[参考文献]

- [1] 张国瑾,赵增荣.国外脑血管疾病研究进展[M].北京:中国医科科技出版社,2000.67—75.
- [2] Li Y, Chopp M, Jiang N, et al. Cell death induced by middle to severe focal cerebral ischemia(10—120 minutes) associate with

internucleosomal DNA cleavage in the rat[J]. Stroke, 1995, 26(1):182.

- [3] 王华,韩玉昆,吴保敏.细胞凋亡与神经系统疾病[J].国外医学儿科学分册,1997,24(3):132—135.
- [4] 文国强,廖小平.细胞凋亡与神经系统疾病[J].海南医学,2000,11(3):51—53.
- [5] Arvin H, Kara L. Minocycline markedly protects the neonatal brain against hypoxic-ischemic injury[J]. Ann Neurol, 2002, 52(1):54—61.
- [6] 黄艳军,晋光荣.脑缺血中细胞凋亡的多元调节及其保护机制[J].国外医学脑血管疾病分册,2002,10(1):69—71.
- [7] De Lanerolle NC, Kim JH, Robbins RJ. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy[J]. Brain Res, 1989, 495(2):387—395.
- [8] Miura M, Zhu H, Rotello R. Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the C. elegans cell death gene *ced-3*[J]. Cell, 1993, 75(4):653—660.
- [9] Harrison DC, Davis RP, Bond BC. Caspase mRNA expression in a rat model of focal cerebral ischemia[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2001, 89(1—2):133—146.
- [10] 余刚,罗勇,彭国光.试验性脑缺血原癌基因表达与神经元凋亡/坏死关系的研究[J].重庆医学,2002,31(2):68—70.
- [11] Morris EJ, Keramaris E, Rideout HJ. Cyclin dependent kinases and P53 pathways are activated independently and mediate Bax activation in neurons after DNA damages[J]. J Neurosci, 2001, 21(14):5017—5026.
- [12] Culmsee C, Zhu Y, Drieglstein J. Evidence for the involvement of Par-4 in ischemic neuron cell death[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(4):334—343.
- [13] Timsit S, Rivera S, Ouaghip. Increased cyclin D1 in vulnerable neurons in the hippocampus after ischemia and epilepsy: a modulator of in vivo programmed cell death[J]? Eur J Neurosci, 1999, 11(1):263—278.

(收稿日期:2003-06-23)