

· 综述 ·

脑源性神经营养因子在缺血性脑损伤中对神经细胞凋亡的作用及其信号传导途径

俞丹 综述,毛萌 审核

(四川大学华西第二医院儿科,四川 成都 610041)

[中图分类号] R748 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2005)01-0084-04

1 缺血性损伤时神经元的凋亡

长期以来,一直认为缺血性神经元死亡是一种细胞的坏死现象。然而,随着人们对细胞死亡过程认识的逐步深入,形态、生化、细胞和分子生物学等方面的研究证明,缺血损伤的神经元死亡方式,不仅仅是坏死,还存在凋亡(apoptosis)。事实上,任何低于引起坏死损伤阈值的损伤因素均可导致凋亡。凋亡是一种细胞主动性死亡模式,是调节机体生长、发育及维持机体细胞平衡的重要生理机制,可以发生于生理或病理情况下。1993年 Macmanus^[1]采用凝胶电泳的技术观察到,缺血脑组织具有典型的梯形条带,首先提出缺血神经元死亡可能存在凋亡的观点。此后的报道中也在各种动物脑缺血模型以及培养神经元的缺氧模型上观察到类似的凋亡现象。用TUNEL原位标记技术观察到脑缺血、缺氧或给予谷氨酸均可导致大量细胞双链DNA断裂。此外,干扰凋亡基因的表达,可改变缺血性神经元上DNA断裂的情况。脑缺血后下丘脑、海马、大脑、小脑的皮质神经元细胞对短暂的缺血十分敏感。大脑半球短暂缺血后,脑内谷氨酸生物转换功能增强, Ca^{2+} 内流增加,自由基大量生成,缺血中心区域的神经细胞很快出现细胞坏死。但缺血中心区周围的神经细胞,以海马CA₁区的锥形细胞最为明显,经过一个潜伏期后,一般1~2d才出现延迟性神经细胞退化(delayed neural degeneration, DND),已证明这种延迟性细胞退化就是细胞凋亡。由于凋亡在神经元死亡中的主动作用,以及与此有关的调控基因的发现,提示通过治疗阻止凋亡的发生是可能的。

2 参与缺血性神经元凋亡的因子

中枢神经系统中,研究最多的参与缺血性神经细胞凋亡因子可概括成2大类:即Bcl-2家族和caspases家族,其他还包括P53,NF- κ B等。

Fas系统是一类与凋亡有关的基因,Fas是细胞膜上的一个受体,其细胞外部分可与抗Fas单克隆抗体或Fas配体特异性结合,介导细胞凋亡。研究表明^[2~6],caspases的活化是导致缺血性神经元凋亡的主要原因。Fas系统被激活后,诱导形成有活性的caspases-8,继而激活caspases-3。激活状态的caspases-3又调节核内不同信号转录通路的功能,最终诱导凋亡的形成。

Bcl-2是相对分子量为25 000的整合膜蛋白,分布于线粒体、内质网和细胞核膜上。其结构上含有2个以上结合区,即BH1,BH2或BH3。从功能上又可将Bcl-2族蛋白分子分成凋亡诱导因子(apoptosis inducers)包括Bax,Bcl-x,Bid,Bak,Bik,以及凋亡抑制因子(apoptosis inhibitors)如Bcl-2,Bcl-xL,Mcl-1。大量的研究证实^[7~11],Bcl-2对缺血性损伤的神经元有保护作用。采用双标技术观察到,一旦缺血损伤的神经元表达Bcl-2蛋白,则这类神经元发生DNA损伤的比例明显下降,而且形态也趋于正常,同时还有DNA修复基因的表达。缺血后,缺血周边区域出现Bcl-2蛋白的表达,这说明非致死的损伤导致细胞表达Bcl-2以抑制缺血性神经元的凋亡,其抗凋亡的机制与抑制caspase的活性有关^[12]。

3 缺血性损伤神经元的内源性保护机制

凋亡相关基因的调控,取决于抑/诱凋亡基因的

[收稿日期] 2003-10-27; [修回日期] 2004-03-16

[作者简介] 俞丹(1976-),女,儿科在读博士生,主攻方向:小儿神经系统疾病。

平衡。脑缺血时,神经元发生凋亡、坏死,此时体内必然会存在一套内源性的保护机制来对抗这种变化,而发挥机体自身的防御作用。目前已经了解到一些因子参与了防御作用,如抗氧化防御系统中的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶,金属离子转运结合蛋白等。有研究^[13~15]证实,一些蛋白生长因子通过抑制凋亡而在缺血缺氧损伤中对机体起到保护作用。

4 脑源性神经营养因子的抗凋亡作用

脑源性神经营养因子(Brain-derived Neurotrophic Factor, BDNF)是Brade等1982年从猪脑中分离纯化的一种碱性蛋白,分子量为12.3 KD。作为脑组织含量最丰富的神经营养因子,BDNF在中枢神经系统内合成并广泛存在于脑组织包括大脑皮层、海马、基底前脑、纹状体、下丘脑和小脑,其中以海马和皮层中含量最高。BDNF通过其特异性受体酪氨酸激酶(TrkB)参与细胞的分化、粘着、增殖与成熟等重要的生物学过程。可以促进神经元的发育、损伤后的修复和再生及维持其存活。

研究发现,BDNF在体外能促进脑干细胞生长,影响神经干细胞向不同的神经亚群分化。Ahmed等^[16]用RT-PCR证实体外培养的对表皮生长因子(EGF)有反应的神经干细胞上有TrkB受体mRNA的表达。用BDNF孵育神经前体细胞后10 d,成熟神经元数目将增加2倍,且有明显的突起生长,而神经前体细胞的数目并不增加,这说明BDNF在体外有诱导神经干细胞向成熟的神经元分化的作用。由于BDNF在成年鼠的大脑皮层广泛表达,因此其可能影响新产生的神经元的成熟与存活。而在体内,将BDNF注入成年鼠侧脑室可导致嗅球新产生的神经元数目显著增加^[17]。BDNF对缺血性脑损伤可能有保护作用,给予BDNF可防止成年脑组织尤其是对缺氧敏感的易损海马CA₁区神经元发生迟发性死亡,在中脑动脉阻塞后30~120 min静脉给予BDNF可显著减少梗死体积^[18,19]。对未成熟鼠脑的实验也显示,生后7 d的大鼠脑室内注入BDNF可发现多个脑区TrkB受体快速而强烈的磷酸化,对缺氧缺血性脑损伤有显著保护作用^[20]。

刘京升等^[21]的实验发现BDNF可对抗大鼠坐骨神经损伤诱导的神经元凋亡。而在缺血缺氧情况下,有研究^[22]认为BDNF可以通过抑制凋亡而起到保护脑细胞的作用。花生四烯酸(arachidonic acid, AA)可通过耗竭营养因子而诱导神经元凋亡,而

BDNF可抑制其作用^[23]。国内的研究也证实了BDNF对缺血后神经细胞有保护作用^[24]。其机制可能为:①通过调节凋亡前蛋白(Bax)及抗凋亡蛋白(Bcl-2)的表达抑制细胞凋亡;②对抗兴奋性氨基酸毒性损伤;③缺血后,脑组织BDNF高表达可能导致梗塞灶周缘(半影区)磷酸化cAMP反应结合蛋白(cAMP response element-binding protein, CREB)水平显著增高,而后者在脑缺血后神经元存活中起关键作用。

5 BDNF的细胞内信号传导途径

研究发现^[5],在体外,BDNF不但可维持正常神经元的存活并有使其免受缺氧损伤的作用,该保护机制可能与BDNF诱导TrkB mRNA表达的上调有关。利用免疫荧光技术结合激光扫描共聚焦显微镜观察到BDNF的干预对缺氧胚鼠脑神经元内TrkB、磷酸化TrkB酪氨酸及丝裂素活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinases, MAPK)水平的影响。BDNF在信号传递系统中,TrkB受体酪氨酸磷酸化是整个系统的启动程序。BDNF的细胞内信号传递途径主要有两条,即Ras-MAPK途径和磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)途径。在大多数情况下MAPK途径是BDNF发挥作用的优势途径^[25,26]。MAPK调节细胞存活与分化,它包括胞外信号调节酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK), c-Jun氨基末端激酶(c-jun-N-terminal kinase, JNK)与P38。ERK与JNK参与了脑缺血后的血管反应。

MAPKs激活后经核转位,可激活各自的核内转录因子如c-JUN、c-FOS、激活转录因子-2(activation transcription factor-2, ATF-2)等,再调节转录因子的靶基因如其他即早基因、后期效应基因和热休克基因等的表达,促进有关蛋白的合成和通道的改变,完成对胞外刺激的反应。目前最具特征的MAPK通路是Ras-MAPK信号通路(ERK通路),对酪氨酸激酶受体、生长因子受体反应;应激活蛋白激酶SAPK/JNK通路,对TNF α 、IL-1和热反应等反应和P38通路,对热休克TNF α 、IL-1等反应。

脑神经元可因缺血而激活MAPK级联反应。脑缺血发生后,通过各种胞膜受体介导,激活蛋白激酶C(PKC)途径、腺苷酸环化酶(AC)、PI3K途径、酪氨酸受体途径、钙-钙调蛋白途径等,再激活MAPK级联反应的ERK通路、JNK通路和P38通路。短暂和持续缺血、局部和全脑缺血,MAPK3通

路均可发生程度不同的磷酸化和激活。

ERK 通路在促进神经细胞增殖、分化、抑制凋亡中发挥重要的调节作用。神经营养因子可激活海马神经元 ERK 通路,在各种神经元损伤中发挥保护作用。JNK 通路在细胞应激反应中起重要作用,可被多种胞外应激信号激活。转录因子 c-JUN、ATF-2、NF- κ B 等均可被 JNK 磷酸化,结合了这些转录因子的反应元件能有力的促进靶基因的转录和表达。JNK 通路是细胞应激反应诱导细胞凋亡的主要信号传导途径,c-FOS 与 c-JUN 在神经元可逆性损伤中,有选择性的诱导表达。热休克蛋白 70 表达的上调,在可逆性损伤中更为明显。JNK1, JNK2, P38MAPK 在缺血再灌注后 10 ~ 30 min 内激活。MAPK 途径是细胞外信号引起细胞核反应并导致细胞死亡的共同通路。细胞死亡涉及 ERK 通路的抑制与 JNK 和 P38 通路的激活^[27]。JNK, P38 通路可能在脑缺血所致的神经细胞死亡中起重要作用。而 ERK 通路在细胞应激反应中起保护作用。脑缺血后,通过缺血前的预处理,可以使磷酸化(激活状态)的 ERK 表达增多,并能减少激活的 JNK 的表达。由此可见,缺血前预处理可能是缺血耐受中起保护作用的重要方面,而且 ERKs 的激活可能与保护反应的诱导产生有关。

研究证明无论是急性的局灶性脑缺血,还是短暂性脑缺血后的迟发性神经元死亡,都有细胞凋亡的参与。确切地理解细胞凋亡在缺血性神经细胞死亡中的作用具有重要的临床意义,将给脑损伤的治疗带来崭新的启示和途径。缺血损伤的神经元其病理生理过程也包括细胞的自身修复机制、细胞自身修复因子的激活状态与死亡调节因子之间的平衡水平将决定损伤神经元的存亡。BDNF 是一种神经营养因子,可维持正常神经元的存活并有使其免受缺氧损伤的显著保护作用,在脑缺氧缺血性损伤中通过激活 ERK 信号途径抑制神经细胞凋亡。此外,还有研究证实其对周围神经病如神经压迫或外伤,基底神经节病如帕金森病,运动神经元病,阿尔茨海默病等学习、记忆机能障碍性疾病,癫痫等的治疗具有应用前景。对其进一步深入研究将有助于发现预防和治疗上述疾病的新方法。

[参 考 文 献]

[1] Macmanus JP, Buchan AM, Hill IE, Rasquinha I, Preston E. Global ischemia can cause DNA fragmentation indicative of apoptosis in rat brain [J]. *Neurosci Lett*, 1993, 164(1-2): 89-92.
[2] Manabat C, Han BH, Wendland M, Derugin N, Fox CK, Choi J,

et al. Reperfusion differentially induces caspase-3 activation in ischemic core and penumbra after stroke in immature brain [J]. *Stroke*, 2003, 34(1): 207-213.
[3] 汤亚南. Caspase-3 与围产期缺氧缺血性脑损伤 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2002, 4(1): 75-78.
[4] Le DA, Wu Y, Huang Z, Matsushita K, Plesnila N, Augustinack JC, et al. Caspase activation and neuroprotection in caspase-3-deficient mice after in vivo cerebral ischemia and in vitro oxygen glucose deprivation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(23): 15188-15193.
[5] Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, Xanthoudakis S, Nicholson D, Robertson GS, et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat [J]. *Neuroscience*, 2002, 115(1): 125-136.
[6] Gill R, Soriano M, Blomgren K, Hagberg H, Wybrecht R, Miss MT, et al. Role of caspase-3 activation in cerebral ischemia-induced neurodegeneration in adult and neonatal brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(4): 420-430.
[7] Love S. Apoptosis and brain ischemia [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27(2): 267-282.
[8] Ishida A, Kawakami H, Yasuzumi F, Morishita R. Gene therapy for cerebral infarction (cerebral ischemia) [J]. *No To Shinkei*, 2002, 54(3): 213-219.
[9] Shimizu S, Nagayama T, Jin KL, Zhu L, Loeffert JE, Watkins SC, et al. Bcl-2 Antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2001, 21(3): 233-243.
[10] Ay I, Sugimori H, Finklestein SP. Intravenous basic fibroblast growth factor (bFGF) decreases DNA fragmentation and prevents down-regulation of Bcl-2 expression in the ischemic brain following middle cerebral artery occlusion in rats [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 19, 87(1): 71-80.
[11] Graham SH, Chen J, Clark RS. Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2000, 17(10): 831-841.
[12] Zhao H, Yenari MA, Cheng D, Sapolsky RM, Steinberg GK. Bcl-2 overexpression protects against neuron loss within the ischemic margin following experimental stroke and inhibits cytochrome c translocation and caspase-3 activity [J]. *J Neurochem*, 2003, 85(4): 1026-1036.
[13] Cao Y, Gunn AJ, Bennet L, Wu D, George S, Gluckman PD, et al. Insulin-like growth factor (IGF)-1 suppresses oligodendrocyte caspase-3 activation and increases glial proliferation after ischemia in near-term fetal sheep [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(6): 739-747.
[14] Shirakura M, Fukumura M, Inoue M, Fujikawa S, Maeda M, Watabe K, et al. Sendai virus vector-mediated gene transfer of glial cell line-derived neurotrophic factor prevents delayed neuronal death after transient global ischemia in gerbils [J]. *Exp Anim*, 2003, 52(2): 119-127.
[15] Denicourt C, Dowdy SF. Protein transduction technology offers novel therapeutic approach for brain ischemia [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24(5): 216-218.
[16] Ahmed S, Reynolds BA, Weiss S. BDNF enhances the differentiation but not the survival of CNS stem cell-derived neuronal precursors [J]. *J Neurosci*, 1995, 15(8): 5765-5778.
[17] Goldman SA, Luskin MB. Strategies utilized by migration neurons of the postnatal vertebrate forebrain [J]. *Trends Neurosci*, 1998, 21(3): 107-114.
[18] Zhang Y, Pardridge WM. Neuroprotection in transient focal brain ischemia after delayed intravenous administration of brain-derived

- neurotrophic factor conjugated to a blood-brain barrier drug targeting system. [J]. *Stroke*, 2001, 32(6): 1378-1384.
- [19] Ferrer I, Krupinski J, Goutan E, Martí E, Ambrosio S, Arenas E. Brain-derived neurotrophic factor reduces cortical cell death by ischemia after middle cerebral artery occlusion in the rat [J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2001, 101(3): 229-238.
- [20] Cheng Y, Gidday JM, Yan Q, Shah AR, Holtzman DM. Marked age-dependent neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor against neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *Ann Neurol*, 1997, 41(4): 521-529.
- [21] 刘京升,孙正义,董晓丽. 脑源性神经营养因子对大鼠坐骨神经损伤诱导神经元凋亡的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 3(19): 130-131.
- [22] Koda M, Murakami M, Ino H, Yoshinaga K, Ikeda O, Hashimoto M, et al. Brain-derived neurotrophic factor suppresses delayed apoptosis of oligodendrocytes after spinal cord injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2002, 19(6): 777-785.
- [23] Garrido R, King-Pospisil K, Son KW, Hennig B, Toborek M. Nicotine up-regulates expression of neurotrophic factors and attenuates apoptosis of spinal cord neurons [J]. *J Neurochem*, 2003, 47(3): 349-355.
- [24] 周晖,毛萌,刘卫平,李胜富,王华. 脑源性神经营养因子对缺氧胚胎脑皮质神经元的保护作用 [J]. *华西医科大学报*, 2002, 33(4): 573-576.
- [25] Dolcet X, Egea J, Soler RM, Martin-Zanca D, Comella JX. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival [J]. *J Neurochem*, 1999, 73(2): 521-531.
- [26] Bonni A, Brunet A, West A. E., Datta SR, Takasu MA, Greenberg ME. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and-independent mechanisms [J]. *Science*, 1999, 12, 286(5443): 1358-1362.
- [27] Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades as regulators of stress responses [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 30(851): 139-146.
- (本文编辑:吉耕中)

· 消息 ·

2005 上海国际儿科论坛征文通知

由复旦大学附属儿科医院主办的2005上海国际儿科论坛定于2005年6月16~18日在上海世博会议大酒店举行。本次论坛以介绍儿科各专业的最新进展为宗旨,将邀请国际和国内知名的儿科学专家进行专题报告。论坛还将进行学术论文交流。欢迎向2005上海国际儿科论坛投稿。征文内容涵盖儿童保健、新生儿医学、急救医学、感染、呼吸、循环、泌尿、神经、血液、消化、免疫、遗传代谢和内分泌专业。投稿要求:中、英文摘要各800字左右。摘要统一书写格式依次为:文题、作者单位、邮编、作者姓名和中英文摘要。摘要内容包括目的、方法、结果和结论四要素,各要素单独起段,用四号宋体,Word格式存盘,以软盘、光盘或电子邮件方式投稿,不接受纸张投稿。投稿请寄:复旦大学附属儿科医院张崇凡收,地址:上海市枫林路183号,邮编:200032。投稿截止日期:2005年3月31日。联系电话:021-54524666-2080, 021-64046505, 传真:021-64038992, Email: xt211311@yahoo.com.cn。为便于了解2005上海国际儿科论坛的相关信息,特设本次论坛网页: <http://www.ch.shmu.edu.cn/SIPF2005>, 敬请浏览。

2005 上海国际儿科论坛组委会