

· 综 述 ·

脑缺血后细胞凋亡通路及针刺调节作用研究概况

程莹莹¹ 倪光夏^{1,2}

神经细胞凋亡是目前公认的脑缺血疾病导致神经系统损伤的重要机制,是梗死周围区神经细胞死亡的主要方式。众多研究显示,脑缺血后兴奋氨基酸毒性、自由基和 NO 的损伤及炎症反应等是介导神经细胞凋亡的主要因素。脑缺血后介导神经细胞凋亡的通路有:Caspase 依赖性凋亡通路—内源性线粒体通路和外源性死亡受体通路,以及非 Caspase 依赖性凋亡通路^[1]。本文就脑缺血后凋亡通路及针刺相关研究概况做如下概述。

1 Caspase 依赖性凋亡通路及针刺调节作用研究

1.1 内源性线粒体通路及针刺调节作用研究

1.1.1 内源性线粒体通路(图 1) 脑缺血后,

神经细胞受到缺血缺氧等刺激后,胞内发生一系列的级联反应。其中之一就是线粒体膜通透性转位孔(MPTP)开放,细胞色素 C(Cyt C)、Smac/DIABLO、丝氨酸蛋白酶 HtrA2/Omi 等从线粒体内释放出来^[2]。一方面,Cyt C 与 Procaspase-9、凋亡活化因子-1(Apaf-1)形成凋亡小体(apoptosome),激活 Caspase-9 继而活化下游的 Caspase-3,引起细胞凋亡^[3,4]。另一方面,Smac/DIABLO 抑制活化的 Caspase-9 与凋亡抑制蛋白(IAP)的结合,进而消除凋亡抑制,加速活化 Caspase-3,介导细胞凋亡^[5]。

Cyt C 从线粒体内、外膜间隙释放到胞浆是细胞凋亡的关键步骤。而在 Cyt C 释放的过程中,线粒体外膜的 Bcl-2 家族蛋白和线粒体通透性转换起决定作

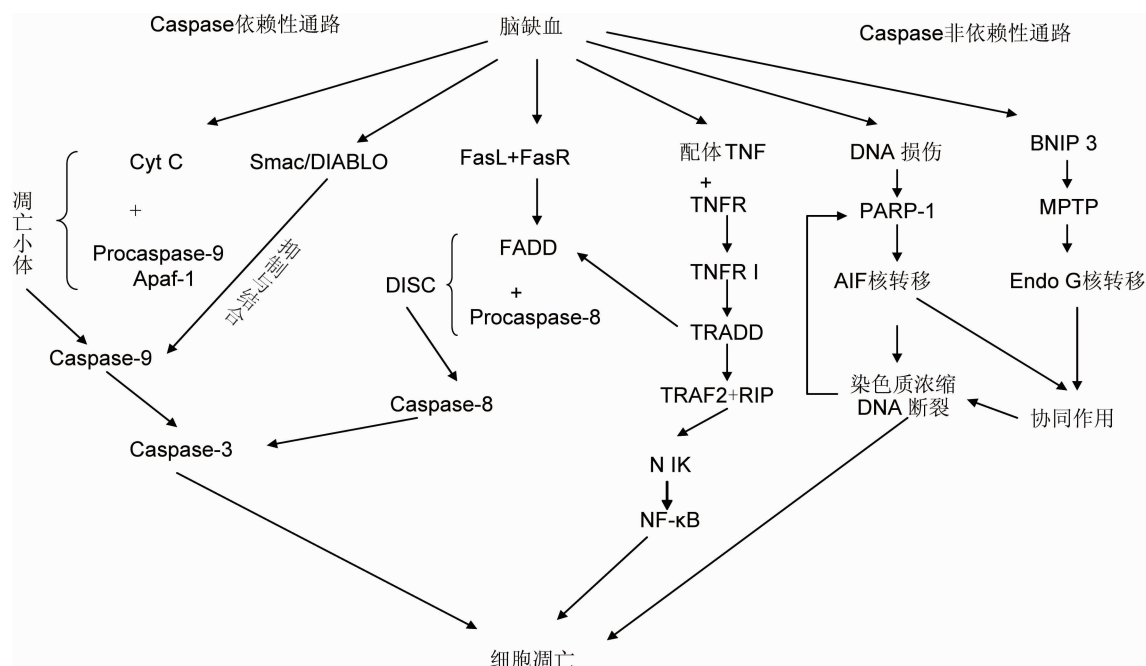


图 1 脑缺血后细胞凋亡信号通路示意图

基金项目:江苏省中医药领军人才科研资助项目(No.LJ200918);江苏省高校优势学科建设工程开放课题资助项目(No.YS2012ZYX409);江苏省自然科学基金面上项目(No.BK20131458)

作者单位:1.南京中医药大学第二临床医学院针药结合部省共建重点实验室(南京 210029);2.南京中医药大学第二附属医院针灸科(南京 210017)

通讯作者:倪光夏,Tel:025-83291049,E-mail:xgn66@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.04.0499

用^[6]。Bcl-2 家族蛋白对 MPTP 有重要的调节作用。Bax 过量表达可以促进 MPTP 的开放。相反, Bcl-2 能够抑制 MPTP 孔道的持续开放^[7]。而且, 有研究证实, Bcl-2 的高表达还能通过抑制 MPTP 的瞬时开放, 抑制氧化应激型的细胞凋亡^[8]。也有研究表明 Caspase 也可以作用于 MPTP, 诱导它开放, 在即将凋亡的细胞中形成一个线粒体-Caspase-线粒体的正反馈放大回路, 可以放大凋亡信号^[9,10]。

1.1.2 针刺对内源性线粒体通路调节作用研究 实验研究表明, 针刺能够促进 Bcl-2 家族中 Bcl-2 的表达, 抑制 Bax 的表达。沈梅红等^[11]运用实时荧光定量聚合酶链反应技术, 发现电针局灶性缺血再灌注模型(MCAO)大鼠百会、大椎可抑制 Bax 的表达, 上调 Bcl-2/Bax 比值。何娜等^[12]电针 MCAO 大鼠足三里、外关, 通过免疫组化法发现大鼠顶叶皮质区的 Bcl-2 表达升高、Bax 表达降低, 上调 Bcl-2/Bax。黄浏姣等^[13]电针百会、水沟、双侧后三里穴, 运用免疫组化技术也发现电针后 MCAO 大鼠海马缺血区 Bcl-2 表达升高、Bax 表达降低。张红星等^[14]运用蛋白免疫印迹(Western blot)技术发现, 头针可上调 Bcl-2/Bax 蛋白相对光密度比值。

马慧芳等^[15]通过针刺 MCAO 大鼠的百会、水沟, 运用免疫组化法检测海马区 Caspase-9 蛋白表达, 结果显示针刺能减轻其过度表达。冉群芳等^[16]针刺 MCAO 大鼠人中、百会、风府、双侧内关, 通过原位杂交技术发现大鼠海马区 Caspase-3 mRNA 表达减少。

因此, 针刺可以通过促进 Bcl-2 的表达、抑制 Bax、Caspase-9、Caspase-3 的表达影响内源性凋亡通路, 从而抑制细胞凋亡, 改善缺血再灌注损伤。

1.2 外源性死亡受体通路及针刺调节作用研究

1.2.1 外源性死亡受体通路(图 1) 死亡受体(DR)可以将细胞外的死亡信号转移至细胞内, 它是肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族中的一个亚家族, 为一类跨膜蛋白, 其胞外区都有一富含半胱氨酸结构域(CRD), 胞浆区含有一段由同源半胱氨酸组成的同源结构域, 即死亡结构域(DD), 该区域与胞浆中介导细胞凋亡信号的蛋白质结合, 启动细胞内部的凋亡程序^[17]。目前结构和功能比较清楚的死亡受体有 5 种, 其中分别由 Fas 受体和 TNFR I 受体为代表介导的信号传导途径研究最多。

细胞在脑缺血的一系列刺激后, 细胞外 Fas 配体(FasL)与细胞表面 Fas 受体(FasR)结合, 触发 Fas 相关死亡域蛋白(FADD)的募集, FADD 与 Pro-

caspase-8 形成死亡诱导信号复合体(DISC), DISC 促使 Caspase-8 的活化, 进而启动下游 Caspase(如 Caspase-3、Caspase-7)级联反应, 导致细胞凋亡。

脑缺血后, 配体 TNF 与 TNFR 结合, TNFR I 三聚体化, 激活 TNFR I, 继而在质膜表面局部招募 TNFR I 相关死亡域结合蛋白(TRADD)。TRADD 可激活两条信号传导通路^[18]:(1)通过招募 FADD 诱导细胞凋亡: TNFR I 胞浆区的死亡结构域与 TRADD 死亡结构域结合, TRADD 向 TNFR I 胞浆区招募 FADD, FADD 再通过 DED(death effect domain)又进一步招募 Procaspase-8; Procaspase-8 发生同源活化, 进而下游 Caspase 级联反应导致细胞凋亡。(2)通过肿瘤坏死因子受体相关蛋白 2 (TRAF2)和相互作用受体蛋白(RIP)诱导转录因子活化: TRAF2 和 RIP 使 NF- κ B 诱导激酶(NIK)活化。NIK 使 κ B 发生磷酸化, 并促进其分解和释放出 NF- κ B, 使 NF- κ B 发生活化, 并进入细胞核, 激活一系列基因表达, 导致细胞凋亡。

1.2.2 针刺对外源性死亡受体通路调节作用研究 王鹏琴等^[19]取 MCAO 大鼠眼针上焦区、下焦区、肝区、肾区针刺, 采用 RT-PCR 法, 发现缺血区脑组织的 Caspase-8、Caspase-3 mRNA 的表达减少。孔立红等^[20]电针 MCAO 大鼠大椎、双侧内关, 通过免疫组化法观察海马 CA1 区 Fas 蛋白表达, 发现其表达显著降低。罗文舒等^[21]针刺 MCAO 大鼠督脉经穴, 通过 Western blot 法, 发现针刺可以抑制 FADD 和 Caspase-8 的过度表达。

孔立红等^[22]取 MCAO 大鼠大椎、双侧内关进行电针, 运用免疫组化和 Western blot 检测海马组织 NF- κ B 的蛋白表达, 发现电针能下调 MCAO 大鼠海马组织 NF- κ B 蛋白水平, 阻滞其转位于核, 发挥神经保护作用。罗文舒等^[23]针刺 MCAO 大鼠的督脉经穴, 利用免疫组化法检测针刺后 NF- κ B 蛋白表达的变化, 并以激光共聚焦扫描显微镜检测 NF- κ B 转录活性, 结果显示针刺督脉经穴可抑制 NF- κ B 蛋白的过度表达, 并且 NF- κ B 转录活性降低。

这些实验结果表明, 针刺可以通过抑制 Fas、FADD、Caspase-8、Caspase-3 的过度表达影响 Fas 受体介导的外源性凋亡通路。同时, 针刺还可以抑制 TNFR I 受体介导的外源性凋亡通路中 NF- κ B 的表达。因此, 针刺干预可通过外源性凋亡通路减少细胞凋亡。

2 Caspase 非依赖性凋亡通路及针刺调节作用研究

2.1 Caspase 非依赖性凋亡通路(图 1) 除了上述两种经典凋亡通路,近年来研究发现还存在 Caspase 非依赖性通路,其机制是一个繁杂的过程,其中以 PARP-1/AIF 介导的凋亡通路研究较多。

多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP-1)是一种 DNA 修复酶,在 DNA 片段化时被激活,参与 DNA 的复制、转录和修复。凋亡诱导因子(AIF)是一种存在于线粒体膜间腔的黄素蛋白,当凋亡信号刺激时,AIF 从线粒体释放到细胞浆,再通过核定位信号转移至细胞核,引起染色质浓缩和大片段 DNA 断裂^[24]。

脑缺血后,一方面大量自由基生成,导致 DNA 断裂损伤,从而诱导 PARP-1 的大量表达,PARP-1 催化 PAR 聚合物生成,PAR 进入线粒体促使线粒体释放 AIF 并转位至细胞核,引起染色质浓缩和 DNA 断裂,继发性促进 PARP-1 过度表达,形成 PARP-1 表达的恶性循环;另一方面当细胞接受凋亡信号刺激后,BNIP 3 同源二聚体与线粒体外膜紧密结合并打开 MPTP,使膜电位丧失,继而线粒体内的核酸内切酶 G(Endo G)释放并向细胞核转移^[25,26]。AIF 与 Endo G 协同作用,引起细胞 DNA 形成大片段化损伤和染色质浓缩,从而导致细胞凋亡^[27]。这个过程与经典凋亡途径不同,它不依赖 Caspase 的参与,也就称作 Caspase 非依赖性凋亡通路。

2.2 针刺对 Caspase 非依赖性凋亡通路调节作用研究 王莹等^[28]电针 MCAO 大鼠大椎、双侧内关,运用实时荧光定量 PCR 和 Western blot 技术,观察 MCAO 大鼠海马区 PARP 的表达,结果发现针刺可减少 PARP 的表达。就目前针刺对脑缺血病研究来看,关于 Caspase 非依赖性凋亡通路相关报道较少,针刺能否通过干预 Caspase 非依赖性凋亡通路来减少脑缺血后细胞凋亡及其机制尚不明确,需要进一步的研究。

3 展望

目前针刺对脑缺血后细胞凋亡的研究多基于凋亡基因与蛋白的靶点研究,大量结果显示针刺可以减少脑缺血后凋亡细胞的数量,影响 Caspase 家族、Bcl-2 家族、Fas/FasI、P53、HSP、即早基因中 c-fos 等的表达,从而抑制细胞凋亡。针刺有关凋亡通路的研究,多数是从内源性线粒体途径和外源性死亡受体途径进行探讨,研究结果较令人满意,但其机制仍不完善。近几年发现的 Caspase 非依赖性凋亡通路已成为脑缺血病又一研究热点,针刺是否能从新途径—Caspase 非依赖性凋亡通路来抑制细胞凋亡值得我们期待。

参 考 文 献

- [1] Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia[J]. Stroke, 2009, 29(1): e331-e339.
- [2] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death[J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(9): 495-516.
- [3] Love S. Apoptosis and brain ischaemia[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(6): 267-282.
- [4] Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia[J]. NeuroRx, 2004, 145(1): 17-25.
- [5] Ekert PG, Silke J, Hawkins CJ, et al. DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed Caspase-9[J]. Cell Biol, 2001, 152(3): 483-490.
- [6] 马洪,刘垒,陈佳.活性氧、线粒体通透性转换与细胞凋亡[J].生物物理学报, 2012, 28(7): 529-530.
- [7] Tsujimoto Y, Shimizu S. Bcl-2 family: Life-or-death switch[J]. FEBS Lett, 2000, 466(11): 6-10.
- [8] Ma Q, Fang H, Shang W, et al. Superoxide flashes: early mitochondrial signals for oxidative stress-induced apoptosis[J]. Biol Chem, 2011, 286(4): 27573-27581.
- [9] Chen Q, Gong B, Almasan A. Distinct stages of cytochrome C release from mitochondria: evidence for a feedback amplification loop linking caspase activation to mitochondrial dysfunction in genotoxic stress induced apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2000, 35(7): 227-233.
- [10] Marzo I, Susin SA, Petit PX, et al. Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function[J]. FEBS Lett, 1998, 427(7): 198-202.
- [11] 沈梅红,刘晓华,李纛,等.电针调节脑缺血再灌注大鼠大脑皮层 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达[J].辽宁中医杂志 2012,39(1): 155-157.
- [12] 何娜,朱春雷,何欣.针刺治疗脑梗死对神经元保护作用机制的实验研究[J].当代医学, 2012, 18(9): 3-4.
- [13] 黄婉蛟,洪亚群,陈邦国,等.电针对局灶性脑缺血再灌注大鼠 Bcl-2、Bax 表达的影响[J].中国康复, 2011, 26(2): 83-85.
- [14] 张红星,杨敏,周利,等.头针对急性脑缺血再灌注大鼠 Bcl-2/Bax 表达的影响[J].湖北中医学院学报, 2008, 10(4): 5-7.
- [15] 马惠芳,林彩霞,任秀君,等.针刺对脑缺血大鼠海马区凋亡细胞及 Caspase-9 蛋白表达的影响[J].中国中医药信息杂志, 2009, 16(11): 25-27.

- [16] 冉群芳,倪光夏,项晓人.针刺对脑缺血再灌注模型大鼠海马 caspase-3 mRNA 表达的影响[J].吉林中医药, 2008, 28(4): 300-302.
- [17] 杨柳,王允山.死亡受体在神经系统疾病中的作用及在神经系统中的下游信号传送机制[J].生命的化学, 2010, 30(5): 723-728.
- [18] Tang W, Wang W, Zhang Y, et al. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced chemokine release in both TRAIL resistant and TRAIL-sensitive cells via nuclear factor kappa B[J]. FEBS Lett, 2009, 276(2): 581-593.
- [19] 王鹏琴,白丽,蔡虹,等.眼针对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织半暗区 Caspase-8、Caspase-3 mRNA 表达的影响[J].针灸临床杂志, 2010, 26(9): 51-54.
- [20] 孔立红,任婕,周华,等.电针对脑缺血再灌注大鼠海马 Fas 蛋白表达的影响[J].中国中医急症, 2006, 15(11): 1252-1253.
- [21] 罗文舒,吴永刚,徐绍刚,等.针刺督脉对脑缺血再灌注大鼠 FADD-Caspase-8 通路的影响[J].中国中医药指南, 2012, 10(8): 319-321.
- [22] 孔立红,孙国杰,刘胜洪.针刺对脑缺血再灌注大鼠海马组织核转录因子- κ B 表达及含量的影响[J].针刺研究, 2006, 31(6): 140-144.
- [23] 罗文舒,饶晓丹,吴永刚,等.针刺督脉对脑缺血再灌注大鼠脑组织核转录因子 κ B 表达的影响[J].中国医药导报, 2012, 9(8): 18-20.
- [24] Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor[J]. Nature, 1999, 397(6718): 441-446.
- [25] Vande Velde C, Cizeau J, Dubik D, et al. BNIP3 and genetic control of necrosis-like cell death through the mitochondrial permeability transition pore[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(11): 5454-5468.
- [26] Cho BB, Toledo-Pereyra LH. Caspase-independent programmed cell death following ischemic stroke[J]. J Invest Surg, 2008, 21(3): 141-147.
- [27] Lee BI, Lee DJ, Cho KJ, et al. Early nuclear translocation of endonuclease G and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice[J]. Neurosci Lett, 2005, 38(6): 23-27.
- [28] 王莹,李文媛,贾桦,等.电针联合脂肪源性干细胞移植对大鼠脑缺血/再灌注 PARP 和 NF- κ B 表达的影响[J].中医药学报, 2012, 40(3): 84-87.

(收稿:2013-02-16 修回:2013-11-20)

第 23 次全国中西医结合肝病学术会议征文通知

中国中西医结合学会肝病专业委员会 2014 年学术年会——“第 23 次全国中西医结合肝病学术会议”拟于 2014 年 8 月中旬在贵州省贵阳市举行。会议将以常见慢性肝病(慢性病毒性肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝癌、脂肪性肝病、酒精性肝病)的中西医结合防治研究进展和临床经验总结交流为重点内容,并将邀请国内知名专家做特邀报告。

征文要求 (1)提交 500—1 000 字中英文摘要。摘要须按照“目的、方法、结果、结论”格式撰写,用于会刊印刷(注意结果中提供重要的数据资料)。另提交中文论文全文(用于评审优秀论文)。写明作者姓名、单位名称、电子邮箱、地址及邮编。通过电子邮件发送至 CARL95@163.com。会议筹备组联系人:张华, Tel: 021-20256520。本次征文不接受纸质文稿。(2)投稿论文文本格式如下:中文标题用黑体、小四号字体,作者姓名及单位用楷体小五,正文宋体五号,1.5 倍行距,英文及数字用 Times New Roman 字体。(3)已在学术刊物公开发表过的论文,不再受理。

截稿日期 2014 年 6 月 15 日。