

## · 综述 ·

## 神经保护蛋白抗脑缺氧缺血的机制研究进展

柳华东 刘爽 杨立涛 陈晓轩 于常海

脑缺氧缺血是卒中等神经系统损伤性疾病的主要病理基础。如何降低脑缺氧缺血对神经细胞的损伤,保护神经元,恢复神经系统功能,是神经科学研究的重要领域。神经保护蛋白能在体内和体外发挥抗损伤作用,降低神经元死亡和神经功能丧失。脑缺氧缺血后,神经细胞能合成和释放更多神经保护蛋白,这可能是机体的自我防御反应。了解神经保护蛋白有利于我们通过外源性途径提升神经保护蛋白的含量,加强其神经保护功能的发挥,从而达到保护受损神经元,治愈脑缺氧缺血性疾病的日的。本文综述了主要神经保护蛋白的作用机制。

## 一、生长因子

能发挥神经保护作用的生长因子主要有:神经营养因子,睫状神经营养因子(CNTF),成纤维细胞生长因子(FGF),胶质细胞源性生长因子(GDNF),胰岛素样生长因子-1(IGF-1),转化生长因子 $\beta$ (TGF- $\beta$ )等。其中神经营养因子包括神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养素-3(NT-3)和神经营养素-4/5(NT-4/5)。血管内皮细胞生长因子(VEGF)和红细胞生成素(EPO)都不是首先在神经系统发现的,但后来的研究证实它们也具有神经保护作用。

研究证实,脑缺氧缺血诱导多种内源性生长因子表达升高,并能保护受损神经元。例如,短暂全脑缺血后,大鼠海马齿状回中 BDNF 和 NGF 的 mRNA 水平显著升高<sup>[1]</sup>。脑缺氧缺血后激活的星形胶质细胞也能高表达 NGF、CNTF 和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)<sup>[2]</sup>。急性脑梗死患者血清中 bFGF 含量升高,其含量与患者神经功能损失呈负相关<sup>[3]</sup>。动物实验和临床应用都证实脑缺氧缺血状态下,神经营养因子能发挥神经保护作用。GDNF 是常用的病毒载体介导脑缺氧缺血基因治疗研究的靶基因。动物实验结果显示,脑内注入表达 GDNF 的病毒载体,能保持脑内 GDNF 高水平表达,并显著缩小双侧颈总动脉和右侧大脑中动脉结扎后脑梗死的面积,保护神经元<sup>[4,5]</sup>。临床静脉给予组织型血纤蛋白溶酶原激活剂(tPA)治疗脑卒中,发现患者血浆游离 IGF-1 含量显著升高。利用 bFGF 和 EPO 治疗脑卒中的研究也

已经达到临床试验阶段<sup>[6]</sup>。

生长因子发挥神经保护作用主要通过与其特异性受体结合,激活下游的信号转导通路,促进神经细胞存活。研究结果显示,生长因子主要通过激活 PI3-K/Akt 和 MAPK 两条信号通路来发挥神经保护作用。例如,BDNF 能通过自分泌和旁分泌的方式上调海马齿状回和 CA1 区 TrkB 受体的表达,主要激活 ERK (MAPK 信号转导通路的主要成员之一),上调 Bcl-2、下调 Bax 的蛋白表达,抑制 caspase-3 的活性<sup>[7]</sup>。GDNF 与 c-Ret 受体(具有酪氨酸激酶活性)结合,激活多条胞内信号通路,包括 PI3-K 和 ERK,保护神经元<sup>[8]</sup>。GFR $\alpha$ -1 是 GDNF 高亲和力的受体,它是一个锚定在细胞表面的糖基化磷脂酰肌醇(GPI),缺乏激酶活性。GDNF 能保护神经元免受 NMDA 诱导的神经元坏死,而磷脂酶 C (PLC)能特异性水解 GPI,逆转 GDNF 的保护作用,说明 GFR $\alpha$ -1 也参与了 GDNF 保护作用的发挥。VEGF 也能调节 PI3-K/Akt/NF- $\kappa$ B 通路,抑制 caspase-3 的活性,降低缺氧缺血诱导的神经元凋亡;并且还能通过 PI3-K 通路抑制外向型延迟钾离子调整电流,升高脑缺氧缺血诱导的 Kv1.2 钾离子通道蛋白酪氨酸磷酸化<sup>[9]</sup>。

生长因子与其受体结合,也能激活其他调节细胞存活或死亡的信号通路,发挥神经保护作用。例如,BDNF 保护体外培养的神经元免受谷氨酸的毒性作用,可能是通过阻断 NMDA 受体导致的钙离子内流,从而抑制了蛋白激酶 C (PKC) 的活性<sup>[10]</sup>。胶质细胞来源的 NGF 是损伤后脑内 NGF 的主要组成部分。在脑损伤情况下,星形胶质细胞上调 NGF 低亲和力受体 p75<sup>NTR</sup> 和高亲和力受体 TrkA 的表达,同时 TrkB mRNA 的表达也升高。说明 NGF 可通过自分泌的方式影响星形胶质细胞<sup>[2]</sup>。在缺氧缺血后,海马神经元(不表达 TrkA)中低亲和力的神经营养因子受体 p75<sup>NTR</sup> 高表达。NGF 与 p75<sup>NTR</sup> 结合,激活神经营养因子依赖的神经磷脂酶和 NF- $\kappa$ B 转录复合物,引起抗氧化酶的活性增强,如锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)。但 p75<sup>NTR</sup> 受体是否参与了 NGF 神经保护作用的发挥,还需要进一步研究证实<sup>[2]</sup>。EPO 通过抑制神经元释放谷氨酸,抵抗一氧化氮对神经元的损伤,增强抗凋亡基因、抑制促凋亡基因的表达,发挥保护作用;抗凋亡的信号通路可能是通过激活 Jak2,继而激活下游的信号转导通路,包括 STAT、MAPK、PI-3K/Akt 和 NF- $\kappa$ B,发挥抗凋亡作用<sup>[11]</sup>。

生长因子还可通过干预其他生长因子的表达发挥保护作用。例如,CNTF、FGF 和 TGF- $\beta$ 1 都能诱导体外培养的神经元和星形胶质细胞表达 NGF<sup>[2]</sup>。并且在受损的脑组织也

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30470543);北京市自然科学基金资助项目(7051004)

作者单位:100083 北京大学神经科学研究所 教育部神经科学重点实验室 北京大学医学部神经生物学系(柳华东、刘爽、杨立涛、于常海);华中科技大学同济医学院 病理生理学系(陈晓轩)

通讯作者:于常海,Email: achy@bjmu.edu.cn

可观察到同样的现象。Forsythe 等<sup>[12]</sup>和 Jin 等<sup>[13]</sup>分别研究发现, VEGF 和 FGF 还能增强室管膜下区神经元前体细胞的增殖和迁移, 促进新生神经元的成熟和分化。这可能也是生长因子发挥神经保护作用的机制之一。

## 二、细胞因子

脑缺氧缺血后, 许多细胞因子, 包括白介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素-6 (IL-6)、白介素-10 (IL-10) 等表达升高。重组人 IL-1 受体抑制剂 (rhIL-1ra) 用于临床治疗脑卒中, 3 个月预后明显好于给予安慰剂的对照组<sup>[14]</sup>。虽然抑制过度的炎症反应是临床治疗脑卒中考虑的方面之一, 但近来研究发现部分细胞因子也可发挥神经保护作用。IL-6 是一种兼具促炎和抗炎作用的多向性细胞因子。中枢神经系统中神经元和胶质细胞都能表达 IL-6 和它的受体。脑缺氧缺血后, IL-6 的表达升高, 并能发挥神经保护作用。IL-6 可通过以下机制发挥保护作用: (1) IL-6 可抑制 IL-1 和 TNF- $\alpha$  的合成, 并刺激可溶性 TNF- $\alpha$  受体和 IL-1 受体拮抗剂产生, 从而对抗 IL-1 和 TNF- $\alpha$  的炎症损伤作用<sup>[15]</sup>。(2) Ali 等<sup>[16]</sup>发现 IL-6 能减轻 NMDA 的神经毒效应, 降低谷氨酸诱导的神经元损伤。(3) IL-6 能诱导星形胶质细胞合成神经生长因子, 包括 NGF 等, 诱导神经细胞生长分化, 有助于神经损伤后的修复<sup>[12]</sup>。(4) IL-6 能上调腺苷 A<sub>1</sub> 受体的表达, 通过腺苷 A<sub>1</sub> 受体依赖的磷酸肌醇信号通路, 发挥神经保护作用<sup>[17]</sup>。

脑缺血后, 脑内 TNF- $\alpha$  的表达迅速增加。局灶性脑缺血后 1 h 皮层就可观察到 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达, 12 h 达高峰, 一直持续到 5 d 以后。早期 TNF- $\alpha$  是由小胶质细胞产生, 晚期则由星形胶质细胞和小胶质细胞共同产生。Stoll 等<sup>[18]</sup>发现在脑缺氧缺血损伤中, TNF- $\alpha$  发挥促损伤和抗损伤的双重作用, 主要与激活的下游信号通路有关。临床病例研究证实 TNF- $\alpha$  高表达可能参与缺血耐受过程<sup>[19]</sup>。TNF- $\alpha$  发挥神经保护作用的机制有: (1) TNF- $\alpha$  刺激成纤维细胞、胶质瘤细胞和星形胶质细胞表达神经生长因子, 有助于缺血中心区和半影区神经元存活。(2) TNF- $\alpha$  导致包括神经元在内的一些细胞产生超氧化物歧化酶 (SOD), 保护神经元免受反应性氧介质 (ROS) 的损害<sup>[20]</sup>。(3) 大脑中动脉阻塞前 8 h, 脑室内给予合成的小鼠 TNF- $\alpha$ , 可以减小局灶性脑缺血的损伤面积。进一步研究发现, 在缺血耐受动物脑梗死区白细胞数降低, CD11 免疫反应性下降, 这可能是脑室内注射 TNF- $\alpha$  获得耐受的机制<sup>[21]</sup>。(4) 基因敲除研究发现, TNF- $\alpha$  在脑缺氧缺血后小胶质细胞对损伤的早期反应中发挥重要神经保护作用。TNF- $\alpha$  的表达和分泌能帮助清除细胞碎片, 限制损伤, 并维持细胞内环境的稳态<sup>[22]</sup>。

## 三、热休克蛋白

许多不同的应激, 包括脑缺氧缺血, 都能诱导细胞内热休克蛋白 (HSP) 的表达上调。在体和离体实验结果都证实, 脑缺氧缺血后高表达的热休克蛋白能发挥神经保护作用。在体局部和全脑缺血模型中, HSP70 高表达的转基因动物和利用疱疹病毒载体使脑内 HSP70 高表达的动物神经元损伤

均较轻; 利用体外培养的星形胶质细胞和神经元研究证实, HSP70 过表达保护星形胶质细胞和神经元免受缺氧缺糖和过氧化氢损伤, 并且过表达 HSP70 的星形胶质细胞还能保护神经元<sup>[23]</sup>。过表达 HSP27 能保护 ND7 细胞和背根节神经元对抗撤血清或神经生长因子缺乏导致的凋亡<sup>[24]</sup>。临床利用 tPA 治疗脑卒中, 也检测到 HSP70 mRNA 含量显著升高。

热休克蛋白通过以下途径发挥神经保护作用: (1) 热休克蛋白作为分子伴侣协助新合成的和变性的蛋白正确折叠。(2) 热休克蛋白抵抗细胞凋亡和坏死。热休克蛋白能抵抗多种形式的凋亡, 包括线粒体或死亡受体介导的经典凋亡和其他不依赖 caspase、不被 Bcl-2 抑制的凋亡。HSP70 能与 Apaf-1 (apoptosis protease activating factor-1) 结合, 阻碍 Apaf-1/cytochrome c/caspase-9 复合体的形成, 抑制经典凋亡途径; 还能与抗凋亡蛋白 BAG-1 相互作用, 抑制 caspase-3 的激活。HSP70 也能与 AIF (apoptosis inducing factor) 特异性结合, 抑制经典凋亡途径以外的凋亡, 保护撤血清导致的 Apaf-1<sup>-/-</sup>细胞的凋亡。Ravagnan 等<sup>[25]</sup>的研究显示, HSP70 的 ATP 结合结构域是 HSP70 抑制 Apaf-1 所必需的, 但却不参与 HSP70 对 AIF 介导凋亡的抑制作用。HSP27 能通过抑制细胞色素 c 释放, 与胞质中的细胞色素 c 结合抑制它与 Apaf-1 相互作用, 或者直接与 caspase-3 结合, 抑制 caspase-3 的激活而抑制线粒体依赖的凋亡途径。HSP27 也能与 Daxx 蛋白相互作用, 抑制凋亡受体介导的凋亡途径<sup>[23]</sup>。但 HSP27 不能抑制 AIF 介导的凋亡。(3) 热休克蛋白能调节其他信号转导通路, 保护神经细胞。HSP70 能与 JNK 相互作用, 改变 JNK 信号通路对凋亡的调节。HSP70 还能调节 NF- $\kappa$ B 等转录因子活性, 间接增强 Akt 活性, 调节抗凋亡和促凋亡基因的表达, 而抵抗凋亡<sup>[16]</sup>。(4) 热休克蛋白可能还参与许多凋亡相关蛋白的基因转录和转录后调控。HSP70 过表达能升高 Bcl-2 的蛋白表达。(5) HSP70 能抑制小胶质细胞和单核细胞的激活, 减轻炎症反应, 还能降低基质金属蛋白酶 (MMP) 的表达量, 发挥神经保护作用。

## 四、其他神经保护蛋白

除了上述三大类神经保护蛋白外, 机体还能合成许多其他种类的神经保护蛋白, 例如, 脑红蛋白、14-3-3 $\gamma$ 、腺苷、抗氧化酶等。本文主要介绍脑红蛋白和 14-3-3 $\gamma$ 。

脑红蛋白是近几年新发现的携氧蛋白家族的成员之一, 它是内源性神经保护因子。在体外培养的皮肤神经元和星形胶质细胞中, 缺氧或缺氧缺糖都能诱导脑红蛋白高表达, 并能保护神经元和星形胶质细胞免受缺氧损伤<sup>[26]</sup>。在体脑缺氧缺血模型中, 外源性给予脑红蛋白的反义寡核苷酸阻断脑红蛋白的表达, 扩大了脑梗死的面积<sup>[27]</sup>。对于脑红蛋白发挥神经保护作用的机制尚需进一步研究。有研究表明, 脑红蛋白可抑制 G 蛋白异源三聚体中  $\alpha$  亚基的解离, 参与脑内信号转导的调控<sup>[28]</sup>。非氧化状态的脑红蛋白与氧气和一氧化氮的反应缓慢。但氧化脑红蛋白能与一氧化氮迅速反应, 产生甲基化脑红蛋白。因此, 脑红蛋白的氧化还原状态

以及其晶体结构和构象的变化,可能参与了神经保护作用的发挥。

14-3-3 $\gamma$  是主要在脑中表达的可溶酸性蛋白,通过与其他蛋白结合,可调节多条信号通路,发挥重要作用<sup>[29]</sup>。14-3-3 $\gamma$  也具有神经保护功能。离体缺氧缺血模型证实,缺氧缺血诱导星形胶质细胞中 14-3-3 $\gamma$  高表达,保护星形胶质细胞免受缺氧缺血损伤<sup>[30]</sup>。其机制之一是通过磷酸化 Bad,抑制 Bad 由胞质到线粒体膜的转位,从而抑制了凋亡<sup>[31]</sup>。14-3-3 $\gamma$  还能与其他许多信号分子作用,包括 FKHL 等<sup>[32]</sup>,调节凋亡相关的信号通路,抑制凋亡。

脑缺氧缺血后,神经保护蛋白直接或通过受体激活神经细胞存活相关的信号通路,抑制死亡相关的信号通路,提高其他神经保护蛋白的表达,抑制毒性物质(如谷氨酸、IL-1、TNF- $\alpha$  等)对神经细胞的损伤。神经保护蛋白作为临床治疗脑卒中的靶点,已被逐渐重视。转基因动物和病毒载体介导的脑内神经保护蛋白过表达研究使临床基因治疗成为可能。对神经保护蛋白的基础研究使我们对一些治疗脑卒中药物(如 tPA 等)的作用机理更加明确。而能增强神经保护蛋白表达的药物开发和应用也将逐步走上日程。

#### 参 考 文 献

- Lindvall O, Ernfors P, Bengzon J, et al. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma (in situ hybridization/brain damage/hippocampus). *Proc Natl Acad Sci*, 1992, 89: 648-652.
- Semkova I, Kriegstein J. Neuroprotection mediated via neurotrophic factors and induction of neurotrophic factors. *Brain Res Brain Res Rev*, 1999, 30: 176-188.
- 宋水江, 闻树群, 黄鉴政, 等. 细胞间黏附分子-1 和碱性成纤维细胞生长因子在脑梗死中的作用. *中华医学杂志*, 2002, 82: 1447-1449.
- Tsai TH, Chen SL, Xiao X, et al. Gene therapy of focal cerebral ischemia using defective recombinant adeno-associated virus vectors. *Front Biosci*, 2006, 11: 2061-2070.
- Kilic U, Kilic E, Dietz GP, et al. Intravenous TAT-GDNF is protective after focal cerebral ischemia in mice. *Stroke*, 2003, 34: 1304-1310.
- Ren JM, Finklestein SP. Growth factor treatment of stroke. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*, 2005, 4: 121-125.
- Schabitz WR, Sommer C, Zoder W, et al. Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2000, 31: 2212-2217.
- Neff F, Noelker C, Eggert K, et al. Signaling pathways mediate the neuroprotective effects of GDNF. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, 973: 70-74.
- Sun FY and Guo X. Molecular and cellular mechanisms of neuroprotection by vascular endothelial growth factor. *J Neurosci Res*, 2005, 79: 180-184.
- Tremblay R, Hewitt K, Lesiuk H, et al. Evidence that brain-derived neurotrophic factor neuroprotection is linked to its ability to reverse the NMDA-induced inactivation of protein kinase C in cortical neurons. *J Neurochem*, 1999, 72: 102-111.
- Marti HH. Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol*, 2004, 207: 3233-3242.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*, 1996, 16: 4604-4613.
- Jin K, LaFevre-Bernt M, Sun Y, et al. FGF-2 promotes neurogenesis and neuroprotection and prolongs survival in a transgenic mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci*, 2005, 102: 18189-18194.
- Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, et al. Acute Stroke Investigators. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2005, 76: 1366-1372.
- Xing Z, Gaudie J, Cox G, et al. IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*, 1998, 101: 311-320.
- Ali C, Nicole O, Docagne F, et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20: 956-966.
- Biber K, Lubrich B, Fiebich BL, et al. Interleukin-6 enhances expression of adenosine A1 receptor mRNA and signaling in cultured rat cortical astrocytes and brain slices. *Neuropsychopharmacology*, 2001, 24: 86-96.
- Stoll G, Jander S, Schroeter M. Cytokines in CNS disorders: neurotoxicity versus neuroprotection. *J Neural Transm Suppl*, 2000, 59: 81-89.
- Castillo J, Moro MA, Blanco M, et al. The release of tumor necrosis factor-alpha is associated with ischemic tolerance in human stroke. *Ann Neurol*, 2003, 54: 811-819.
- Uno H, Matsuyama T, Akita H, et al. Induction of tumor necrosis factor  $\alpha$  in the mouse hippocampus following transient forebrain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17: 491-499.
- Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, et al. TNF- $\alpha$  pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1997, 17: 483-490.
- Turrin NP, Rivest S. Tumor necrosis factor  $\alpha$  but not interleukin 1 $\beta$  mediates neuroprotection in response to acute nitric oxide excitotoxicity. *J Neurosci*, 2006, 26: 143-151.
- Latchman DS. Protective effect of heat shock proteins in the nervous system. *Curr Neurovasc Res*, 2004, 1: 21-27.
- Wagstaff MJ, Collaco-Moraes Y, Smith J, et al. Protection of neuronal cells from apoptosis by hsp27 delivered with a herpes simplex virus-based vector. *J Biol Chem*, 1999, 274: 5061-5069.
- Ravagnan L, Gurbuxani S, Susin SA, et al. Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 839-843.
- Sun Y, Jin K, Mao XO, et al. Neuroglobin is up-regulated by and protects neurons from hypoxic-ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, 98: 15306-15311.
- Sun Y, Jin K, Peel A, et al. Neuroglobin protects the brain from experimental stroke in vivo. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100: 3497-3500.
- Wakasugi K, Kitatsuji C, Morishima I. Possible neuroprotective mechanism of human neuroglobin. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1053: 220-230.
- 陈晓轩, 乌维宁, 于常海. 14-3-3: 保护性信号转导调节蛋白. *生理科学进展*, 2004, 35: 247-250.
- Chen XQ, Chen JG, Zhang Y, et al. 14-3-3 $\gamma$  is upregulated by in vitro ischemia and binds to protein kinase Raf in primary cultures of astrocytes. *Glia*, 2002, 42: 315-324.
- Chen XQ, Fung YW, Yu AC. Association of 14-3-3 $\gamma$  and phosphorylated bad attenuates injury in ischemic astrocytes. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25: 338-347.
- Rosenquist M. 14-3-3 proteins in apoptosis. *Braz J Med Biol Res*, 2003, 36: 403-408.

(收稿日期:2006-03-01)

(本文编辑:朱瑶)