

缺血性脑卒中神经元死亡方式的研究进展

Recent advances in neuronal death in ischemic stroke

张琳函 尤卫艳

Linhan Zhang Weiyan You

南京医科大学 中国·江苏 南京 211166

Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 211166, China

摘要:缺血性脑卒中是脑卒中的主要类型,其发生后神经元死亡是造成神经功能损伤的最主要原因。除凋亡、坏死外,近年来许多新的细胞死亡方式被发现,包括焦亡、PARP-1 依赖性细胞死亡、铁死亡、胀亡等。本文旨在对缺血后脑中神经元的死亡方式及其研究进展予以综述。

Abstract: Ischemic stroke is the main type of stroke, and neuronal death is a leading cause of neurological deficit after cerebral ischemia. Besides apoptosis and necrosis, many new modes of cell death have been discovered in recent years, including pyroptosis, parthanatos, ferroptosis, oncosis, etc. In this review, we summarised the current studies on the neuronal death mechanisms in cerebral ischemia.

关键词:缺血性脑卒中;神经元;细胞死亡;研究进展;综述

Keywords: ischemic stroke neuron; cell death; research advances; review

基金项目:资助项目:江苏省高校自然科学研究项目一面上项目(18KJB180017)

DOI: 10.36012/pmr.v2i4.2714

1 前言

脑卒中是造成全人类生命损失的第三位疾病,缺血性脑卒中是其主要类型,具有发病率高、致残率高、致死率高、复发率高等特点,因此,我们急需通过基础研究寻求更有效地预防和治疗脑卒中的方法,而详细了解脑卒中后脑内发生的变化是我们探究更有效防治方法的基础。本文旨在对缺血后脑中神经元的死亡方式及其研究进展予以综述,包括凋亡、坏死性凋亡、焦亡、PARP-1 依赖性细胞死亡、铁死亡、胀亡、溶酶体依赖性细胞死亡、自噬性细胞死亡。

2 脑缺血与细胞死亡

急性局灶性脑缺血损伤后会经历三个互有重叠的阶段:一是细胞死亡和炎症,二是细胞增殖和组织替代,三是组织重塑^[1]。脑缺血后细胞的死亡是由各种复杂机制相互作用所介导的。目前,除了经典的坏死、凋亡外,多种新型细胞死亡方式被陆续发现并成为研究热点,如铁死亡、焦亡等。了解脑缺血后神经元的不同死亡方式不仅有助于研究者更清

晰地掌握脑缺血后神经元命运,也有助于阐明已有治疗方法的作用机制及进一步进行相关靶向药物的研发和应用。

2.1 凋亡

凋亡又称 I 型程序性细胞死亡,含半胱氨酸的 Caspases 家族是细胞凋亡的中心调节分子,其他参与凋亡过程的重要分子还有促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白。神经细胞凋亡是脑缺血后神经系统损伤的重要机制,抗凋亡治疗已成为治疗脑缺血疾病的重要途径。如丹参缩酚酸 B^[2]、草木犀^[3]通过上调 Bcl-2 和下调 Bax 来抑制脑缺血后的细胞凋亡;类固醇激素治疗通过减低 calpain-1 和 Caspase-3 的活化,抑制内源性细胞凋亡途径来减小脑的梗死灶体积^[4]。多项研究显示,miRNA 和 circRNA 参与调控脑缺血后细胞凋亡过程^[5],干预其表达对缺血性脑卒中后的转归有重要治疗学意义。多个 miRNA 可以直接靶向促凋亡或抗凋亡基因,如 miR-9 通过抑制 Bcl2l1 的基因转录来抑制凋亡,进而减轻神经损伤^[6],再如 miR-106b-5p 靶向调节 Mcl-1 发挥促凋亡作

用^[7]。而脑缺血再灌注后,hsa-circ-camk4 表达上调并通过靶向多个 microRNAs 来发挥促凋亡作用^[8]。显然,细胞凋亡机制在脑缺血导致神经功能损伤过程中发挥重要作用。

2.2 自噬性细胞死亡

自噬性细胞死亡又称 II 型程序性细胞死亡,其典型的自噬通路为 mTOR/Ulk1 信号通路^[9-10]。缺血后海马 CA1 区和 DG 区神经元中自噬体和自噬溶酶体数量均显著上调^[11]。研究者借助自噬的激动剂雷帕霉素和自噬的拮抗剂 3-甲基腺嘌呤、溶酶体的拮抗剂 MHY1485,证实了脑缺血后自噬的激活及其对脑组织的保护作用^[12]。缺氧诱导因子(HIF)是对氧敏感的关键调节因子^[13],近来研究表明,HIF-1 通过加强自噬来发挥脑缺血后的神经保护作用^[14]。多种脑卒中治疗药物的作用机制与自噬相关,譬如,姜黄素通过上调 p-Akt 和 p-mTOR,上调 PI3K/Akt/mTOR 信号通路进而下调自噬水平,对脑缺血灶起显著的神经保护作用^[15]。罗格列酮通过抑制神经系统的炎症、减弱神经细胞的自噬性死亡来降低脑梗死灶体积和脑水肿程度,提高神经存活率和神经功能恢复进程的作用^[16]。但也有报道显示,过度激活自噬具有神经毒性^[17]。氨基酸代谢物同型半胱氨酸(Hcy)水平升高是缺血性中风的危险因素,可能的机制是 Hcy 过度激活自噬,对脑缺血后神经干细胞具有毒性作用^[18]。可见,自噬是脑缺血损伤发生发展过程中的一把双刃剑。

2.3 坏死性凋亡(necroptosis)

既往认为,坏死是非程序性的细胞死亡形式,不受基因调控,但在 2005 年研究人员发现 necrostatin-1 专一性地阻断细胞坏死但不抑制凋亡,证明坏死也受到精确的细胞信号控制;由此,这种死亡方式被命名为坏死性凋亡^[19]。具体过程:首先 RIPK1 与 RIPK3 形成坏死小体,随后招募并活化 MLKL,后者诱导胞膜通透性改变,终致细胞死亡^[20]。研究显示,缺血引起的脑组织酸中毒通过酸敏感离子通道(ASIC1a)招募 RIPK1,进而诱导 RIPK1 的自体磷酸化和激活,最终诱导神经元坏死性凋亡^[21];necrostatin-1 通过抑制 RIPK1 的磷酸化、阻断 RIPK1/RIPK3/MLKL 信号通路,抑制坏死性凋亡,减轻缺血性脑损伤^[22]。有趣的是,高血糖可上调缺血脑组织中 RIPK1 和 MLKL 的蛋白水平,使神经元的死亡模式由凋亡转向坏死性凋亡^[23]。坏死性凋亡的相关研究也为揭示药物的作用机制提供全新的角度。研究表明,达拉非尼 Dabrafenib^[24]、甘草黄酮 Ligustroflavone^[25]、艾利康 Emricasan 与波那替尼 Ponatinib 两者联用^[26]均可以抑制神经元坏死性凋亡,发挥神经保护作用。在缺血脑组织中 ex-

制坏死性凋亡^[27];在大鼠脑缺血模型和细胞缺血模型中,给予抗 TrkB 抗体治疗可通过 BDNF 依赖性途径来抑制细胞坏死性凋亡^[28],此类研究为研发缺血性脑卒中的新治疗手段提供有力的理论依据和潜在的药物靶点。

2.4 焦亡(pyroptosis)

焦亡是一种细胞炎症程序性死亡过程,相比于凋亡,焦亡发生更快并伴随大量促炎症因子的释放。两条公认的焦亡信号通路分别由 caspase-1 和 caspase-11/4/5 介导,最终通过效应蛋白 GSDMD 介导胞膜破裂、细胞死亡,其中经典途径始于炎症小体激活 caspase-1^[29]。脑缺血后炎症小体激活 caspase-1,触发缺血灶周围神经元焦亡^[30],研究表明,AIM2 炎症小体介导的焦亡参与脑缺血后的认知功能损伤^[31]。此外,Sirt1-ROS-TRAF6 信号通路对脑缺血后神经元焦亡具有重要的调控作用^[32]。目前发现多种治疗方案的作用机制与焦亡密切相关,如低温通过抑制 Caspase-1 和 Caspase-11 的活化、抑制神经元焦亡而起神经保护作用^[33-34],具有抗炎杀菌作用的中草药高车前素^[35]和治疗脑缺血的中药补阳还五汤(BYHWD)中的有效成分如黄芪甙 IV、芍药甙等^[36]通过抑制 NLRP3 炎症小体诱导的经典焦亡途径,最终减轻脑损伤,改善神经功能。同时,一些非脑卒中治疗药物可抑制神经元焦亡,如骨钙素^[37]、用于治疗癫痫的药物 VPA^[38]、吡格列酮^[39]等,这些本用于其它领域的药物有望用于治疗脑卒中。其他非药物化合物亦能够抑制神经元焦亡,减轻神经损伤,如焦亡特异性抑制剂 Vx765 通过抑制 GSDMD 的激活,缩小梗死灶体积并提高神经功能学评分^[30],A151 通过抑制 AIM2 炎症小体的形成和 caspase-1、GSDMD 等焦亡相关蛋白的表达以抑制神经元焦亡^[40],内质网跨膜激酶 1 α 抑制剂 STF083010 通过 miR-125/NLRP1/caspase-1 途径抑制神经元焦亡^[41],这些均为研发新的靶向治疗药物提供了方向。

2.5 PARP-1 依赖性细胞死亡(Parthanatos)

PARP-1 依赖性细胞死亡的主要过程为环境中化学物或氧化应激副产物损伤 DNA,引起 PARP-1 过度激活及其催化产物 PAR 聚集,导致线粒体通透性的改变,使得 AIF 从线粒体释放并携带 MIF 至细胞核,后者剪切染色体 DNA,最终介导细胞死亡^[42]。在缺血性脑卒中模型中观察到 DNA 的氧化损伤、PAR 的聚集和 AIF 向胞核的转运,而 PARP-1 抑制剂可减轻缺血性损伤^[43]。PARP-1 依赖性细胞死亡也被证实与缺血性脑卒中过程中谷氨酸 NMDA 型受体诱导的兴奋性毒性密切相关^[44]。目前发现多种脑卒中治疗药物的作用机制与 PARP-1 依赖性细胞死亡相关,譬如,黄芩素

治疗通过抑制 PARP-1 的激活、AIF 和 MIF 向胞核的转运等阻止 PARP-1 依赖性细胞死亡,发挥脑缺血后神经保护作用^[45]。黄芪甙 IV 可通过减少 AIF 的释放从而保护神经元^[43]。间质干细胞治疗亦可通过抑制 AIF 向胞核的转移、抑制 PARP-1 依赖性细胞死亡从而影响脑缺血的转归^[46]。可见,对 PARP-1 依赖性细胞死亡的深入研究同样可为缺血性脑卒中相关药物的研发提供依据。

2.6 铁死亡(ferroptosis)

铁死亡是一种不同于自噬、凋亡和坏死的依赖于铁离子和活性氧的新型细胞程序性死亡方式,以铁依赖性的脂质过氧化和 ROS 的激增为主要特征^[47]。早在 Dixon 等人首次提出铁死亡概念时就已发现,高浓度谷氨酸介导的神经兴奋性毒能够被铁死亡抑制剂所逆转。应用血浆铜蓝蛋白等铁死亡抑制剂可对脑缺血后神经元起到保护作用,在 tau 敲除鼠中的研究显示,缓解脑缺血后铁离子的富集,可以有效抑制铁死亡,进而起到神经保护作用^[48]。提示逆转神经元内铁的过度聚集,可能是缓解脑缺血再灌注损伤的一种有效策略。谷胱甘肽过氧化物酶 4(GPX4)是调节铁死亡途径的关键分子,通过清除脂过氧化物,保护细胞免受脂质过氧化引起的铁死亡。在对沙鼠脑缺血模型的研究中发现,香芹酚通过降低 ROS 和铁离子的堆积,提高 GPX4 的表达水平,抑制铁死亡,进而保护海马区神经元^[49]。目前铁死亡参与脑缺血损伤的相关性研究较少,未来仍需深入挖掘其具体机制及干预方法。

2.7 溶酶体依赖性细胞死亡(Lysosome-dependent cell death, LCD)

LCD 是由溶酶体释放的组织蛋白酶 cathepsins 介导的一种细胞程序性死亡,其特征是溶酶体破裂(LMP)。脑缺血再灌注 4 小时后可观察到溶酶体膜结合跨膜糖蛋白 LAMP-1 在胞质中分布增加并呈弥散性,并观察到 cathepsin-B 溢出溶酶体,意味着溶酶体膜通透性升高^[50]。研究人员发现,联合抑制 caspase-3 和 cathepsin-B 比单独抑制提供了更好的神经保护,证明溶酶体依赖性细胞死亡参与脑缺血再灌注损伤过程。脑缺血缺氧会激活 cGAS/STING 信号通路,而抑制该通路明显降低脑梗死体积,减少皮质神经元变性,改善神经行为,分子层面研究结果显示,STING 和 LAMP-1 共定位,若阻断 STING 能降低组织蛋白酶 B 的表达,提示 cGAS/STING 信号通路通过降低溶酶体依赖性细胞死亡途径来保护神经元^[51]。另有研究提示,miR-207 通过靶向性调节 LAMP-2,降低细胞中溶酶体数量,进而影响溶酶体依赖性细胞死亡途径,减轻神经功能缺损评分和脑梗

死体积^[52]。据此,可推测靶向抑制溶酶体依赖性细胞死亡途径可以改善脑卒中的预后。

2.8 胀亡(Oncosis)

胀亡以细胞肿胀和细胞溶解为明显特征,与细胞能量代谢状态、维持细胞内外离子及水平衡的各类转运体及通道功能密切相关^[53-54]。脑梗死区由于严重缺乏血供,表现以胀亡为主,而缺血周边区因血供相对不足而表现以凋亡为主。脑内所有类型的细胞都会发生肿胀,当胶质细胞和血管内皮细胞发生胀亡后,血脑屏障受损,血液中的水得以自由进入脑实质,导致血管源性水肿^[54]。因此,胀亡是细胞中毒性脑水肿的直接原因,也间接参与了血管源性水肿,甚至可导致脑疝^[54]。

3 展望

缺血性脑卒中发生后,尽早通过静脉溶栓或血管内介入治疗,实现血管再通,恢复脑组织血氧供给(即缺血再灌注),否则神经细胞将不可逆转的死亡。缺血半暗带是血流灌注恢复后尚可以恢复其生理功能的组织,如何挽救缺血半暗带,减少神经元的丢失是目前脑卒中治疗方向的研究热点之一。而神经元死亡方式的机制十分复杂,尚需要进一步阐明其中的信号转导过程。已有治疗手段的作用机制与细胞的死亡信号转导通路之间的联系并非单一,如黄芪甙 IV 通过抑制神经元焦亡、PARP-1 依赖性细胞死亡并减轻神经元凋亡从而减轻脑损伤,改善神经功能^[36-43];间充质干细胞治疗通过抑制凋亡、坏死性凋亡和 PARP-1 依赖性细胞死亡发挥其神经保护作用^[46]。可见对于缺血性脑卒中细胞死亡方式机制的阐述不仅为揭示现有药物的作用机制提供全新的视角,也为研发缺血性脑卒中的新靶向药物提供有力的理论依据和新的方向,笔者认为,开展不同靶向药物的联合治疗可能更有助于缺血性脑卒中的治疗。

参考文献

- [1] Neuron 81, 229-248 (2014).
- [2] Brain Res Bull 115, 30-36 (2015).
- [3] Biomed Pharmacother 89, 1346-1352 (2017).
- [4] Neurol Res 39, 54-64 (2017).
- [5] Prog Neurobiol 163-164, 59-78 (2018).
- [6] Mol Neurobiol 53, 6809-6817 (2016).
- [7] Mol Neurobiol 54, 2901-2921 (2017).
- [8] Sci Rep 10, 7012 (2020).
- [9] Mol Biol Cell 20, 1992-2003 (2009).
- [10] Curr Opin Cell Biol 22, 132-139 (2010).
- [11] J Neurochem 115, 68-78 (2010).
- [12] Int J Mol Med 40, 1699-1708 (2017).

- [13] *Neurol Res* 31, 114–121 (2009).
- [14] *Oncotarget* 8, 98482–98494 (2017).
- [15] *J Mol Neurosci* 64, 129–139 (2018).
- [16] *J Neurol Sci* 349, 65–71 (2015).
- [17] *Neural Regen Res* 15, 1388–1396 (2020).
- [18] *Cell Death Dis* 10, 561 (2019).
- [19] *Nat Chem Biol* 1, 112–119 (2005).
- [20] *Annu Rev Pathol* 12, 103–130 (2017).
- [21] *Elife* 4, (2015).
- [22] *Aging Dis* 10, 807–817 (2019).
- [23] *Cell Death Discov* 4, 55 (2018).
- [24] *Neural Regen Res* 13, 252–256 (2018).
- [25] *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 392, 1085–1095 (2019).
- [26] *Transl Stroke Res* 9, 382–392 (2018).
- [27] *J Cell Physiol* 234, 1816–1826 (2019).
- [28] *Neurobiol Dis* 127, 570–581 (2019).
- [29] *Nature* 526, 660–665 (2015).
- [30] *CNS Neurosci Ther* 26, 925–939 (2020).
- [31] *Brain Behav Immun* 87, 765–776 (2020).
- [32] *Neurosci Bull* 36, 845–859 (2020).
- [33] *Brain Res Bull* 159, 25–31 (2020).
- [34] *Brain Res Bull* 150, 1–12 (2019).
- [35] *Life Sci* 232, 116599 (2019).
- [36] *J Ethnopharmacol* 242, 112051 (2019).
- [37] *Aging (Albany NY)* 12, 387–396 (2020).
- [38] *Neurochem Int* 124, 141–151 (2019).
- [39] *Cell Physiol Biochem* 45, 2351–2368 (2018).
- [40] *EMBO Mol Med* 12, e11002 (2020).
- [41] *J Neuroinflammation* 17, 152 (2020).
- [42] *Science* 354, (2016).
- [43] *Free Radic Biol Med* 131, 251–263 (2019).
- [44] *J Neurosci* 20, 8005–8011 (2000).
- [45] *Apoptosis* 25, 354–369 (2020).
- [46] *Cell Mol Neurobiol* 37, 303–313 (2017).
- [47] *Cell* 149, 1060–1072 (2012).
- [48] *Mol Psychiatry* 22, 1520–1530 (2017).
- [49] *Life Sci* 235, 116795 (2019).
- [50] *Neurobiol Dis* 40, 293–302 (2010).
- [51] *Mol Neurobiol* 57, 2600–2619 (2020).
- [52] *Neuroscience* 305, 1–14 (2015).
- [53] *Exp Mol Pathol* 93, 302–308 (2012).
- [54] *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 176, 37–64 (2019).

(上接第10页)被认为是广泛的预测性生物标志物,可用于指导患者的治疗^[4,5]。目前 RT-qPCR 和实时定量 PCR (RT-qPCR)主要用于检测特异性嵌合融合基因,通用型基因主要以 RT-PCR 检测 WT-1^[6]为主。需要进一步发掘新的通用型特异性基因。

我们选择了急性早幼粒细胞白血病细胞株 NB4,在体外进行了全反式维甲酸的诱导分化,首先通过芯片差异分析,发现 STC-1 基因表达升高。本研究在此基础上,采用 RT-PCR 对该基因的表达水平进行了进一步研究,结果表明 ATRA 诱导 NB4 细胞后,细胞增值水平受到抑制,而分化水平升高,表现为成熟分化形态表现,分化抗原 CD11b 升高。同时证实, STC-1 基因表达水平明显降低,提示该基因有可能成为临床检测微小残留病的重要生物学指标。

参考文献

- [1] Ballman, K. V. Biomarker: Predictive or prognostic? *J. Clin. Oncol.* 2015, 33, 3968–3971.
- [2] Gerstung, M.; Papaemmanuil, E.; Martincorena, I.; Bullinger, L.; Gaidzik, V. I.; Paschka, P.; Heuser, M.; Thol, F.; Bolli, N.; Ganly, P.; et al. Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach. *Nat. Genet.* 2017, 49, 332–340.
- [3] Döhner, K.; Paschka, P. Intermediate-risk acute myeloid leukemia therapy: Current and future. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2014, 2014, 34–43.
- [4] Ossenkoppele, G.; Schuurhuis, G. J. MRD in AML: Does it already guide therapy decision-making? *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Progr.* 2016, 2016, 356–365.
- [5] Grimwade, D.; Freeman, S. D. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Which platforms are ready for “prime time”? *Blood* 2014, 124, 3345–3355.
- [6] Messina, C.; Candoni, A.; Carrabba, M. G.; Tresoldi, C.; Sala, E.; Tassara, M.; Crippa, A.; Peccatori, J.; Assanelli, A.; Gattillo, S.; et al. Wilms’ tumor gene 1 transcript levels in leukapheresis of peripheral blood hematopoietic cells predict relapse risk in patients autografted for acute myeloid leukemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2014, 20, 1586–1591.