

酒精诱发发育中大脑神经元凋亡机制研究进展

许传芹 综述 陈卫星 审校

浙江大学医学院附属第一医院, 浙江省杭州市 310003

摘要: 胎儿酒精综合征 (FAS) 是由于孕妇饮酒给胎儿造成的永久性出生缺陷, 酒精诱导的神经元凋亡是引起 FAS 的主要原因。FAS 可导致胎儿出生后的中枢神经系统功能异常及认知功能障碍。近年来大量实验研究表明, 酒精可通过多种机制引起发育中的中枢神经元发生凋亡。本文回顾了国内外相关文献, 从细胞水平、分子水平、各种相关信号通路、酶活性变化、相关受体及蛋白合成等方面的发病机制及相关因素做一简要综述。

关键词: 酒精; 胎儿酒精综合征; 神经元; 细胞凋亡; 凋亡机制; 神经胶质细胞; 氧化应激

胎儿酒精综合征 (fetal alcohol syndrome, FAS) 由 Jones 和 Smith 于 1973 年首次提出, 是母亲在妊娠期间酗酒对胎儿所造成的永久出生缺陷, 其主要特征包括小头和面部畸形、生长发育迟缓和一系列中枢神经系统症状 (智力低下、大脑过小、脑畸形)。在大脑发育的关键时期 (突触形成时期) 短暂的酒精接触就能引起神经元的大量凋亡^[1, 2]。在患有 FAS 的儿童中酒精的这种促凋亡效应可能在引起神经病理学异常的过程中起到关键作用。

酒精可引起神经系统及其他多系统损伤^[3], 神经细胞对酒精的凋亡诱导效应尤其敏感^[4]。幼年动物暴露于酒精可触发大脑广泛的神经元凋亡退化性变, 抑制神经生长, 造成认知功能损害^[5]。

1 酒精诱发神经元氧化应激

体内外的研究均证明酒精诱导的神经元凋亡与酒精诱发的氧化应激有关^[6]。通过诱导应激, 酒精可增加活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的产生, ROS 可降低超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性^[7]。ROS 在氧化应激诱导的细胞凋亡中起到关键的作用, 并可触发神经元的炎症反应。酒精还可通过诱导细胞色素 P450 (CYP2E1) 增加超氧阴离子自由基合成和过氧化氢的生成, 使线粒体受损, 特别是对呼吸链的部分抑制, 导致氧化还原载体如辅酶 Q 的自氧化, 增加氧自由基的产生。酒精还可因氧化应激引起 NADH/NAD 比例增加, 生成大量羟自由基, 造成脂质过氧化^[8]。

星形胶质细胞在维持神经元内谷胱甘肽的 (GSH) 的动态平衡中起着重要作用, 而胞内 GSH 的减少可使凋亡趋于正常化, 证明星形胶质细胞可保护神经元^[9]。还有研究发现酒精及其代谢产物乙醛对少突胶质细胞和小胶质细胞的生长有明显的抑制作用, 这可能是 FAS 中髓鞘发育异常的主要原因之一^[10, 11]。

2 酒精影响神经营养因子信号通路

神经营养因子是神经元的存活、增殖、分化等所必需的一类生长因子。大量研究表明酒精通过干扰神经营养因子的信号通路引起神经元的凋亡。酒精可通过多种途径干扰神经营养因子的作用, 如影响营养因子的表达、受体的水平或这些因子激活的下游信号通路^[12]。

脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) 的生物学效应是在大脑发育阶段 BDNF 通过与受体结合激活外源性信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase 1, ERK1 和 extracellular signal-regulated kinase 2, ERK2) 及磷酸肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase/Akt, PI3K/Akt) 通路, 引起细胞增殖相关的一些转录因子的表达。酒精能降低大脑中 BDNF 水平并抑制其受体功能, 同时抑制 BDNF 激活的 PI3K 及 ERK 信号通路^[13]。

胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 是一类促进细胞生长, 具有与胰岛素相似的分子结构及生物学功能的神经营养因子, 其受体具有两个 α 亚基及两个 β 亚基^[14], IGF-1 与受体

基金项目: 国家十一五支撑计划 (2008BAI52B03)

收稿日期: 2010-08-24; 修回日期: 2010-11-11

作者简介: 许传芹 (1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事酒精性疾病的研究。

通讯作者: 陈卫星 (1952-), 男, 科室副主任, 主任医师, 博士后, 主要从事酒精性肝病的研究。

α 亚基结合导致受体酪氨酸自体磷酸化及 β 亚基本身的酪氨酸激酶活性被激活,然后激活胰岛素受体底物 1 (insulin receptor substrate-1, IRS-1), IRS-1 可以招募并活化 PI3 K,从而激活 PI3 K 信号通路,抑制细胞凋亡。酒精通过使 IRS-1 的磷酸化水平降低,阻碍 PI3 K 的结合,抑制 IGF-1 的神经保护作用^[15]。Rubin 等^[16]发现酒精结合于胰岛素受体和 IGF-1 受体激酶活性区域的疏水区并与极性氨基酸残基通过亲水结合稳定下来,从而抑制受体激酶活性,阻断胰岛素信号通路。

此外,酒精还可通过多种途径干扰神经营养因子-3 (neurotrophin-3, NT-3)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF)、表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 等神经营养因子的作用导致神经元凋亡。

3 酒精诱导糖原合酶激酶 3 β 活性增加

糖原合酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β) 是一种多功能丝氨酸/苏氨酸激酶,介导酒精的神经毒性作用。GSK3 β 上丝氨酸 9 的磷酸化下调其活性。酒精可以诱导 GSK3 β 上丝氨酸 9 去磷酸化及 Bax 与 caspase 的活化促进凋亡发生,高水平的 GSK3 β 或活性形式的 GSK3 β 还会增加神经元对酒精的敏感性,它在细胞中的表达状态决定神经元对酒精的易感性^[17]。

4 酒精诱导激活 JNK 信号通路

c-jun 氨基末端激酶 (c-Jun amino-terminal kinase, JNK) 信号通路是丝裂原激活蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 中重要的通路之一,在调节神经系统凋亡的过程中起着关键的作用。JNK 是一个与凋亡相关的有丝分裂原激活蛋白激酶,可由各种凋亡刺激激活^[18],通过磷酸化促凋亡蛋白,如 Bax 及 Bad 调节凋亡信号通路^[19]。最近的研究称,除了诱导促凋亡基因的转录,JNK 也直接激活细胞凋亡机制^[20]。

5 酒精激活内源性凋亡通路

B 细胞淋巴瘤/白血病-2-基因 (B-cell lymphoma/Leukemia-2, Bcl-2) 蛋白家族在细胞凋亡的调控机制中起着重要的作用,该家族分为抗凋亡蛋白 (Bcl-2 和 Bcl-xl) 和促凋亡蛋白,后者又分为多结构域蛋白 (Bax、Bak 和 Bok) 和 BH3-only 蛋白 (Bid、Bad、Bim、Bmf、Nova、Hrk、Puma 等)。

酒精诱导的神经细胞凋亡是内源性凋亡通路,极度依赖于内源性凋亡通路的重要递质 Bax 的表

达,并导致线粒体细胞色素 c 释放及 caspase-3 的激活,Bax 缺失的小鼠可完全阻止酒精诱导的 caspase-3 激活及神经元凋亡^[20]。凋亡发生时 Bax 发生构象改变并由胞液转移到线粒体膜内。线粒体 Bax 触发细胞色素 c 释放到胞液中,导致凋亡小体形成,caspase-9 裂解及 caspase-3 激活^[21]。

在有些细胞体系,Bax 激活需要 p53 依赖性的 noxa 和 (或) puma 蛋白的表达^[22]。其他 BH3-only 结构域蛋白分子,如 Bad 及 Bid,可能调节 Bax 依赖性细胞凋亡^[23]。

p53 正像凋亡调控因子 (Puma; Bcl-2 蛋白家族的促凋亡成员之一) 一样,可被内、外源性 p53 快速诱导活化,而 Puma 是通过依赖 p53 的途径导致细胞发生凋亡。缺乏 Puma 可表现出显著的抗凋亡作用,caspase-3 的激活也受到抑制^[24]。高水平活性形式的 Bad 干扰线粒体膜的通透性及促进细胞色素 c 的释放,导致 caspase 的激活。Bad 的失活可认为是保护细胞免受凋亡的重要部分。

6 酒精影响神经递质受体功能

γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 是中枢神经系统中很重要的抑制性神经递质。N-甲基-D-门冬氨酸 (N-methy-D-aspartate, NMDA) 可介导大脑中各区域兴奋性突触传递过程。在神经系统发育的突触生成阶段,当 NMDA 受体拮抗剂阻断 NMDA 受体及 GABA 能物质过度激活 GABA 受体时可造成神经元的广泛凋亡。酒精的作用很大程度上归因于它所具有的 NMDA 受体拮抗剂及 GABA 受体激活剂的特性^[25, 26]。酒精通过对 NMDA 及 GABA 受体的作用,触发一个或多个 p53 非依赖性促凋亡分子的上调。给小鼠注射 GABA 受体激活剂和 NMDA 受体拮抗剂可诱导大脑大面积神经元凋亡^[1]。

7 酒精抑制环磷酸腺苷信号通路

cAMP 信号转换系统已被证明对神经细胞的生存及神经再生很重要^[27],并且是对酒精敏感性的重要调节剂^[28]。腺苷酸环化酶 1 (adenylate cyclase, AC1) 和腺苷酸环化酶 8 (adenylate cyclase, AC8) 广泛表达于发育中的大脑的许多区域,如海马、皮质及丘脑中^[29],是大脑中唯一的同工酶并在胞浆钙离子浓度升高的情况下被激活,AC 同工酶催化 ATP 转化为 cAMP,激活下游信号通路,调节细胞功能^[30]。与正常对照组相比,AC1 及 AC8 缺失的小鼠暴露于酒精会加剧酒精诱导的神经元凋亡,并伴

有如下几种蛋白磷酸化的显著降低: 促存活蛋白、胰岛素受体底物-1 (IRS-1), Akt 及细胞外信号调节酶 (ERKs)。研究表明 AC1 及 AC8 是急性酒精暴露后细胞生存信号通路的关键激活剂, 并且是决定 FAS 相关症状的严重程度的重要分子因素^[31]。

8 酒精抑制 PKR 介导的蛋白合成

双链 RNA 激活蛋白激酶 (double-stranded RNA-activated protein kinase, PKR) 为丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 在细胞蛋白翻译、细胞生存及抗病毒反应中起着重要的作用。蛋白合成停止是细胞凋亡的重要机制之一。蛋白翻译起始时, 真核细胞翻译起始因子 2α (eIF2 α) 由结合二磷酸鸟苷 (GDP) 形式转换为结合三磷酸鸟苷 (GTP) 形式, 使携带有氨基酸的转运 RNA (tRNA) 与小亚基结合并为起始复合物的形成提供能量。

PKR 被病毒或 dsRNA 激活后, PKR 磷酸化其底物 eIF2 α 抑制翻译起始。PKR 还可被其蛋白激活物 PACT 或鼠同源物 RAX 激活。酒精增加了 PKR 及 eIF2 α 的磷酸化, 酒精对 PKR 及 eIF2 α 的作用与 PACT 和 RAX 的表达呈正相关^[32], 说明酒精可通过阻断蛋白质合成使神经元发生凋亡。

9 酒精诱导神经元凋亡的其他机制

其他的与神经发育及生存机制有关的细胞信号通路过程有细胞外信号调控的蛋白激酶 (ERKs) 及磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 信号通路。酒精诱导的神经元凋亡部分是由于胰岛素刺激的 PI3K 活性被抑制^[18]。酒精对胰岛素及胰岛素样生长因子 1 型受体信号通路的抑制导致 PI3K 活性的降低及随后的 Akt 磷酸化水平及 Akt 激酶活性的降低^[21]。

酒精还可通过多种途径损伤线粒体 DNA 及减少线粒体数量致线粒体功能受损, 导致神经细胞减少及凋亡发生^[33]。

10 结语

宫内及幼年动物暴露于酒精可触发大脑广泛的神经元凋亡, 抑制神经发育, 并造成严重的认知功能障碍。酒精触发神经元凋亡可能是通过多作用位点和作用方式实现的, 对酒精诱导的神经元凋亡的分子机制进行更深入的研究有利于揭示 FAS 认知功能障碍的发病机制, 为临床诊断及预防提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 2000, 287 (5455): 1056-1060.
- [2] Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, et al. Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis*, 2001, 8 (3): 359-379.
- [3] Chen SH, Wang JW, Li YM. Is alcohol consumption associated with gastroesophageal reflux disease? *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed Biotechnol)*, 2010, 11 (6): 423-428.
- [4] Olney JW, Young C, Wozniak DF, et al. Do pediatric drugs cause developing neurons to commit suicide? *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25 (3): 135-139.
- [5] Creeley CE, Olney JW. The young: neuroapoptosis induced by anesthetics and what to do about it. *Anesth Analg*, 2010, 110 (2): 442-448.
- [6] Ramachandran V, Watts LT, Maffi SK, et al. Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *J Neurosci Res*, 2003, 74 (4): 577-588.
- [7] Amini S, Merabova N, Khalili K, et al. p38SJ, a novel DINGG protein protects neuronal cells from alcohol induced injury and death. *J Cell Physiol*, 2009, 221 (3): 499-504.
- [8] Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, et al. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 2005, 160 (2): 146-156.
- [9] Watts LT, Rathinam ML, Schenker S, et al. Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death. *J Neurosci Res*, 2005, 80 (5): 655-666.
- [10] 屈卫东, 吴德生, 魏大鹏, 等. 酒精及其代谢产物乙醛对大鼠少突胶质细胞增殖的影响. *卫生毒理学杂志*, 2000, 14 (1): 35-37.
- [11] 杨志强, 陈雯, Kane Cynthia JM. 酒精影响体外大鼠小胶质细胞的生存和繁殖. *卫生毒理学杂志*, 1999, 13 (1): 12-15.
- [12] Luo J, Miller MW. Growth factor-mediated neural proliferation: target of ethanol toxicity. *Brain Res Brain Res Rev*, 1998, 27 (2): 157-167.
- [13] Climent E, Pascual M, Renau-Piqueras J, et al. Ethanol exposure enhances cell death in the developing cerebral cortex: role of brain-derived neurotrophic factor and its signaling pathways. *J Neurosci Res*, 2002, 68 (2): 213-225.
- [14] D'Ercole AJ, Ye P, Calikoglu AS, et al. The role of the insulin-like growth factors in the central nervous system. *Molecular neurobiology*, 1996, 13 (3): 227-255.

- [15] Zhang FX, Rubin R, Rooney TA. Ethanol induces apoptosis in cerebellar granule neurons by inhibiting insulin-like growth factor 1 signaling. *J Neurochem*, 1998, 71(1): 196-204.
- [16] Rubin R, Harrison R, Chen XF, et al. Inhibition of insulin-like growth factor I receptor tyrosine kinase by ethanol. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(10): 2009-2017.
- [17] Liu Y, Chen G, Ma C, et al. Overexpression of glycogen synthase kinase 3 beta sensitizes neuronal cells to ethanol toxicity. *J Neurosci Res*, 2009, 87(12): 2793-2802.
- [18] Lee YJ, Shukla SD. Pro- and anti-apoptotic roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in ethanol and acetaldehyde exposed rat hepatocytes. *Eur J Pharmacol*, 2005, 508(1-3): 31-45.
- [19] Kim BJ, Ryu SW, Song BJ. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol Chem*, 2006, 281(30): 21256-21265.
- [20] Kristiansen M, Hughes R, Patel P, et al. Mkp1 is a c-Jun target gene that antagonizes JNK-dependent apoptosis in sympathetic neurons. *J Neurosci*, 2010, 30(32): 10820 - 10832.
- [21] Young C, Klocke BJ, Tenkova T, et al. Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death Differ*, 2003, 10(10): 1148-1155.
- [22] Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219.
- [23] Villunger A, Michalak EM, Coultas L, et al. p53- and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. *Science*, 2003, 302(5647): 1036-1038.
- [24] Akhtar RS, Ness JM, Roth KA. Bcl-2 family regulation of neuronal development and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1644(2-3): 189-203.
- [25] Ghosh AP, Walls KC, Klocke BJ, et al. The proapoptotic BH3-only, Bcl-2 family member, Puma is critical for acute ethanol-induced neuronal apoptosis. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68(7): 747-756.
- [26] Ron D. Signaling cascades regulating NMDA receptor sensitivity to ethanol. *Neuroscientist*, 2004, 10(4): 325-336.
- [27] Ueno S, Harris RA, Messing RO, et al. Alcohol actions on GABA(A) receptors: from protein structure to mouse behavior. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001, 25(5): 76S-81S.
- [28] 吴园园, 李涵, 杨萍. cAMP 促进成年哺乳动物中枢神经系统再生分子机制的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(1): 88-91.
- [29] Maas JW Jr, Indacochea RA, Muglia LM, et al. Calcium-stimulated adenylyl cyclases modulate ethanol-induced neurodegeneration in the neonatal brain. *J Neurosci*, 2005, 25(9): 2376-2385.
- [30] Conti AC, Maas JW Jr, Muglia LM, et al. Distinct regional and subcellular localization of adenylyl cyclases type 1 and 8 in mouse brain. *Neuroscience*, 2007, 146(2): 713-729.
- [31] Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1996, 36: 461-480.
- [32] Conti AC, Young C, Olney JW, et al. Adenylyl Cyclases Types 1 and 8 Promote Pro-Survival Pathways After Ethanol Exposure in the Neonatal Brain. *Neurobiol Dis*, 2009, 33(1): 111-118.
- [33] Chen G, Ma C, Bower KA, et al. Interaction between RAX and PKR modulates the effect of ethanol on protein synthesis and survival of neurons. *J Biol Chem*, 2006, 281(23): 15909-15915.
- [34] de La Monte SM, Wands JR. Mitochondrial dna damage and impaired mitochondrial function contribute to apoptosis of insulin-stimulated ethanol-exposed neuronal cells. *Alcohol Clin Exp Res*, 2001, 25(6): 898-906.