

- [12] Speechley KN, Sang X, Levin S, et al. Assessing severity of epilepsy in children: preliminary evidence of validity and reliability of a single-item scale. *Epilepsy Behav*, 2008, 13 (5): 337-342.
- [13] Cramer JA, Baker GA, Jacoby A. Development of a new sei-

zure severity questionnaire: initial reliability and validity testing. *Epilepsy Res*, 2002, 48 (9): 187-197.

- [14] Cramer JA, French J. Quantitative assessment of seizure severity for clinical trials: a review of approaches to seizure components. *Epilepsia*, 2001, 42 (1): 119-129.

癫痫发作后认知功能与 Bcl-2 关系的研究进展

徐学于¹ 综述 张晓琴² 审校

1. 武汉大学第二临床学院,湖北省武汉市 430071

2. 武汉大学中南医院,湖北省武汉市 430071

摘 要: 癫痫发作后脑部易感区域神经元的死亡,从而导致患者的认知功能出现损害,有实验研究证明 Bcl-2 基因家族蛋白在癫痫发作后神经元死亡的信号分子通路中发挥着重要的作用,并且癫痫发作后认知功能的损害可能与 Bcl-2 基因家族蛋白的水平相关,因此监测颅内或外周组织中 Bcl-2 基因家族蛋白水平的变化情况可以反映出癫痫发作后认知功能损害的程度,以便临床能够早期进行适当的干预,从而减轻患者认知功能损害的程度。

关键词: 癫痫; 认知功能; Bcl-2 基因家族蛋白; 神经元死亡

癫痫是多种原因导致的脑部神经元高度同步化异常放电的临床综合征,是神经系统常见疾病,流行病学资料显示癫痫的患病率为 5‰,我国约有 600 万以上的癫痫患者^[1]。颞叶癫痫是最常见癫痫类型,约有 70% 为耐药性癫痫^[2],虽然不断有新的抗癫痫药物出现和手术治疗成功率的增加,但是仍有很多的患者既没有控制癫痫发作还要忍受药物和手术带来的不良反应^[3]。癫痫发作导致海马等易感区域神经元的死亡和脑部形态学的改变,特别是与癫痫发作的持续时间相关^[4]。实验已经证明癫痫持续状态可以导致脑部易感区域选择性的神经元死亡和认知功能损害^[5,6]。随着分子生物学技术的不断发展,在癫痫发作后神经元死亡的动物试验模型中已经证实很多关于细胞凋亡的信号和分子途径^[7,8]。癫痫发作后主要是内在线粒体和外在死亡感受器两个分子信号途径被激活,两个调节细胞凋亡的主要的信号分子通路分别是: B 细胞淋巴瘤/白血病基因-2 (Bcl-2) 基因家族和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspases), Bcl-2 基因家族主要由抗细胞凋亡蛋白 (包括 Bcl-2、Bcl-xl 和 Bcl-w 等)、

促进细胞凋亡蛋白 (包括 Bax、Bak 等) 和 BH3-only 蛋白 (Bcl-2 homology domain 3-only, 包括 Bid、Bad、Bak、Bim 和 Puma 等) 组成, Bcl-2 基因家族蛋白主要调节线粒体外细胞膜的通透性从而主要参与内在细胞凋亡途径^[9,10]。Caspases 是半胱氨酸蛋白水解酶类的家族,发挥着重要的外在细胞凋亡途径, Caspase-3 是细胞凋亡的主要执行者,对许多的关键蛋白都有溶蛋白性的裂解作用^[11]。以下主要介绍 Bcl-2 基因家族蛋白在癫痫发作后神经元死亡中的作用,即癫痫发作后神经元死亡的内在线粒体凋亡途径。

1 抗细胞凋亡蛋白 (anti-apoptotic protein)

1.1 Bcl-2

Díaz-Prieto 等^[12]的研究表明 Bcl-2 蛋白主要是与在癫痫疾病中发挥重要作用的钙离子信号通道^[13]联系而产生抗细胞凋亡的作用。Bcl-2 能够间接的导致 L 型钙通道的向下调节, L 型钙通道可以导致钾离子的降低引起细胞质和线粒体钙离子浓度的增加,从而阻止线粒体钙离子的超载,使神经元细胞对各种细胞凋亡刺激有抵抗力。

收稿日期: 2012-08-10; 修回日期: 2012-10-04

作者简介: 徐学于 (1987-), 男, 硕士研究生在读, 主要从事癫痫诊断和治疗的研究。

1.2 Bcl-xl

Leber 等^[14]的研究表明 Bcl-xl 的抗细胞凋亡功能主要是对促进细胞凋亡的 Bax 蛋白有抑制作用。丛生蛋白 (CLU) 分为参与促进细胞凋亡的 nCLU 和抗细胞凋亡的 Sclu^[15], 长时间的癫痫发作后促进细胞凋亡的 nCUL 能够降低 Bcl-xl 对于 Bax 的作用^[16]。Upton 等^[17]的研究表明虽然 Bcl-xl 能被 BH3-only 蛋白所抑制, 但是 Bcl-xl 能够整合 BH3-only 的激活蛋白如 tBid 和 Bim, 使得 tBid 和 Bim 不能够激活抗细胞凋亡的 Bax 或 Bak, 使 Bax 在细胞凋亡中必需经历 N 末端位置的暴露的构象变化才能够成为有活性的 Bax。

1.3 Bcl-w

Murphy 等^[9]的研究表明 Bcl-w 蛋白缺乏老鼠在癫痫持续状态之后海马神经元死亡是对照组的两倍, Bcl-w 蛋白在癫痫持续状态后海马 CA3 区神经元丢失、DNA 裂解方面有内源性的保护作用及消除起始发作时的多发棘波的功能, 说明 Bcl-w 蛋白在癫痫发作中有抗细胞凋亡的功能, 并且这种作用主要是通过抗细胞凋亡的 Bim 蛋白结合并整合到线粒体膜而使 Bim 失活和与 HIV Tat 蛋白转导结合抑制 GABA 的流通作用来减少癫痫发作后海马神经元损害。

2 促进细胞凋亡蛋白 (pro-apoptotic protein)

2.1 Bax

Zhang 等^[6]在锂-毛果芸香碱诱导的老鼠癫痫持续状态后的模型中显示海马 CA1 区 Bax 蛋白的表达显著增加及 Bcl-xl 蛋白减少, 同样的实验模型 Xu 等^[18]研究显示 Bax 蛋白的表达增加和 Bcl-2 蛋白减少, 说明 Bax 蛋白在癫痫发作后有促进神经元细胞凋亡的作用, 可能是与抗细胞凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xl 竞争实现。Mikati 等^[19]在红藻氨酸 (kainic acid, KA) 诱导的老鼠癫痫持续状态后显示开始出现 Bax 蛋白的表达增加, 随后出现 Caspase-3 的激活和 TUNEL 阳性, 说明 Bax 蛋白可能通过激活 Caspase-3 及 TUNEL 来促进细胞凋亡。Jiao 等^[20]的实验证明 Bax 对于 caspase-3 的激活是必要的, 并且 Bad-Bax-caspase-3 的串联能够抑制海马神经元的突触传递。

2.2 Bak

Bak 与 Bax 结合是 BH3-only 蛋白诱导细胞凋亡的起始^[21], Bak 促进神经元细胞凋亡必须与完整的 Bak 结合。Bak 蛋白仅仅表达在出生后的皮质及小脑的颗粒细胞, 并且是以 N-Bak 的形式在 BH3 区域, N-Bak 通过 Bcl-xl 的相互作用增加 Bax 蛋白

易位到线粒体从而提高 Bax 蛋白诱导海马等区域神经元死亡^[22]。Fannjiang 等^[23]的研究表明, Bak 促进或抑制神经元死亡取决于出生后发育的不同阶段, KA 诱导癫痫发作后, Bak 蛋白对海马 CA3 和 CA4 区域兴奋性毒性的神经元死亡的保护作用主要体现在老鼠的成熟阶段。

3 BH3-only 蛋白

3.1 Bid

Bid 是促进细胞凋亡的 BH3-only 蛋白之一^[24], Bid 蛋白经过蛋白水解的激活转移到线粒体来提升促进细胞凋亡的 Bcl-2 家族亚型 Bax/Bak 的活性, 从而导致细胞凋亡因子细胞色素 C^[25] 和 AIF (apoptosis-inducing factor) 的释放^[26]。完整 Bid 对于线粒体细胞凋亡途径的激活是必要的^[25], Engel 等^[24]的研究表明 Bid 的裂解是癫痫诱导神经元死亡的特征, 但是缺乏 Bid 对长时间的癫痫发作后神经元死亡和 AIF 易位没有显著地影响。

3.2 Bim

Murphy 等^[27]在 KA 诱导的老鼠癫痫持续状态发作的实验中表明 Bim 有促进细胞凋亡的作用, 癫痫发作后 Bim 蛋白导致海马 CA3 区域的 FoxO 转录因子、CHOP 和 C-JUNNH (2) 末端激酶类的激活通过转录和逆转录激活 Bim, 导致 Bim mRNA 和 Bim 的增加, 但是在新皮质 Bim 的表达是下降的, 而且还证明 Bim 蛋白对正常的神经元细胞没有促进细胞凋亡的作用。

3.3 Bad

促进细胞凋亡的 Bad 蛋白在 Ser112、Ser136 和 Ser155 等位点磷酸化后可以导致 Bad 蛋白促进细胞凋亡的功能丧失, 并且 Ser155 位点是 Bad 蛋白最重要的磷酸化位点^[28], Jeon 等^[29]的实验证明电惊厥疗法治疗 (electroconvulsive therapy, ECT) 在反复惊厥发作后可以导致 Bad 蛋白在 Ser155 位点的磷酸化增加, 并且能够增加额皮质的 Bad 与保护神经元死亡的 14-3-3 蛋白^[30] 结合而游离出抗细胞凋亡的 Bcl-xl 蛋白。Jiao 等^[20]的实验证明 Bad 是对于 caspase-3 的激活是必需的, 并且说明 Bad-Bax-caspase-3 的串联能够抑制海马区域神经元突触传递, 从而促进神经元的死亡。

3.4 Puma

Puma 是最有效的促进细胞凋亡的蛋白之一, 但是 Puma 蛋白在细胞凋亡中的调节机制目前还不清楚, Puma 能够抑制所有的抗细胞凋亡的

Bcl-2 家族蛋白,并且在线粒体中能够直接激活促进细胞凋亡的 Bax 蛋白^[31, 32]。Puma 在 KA 诱导的癫痫持续状态发作之后促进神经元死亡主要是通过 P⁵³ 作用,并且 Puma 缺乏老鼠海马萎缩显著减少^[33], Engel 等^[34]的研究表明 Puma 缺乏的老鼠在 KA 诱导的癫痫持续状态之后神经元死亡明显减少,并且与发作持续时间成正相关,说明 Puma 有促进癫痫诱导神经元死亡的作用。

4 癫痫发作后认知功能改变与 Bax、Bcl-xl、Bcl-2 和 caspase-3 等细胞凋亡蛋白的相关性

Zhang 等^[6]用水迷宫实验说明锂-毛果芸香碱诱导的老鼠癫痫持续状态之后可以导致空间学习和记忆功能等认知功能的损害,并且认知功能损害与细胞凋亡因子 Bax、Bcl-xl 和 caspase-3 等相关;类似的实验^[5]证明老鼠癫痫持续状态发作之后有空间学习能力等认知功能的下降,并且与细胞凋亡因子 Bcl-2、Bax 相关,而与 Bid 无关;两个实验说明癫痫发作后认知功能的改变可能与细胞凋亡蛋白相关联。

Kilany 等^[35]对 30 位儿童颞叶癫痫患者的研究发现患者血清中有抑制细胞凋亡的 Bcl-2 蛋白因子水平的升高,并且与对照组(健康儿童)相比有明显的总智力测量分数(IQ)降低,并且 Bcl-2 蛋白的升高与癫痫发作的持续时间、发作的严重程度及发作的频率呈负相关。目前的研究已经证明癫痫发作后存在有认知功能损害,主要表现在记忆力、执行功能、IQ、运动功能、命名等方面,并且主要与癫痫发作的持续时间、发作年龄和异常定量磁共振体积相关^[36]。虽然目前这方面的研究只涉及 Bcl-2、Bax、Bcl-xl、Bid 等几个细胞凋亡蛋白,但是相信随着更多的临床实验研究的开展和分子生物学技术的不断发展,会有更多的、更加敏感的 Bcl-2 基因家族蛋白的监测指标被检测出来,并应用于临床。

癫痫发作损害患者的认知功能,从而导致患者的生活质量及社会能力降低,造成严重的家庭和社会负担,虽然随着神经影像学技术的不断发展,癫痫发作后认知功能的研究也取得巨大的进展,但是对于我国这样的发展中国家仍将是一笔很大的投入,因此,寻找血清等容易监测而且价格相对低廉的外周组织中更加敏感的能够反应出癫痫发作后认知功能损害的相关分子学检测指标,对癫痫发作后认知功能的改善及癫痫的治疗将会有很重要的

临床意义。

参 考 文 献

- [1] 贾建平. 神经病学. 第六版, 北京: 人民卫生出版社, 2009, 292.
- [2] Fuerst D, Shah J, Shah A, et al. Hippocampal sclerosis is a progressive disorder: a longitudinal volumetric MRI study. *Ann Neurol*, 2003, 53(3): 413-416.
- [3] Boon P, Raedt R, de Herdt V, et al. Electrical stimulation for the treatment of Epilepsy. *Neurotherapeutics*, 2009, 6(2): 218-227.
- [4] Rossetti F, de Araujo Furtado M, Pak T, et al. Combined diazepam and HDAC inhibitor treatment protects against seizures and neuronal damage caused by somane exposure. *Neurotoxicology*, 2012, 33(3): 500-511.
- [5] Jun Y, Jiang TX, Yuan GH, et al. Erythropoietin pre-treatment prevents cognitive impairments following status epilepticus in rats. *Brain Res*, 2009, 1282: 57-66.
- [6] Zhang Y, Wang W, Sun Z, et al. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Treatment Prevents Cognitive Impairment Following Status Epilepticus in Rats. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(4): 572-579.
- [7] Liou AKF, Clark RS, Henshall DC, et al. To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog Neurobiol*, 2003, 69(2): 103-142.
- [8] Henshall DC, Simon RP. Epilepsy and apoptosis pathways. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2005, 25(12): 1557-1572.
- [9] Murphy B, Dunleavy M, Shinoda S, et al. Bcl-w protects hippocampus during experimental status epilepticus. *Am J Pathol*, 2007, 171(4): 1258-1268.
- [10] Chipuk JE, Green DR. How do BCL-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol*, 2008, 18(4): 157-164.
- [11] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis. *Methods Mol Biol*, 2008, 414: 13-21.
- [12] Díaz-Prieto N, Herrera-Peco I, de Diego AM, et al. Bcl2 mitigates Ca²⁺ entry and mitochondrial Ca²⁺ overload through downregulation of L-type Ca²⁺ channels in PC12 cells. *Cell Calcium*, 2008, 44(4): 339-352.
- [13] Berliocchi L, Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and death programmes in neurons. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2005, 360(1464): 2255-2258.
- [14] Leber B, Lin J, Andrews DW. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. *Oncogene*, 2010, 29(38): 5221-5230.

- [15] Trougakos IP, Djeu JY, Gonos ES, et al. Advances and challenges in basic and translational research on clusterin. *Cancer Res*, 2009, 69(2): 403-406.
- [16] Kim YS, Choi MY, Ryu JH, et al. Clusterin interaction with Bcl-xL is associated with seizure-induced neuronal death. *Epilepsy Res*, 2012, 99(3): 240-251.
- [17] Upton JP, Valentijn AJ, Zhang L, et al. The N-terminal conformation of Bax regulates cell commitment to apoptosis. *Cell Death Differ*, 2007, 14(5): 932-942.
- [18] Xu J, Wang S, Lin Y, et al. Ghrelin protects against cell death of hippocampal neurons in pilocarpine-induced seizures in rats. *Neurosci Lett*, 2009, 453(1): 58-61.
- [19] Mikati MA, Zeinieh M, Habib RA, et al. Changes in sphingomyelinases, ceramide, Bax, Bcl(2), and caspase-3 during and after experimental status epilepticus. *Epilepsy Res*, 2008, 81(2-3): 161-166.
- [20] Jiao S, Li Z. Nonapoptotic Function of BAD and BAX in Long-Term Depression of Synaptic Transmission. *Neuron*, 2011, 70(4): 758-772.
- [21] Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science*, 2007, 315(5813): 856-859.
- [22] Uo T, Kinoshita Y, Morrison RS, et al. Neurons exclusively express N-Bak, a BH3 domain-only Bak isoform that promotes neuronal apoptosis. *J Biol Chem*, 2005, 280(10): 9065-9073.
- [23] Fannjiang Y, Kim CH, Haganir RL, et al. BAK alters neuronal excitability and can switch from anti-to pro-death function during postnatal development. *Dev Cell*, 2003, 4(4): 575-585.
- [24] Engel T, Caballero-Caballero A, Schindler CK, et al. BH3-only protein Bid is dispensable for seizure-induced neuronal death and the associated nuclear accumulation of apoptosis-inducing factor. *J Neurochem*, 2010, 115(1): 92-101.
- [25] König HG, Rehm M, Gudorf D, et al. Full length Bid is sufficient to induce apoptosis of cultured rat hippocampal neurons. *BMC Cell Biol*, 2007, 8: 7.
- [26] Landshamer S, Hoehn M, Barth N, et al. Bid-induced release of AIF from mitochondria causes immediate neuronal cell death. *Cell Death Differ*, 2008, 15(10): 1553-1563.
- [27] Murphy BM, Engel T, Paucard A, et al. Contrasting patterns of Bim induction and neuroprotection in Bim-deficient mice between hippocampus and neocortex following status epilepticus. *Cell Death Differ*, 2010, 17(3): 459-468.
- [28] Datta SR, Katsov A, Hu L, et al. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell*, 2000, 6(1): 41-51.
- [29] Jeon WJ, Kim SH, Seo MS, et al. Repeated electroconvulsive seizure induces c-Myc down-regulation and Bad inactivation in the rat frontal cortex. *Exp Mol Med*, 2008, 40(4): 435-444.
- [30] Kim YS, Choi MY, Kim YH, et al. Protein kinase Cdelta is associated with 14-3-3 phosphorylation in seizure-induced neuronal death. *Epilepsy Res*, 2010, 92(1): 30-40.
- [31] Steckley D, Karajgikar M, Dale LB, et al. Puma is a dominant regulator of oxidative stress induced Bax activation and neuronal apoptosis. *J Neurosci*, 2007, 27(47): 12989-12999.
- [32] Gallenne T, Gautier F, Oliver L, et al. Bax activation by the BH3-only protein Puma promotes cell dependence on anti-apoptotic Bcl-2 family members. *J Cell Biol*, 2009, 185(2): 279-290.
- [33] Engel T, Murphy BM, Hatazaki S, et al. Reduced hippocampal damage and epileptic seizures after status epilepticus in mice lacking proapoptotic Puma. *FASEB J*, 2010, 24(3): 853-861.
- [34] Engel T, Hatazaki S, Tanaka K, et al. Deletion of puma protects hippocampal neurons in a model of severe status epilepticus. *Neuroscience*, 2010, 168(2): 443-450.
- [35] Kilany A, Raouf ER, Gaber AA, et al. Elevated serum Bcl-2 in children with temporal lobe epilepsy. *Seizure*, 2012, 21(4): 250-253.
- [36] Hermann BP, Seidenberg M, Dow C, et al. Cognitive prognosis in chronic temporal lobe epilepsy. *Ann Neural*, 2006, 60(1): 80-87.