

- of a neutralizing monoclonal antibody. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67(5): 1001-1009.
- [24] Ishiguro M, Kawasaki K, Suzuki Y, et al. A Rho kinase (ROCK) inhibitor, fasudil, prevents matrix metalloproteinase-9-related hemorrhagic transformation in mice treated with tissue plasminogen activator. *Neuroscience*, 2012, 220: 302-312.
- [25] Liebetrau M, Burggraf D, Wunderlich N, et al. ACE inhibition reduces activity of the plasminogen/plasmin and MMP systems in the brain of spontaneous hypertensive stroke-prone rats. *Neurosci. Lett*, 2005, 376(3): 205-209.
- [26] Yamamoto D, Takai S, Akimoto T, et al. Matrix metalloproteinase-2 inhibition by temocapril and its important role in peritoneal transport. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(10): 864-868.
- [27] Kim HY, Singhal AB, Lo EH. Normobaric hyperoxia extends the reperfusion window in focal cerebral ischemia. *Ann Neurol*, 2005, 57(4): 571-575.
- [28] Jang JW, Lee JK, Lee MC, et al. Melatonin reduced the elevated matrix metalloproteinase-9 level in a rat photothrombotic stroke model. *J Neurol Sci*, 2012, 323(1-2): 221-227.
- [29] Ishiguro M, Mishi K, Fujiwara Y, et al. Phosphodiesterase-III inhibitor prevents hemorrhagic transformation induced by focal cerebral ischemia in mice treated with tPA. *PLoS One*, 2010, 5(12): e15178.
- [30] Lee JH, Lee SR. The effect of baicalein on hippocampal neuronal damage and metalloproteinase activity following transient global cerebral ischaemia. *Phytother Res*, 2012, 26(11): 1614-1619.
- [31] Ni C, Zeng N, Xu F, et al. Effects of aromatic resuscitation drugs on blood brain barrier in cerebral ischemia-reperfusion injury model rats. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2011, 36(18): 2562-2566.
- [32] van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res*, 2008, 78(2): 203-212.
- [33] Lindsey ML, Escobar GP, Dobrucki LW, et al. Matrix metalloproteinase-9 gene deletion facilitates angiogenesis after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(1): H232-H239.
- [34] Zhao BQ, Wang S, Kim HY, et al. Role of matrix metalloproteinases in delayed cortical responses after stroke. *Nat Med*, 2006, 12(4): 441-445.
- [35] Nagel S, Sandy JD, Meyding-Lamade U, et al. Focal cerebral ischemia induces changes in both MMP-13 and aggrecan around individual neurons. *Brain Res*, 2005, 1056(1): 43-50.
- [36] Sood RR, Taheri S, Candelario-Jalil E, et al. Early beneficial effect of matrix metalloproteinase inhibition on blood-brain barrier permeability as measured by magnetic resonance imaging countered by impaired long-term recovery after stroke in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(2): 431-438.

细胞凋亡线粒体途径相关蛋白 Bad 和 Bcl-xL 参与缺血性脑卒中的研究进展

杨文 综述 朱榆红 审校

昆明医科大学第二附属医院神经内科, 云南省昆明市 650101

摘要:近年研究发现,Bcl-2 家族的促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白通过竞争性相互作用来共同调控细胞凋亡。Bad 是 Bcl-2 家族中和 Bcl-xL 相关的促凋亡基因。Bad 和 Bcl-xL 在多种细胞中表达,两者可通过细胞信号转导通路参与细胞凋亡的全过程。其在脑缺血损伤方面的研究受到重视。

关键词:脑缺血;细胞凋亡;Bad;Bcl-xL;细胞信号转导;神经细胞;损伤机制

脑卒中(stroke)是一组突发性的脑血液循环障碍,并以局灶性神经功能缺失为共同特征的疾病,

有较高的发病率、致残率和死亡率。随着医学发展,卒中后存活率显著增高,但幸存者 75% 以上均

基金资助:国家自然科学基金(81060102);2011 云南省教育厅高校创新团队基金项目支持;云南省卫生厅内设机构资助项目(2011WS0083)
收稿日期:2012-11-20;**修回日期:**2013-01-18

作者简介:杨文(1986-),女,在读硕士研究生,主要从事脑血管病的研究。

通讯作者:朱榆红,女,教授,主要从事脑血管疾病的研究。E-mail: yuhong_lilin@yahoo.com.cn.

留有不同程度的后遗症^[1],严重影响了患者的生存质量,并给家庭和社会带来了沉重的负担。

脑卒中分为缺血性卒中与出血性卒中两大类,其中急性缺血性脑卒中(脑梗死)是脑卒中最常见的主要类型,占全部脑卒中的 60%~80%^[2]。脑缺血可导致神经细胞的坏死和凋亡。凋亡(apoptosis)是细胞在接受外界信号刺激后启动的,受自身基因调控的主动的、程序性细胞死亡过程。随着对脑缺血病理生理学机制研究的不断深入,细胞凋亡参与缺血性卒中的作用受到越来越多的重视。研究发现,缺血性脑损伤中神经细胞凋亡主要是由天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(Caspase)参与的级联反应^[3],Caspase 的激活存在着两条途径:死亡受体介导途径和线粒体途径。其中,线粒体途径在细胞凋亡中占有极其重要的地位^[4],现将线粒体途径相关蛋白 Bad、Bcl-xL 参与缺血性神经细胞凋亡的进展介绍如下。

1 Bad 蛋白

1.1 Bad 蛋白的生物学特性

Bcl-2 家族在细胞凋亡中起重要作用,它们共同构成一个非常复杂的相互作用网络,由抗凋亡成员和促凋亡成员组成,共同调控细胞凋亡。Bad 是 Bcl-2 家族的促凋亡成员。由 Yang 等^[5]在 1995 年发现。其基因编码一含 204 个氨基酸,分子量为 22.1 kDa 的蛋白质。Bad 蛋白只含有 BH3 结构域,此结构域为 Bad 与 Bcl-2 家族蛋白结合所必需的重要功能区。Bad 的促凋亡作用是依赖于与 Bcl-2、Bcl-xL 的结合而调控细胞凋亡的。

1.2 Bad 参与细胞凋亡的机制

1.2.1 Bad 的磷酸化与去磷酸化 Bad 蛋白 BH3 结构上的位点(鼠类为 Ser155、Ser112 和 Ser136;人类为 Ser75、Ser99 和 Ser118)磷酸化干扰了其 Bcl-2 和 Bcl-xL 的结合而促进细胞得以存活^[6]。14-3-3 蛋白在调控细胞凋亡中起重要作用,Bad 蛋白的相关位点(鼠类为 Ser155 和 Ser118;人类为 Ser75、Ser99)在相关激酶的作用下磷酸化,使 Bad 与 14-3-3 蛋白结合封存于细胞质中而不能与 Bcl-2 和 Bcl-xL 结合,从而抑制细胞凋亡^[7]。现研究发现,在体外,至少有四种激酶(PKA、Akt/PKB、PKC、Raf-1)可使 Bad 磷酸化,其中,RAF 激酶对人类 Bad 蛋白的磷酸化起重要作用,C-RAF 能直接参与抑制 Bad 的促凋亡功能,建立信号转导和细胞凋亡调控之间的首要联系^[8]。

1.2.2 Bad 的结构变化 Hinds 等^[9]在 2007 年发

现,Bad 蛋白在缺少其黏附搭档的情况下,本质上是一个没有结构的蛋白质。Hekman^[8]发现人类 Bad 蛋白与细胞膜有非常高的亲和力,并确定这种亲和力是由两个都位于人类 Bad 蛋白 C 末端的脂质黏附结构(LBD1 和 LBD2)与不同的黏附部位决定的,如 Bad 蛋白的 BH3 结构添加 25-residue 肽显著增加了 Bcl-xL 与脂质黏附结构的结合,这些研究结果凸显出了关于 Bad 在线粒体定位和与 Bcl-xL 结合的重要角色。

1.2.3 Bad 与 Bax Bax 是一种 Bcl-2 家族的前凋亡蛋白,在哺乳动物细胞,Bcl-2/Bax 和 Bcl-xL/Bax 异二聚体存在于线粒体外膜,可维持线粒体外膜完整性,提高细胞的存活率。Bax 异二聚体和同二聚体的含量决定细胞是否发生凋亡,如果异二聚体的含量大于 >50%,则细胞就能免受凋亡^[6],反之细胞则走向凋亡。去磷酸化的 Bad 通过与 Bax 竞争,取代 Bax 的位置,使 Bax 释放形成同二聚体促进细胞凋亡。Bax 可以构成跨线粒体外膜的孔,并导致膜电位的降低和细胞色素 C(Cyt C)及凋亡诱导因子(AIF)的外流。细胞色素 C 与 Apaf-1 和 ATP 及 pro-Caspase-9 形成复合物(凋亡体),并导致 Caspase-9 的激活,诱导细胞凋亡。

1.3 Bad 与缺血性脑损伤

Cho 等^[10]通过建立大鼠永久性脑缺血模型检测缺血 24 h 后磷酸化 Bad 的表达情况,结果发现磷酸化的 Bad 表达水平较假手术组明显降低,银杏提取物(神经保护剂)治疗组磷酸化的 Bad 表达较其表达水平明显升高,脑梗死面积明显缩小。

张雷等^[11]通过建立大鼠局灶性脑缺血再灌注后模型测定大鼠脑缺血再灌注不同时间磷酸化 Bad 的平均光密度值,结果发现磷酸化的 Bad 蛋白在缺血再灌注 2 h 明显升高,于 4 h 达到峰值,随灌注时间延长表达逐渐减少并低于假手术组。

邵雪非等^[12]通过制备大鼠重度脑弥漫性轴索损伤模型,探讨镁离子对大鼠脑弥漫性轴索损伤后神经元的保护作用机制中发现大鼠脑弥漫性轴索损伤后,海马区神经元存在有迟发性细胞凋亡现象,硫酸镁可通过抑制 Bax 蛋白,减少神经细胞凋亡,对促进神经细胞修复和功能重塑有益。

以上实验结果表明 Bad 参与脑缺血的机制可能是:脑缺血早期可诱导胞质中 Bad 的磷酸化水平升高,可能通过与 14-3-3 蛋白结合形成稳定复合物存在于细胞质中而不能与 Bcl-2、Bcl-xL 结合,

使 Bax 不能形成同二聚体,抑制 Bax 表达,维持线粒体正常膜电势和 ATP,内质网等 Ca^{2+} 库的正常功能,从而使神经细胞免受凋亡,减轻其损伤程度。磷酸化 Bad 于再灌注 24 h 明显低表达,凋亡发生高峰期 24 ~ 48 h 左右磷酸化 Bad 逐渐减少,表明脑缺血后期随着缺血时间延长,接受一系列凋亡信号刺激后,可诱导 Bad 去磷酸化,去磷酸化的游离 Bad 通过易位和一系列细胞活动导致促凋亡的发生,从而使神经细胞凋亡,促进缺血性损伤和功能障碍。

2 Bcl-xL 蛋白

2.1 Bcl-xL 的生物学特性

Bcl-xL 是由 Bcl-x 基因拷贝而来, Bcl-x 基因能够拷贝两种不同的蛋白,一种是由 241 个氨基酸组成、与 Bcl-2 有 47% 同源,具有抑制细胞凋亡功能的长链 Bcl-xL,另一种由 178 个氨基酸组成、具有促进细胞凋亡功能的短链 Bcl-xs。Bcl-xL 属于 Bcl-2 家族,与其他抗凋亡成员一样,包含 4 个 Bcl-2 同源结构域 BH 和 1 个跨膜结构域。主要定位于线粒体外膜、内质网膜和核膜等^[13]。

大量研究表明, Bcl-xL 参与了多个系统肿瘤的发生发展过程,起到抗凋亡作用。王政华等^[14]通过研究发现 Bcl-xL 在前列腺癌中存在着高表达,并通过抑制细胞凋亡参与前列腺癌的发生、发展, Bcl-xL 基因特异性 RNA 干扰可以显著抑制前列腺癌 PC-3 细胞的体外增殖并诱导细胞凋亡。黄志宏等^[16]通过研究发现丙戊酸钠通过诱导细胞凋亡,使细胞抗凋亡蛋白 Bcl-xL 表达减少,显著抑制肺癌 SPC-A1 细胞的增殖。另外, Bcl-xL 与炎症的发生发展也有密切关系,王大平等^[16]通过检测骨关节炎患者关节软骨细胞中 Bcl-xL 表达和软骨细胞凋亡情况,发现 Bcl-xL 的表达程度增高,软骨细胞凋亡程度与 Bcl-xL 蛋白的表达呈负相关,说明 Bcl-xL 在骨关节炎软骨细胞中表达可保护软骨细胞免遭凋亡。

2.2 Bcl-xL 参与细胞凋亡的机制

Bcl-xL 能抑制线粒体膜通透性运转孔 (MMP) 的开放,阻止细胞色素 C 和凋亡诱导因子的释放,也能结合和灭活 Apaf-1,抑制 Apaf-1/caspase-9 复合物的形成,又可与 Bax 形成异二聚体,抑制 Bax 的促凋亡作用,最终抑制细胞凋亡。Bax 在组织中广泛表达,在哺乳动物中 Bcl-xL 必须与 Bax 结合,形成异源二聚体而抑制细胞凋亡,当 Bcl-xL 与 Bax 的结合点断裂时,对细胞的保护作用则消失^[18]。另有研究发现, Bcl-xL 可以使细胞在缺乏生长因

子的条件下抵抗凋亡的发生,其机理可能是抑制内质网 Ca^{2+} 的释放、调节核内外运输及与其他癌基因相互作用、阻止促凋亡基因信号传递或阻止这些诱导基因产物发挥作用、抑制自由基等^[17]。

2.3 Bcl-xL 与缺血性脑损伤

作为 Bcl-2 家族的一员, Bcl-xL 在脑缺血中起着重要的神经元保护作用。

Kim 等^[18]发现,应用 Bcl-xL 基因与脂质体共同转染神经干细胞发现, Bcl-xL 对于脂质体毒性引起的神经干细胞的凋亡有很好的保护作用。Wissner 等^[19]通过构建 Bcl-xL 和 Bcl-2 两种转基因小鼠,并对两种小鼠的大脑中动脉永久性阻塞,用 MRI 测其梗死面积,与非转基因小鼠进行比较, Bcl-xL 转基因小鼠的脑梗死面积缩小了 21%,而 Bcl-2 转基因小鼠的并没有缩小。王芙蓉^[20]等通过建立 Bcl-xL 过表达转基因小鼠模型,将该模型小鼠与同种系野生型小鼠同时行线栓永久性阻塞大脑中动脉,结果发现缺血 24 h 转基因小鼠的神经功能评分低于野生型小鼠。在缺血后不同时间点,转基因小鼠的梗死体积小于并且皮质缺血区内的凋亡细胞数明显少于野生型小鼠,且保护作用发生时间早,持续时间较长。梗死前后转基因小鼠的皮质细胞 Bcl-xL 的表达量均明显高于野生型小鼠。缺血后再灌注后不同时间点,转基因小鼠缺血局部细胞色素 C 的表达及 caspase-3 的活化明显低于野生型小鼠。Liste 等^[21]研究发现, Bcl-xL 能调控人类神经干细胞向神经元分化。Jonas 等^[22]发现, Bcl-xL 可通过不依赖于 Ca^{2+} 通道的方式促进突触间信号的传递,同时,还可以增加神经递质的再摄取。

以上结果均表明, Bcl-xL 在缺血引起的神经元损伤中具有重要的保护作用。Bcl-xL 表达抑制了细胞色素 C 的释放及 caspase-3 等相关促凋亡因子的活化,抑制神经细胞凋亡并减轻神经功能受损程度而实现脑保护作用。在缺血灌注早期, Bcl-xL 基因可被大量激活,与 Bcl-2 基因协同抑制细胞凋亡发生,调控神经干细胞向神经元分化,但能否促进神经干细胞进一步分化为功能性神经元仍需进一步研究, Bcl-xL 通过促进突触间的信号传递,增加神经递质的再摄取,从而减轻脑缺血神经元的损伤程度。

3 Bad 蛋白与 Bcl-xL 蛋白的相互作用

Bcl-xL 通过 BH1、BH2、BH3 结构域空间上邻近形成的疏水口袋与 Bcl-2 家族成员相互作用, BH3 结构域是二聚体形成中的配体, BH3 的疏水

区插入 BH1、BH2、BH3 形成的疏水口袋,介导分子间的二聚化发挥其抑制凋亡的生物学功能。Bcl-xL/Bax 异二聚体存在于线粒体外膜,BH3-only 家族中的成员 Bad 发生去磷酸化时,以其自身的 BH3 结构域与 Bcl-xL 结合,使得原来与 Bcl-xL 相结合的 Bax 释放出来,Bax 形成同二聚体,发挥其促凋亡作用,通过引起线粒体通透性转变孔道的开放和增加线粒体膜的通透性引起细胞色素 C 等一系列物质的释放导致细胞的凋亡^[23]。

4 展望

目前,基因治疗越来越受到人们的广泛关注。动物实验中基因治疗已经证实有很好的效果。若能够通过基因治疗,将 Bcl-xL 基因转移到脑缺血患者体内,通过提高 Bcl-xL 蛋白在体内的表达,通过药物抑制 Bad 蛋白的去磷酸化,发挥其抑制神经细胞凋亡的功能,从而达到治疗效果,在基因水平上实现治疗目的,这也可能构成一种脑缺血损伤及其他慢性损伤新的防治策略,为脑缺血的治疗及其预防提供了新的思路。另外,在肿瘤疾病的诊断治疗中,可以通过检测 Bcl-xL 来评估癌症的发生、发展及判断转移趋势和估计预后,通过各种途径抑制 Bcl-xL 的表达,可为恶性肿瘤的治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] 韩秀兰,王楚怀. 脑卒中后家庭康复的若干问题. 中国康复医学杂志, 2010, 25(7): 708-711.
- [2] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010. 中华神经科杂志, 2010, 43(2): 146-153.
- [3] Love S. Apoptosis and brain ischaemia. Prog In NeuroPsychopharm Bio Psych, 2003, 27: 267-282.
- [4] Sims NR, Anderson MF. Mitochondrial contributions to tissue damage in stroke. Neurochem Int, 2002, 40: 511-526.
- [5] Yang E, Zha J, Jockel J, et al. Bad, a heterodimeric partner for Bcl-xL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. Cell, 1995, 80(2): 285-291.
- [6] 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.
- [7] Hekman M, Albert S, Galmiche A, et al. Reversible membrane interaction of BAD requires two C-terminal lipid binding domains in conjunction with 14-3-3 protein binding. J Biol Chem, 2006, 281(25): 17321-17336.
- [8] Rapp UR, Rennefahrt U, Troppmair J. Bcl-2 proteins: master switches at the intersection of death signaling and the survival control by Raf kinases. Biochim Biophys Acta, 2004,

1644(2-3): 149-158.

- [9] Hinds MG, Smits C, Fredericks-Short R, et al. Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to pro-survival Bcl-2 targets. Cell Death Differ, 2007, 14(1): 128-136.
- [10] Cho JH, Sung JH, Cho EH, et al. Ginkgo biloba Extract (EGb 761) Prevents Ischemic Brain Injury by Activation of the Akt Signaling Pathway. Am J Chinese Med, 2009, 37(3): 547-555.
- [11] 张雷,潘蓓,刘瑞珍,等. 依达拉奉对大鼠局灶性脑缺血再灌注后 p-Bad 的作用. 临床医药实践, 2010, 19(11): 837-839.
- [12] 邵雪非,陶进,许安定,等. 硫酸镁对大鼠脑弥漫性轴索损伤海马区 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达影响的研究. 国际神经病学神经外科学杂志, 2011, 5(6): 426-431.
- [13] Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. Clin Cancer Res, 2009, 15(4): 1126-1132.
- [14] 王政华,牟平,刘晓梅,等. 靶向 Bcl-xL 基因 siRNA 在前列腺癌细胞增殖和凋亡中的作用. 肿瘤防治研究, 2011, 38(5): 509-511.
- [15] 黄志宏,陈庆,马刘红,等. 丙戊酸钠对人肺癌 SPC-A1 细胞的增殖抑制作用及其机制. 南方医科大学学报, 2012, 32(5): 606-608.
- [16] 王大平,欧阳侃一,熊建义,等. Caspase-3、bcl-xl 在骨关节炎软骨细胞中的表达及意义. 中国医师杂志, 2007, 9(2): 258-259.
- [17] Yin W, Cao GD, Michael J, et al. TAT-mediate delivery of bcl-xl protein is neuroprotective against neonatal hypoxic-ischemic brain injury via inhibition of caspases and AFI. Neurobiol Dis, 2006, 21: 358-371.
- [18] Kim YC, Shim JW, Oh YJ, et al. Cz-transfection with cDNA encoding the Bcl family of an tiapoptotic proteins improves the efficiency of transfection in primary fetal neural stem cells. Neurosci Met Iods, 2002, 117(2): 153-158.
- [19] Wiessner C, Allegrini PR, Rupalla K, et al. Neuron-specific transgene expression of Bcl-xl but not Bcl-2 genes reduced lesion size after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. Neurosci Lett, 1999, 268(3): 119-122.
- [20] 王芙蓉,姜永生,刘艳,等. Bcl-xl 基因过表达在脑梗死中的保护作用及细胞色素 C 与 caspase-3 的表达研究. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(9): 917-920.
- [21] Liste I, Garela-Garcia E, Bueno C, et al. Bcl-XL modulates the differentiation of immortalized human neural stem cells. Cell Death Differentiat, 2007, 14: 1880-1892.
- [22] Jonas EA. BCL-xL regulates synaptic plasticity. Mol Interv, 2006, 6: 208-222.
- [23] Tsujimoto Y, Shimizu S. VDAC regulation by the Bcl-2 family of proteins. Cell Death Differ, 2000, 7: 1174-1181.