

线粒体及凋亡相关信号途径在脑缺血性损伤细胞死亡过程中的重要角色

代海滨, 苗晓蕾, 嵇 晴, 段满林(解放军第二军医大学南京临床医学院(南京军区南京总医院)麻醉科, 江苏省南京市 210002)

文章亮点:

- 1 此问题的已知信息: 线粒体是为生命活动提供能量的主要场所, 线粒体可以产生大量活性氧, 活性氧能造成多种大分子的损伤, 例如脂质过氧化和蛋白质及核酸的氧化损伤, 从而导致细胞的死亡。
- 2 文章增加的新信息: 线粒体产生的活性氧, 除造成多种大分子的损伤外, 还能作为细胞内的信号分子转导其他一系列信号途径。并且, 线粒体还能通过储存 Ca^{2+} , 贮存及释放细胞色素 C 和凋亡诱导因子等促凋亡因子, 及开放通透性转换孔等方式调控细胞的凋亡。
- 3 临床应用的意义: 脑缺血等病理情况下, 线粒体可产生大量的活性氧, 激活多种信号通路, 及参与凋亡的内在途径调控, 在细胞死亡中起重要作用。将来此方面的进一步深入研究可能为临床上治疗脑卒中提供新的策略。

关键词:

组织构建; 组织工程; 线粒体; 凋亡; 脑缺血; 活性氧; 再灌注; 超氧化物歧化酶; 一氧化氮合酶; Bcl-2 蛋白家族; 国家自然科学基金

主题词:

组织工程; 线粒体; 细胞凋亡; 脑缺血

基金资助:

国家自然科学基金(81102514)

摘要

背景: 脑缺血后神经细胞病理变化的机制仍未完全阐明, 现有的研究已经从细胞器水平, 如线粒体等, 深入研究其病理变化的机制。

目的: 总结和讨论线粒体及凋亡相关信号途径在脑缺血性损伤中的作用。

方法: 应用计算机检索 CNKI 和 PubMed 外文数据库, 以“线粒体, 凋亡, 脑缺血, 活性氧, 再灌注, 超氧化物歧化酶, 一氧化氮合酶, Bcl-2 蛋白家族, 综述”为中文检索词, 以“cerebral ischemia, mitochondrion, apoptosis, reactive oxygen species, reperfusion, superoxide dismutase, nitric oxide synthase, Bcl-2 protein family, review”为英文检索词, 按纳入和排除标准对文献进行筛选, 排除与研究目的无关和内容重复者, 保留 50 篇文献做进一步分析。

结果与结论: 现有的研究表明, 线粒体可通过产生大量活性氧, 进而激活多种信号途径, 及调控线粒体相关凋亡途径在脑缺血性损伤中起重要的作用。活性氧在脑缺血导致的细胞死亡中有重要作用, 不仅引起生物大分子损伤, 而且可引起凋亡信号转导。线粒体产生大量的活性氧, 从而激活多种信号通路及参与凋亡的内在途径调控, 在细胞死亡中起重要作用。

代海滨, 苗晓蕾, 嵇晴, 段满林. 线粒体及凋亡相关信号途径在脑缺血性损伤细胞死亡过程中的重要角色[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(15):2425-2430.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.15.025

Neuronal mitochondria and apoptosis signaling pathways play an important role in cell death during transient cerebral ischemia

Dai Hai-bin, Miao Xiao-lei, Ji Qing, Duan Man-lin (¹Department of Anesthesiology, Nanjing Clinical Hospital of Second Military Medical University (Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region), Nanjing 210002, Jiangsu Province, China)

Abstract

BACKGROUND: Although the mechanism why neuronal cells will die after transient cerebral ischemia has not been completely elucidated, many researches nowadays have investigated the pathological mechanism in the level of cellular organs, such as mitochondria.

OBJECTIVE: To summarize and discuss the functions of neuronal mitochondria and apoptosis signaling pathways in transient cerebral ischemia.

METHODS: A computer-based online retrieval was performed to search papers in CNKI and PubMed databases using the key words of “cerebral ischemia, mitochondrion, apoptosis, reactive oxygen species, reperfusion, superoxide dismutase, nitric oxide synthase, Bcl-2 protein family, review” in Chinese and English, respectively. Papers published recently or in the prestigious journals were selected in the same field. After excluding objective-independent papers and repeated studies, 50 papers were included for further analysis.

RESULTS AND CONCLUSION: Recently mitochondria are found to play an important role after transient

代海滨, 男, 1977 年生, 解放军第二军医大学在读博士, 主要从事危重患者麻醉和器官保护的研究。

通讯作者: 嵇晴, 博士, 主任医师, 解放军第二军医大学南京临床医学院(南京军区南京总医院)麻醉科, 江苏省南京市 210002

中图分类号:R318

文献标识码:A

文章编号:2095-4344

(2015)15-02425-06

稿件接受: 2015-03-13

http://www.crter.org

Dai Hai-bin, Studying for doctorate, Department of Anesthesiology, Nanjing Clinical Hospital of Second Military Medical University (Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region), Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Corresponding author: Ji Qing, M.D., Chief physician, Department of Anesthesiology, Nanjing Clinical Hospital of Second Military Medical University (Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region), Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Accepted: 2015-03-13

cerebral ischemia by producing a lot of reactive oxygen species to activate many kinds of signaling pathways and regulate mitochondria-mediated apoptosis. Reactive oxygen cannot only induce biomacromolecule injury but also induce apoptosis signal transduction. Deeply investigation is needed on the pathological mechanism after transient cerebral ischemia.

Subject headings: Tissue Engineering; Mitochondria; Apoptosis; Brain Ischemia

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81102514

Dai HB, Miao XL, Ji Q, Duan ML. Neuronal mitochondria and apoptosis signaling pathways play an important role in cell death during transient cerebral ischemia. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(15):2425-2430.

0 引言 Introduction

细胞的线粒体是为生命活动提供能量的主要场所, 主要生理功能为通过电子传递链进行氧化磷酸化产生ATP。线粒体电子传递链是由五种多亚基的酶复合体组成(即复合体I-V), 活性氧主要在呼吸过程中由复合体I与III产生^[1]。因此, 氧代谢也是组织和细胞损伤的潜在威胁之一。既往的研究表明, 活性氧在脑缺血、脑外伤和神经退行性疾病等中枢神经系统功能紊乱中有重要病理作用。活性氧能造成多种大分子的损伤, 例如脂质过氧化、蛋白质及核酸的氧化损伤, 从而导致细胞的死亡^[2]。另外, 活性氧能作为细胞内的信号分子转导其他一系列信号途径, 如细胞死亡的相关途径^[3], 与活性氮在内皮细胞及神经元中的作用很相似^[4-5]。除了能够产生过量活性氧进而激活其他多种信号途径外, 线粒体还能够通过储存 Ca^{2+} , 贮存及释放细胞色素C、凋亡诱导因子等促凋亡因子及开放通透性转换孔等方式调控细胞的凋亡^[6]。现有的研究已经从细胞器水平, 如线粒体等, 深入研究其病理变化的机制。文章主要探讨在脑缺血损伤模型中线粒体活性氧产生及相关细胞凋亡途径的作用。

1 资料和方法 Data and methods

1.1 资料来源 第一作者于2006年1月至2012年12月进行计算机检索, 检索数据库: PubMed数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>)和中国期刊全文数据库(<http://www.cnki.net>)。英文检索词“cerebral ischemia, mitochondrion, apoptosis, reactive oxygen species, reperfusion, superoxide dismutase, nitric oxide synthase, Bcl-2 protein family, review”; 中文检索词“线粒体, 凋亡, 脑缺血, 活性氧, 再灌注, 超氧化物歧化酶, 一氧化氮合酶, Bcl-2蛋白家族, 综述”。

1.2 纳入和排除标准

纳入标准: ①具有原创性, 论点论据与线粒体和脑缺血性损伤相关的进展类文章。②观点明确, 分析凋亡信号途径和脑缺血性损伤类文章。③文献主题内容与线粒体和凋亡信号途径联系紧密的文章。

排除标准: 重复性研究, 与本文内容无关的研究。

1.3 文献质量评估 共检索到156篇文献, 文章内容涉及线粒体及凋亡相关信号途径在脑缺血性损伤中的作

用研究进展。

2 结果 Results

2.1 纳入资料基本概况 按入选标准筛选, 并排除研究目的与文章无关及内容重复的研究, 最后保留其中50篇归纳总结^[1-50]。

2.2 纳入资料的研究结果特征

2.2.1 线粒体活性氧的产生和作用

生理条件下活性氧产生和清除: 在生理情况下, 线粒体在呼吸过程中可产生超氧阴离子(O_2^-)和过氧化氢(H_2O_2)^[1], 因而, 氧代谢过程既是细胞生存所必须的, 也是引起细胞损伤的潜在因素。促氧化的酶, 例如一氧化氮合酶、环氧合酶、黄嘌呤脱氢酶、黄嘌呤氧化酶、NADPH氧化酶、髓过氧化物酶及单胺氧化酶等都可产生活性氧, 其包括 O_2^- , H_2O_2 , 一氧化氮和脂质过氧化物等。与此同时, 细胞内也存在活性氧清除系统, 例如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶等。超氧化物歧化酶分为3种亚型: $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ 超氧化物歧化酶(超氧化物歧化酶1)、 Mn^{2+} 超氧化物歧化酶(超氧化物歧化酶2)和细胞外超氧化物歧化酶(超氧化物歧化酶3)。这3种亚型, 均能使 O_2^- 歧化成 H_2O_2 及分子氧。谷胱甘肽过氧化物酶能在谷胱甘肽作用下, 使 H_2O_2 转变为 H_2O 。过氧化氢酶能催化 H_2O_2 转变为水^[2]。其他一些小分子, 非酶抗氧化物如维生素E和维生素C等也可在自由基清除中发挥一定的作用^[7]。细胞的氧化应激, 本身是细胞内活性氧的产生超过了其清除能力, 从而导致细胞损伤的病理过程。脑缺血性损伤后其细胞内活性氧的产生与清除失衡, 产生远大于清除, 导致氧化应激相关信号通路的激活和细胞损伤。

活性氧与再灌注损伤: 在恢复血液灌流后脑损伤进一步加重, 表现为进行性的血管性水肿、出血、梗死面积增加等, 称为再灌注损伤。活性氧在再灌注损伤中的作用, 早在1980年已有学者阐述^[8]。其后, 大量的实验证实了活性氧与再灌注损伤的密切关系。缺血脑组织中, 细胞质内促氧化酶、线粒体和抗氧化剂的过度消耗, 并且补充不足和还原系统的失活都能促进活性氧的生成^[2]。过量生成的活性氧引起了多种大分子的损伤, 并激活多种途径产生一系列病理效应。

活性氧的检测与定量: 检测缺血的脑组织中活性氧含

量, 一般采用间接的方法, 原因是大多数种类的活性氧半衰期都很短。一种方法是通过检测活性氧靶分子的氧化产物的含量, 例如脂质过氧化产物、蛋白质及DNA的氧化产物的含量来进行活性氧的定量。另外一种方法, 是应用被活性氧氧化后产生发光物质的指示剂, 如Hydroethidine (HET)已用于检测组织及细胞中 O_2^- 的存在^[9]。HET被 O_2^- 氧化后, 可发出红色荧光即“乙啡啶荧光”, 用于 O_2^- 的追踪研究^[9]。但是, 近来一项研究显示, 其他种类的活性氧也可产生乙啡啶。2-羟基乙胺(2-HE)是HET的两电子氧化产物, 比HET更适用于 O_2^- 的专一性测量^[10]。虽然2-羟基乙胺和乙啡啶产生的荧光光谱有重叠, 并且2-羟基乙胺产生的荧光不能被荧光显微镜分离, 但是HET氧化后产生的红色荧光, 仍是检测活性氧, 尤其是 O_2^- 的重要方法。在脑缺血性损伤后, 这种红色荧光亮度上调, 显示 O_2^- 影响信号转导和造成细胞损伤^[11]。应用HET进行检测的缺陷是, 普通荧光显微镜不能提供可靠的定量检测, 要辅助高性能的液体色谱/荧光分析进行 O_2^- 的定性和定量检测^[10]。

超氧化物歧化酶的转基因和基因敲除研究: 虽然对活性氧检测及定量技术的发展, 使研究活性氧在脑缺血性损伤中的作用更为便利, 可是关于活性氧导致缺血性脑损伤的确切机制仍未阐明。最近, 转基因和基因敲除技术被用于研究活性氧在缺血性脑损伤中的分子机制。已有大量此方面的研究, 应用携带人类超氧化物歧化酶基因或超氧化物歧化酶基因敲除(超氧化物歧化酶^{+/+}或超氧化物歧化酶^{-/-})的转基因动物, 建立了脑缺血性损伤模型。

超氧化物歧化酶1基因有神经保护作用。应用携带人类超氧化物歧化酶1基因的杂合子转基因动物的研究发现, 与野生型相比, 超氧化物歧化酶1的活性在小鼠增加了3倍^[12]、在大鼠增加了4倍^[13]。超氧化物歧化酶1转基因动物, 前脑缺血后脑梗死面积与野生型相比, 减少了35%–50%^[14]。短暂性全脑缺血后延迟性神经元死亡, 在超氧化物歧化酶1转基因小鼠中减少了50%^[15]。对多种信号通路的调控, 都能产生神经保护作用, 如激活磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3-K)相关途径^[16], 如抑制丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)途径^[17]、p53信号途径^[11]、核转录因子 κ B^[18]和线粒体依赖的凋亡途径等^[19]。而且, 在超氧化物歧化酶1基因敲除(超氧化物歧化酶^{-/-})小鼠, 前脑缺血后脑梗死面积及水肿都降低^[20], 但短暂性全脑缺血后细胞死亡增加^[21]。

超氧化物歧化酶2基因同样有重要的神经保护作用。应用携带人类超氧化物歧化酶2基因的杂合子转基因小鼠的研究发现, 前脑缺血中脑损伤^[22]及血管内皮细胞死亡程度^[23]都降低。在超氧化物歧化酶2基因敲除鼠前脑缺血模型中, 脑梗死面积^[24]、水肿^[23]、 O_2^- 的产量^[11]、基质金属蛋白酶9的活性^[23]、caspase-9的活性^[25]

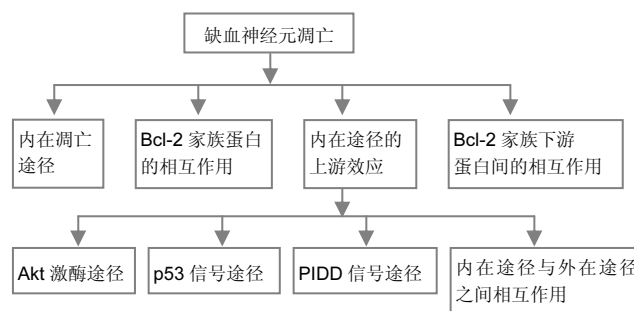


图1 缺血神经元凋亡途径

以及细胞色素C的释放^[26], 与野生型相比都升高。而且超氧化物歧化酶2基因敲除小鼠, 短暂性前脑缺血后出血性转化增加^[23]。

目前, 仅有少量的超氧化物歧化酶3转基因或基因敲除鼠, 用于脑缺血模型研究, 这些研究也显示了超氧化物歧化酶3有神经保护作用。在前脑缺血后, 与野生型相比超氧化物歧化酶3转基因小鼠脑梗死面积降低了28%^[27], 并且超氧化物歧化酶3含量增加了5倍^[28]。可是超氧化物歧化酶3基因敲除(超氧化物歧化酶^{3-/-})鼠, 前脑缺血后脑梗死面积增加了81%^[29]。总之, 应用超氧化物歧化酶转基因或基因敲除动物的研究, 都显示活性氧在脑缺血性损伤中有重要作用, 通过激活多种信号途径参与缺血性损伤。

线粒体一氧化氮合酶: 研究发现, 在哺乳动物有3种一氧化氮合酶亚型, 为神经元型、诱导型和内皮细胞型一氧化氮合酶。可是, 目前的研究也发现, 线粒体内膜中含有其独有的亚型, 即线粒体型一氧化氮合酶^[30]。线粒体型一氧化氮合酶并非由线粒体的基因编码, 而由核DNA编码, 推测其可能在细胞质中合成后, 转运到线粒体中, 其具体的转运机制现在并不清楚。线粒体内 Ca^{2+} 含量升高后, 可以激活线粒体型一氧化氮合酶。线粒体型一氧化氮合酶能够持续控制线粒体呼吸, 因而被认为是导致再灌注损伤的重要分子之一^[30]。在缺血性损伤的鼠中, 线粒体型一氧化氮合酶酶活性比正常鼠升高。线粒体型一氧化氮合酶也被认为是引起脑组织老化的指标之一。在高龄老年鼠中, 线粒体型一氧化氮合酶的活性与神经行为学表现, 及神经存活率呈线性相关^[31]。由于线粒体型一氧化氮合酶控制线粒体呼吸, 和催化一氧化氮生成, 因此, 可能与脑卒中后神经细胞的凋亡有关。有关线粒体型一氧化氮合酶在脑卒中中作用的进一步研究, 也可能有助于提供更理想的治疗策略。

2.2.2 缺血后神经元的凋亡途径 见图1。

内在凋亡途径: 由于线粒体过量产生活性氧, 从而激活多种信号途径后, 凋亡信号在唯BH3结构域的蛋白辅助下到达线粒体。Bcl-2家族蛋白, 如细胞色素C、凋亡诱导因子、核酸内切酶G及线粒体衍生的二级caspase的激活子[Smac], 之间的相互作用, 引起线粒体膜间隙中贮存的促凋亡蛋白释放, 导致神经元凋亡。

此途径被称作“内在途径”。

Bcl-2家族蛋白的相互作用: Bcl-2蛋白家族是维持线粒体膜完整性, 及其功能的重要调节因子。依据其结构的同源性可分为3个亚类: ①抗凋亡的蛋白, 例如Bcl-2, Bcl-XL以及Bcl-w。②促凋亡的蛋白, 例如Bax和Bak。③唯BH3结构域的蛋白, 例如Bad, Bid, Bim, Noxa和p53正向凋亡调节因子。由于神经元中缺乏全长的Bak, 因此Bax是神经元中惟一的促凋亡蛋白。在凋亡相关信号下, 唯BH3结构域的蛋白被激活, 并转导凋亡相关信号至线粒体。有研究发现脑缺血后, 唯BH3结构域的蛋白表达上调, 提示脑缺血可激活多种凋亡相关途径。

目前的研究, 有两种学说解释Bcl-2蛋白家族成员间的相互作用, 即“直接模式”和“分级结构模式”。直接模式中, 抗凋亡蛋白可抑制促凋亡蛋白, 唯BH3结构域的蛋白可解除这种抑制作用, 导致促凋亡蛋白释放, 进而引起凋亡。Kim等^[32]近来提出“分级结构模式”。这种模式中, 唯BH3结构域蛋白分为两种: “激活子”组和“失活子”组。如Bim和p53正向凋亡调节因子和截短了的Bid (truncated Bid, tBid)属于激活子组, 而其他唯BH3结构域蛋白属于失活子组。激活子组的蛋白能被抗凋亡蛋白抑制, 但是, 不被促凋亡蛋白抑制。失活子组的唯BH3结构域蛋白, 能解除抗凋亡蛋白对激活子组蛋白的抑制引起后者的释放。释放的激活子蛋白, 与促凋亡蛋白相互作用, 进而引起凋亡。

Bcl-2家族蛋白, 在脑缺血中有多种作用。唯BH3结构域蛋白, 其包括Bad^[19], Bim^[33], Noxa^[33], p53正向凋亡调节因子^[11]和tBid^[11], 主要通过与其他Bcl-2家族蛋白相互作用, 导致脑缺血后脑细胞的死亡。前脑缺血^[34]或短暂性全脑缺血^[35]后Bax的含量增高, 并在c-Jun N-端激酶及BimL的介导下从细胞质转位到线粒体^[36]。Bim, tBid和p53正向凋亡调节因子都可与Bax相互作用, 这些都是对“分级结构模式”的支持。通过与其他Bcl-2家族蛋白相互作用, Bax寡聚体化并被激活, 引起线粒体膜间隙中贮存的凋亡蛋白释放, 进而导致神经元凋亡^[36]。

Bcl-2家族下游蛋白间的相互作用: 线粒体膜间隙中的蛋白, 如细胞色素C, Smac, 凋亡诱导因子及核酸内切酶G都可在脑缺血后释放, 进而导致凋亡信号的转导。细胞色素C与凋亡激活因子1、脱氧三磷酸腺苷及caspase-9前体相互作用, 形成凋亡复合物, 从而激活caspase-9的前体^[37]。激活的caspase-9激活caspase-3, 后者可以切割caspase激活的脱氧核糖核酸酶抑制剂, 导致caspase激活的脱氧核糖核酸酶释放, 引起DNA损伤, 从而诱导凋亡。Caspase-3也能够使其他种类的caspases效应蛋白激活, 如多聚ADP核糖聚合酶, 引起脑缺血损伤中凋亡的激活^[38]。虽然多聚ADP核糖聚合酶与凋亡性和非凋亡性细胞死亡均有关, 但研究表明,

caspases可将其切割成相对分子质量89 000和21 000的2个片段, 这2个片段都与脑缺血后细胞凋亡相关^[38]。Smac也能够导致caspases的激活。与X-染色体连锁的凋亡抑制蛋白, 能够阻止caspases前体激活, 也能抑制已活化的caspases活性。Smac从线粒体中释放后, 与X-染色体连锁的凋亡抑制蛋白结合, 从而使其效应失活, 导致了caspases激活^[39]。

研究显示, caspase非依赖的途径, 在凋亡中也有重要作用。凋亡诱导因子从线粒体移位至细胞核内, 诱导了短暂性前脑缺血后细胞凋亡^[40]。在表达低水平的凋亡诱导因子突变小鼠, 短暂性前脑缺血后脑梗死的面积减少了43%^[40]。多聚ADP核糖聚合酶能辅助凋亡诱导因子进行核转位, 核酸内切酶G也能够转位至细胞核内, 引起短暂性前脑缺血后DNA片段化降解^[41]。

内在途径的上游效应: 活性氧能够激活一系列信号途径, 如PI3-K, MAPK及p53信号途径, 而这些信号途径能对凋亡的固有途径进行调控。

(1)激酶途径: Akt为调控脑缺血后神经元存活或死亡的重要分子之一。Akt是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 而且是PI3-K下游的重要靶分子^[16]。Akt能使得脑缺血后, Bad磷酸化失活^[42]。磷酸化的Bad失去了对Bcl-2家族中促存活蛋白的抑制, 从而使凋亡途径失活。Akt可以使caspase-9的前体及caspase-9的196位丝氨酸磷酸化。Caspase-9的前体磷酸化后, 能抑制自身的激活, caspase-9磷酸化能够抑制其本身蛋白酶的活性^[43]。Akt可以使MDM2(murine double minute gene 2)磷酸化, 进而调节p53的降解。其他种类的蛋白激酶, 也可以参与凋亡内在途径的调控。磷酸化的细胞外信号调节激酶, 也能够使Bad磷酸化失活, 在短暂性前脑缺血后表达增加^[19]。蛋白激酶A, 也能够使脑缺血后Bad磷酸化失活^[19]。

(2)p53信号途径: 大多数的Bcl-2家族蛋白, 如Bax, Bid, Noxa和p53正向凋亡调节因子及p53AIP1都是p53的产物, 可见p53在凋亡内在途径中起的重要作用。Bcl-2家族蛋白在脑缺血后表达上调, 并参与细胞死亡的调控, 在以上3.2部分中已描述。最近的研究揭示, p53可通过依赖或不依赖转录两种方式激活凋亡的内在途径^[44]。在短暂性全脑缺血模型中, p53转位至线粒体中, 与抗凋亡蛋白Bcl-XL相互作用, 从而导致细胞色素C释放^[44]。p53的抑制剂pifithrin- α , 可抑制p53转位, 因而对短暂性全脑缺血后海马CA1区神经元有保护作用^[44]。当p53通过不依赖转录的方式参与凋亡调控时, 与唯BH3结构域的蛋白作用方式相似。而且, 也可通过转录凋亡相关蛋白, 如Bcl-2家族蛋白, 以依赖转录的方式参与凋亡调控。

(3)PIDD信号途径: p53和caspase-2都与应激诱导的凋亡有关, 但是, 其相关的重要分子仍未阐明。据Tinel和Tschopp研究显示^[45], p53诱导的蛋白都含有一个死亡结构域(p53 inducible protein with death domain,

PIDD), 为 p53 作用的靶位点, 能与 RAIDD(RIP-associated ICH-1/Ced3-homologous protein with a Death Domain, RAIDD)和caspase-2前体形成一个高分子量的蛋白复合体, 称为“PIDD复合体”。此凋亡复合体中caspase-2被激活^[45]。短暂性全脑缺血后, 海马CA1区的PIDD复合体含量增高, 使得caspase-2激活, caspase-2激活后切割Bid, 进而促进神经元凋亡^[46]。有关PIDD途径的体外研究有新的发现。新近研究发现, caspase-2能直接与线粒体相互作用, 激活线粒体依赖的凋亡途径^[47], 这种相互作用与其本身的蛋白水解作用无关。另一发现表明, PIDD的切割片段PIDD-C能形成另一种蛋白复合体, 此蛋白复合体含有PIDD-C及核转录因子κB, 可以起到抗凋亡作用^[48]。

(4)内在途径与外在途径之间相互作用: 凋亡相关的外在途径, 是通过死亡受体接收细胞外信号并传导至细胞内。近来的研究表明, 死亡受体途径除介导细胞凋亡以外, 还能调控多种生理功能。

Fas途径(Fas为一种死亡受体), 与脑缺血后神经细胞的凋亡相关^[49]。Fas、Fas相关死亡结构域和caspase-8的前体, 共同组成死亡诱导信号复合体, 可激活caspase-8, 类似凋亡复合体可激活caspase-9, Caspase-8进一步激活caspase-3与caspase-10^[50]。

凋亡的内在途径与外在途径间是相互联系的, 维持这种联系的关键分子是Bid, 它也同时是p53-caspase-2途径关键分子。Bid被caspase-8截短后, 转移至线粒体中与其他Bcl-2家族蛋白间相互作用, 从而引起细胞色素C释放, 导致凋亡。

3 小结 Conclusion

活性氧在脑缺血导致的细胞死亡中有重要作用, 不仅引起生物大分子损伤, 而且可引起凋亡信号转导。线粒体产生大量的活性氧, 从而激活多种信号通路及参与凋亡的内在途径调控, 在细胞死亡中起重要作用。

作者贡献: 第一作者和第二作者负责资料收集、成文, 由第三作者和第四作者审校。第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

学术术语: 线粒体电子传递链—是由 5 种多亚基的酶复合体组成(即复合体 I-V), 活性氧主要在呼吸过程中由复合体 I 与III产生, 活性氧可激活多种信号途径

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

[1] Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973;134(3):707-716.

[2] Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21(1):2-14.

[3] Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(3):463-499.

[4] Patel RP, McAndrew J, Sellak H, et al. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1411(3): 385-400.

[5] Bredt DS. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 1999;31(6):577-596.

[6] Fiskum G, Murphy AN, Beal MF. Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(4):351-369.

[7] Packer JE, Slater TF, Willson RL. Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature.* 1979;278(5706):737-738.

[8] Yoshida S, Abe K, Busto R, et al. Influence of transient ischemia on lipid-soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain. *Brain Res.* 1982;245(2):307-316.

[9] Bindokas VP, Jordan J, Lee CC, et al. Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci.* 1996;16(4):1324-1336.

[10] Zhao H, Joseph J, Fales HM, et al. Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(16):5727-5732.

[11] Niizuma K, Endo H, Nito C, et al. Potential role of PUMA in delayed death of hippocampal CA1 neurons after transient global cerebral ischemia. *Stroke.* 2009;40(2):618-625.

[12] Chan PH, Epstein CJ, Kinouchi H, et al. SOD-1 transgenic mice as a model for studies of neuroprotection in stroke and brain trauma. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;738:93-103.

[13] Sugawara T, Noshita N, Lewen A, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage by blocking the mitochondrial pathway of caspase activation. *J Neurosci.* 2002; 22(1):209-217.

[14] Kamii H, Mikawa S, Murakami K, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibition on brain infarction in SOD-1-transgenic mice following transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1996;16(6):1153-1157.

[15] Chan PH, Kawase M, Murakami K, et al. Overexpression of SOD1 in transgenic rats protects vulnerable neurons against ischemic damage after global cerebral ischemia and reperfusion. *J Neurosci.* 1998;18(20):8292-8299.

[16] Noshita N, Sugawara T, Lewen A, et al. Copper-zinc superoxide dismutase affects Akt activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Stroke.* 2003;34(6):1513-1518.

[17] Nito C, Kamada H, Endo H, et al. Role of the p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A2 signaling pathway in blood-brain barrier disruption after focal cerebral ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(10):1686-1696.

[18] Song YS, Lee YS, Narasimhan P, et al. Reduced oxidative stress promotes NF-kappaB-mediated neuroprotective gene expression after transient focal cerebral ischemia: lymphocytotropic cytokines and antiapoptotic factors. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27(4):764-775.

- [19] Saito A, Hayashi T, Okuno S, et al. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase in transgenic mice protects against neuronal cell death signaling pathway. *J Neurosci*. 2003;23(5):1710-1718.
- [20] Kondo T, Reaume AG, Huang TT, et al. Reduction of CuZn-superoxide dismutase activity exacerbates neuronal cell injury and edema formation after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1997;17(11):4180-4189.
- [21] Kawase M, Murakami K, Fujimura M, et al. Exacerbation of delayed cell injury after transient global ischemia in mutant mice with CuZn superoxide dismutase deficiency. *Stroke*. 1999;30(9):1962-1968.
- [22] Keller JN, Kindy MS, Holtzberg FW, et al. Mitochondrial manganese superoxide dismutase prevents neural apoptosis and reduces ischemic brain injury: suppression of peroxynitrite production, lipid peroxidation, and mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*. 1998;18(2):687-697.
- [23] Maier CM, Hsieh L, Crandall T, et al. Evaluating therapeutic targets for reperfusion-related brain hemorrhage. *Ann Neurol*. 2006;59(6):929-938.
- [24] Murakami K, Kondo T, Kawase M, et al. Mitochondrial susceptibility to oxidative stress exacerbates cerebral infarction that follows permanent focal cerebral ischemia in mutant mice with manganese superoxide dismutase deficiency. *J Neurosci*. 1998;18(1):205-213.
- [25] Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Kawase M, et al. Manganese superoxide dismutase mediates the early release of mitochondrial cytochrome c and subsequent DNA fragmentation after permanent focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci*. 1999;19(9):3414-3422.
- [26] Noshita N, Sugawara T, Fujimura M, et al. Manganese superoxide dismutase affects cytochrome c release and caspase-9 activation after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(5):557-567.
- [27] Sheng H, Bart RD, Oury TD, et al. Mice overexpressing extracellular superoxide dismutase have increased resistance to focal cerebral ischemia. *Neuroscience*. 1999;88(1):185-191.
- [28] Oury TD, Ho YS, Piantadosi CA, et al. Extracellular superoxide dismutase, nitric oxide, and central nervous system O₂ toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(20):9715-9719.
- [29] Sheng H, Brady TC, Pearlstein RD, et al. Extracellular superoxide dismutase deficiency worsens outcome from focal cerebral ischemia in the mouse. *Neurosci Lett*. 1999;267(1):13-16.
- [30] Finocchietto PV, Franco MC, Holod S, et al. Mitochondrial nitric oxide synthase: a master piece of metabolic adaptation, cell growth, transformation, and death. *Exp Biol Med*. 2009;234(9):1020-1028.
- [31] Boveris A, Navarro A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*. 2008;60(5):308-314.
- [32] Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2 subfamilies. *Nat Cell Biol*. 2006;8(12):1348-1358.
- [33] Inta I, Paxian S, Maegele I, et al. Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2006;26(50):12896-12903.
- [34] Gillardon F, Lenz C, Waschke KF, et al. Altered expression of Bcl-2, Bcl-X, Bax, and c-Fos colocalizes with DNA fragmentation and ischemic cell damage following middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res Mol Brain Res*. 1996;40(2):254-260.
- [35] Krajewski S, Mai JK, Krajewska M, et al. Upregulation of Bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1995;15(10):6364-6376.
- [36] Okuno S, Saito A, Hayashi T, et al. The c-Jun N-terminal protein kinase signaling pathway mediates Bax activation and subsequent neuronal apoptosis through interaction with Bim after transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2004;24(36):7879-7887.
- [37] Yoshida H, Kong YY, Yoshida R, et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. *Cell*. 1998;94(6):739-750.
- [38] Chaitanya GV, Babu PP. Differential PARP cleavage: an indication of heterogeneous forms of cell death and involvement of multiple proteases in the infarct of focal cerebral ischemia in rat. *Cell Mol Neurobiol*. 2009;29(4):563-573.
- [39] Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(4):329-339.
- [40] Culmsee C, Zhu C, Landshamer S, et al. Apoptosis-inducing factor triggered by poly(ADP-ribose) polymerase and Bid mediates neuronal cell death after oxygen-glucose deprivation and focal cerebral ischemia. *J Neurosci*. 2005;25(44):10262-10272.
- [41] Lee BI, Lee DJ, Cho KJ, et al. Early nuclear translocation of endonuclease G and subsequent DNA fragmentation after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett*. 2005;386(1):23-27.
- [42] Kamada H, Nito C, Endo H, et al. Bad as a converging signaling molecule between survival PI3-K/Akt and death JNK in neurons after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(3):521-533.
- [43] Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, et al. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science*. 1998;282(5392):1318-1321.
- [44] Endo H, Kamada H, Nito C, et al. Mitochondrial translocation of p53 mediates release of cytochrome c and hippocampal CA1 neuronal death after transient global cerebral ischemia in rats. *J Neurosci*. 2006;26(30):7974-7983.
- [45] Tinel A, Tschopp J. The PIDDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science*. 2004;304(5672):843-846.
- [46] Niizuma K, Endo H, Nito C, et al. The PIDDosome mediates delayed death of hippocampal CA1 neurons after transient global cerebral ischemia in rats. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(42):16368-16373.
- [47] Robertson JD, Gogvadze V, Kropotov A, et al. Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep*. 2004;5(6):643-648.
- [48] Tinel A, Janssens S, Lippens S, et al. Autoproteolysis of PIDD marks the bifurcation between pro-death caspase-2 and pro-survival NF-kappaB pathway. *EMBO J*. 2007;26(1):197-208.
- [49] Rosenbaum DM, Gupta G, D'Amore J, et al. Fas (CD95/APO-1) plays a role in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *J Neurosci Res*. 2000;61(6):686-692.
- [50] Jin K, Graham SH, Mao X, et al. (CD95) may mediate delayed cell death in hippocampal CA1 sector after global cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(12):1411-1421.