

神经细胞凋亡在脑发育和神经退行性疾病中的作用

邓锦波 牛艳丽 皇甫超申

【作者简介】 邓锦波,医学博士,教授,河南大学黄河学者。现任神经生物学研究所所长,河南省教育厅学术带头人,德国 Freiburg 大学客座教授,美国神经科学学会会员。神经科学通报(英文版)常务理事。1996 年获上海第二医科大学医学博士学位,1996~2005 年分别在德国弗莱堡大学、美国田纳西大学和布朗大学作博士后,长期致力于突触的发生与可塑性研究、神经细胞迁移和学习与记忆、以及神经毒理学等神经科学前沿领域的科学研究,在脑片培养和利用双光子显微镜进行突触的活体观察研究等领域有较深的造诣,获省部级奖励 3 项。

细胞死亡有不同的形式,常见的有细胞坏死、凋亡、自吞噬性死亡等。细胞死亡有着重要的生理和病理学意义。细胞死亡按形态特征可分为 3 类:Ⅰ型细胞死亡,即凋亡性细胞死亡。Ⅱ型细胞死亡,即溶酶体细胞死亡,也叫自吞噬性死亡(autophagic death)。其特征是胞内初级溶酶体的形成与激活,自体吞噬体的形成,最终使细胞走向死亡^[1]。Ⅲ型细胞死亡,即坏死。坏死是细胞无序变化的死亡过程,表现为细胞胀大,胞膜破裂,细胞内容物外溢;而核变化较慢,DNA 降解也不充分。细胞死亡类型之间有时没有明确的界限,病理性的细胞死亡属于坏死的范畴,而生理性的细胞死亡属于凋亡范畴。其中Ⅰ型和Ⅱ型细胞死亡总称为程序性细胞死亡,也就是我们常说的凋亡。虽然凋亡与坏死的最终结果都是被吞噬降解,但它们的过程与表现却有很大区别,细胞坏死是一种不可控制的细胞死亡,细胞死亡过程中伴随有 ATP 或膜泵的丧失,大多数情况下,细胞膜和细胞器发生渗透性膨胀,并伴有内容物的外溢和蛋白质沉淀,由此引起局部严重的炎症反应。凋亡的特点是在细胞自杀过程中细胞始终保持了细胞膜的完整性。在巨噬细胞或相邻细胞吞噬死亡细胞过程中细胞内容物也不释放,不会引发局部的炎症反应^[2]。

一、Ⅰ型细胞凋亡的特点和基因调控

1. Ⅰ型细胞凋亡的机制:凋亡常伴随半胱氨酸蛋白酶(cysteiny l aspartate specific proteinases, caspase)的激活,属于 caspase 依赖性凋亡,即通常说的凋亡。

多种途径可以激活 caspase:①caspase 的膜受体途径,caspase 的膜受体途径主要通过激活 caspase-8,经过一系列信号转导最终导致 caspase-3 的激活而引发细胞凋亡。膜受体途径通过 Fas/FasL 信号途径和 TNFR-1 信号途径而实现;②caspase 激活的线粒体途径,细胞色素 C (cytochrome C, Cyt c) 的释放是线粒体参加细胞凋亡的关键环节。胞内死亡信号刺激下,可造成线粒体细胞色素 C 的释放。在 dATP/ATP 条件下进一步活化 caspase-9。caspase-9 激活后下游信号转导通路的 caspase-3 也被激活,最终诱导细胞凋亡;③ERS 途径:ERS 可由多种原因引起,这些刺激引起从 ER 到胞质和胞核的信号传导,最终导致对细胞存活的适应或凋亡。当严重的或长时间的 ERS 损伤了 ER 的功能时,发生细胞凋亡,以去除受损伤的细胞。

2. Ⅰ型细胞凋亡的调节:Ⅰ型细胞凋亡的调节在其激活和介导凋亡的过程中受到多种因素的调节。CrmA 对 caspase-1、4、6、8 是强效抑制剂。哺乳动物中的 Bcl-2 也是 caspase 通路中的上游调节因子,它可以抑制 caspase 的促凋亡作用,还可以通过抑制线粒体 cytc C 的释放而实现。同样,在线虫 ced-9 也具有抑制细胞凋亡的作用。细胞凋亡抑制因子家族(inhibitor of apoptosis protein family, IAPs)主要通过抑制 caspase 效应分子的活性来阻止凋亡。某些 IAPs 还可将 caspase 从胞内清除或与 caspase 底物结合,从而阻断其介导的蛋白酶级联反应。

二、Ⅱ型细胞凋亡的特点和基因调控

1. Ⅱ型细胞凋亡的机制:此种形式的凋亡无需 caspase 的参与,属 caspase 非依赖性凋亡,也称自吞噬性死亡。自吞噬是细胞内的物质成分利用溶酶体的降解过程。它是真核细胞所特有的。自噬程序被

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30771140)

作者单位:475004 开封,河南大学神经生物学研究所

通讯作者:邓锦波,电子信箱:jnbo_deng@henu.edu.cn

某些因素诱导后,细胞开始在胞质内形成 300 ~ 900nm 大小的双层膜的液泡,然后,包裹着要被降解的细胞器或大分子物质,形成初级自吞噬体,在微管结合蛋白作用下运输至溶酶体,随后初级自吞噬体与溶酶体融合形成自吞噬体,自吞噬体中的底物在酸性环境溶酶体酶的共同作用下被降解。这种自吞噬降解达到一定程度可导致细胞死亡。为了别于 I 型细胞凋亡,这种细胞死亡形式也叫 II 型细胞凋亡。众所周知,细胞自身稳定,需要受细胞内物质的合成与分解精确调控。细胞可以检测环境变化,并且将这些变化体现为合成代谢和分解代谢反应,其结果是促进细胞对恶劣环境,如饥饿的适应。机体对于营养剥夺的适应,最常见的方式是重新利用细胞内成分去维持细胞代谢需要。降解细胞自身蛋白质可以暂时性维持细胞对营养蛋白质需要,这一降解过程仅局限于胞质内短寿蛋白,然而大多数细胞结构蛋白都是长寿蛋白;因此,大量的大分子物质采取另外替代途径进行再利用,这种再利用方式可以帮助细胞在恶劣的环境下生存,这种替代途径就是溶酶体途径。溶酶体是一个分离的细胞器,它拥有适合多种不同水解酶催化活性的环境,这一特征使得溶酶体具有降解几乎所有任何形式的细胞成分。这一负责搬运细胞质到溶酶体或液泡的过程被称之为自吞噬。自吞噬对于维持细胞环境的稳定性非常重要。自吞噬过程见于几乎所有的真核细胞生物,在植物、酵母菌和动物细胞中都可表现出某些自吞噬的特征,提示它是在进化过程中得以保留下来的有效凋亡机制。虽然自吞噬现象已经发现了很长时间,但对它分子机制的阐述才是近 10 年的事,而且主要是基于酵母菌遗传学方面的发现。根据底物的种类、转运的方式和调控机制,自吞噬可分为 3 种类型:巨型自吞噬 (macroautophagy),微型自吞噬 (microautophagy) 和伴侣介导自吞噬 (chaperone - mediated autophagy)^[3]。其中巨型自吞噬主要负责降解细胞内稳定并永久存在的蛋白质,产生氨基酸以维持细胞在缺乏营养时的生存,自吞噬一般指的是巨型自吞噬。微型自吞噬是指部分胞质被鞘状溶酶体所包围,然后将内容物逐步降解。伴侣介导自吞噬选择性地传递胞质蛋白到溶酶体,而这一过程依赖溶酶体受体对蛋白氨基酸序列的识别。巨型自吞噬是主要的溶酶体通路对胞质成分降解的途径。这个过程开始与吞噬事件有关的囊泡状膜,即隔离膜的形成有关。这一结构导致了所谓的吞噬体 (autophagosome) 的形成。含有大量的细胞质的吞噬体最终将

与溶酶体溶合。吞噬物内膜及其里面的蛋白质和细胞器最后被溶酶体水解酶降解和重新利用。经过深入的研究,人们已经勾绘出自体吞噬过程的大致轮廓:主要包括 4 个环节,即底物诱导自噬前体 (proautophagosome, PAS) 的形成、自噬体 (autophagosome) 形成、自噬体与溶酶体融合和自噬体内容物被降解。细胞质中线粒体等细胞器首先被称之为“隔离膜”的囊泡所包被,这种“隔离膜”主要来自于内质网和高尔基体。囊泡最终形成双层膜结构,即自吞噬体,也称之为前自体吞噬泡 (initial autophagic vacuoles, AVi);然后,自体吞噬泡的外膜与溶酶体融合形成降解自体吞噬泡 (degrading autophagic vacuoles, AVd),最后,由溶酶体内的水解酶降解自体吞噬泡中的内容物和内膜。虽然自体吞噬并不直接破坏细胞膜和细胞核,但在整个自体吞噬过程中,细胞质和细胞器都受到破坏,最明显的是线粒体和内质网受损。自体吞噬在哺乳动物中的意义主要是:①恶劣环境中的应答反应,如饥饿等等,氨基酸的匮乏会诱导细胞产生自体吞噬;②发育过程中的自吞噬作用。动物在发育过程中必须伴随分化、变态、老化等过程,这些过程的实现必定伴随自吞噬的作用;③某些组织中特定功能,如黑人的塞梅林神经节中,多巴胺能神经元中的神经黑色素的合成就需要把细胞质的多巴胺醌用 AV 包被隔起来。对于自吞噬在细胞死亡的确切作用仍有争论。一些报道描述了自吞噬的激活常常伴随细胞的凋亡,但也有一些例子说明自吞噬导致的细胞死亡并不存在 caspase 的激活。因此,自吞噬途径可能在细胞死亡中扮演绝然不同的角色。昆虫变态就是极好的例子说明凋亡伴随自吞噬的现象。变态果蝇幼虫解体组织和唾液腺常常和 caspase 激活、DNA 断裂相联系;同时,细胞内也常常出现大量的溶酶体泡堆积^[4]。在 caspase 依赖的细胞凋亡过程中,来自于死亡细胞的凋亡小体被吞噬细胞的溶酶体降解;相反,在经历自吞噬过程中,降解通常是由死亡细胞自身溶酶体来执行的。当整个器官和组织需要降解时,这些细胞的死亡是必需的,而一般凋亡时的吞噬细胞不足以将全部的死亡细胞清除。然而,有些证据表明 caspase 非依赖性的自吞噬发生,比如, MCF - 7 乳腺癌经 tamoxifen 治疗后经历了自吞噬性细胞死亡,这些细胞内有大量的自吞噬泡堆积;而且,没有发现明显的 caspase 依赖性凋亡现象。自吞噬有时无需导致细胞死亡,仅涉及细胞成分的例行更换的生理过程。在进化上这是一个古老过程,在许多原虫纲和酵母菌

都可以见到,特别是在变态的昆虫经常会被描述,其意义主要是调节许多蛋白质和细胞器的反转和更新。自吞噬可以被饥饿和分解代谢所诱导,并受泛素蛋白(ubiquitin)精确调控,阻断自吞噬可以导致线粒体贮留,提示线粒体数量是受自吞噬调节的。自吞噬后的水解蛋白可在机体饥饿状态下为细胞内所再利用,自吞噬还可以清除异常的蛋白质。通常废用性细胞、饥饿细胞、激素剥夺细胞易产生营养缺乏,这是由于胞质被自吞噬或其他形式所消耗造成的,其意义是使细胞得以存活,而且在适当的环境下复苏。在什么情况下自吞噬可以造成细胞死亡呢?其实自吞噬是一个保护性的机制,其目的是通过降低代谢来回避细胞死亡,一个饥饿的生物机体首先将消耗不稳定的肌蛋白,细胞体积得以减少。当自吞噬的机体保护功能到达了它们的极限时,凋亡就可导致细胞死亡的产生。通常幼虫在饥饿时,急剧增加的自吞噬将在果蝇唾液腺细胞发现,继后细胞发生营养不良,通过自吞噬这些细胞死亡,变态过程得以实现。而生理调节性自吞噬和自吞噬致细胞死亡之间的差别、逆转自吞噬性细胞死亡以及激活自吞噬过程是目前人们亟需了解的问题。

2. 自吞噬的调节:参与自吞噬过程的信号转导分子非常复杂,目前尚未完全被我们所了解。①mTOR(mammalian target of rapamycin)信号途径:TOR 激酶是氨基酸、ATP 和激素的感受器,对细胞生长具有重要调节作用,抑制自噬的发生,是自噬的负调控分子,并发挥“门卫”作用。哺乳动物细胞中的核糖体蛋白质 S6(p70S6)抑制自噬的发生,它位于 TOR 信号途径下游,其活性受 mTOR 调节^[5]。纳巴霉素(rapamycin)通过抑制 mTOR 的活性,发挥抑制 p70S6 活性、诱导自噬发生的作用。TOR 激酶抑制自噬的信号通路目前尚未完全明了。在酵母细胞,TOR 激酶可能通过抑制 ATG1 激酶的活性来抑制自噬的发生;②Class I PI₃K/PKB 途径:Class I PI₃K 是自噬的负调节分子,它可磷酸化 PtdIns4P 和 PtdIns(4,5)P₂,生成 PtdIns(3,4)P₂ 和 PtdIns(3,4,5)P₃,然后结合 Akt/PKB 和它的活化分子 PDK1,抑制自噬的发生。结节性硬化复合物 1(TSC1)和 TSC2 蛋白位于 Class I PI₃K/PKB 途径的下游,可通过抑制小 G 蛋白 Rheb,抑制 TOR 激酶的活性,对自噬发挥正向调节作用。PTEN 磷酸酶也是自噬的正向调节分子,它使 PtdIns(3,4,5)P₃ 去磷酸化,从而解除 Class I PI₃K/PKB 途径对自噬的抑制^[6];③Gαi3 蛋白途径:GTP 结合的 G 蛋白亚基 Gαi3 是自噬的抑制因子,而 GDP 结合的

Gαi3 蛋白则是自噬的活化因子。GAIP(G Alpha interacting protein)作为 RGS(regulators of G-protein signaling)家族成员之一,通过 Gαi3 蛋白加速 GTP 的水解,促进自噬的发生。另外,AGS3(activator of G-protein signaling 3)也能正向调控自噬效应。氨基酸作为自噬过程蛋白降解物的终产物,可负性反馈调节自噬。外源性氨基酸的去除,可以阻断 TOR 信号途径,而自噬产生的内源性氨基酸可补足氨基酸缺陷,恢复 TOR 信号转导;④其他途径:激素在自噬的调控中也起重要作用。胰岛素可抑制自噬,而胰高血糖素则促进自噬。酪氨酸激酶受体、PKA、casein 激酶 II、MAP 激酶、calcium 也存在于自噬过程错综复杂的调控网络中,但其机制还不甚清楚。

3. 自吞噬死亡与凋亡的关系:据报道一些作为激活凋亡的介导分子同样具有介导自吞噬激活的功能。在乳腺腺泡腔的形成过程中,通过 TRAIL 通路可调节自吞噬。在成神经细胞,生长因子的剥夺可导致自吞噬细胞的死亡,其过程可被抗凋亡 Bcl-2 所阻断^[7]。神经酰胺(ceramide)被认为参与凋亡的激活,同时它对于自吞噬的形成至关重要。内体性溶酶体系统出现在早期的阿尔茨海默病(Alzheimer),但细胞的死亡最终是由 caspase 依赖性凋亡实现的。在果蝇唾液腺,caspase 对于自吞噬是必要的。在解释自吞噬和凋亡之间相互作用时,一般认为溶酶体可以激活 caspase 依赖性凋亡。利用新的抑制剂和荧光标志物,Kroemer 及其同事^[8]已经证明溶酶体可以激活经典的凋亡途径。一些实验室也已经观察到溶酶体的损伤,就像其他的对细胞的严重损伤可以激活凋亡。他们的发现提示溶酶体行为异常可以触发凋亡,其过程是通过线粒体途径,但这种激活凋亡发生具体过程尚不清楚。

三、神经系统的发育与细胞凋亡

1. 神经干细胞的凋亡:神经系统的发生与神经管的形成与分化密不可分。神经管最初由一层增生能力极强的神经上皮构成。神经上皮细胞可以分裂增生,增生的成神经细胞和成胶质细胞可以穿过基膜并形成位于软膜之下的神经组织,神经组织内的神经元和神经胶质细胞分别由成神经细胞和成胶质细胞增生而来。在胚胎发育过程中神经细胞的凋亡具有独特的生物学意义,从一个结构简单的神经板到一个构筑精巧、功能精细复杂的脑,神经细胞的增生、迁移与细胞死亡发挥着极其重要作用,一旦这种生长与死亡之间的平衡遭到破坏,将导致各种各样的神经系统发

育畸形。一般认为,发育过程中的增生与凋亡之间的平衡决定最终组织和器官的结构大小和形态^[9]。在神经上皮正常存在的细胞死亡第1次被描述于50多年前^[10]。最近,最早的神经细胞的死亡被描述发生在神经嵴形成和神经管发生时期,它们广泛分布在中枢神经系统和周围神经系统的神经节。在这些发育阶段,已分化的神经元即使不是完全缺乏也是非常罕见。虽然明确的死亡细胞的辨认通常很难提供,但有理由假定它们必然是增生的神经元前体细胞或者是新产生的成神经细胞,但不是神经元。细胞凋亡在神经管的形成之初就可以出现,主要是神经干细胞的凋亡。神经干细胞的凋亡常发生在神经板转变为神经管的过程中,表皮外胚层与神经外胚层连接处出现大量细胞死亡。在神经管关闭过程中,前神经孔部位也有大量细胞死亡;即使神经沟关闭后,大量的细胞死亡依然在背侧中线见到。在增生区内广泛的细胞死亡已经引起人们的关注,这些濒临死亡细胞所处的部位提示凋亡可能在发育过程中的其他的特殊意义。因为这些濒死细胞并没有迁移、优化轴突或形成突触,对这一类神经细胞凋亡的理解还需进一步调研。细胞凋亡对于神经管的形成有重要意义,它有助于神经管与外胚层分离,同时也是神经管头部脑泡塑形的基础。神经细胞的凋亡与神经管的分化、发育也有密切关系,如神经管分化过程中背侧两面的细胞凋亡不尽相同,而且脑泡不同节段细胞凋亡也有区别,这些现象都是由于神经管区域性分化需要决定的。神经管分化阶段的细胞凋亡可能是神经干细胞或者早期有丝分裂后细胞。神经管神经上皮细胞的死亡也主要是通过caspase依赖性凋亡和自吞噬加以实现的,caspase依赖性凋亡细胞主要是由相邻细胞或巨噬细胞经异体吞噬作用消除死亡细胞,而自吞噬主要是依靠细胞自身溶酶体的自噬作用消除死亡细胞。

2. 神经细胞的凋亡:神经管形成之后,脑内细胞死亡以神经细胞和神经胶质细胞凋亡为主,由于神经元在神经系统中的特殊功能,本文着重讨论神经细胞的凋亡。由于增生、分化和凋亡在早期神经发生中共存,因此细胞增生和凋亡之间的关系往往模糊不清。凋亡和增生之间的联系在大脑皮质发育早期就已经建立,在小鼠胚胎的大脑皮质神经发生阶段(E10~E18),细胞死亡的高峰发生在E14,约有70%细胞凋亡,接下来凋亡率逐步降低,E18有50%细胞凋亡。细胞凋亡的部位多位于增生区,而不是有丝分裂后神经元占领区。在大鼠,室管层细胞凋亡的高峰发生在

E16;在室管下层,细胞高峰发生在E19~P0。从新生动物室管下层提取的DNA凝胶电泳表现了特征性的凋亡梯形模式。凋亡细胞数在这一区域维持很高,达2周之久。这一现象与持续性的有丝分裂相出现是相互平行的。Thomaidou等^[11]用BrdU标记,表明71% TUNEL标记细胞在经历细胞死亡之前已经吸收这种S期标志物,提示凋亡可以发生在增生细胞。他们同时发现TUNEL阳性细胞核的清除时间是2小时20分,大多数TUNEL阳性细胞处于G₁期。哺乳动物的小脑为研究这一问题提供了一个比较理想的模型,因为小脑的发育是在生后完成的。出生时小脑被外颗粒层覆盖,而外颗粒层是一细胞增生层,其增生过程可以在生后维持相当一段时间。在小鼠,出生后1周内外颗粒层增生迅速,产生了1亿多个颗粒细胞,且密集排列于外颗粒层;随着小脑发育外颗粒层变薄,同时外颗粒层细胞穿过Purkinje细胞层向内颗粒层迁移,在生后2周外颗粒层细胞迁移完毕,外颗粒细胞完全消失,成为细胞相对匮乏的分子层。外颗粒细胞是在放射状胶质细胞指导下,穿越Purkinje细胞层进入内颗粒层的,内颗粒层细胞可以和Purkinje细胞形成突触联系。Purkinje细胞与颗粒细胞之间的比例是高度调控的,细胞的死亡在这种调控中扮演着十分重要的角色,大量的外颗粒细胞在生后的发育过程中死亡,包括人类在内的多种哺乳动物都发现在出生后第1周,小脑存在大量的凋亡细胞。外颗粒层内的大多数是未成熟颗粒细胞出现凋亡,根据程相树等^[12]的研究资料表明,生后P0即有大量的外颗粒层凋亡,其凋亡高峰在P8,2周后由于几乎没有颗粒细胞位于外颗粒层,其凋亡率几乎为零。内颗粒层自P0开始即有凋亡细胞的存在,其凋亡的最高峰在P10,以后逐步下降,生后1个月仍可观察到细胞凋亡。用单位面积细胞凋亡数等参数比较外颗粒层与内颗粒层凋亡高峰时细胞凋亡数,表明外颗粒层细胞凋亡明显高于内颗粒层,分别是:1292.4/mm²和382.3/mm²。由于外颗粒层主要由干细胞和分化早期的有丝分裂后颗粒细胞构成。故可以断言,在中枢神经系统增生区干细胞凋亡明显高于成熟神经元的凋亡。神经细胞凋亡常常发生在突触联系建立的过程中,广泛的细胞死亡已经发生,据估计神经系统中有超过一半的细胞要在发育过程中凋亡。为什么会有过多的细胞产生呢?假设之一是细胞过剩可以允许在神经细胞与它们的靶结构之间有更为精确的配对联系^[13]。在突触发生过程中,过剩的神经元可能

增加生存的竞争性,同时也要增加与产生在靶器官的有限的生长因子的竞争。神经元在它们建立了适当的突触联系后,被认为需要摄取从靶结构而来的生长因子,这些获得足够生长因子的神经元将生长兴旺,而那些没得到足够生长因子的神经元将死亡。生长因子对细胞的生存负有责任,它们包括神经营养素。很明显某些生长因子抑制内源性的细胞凋亡。细胞凋亡常常是健康细胞的 DNA 受损,当 DNA 受损时,细胞不再维持它们的完整性。细胞并不完全瓦解,但细胞内容物可以漏入细胞间隙,被膜包被成凋亡小体 (apoptotic bodies),这些凋亡小体被周围的巨噬细胞迅速识别和消化。这样巨噬细胞保护了潜在的细胞毒性物质破坏邻近的细胞并引发炎症反应。没有足够的生长因子维持,细胞将表达自杀基因,一旦凋亡级联反应启动后,细胞死亡将在 24 ~ 48h 内发生,仅仅是那些建立了适当突触联系的神经元才得以生存。

总之,在许多物种,神经细胞死亡出现两个波峰,第 1 个波峰发生在胚胎发育中期神经发生 (neurogenesis) 的鼎盛期,大量的正在分裂的神经干细胞被清除。这一时期的神经细胞干细胞凋亡也叫早期清除。第 2 次波峰发生在出生后早期,大量的已分化的神经元死于它们的迁移过程中,或者死于它们与靶细胞的连接过程中^[14]。后一个凋亡过程通常认为是经典的程序化死亡。两个波峰有它们各自不同的意义。第 1 峰主要是调节神经干细胞生发池 (pool) 的大小,第 2 峰主要是保证适当的神经网络连结。

四、神经细胞凋亡的调节机制

1. 细胞外分子的调节作用以及神经凋亡保护因子:过剩的神经元产生于脑的发育过程中,它们在胚胎和生后神经系统优化过程中将被清除掉。依靠凋亡机制,细胞可以专一性清除那些无功能细胞,而不影响遗留细胞的进一步发育。在对神经系统细胞凋亡观察之后,Levi Montalcini 和 Hamburger^[15]描述了运动神经元发育过程中的细胞死亡,以及它们受位于神经支配区域的某些因子的调节。这一先驱性工作为后来的细胞凋亡的神经营养因子理论夯实了基础。按神经营养学说,数种关键的细胞外因子已经认为与发育过程中的神经凋亡有关,它们是神经营养因子 (neurotrophic factors)、激活 NMDA 受体的递质、胞外核苷酸、神经纤维引导因子和细胞黏附因子。此外细胞内因子也参与神经细胞凋亡,它们主要是 Bcl-2, Bax 等。总之:发育过程中的神经凋亡是受输入和输出神经活动来调控的。一般认为发育过程中的凋亡

部分原因是由于神经营养因子供应与神经细胞之间的相互竞争造成的。神经营养因子中包括了神经生长因子 (NGF) 家族,脑源性神经营养因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 和神经营养素 (neurotrophin)。胶质细胞源性神经营养因子 (glial cell-derived neurotrophic factor, GDNF), 神经营养细胞因子 (neurotrophic cytokine) 已经引起了广泛的关注^[16]。虽然胚胎期凋亡峰和出生后凋亡峰都可由神经营养因子调控,但具体涉及的因子是有区别的。即使是相同的神经元对同一神经营养因子的反应也是根据其成熟的时期而有区别。例如, GDNF 表现出保护多巴胺能神经元以对抗凋亡作用,但 GDNF 基因缺失小鼠死于出生前,展现了正常数量的黑质多巴胺能前体神经元,提示胚胎早期的细胞死亡对于 GDNF 并不敏感。Ret 属于受体酪氨酸激酶超家族成员,它可以转导 GDNF 信号。对于多巴胺神经元的存在, Ret 是必不可少的。同样,小鸡视网膜节细胞在早期神经发育过程中要求 NGF 和 BDNF 才能存活,而这两种因子都不对生后的细胞凋亡产生作用。神经营养素前体与 p75 神经营养受体 (p75 neurotrophin receptor, p75NTR) 具有高亲和力,但缺乏与 Trk 受体 (NGF 家族受体) 结合的能力,而它们可以通过在神经元表达的生存促进 Trk 受体 p75NTR 诱导细胞凋亡。总之,通过神经营养因子调节发育过程中的神经凋亡依赖于营养因子与靶结构之间平衡调整。最近一些证据表明神经递质也在发育过程中的神经细胞凋亡扮演了一个十分重要的角色,胚胎时期与生后神经凋亡的明显区别是神经递质和突触活动的影响;在胚胎时期,抑制突触的活动不会对脑神经元和突触的形态有明显影响,而在出生后,突触的发生到达了顶峰,大量的细胞死亡可以由急性阻断谷氨酸受体而引发。现已证实,谷氨酸能 NMDA 受体在控制发育过程中细胞死亡起关键的作用。阻断 NMDA 受体可以诱导在出生后早期啮齿类和灵长类动物细胞凋亡^[17]。突触内抑或突触外 NMDA 受体都可以影响到神经元生存,突触内或突触外 NMDA 受体的 Ca^{2+} 内流可以产生与 cAMP 反应元件结合蛋白 (cAMP response-element binding protein, CREB) 相反的作用,如 BDNF 基因调节神经元生存和 Akt 磷酸化。增加胞内 Ca^{2+} 浓度可以促进细胞生存,而消耗胞内 Ca^{2+} 可以引发细胞死亡。在神经元表面,激活突触内 NMDA 受体有利于神经元生存。实验还表明:生后不久幼稚神经元的生存是受它们本身 NMDA 受体调节的。而病理情

况下的细胞凋亡,过量的谷氨酸作用表现完全不同,这时,谷氨酸大量释放并从突触中外溢激活 NMDA 受体导致细胞死亡。NMDA 受体拮抗剂 MK-801 是一种保护剂,对于脑发育过程中的局部缺血造成的细胞凋亡有保护作用。而 AMPA 型谷氨酸受体,在发育过程中并不直接影响细胞死亡,但改变 AMPA 信号在病理情况下产生 NMDA 调节型的细胞死亡。在神经网络形成过程中,大多数神经递质都有营养效应,递质缺乏活性可能促使细胞凋亡。其他的细胞外分子如核苷酸(ATP 等)同样可以调节发育过程中的神经细胞存活,提示神经活动状态是神经细胞生存的关键调控点。除神经保护性调节外,某些细胞外因子在发育过程中可以直接诱导细胞死亡。比如,原神经营养素(proneurotrophin)与 p75 神经营养素受体(p75NTR)有较高的亲和力,它可以直接诱导神经细胞死亡。这些受体常称为死亡受体,它们与特异性凋亡效应器如 caspase-8 结合。Fas 作为肿瘤坏死因子- α 受体家族成员,在发育过程中可以在脊髓,海马和皮质中表达。它同时也与运动神经元的死亡有关。在过去若干年中,一些分子在神经发育过程中的多个环节中起对生理性细胞死亡的调节作用。胶质细胞本身对神经发育过程中也起调节作用,它调节神经元的数量。这种调节作用在发育早期主要是能动性地通过影响神经前体细胞的分裂,在发育晚期主要是通过吞噬作用促进神经细胞死亡。

2. 细胞内分子的调节作用:在过去的 10 年中,许多介入细胞死亡的分子已经迅速发现。这些细胞内分子在细胞死亡过程中得到激活,其意义在于调节生理性和病理性神经细胞凋亡。神经细胞的死亡有 3 种形式,它们是 caspase-3 依赖性凋亡,自吞噬和坏死。内源性和外源性信号都可以引发神经细胞的凋亡。激活 caspase-9/APAF-1 复合体,最终导致 caspase-3 的激活是早期胚胎细胞凋亡和出生后凋亡的关键步骤。通过基因打靶来抑制这些效应器可产生严重的脑发育畸形,提示对于神经前体细胞以及分裂后的神经元的清除对正常的脑发育非常必要。然而,这些基因突变并不产生脊髓和脑干的改变,但可引起某些器官,如胸腺,产生广泛性的细胞凋亡,提示 caspase 依赖性凋亡可能表现出区域、神经细胞类型和发育阶段的差异。增生中的颗粒细胞和迁移中的神经母细胞的凋亡常常发生在 caspase-3 裂解障碍的情况下,而有丝分裂后迁移中的神经细胞死亡则常常与 caspase-3 激活相关连。在发育过程中,

caspase 的激活以及 Bcl-2 家族构成了神经细胞凋亡调节点。发育中神经元生存与死亡之间的平衡取决于抗凋亡因子(Bcl-2 和 Bcl-XL)和促凋亡因子(Bax)的比率。Bcl-2 是最早发现的拮抗凋亡基因,它可以在神经系统内表达;Bcl-2 的过度表达可减少神经元的凋亡,引起特定脑区神经元数目的增多,但 Bcl-2 基因突变鼠仅引起轻微的神经营养异常,而主要影响出生后神经元亚群的生存状态。caspase-3 缺乏小鼠也出现相似现象,但生后运动神经元将出现凋亡,同时感觉神经元,视网膜,皮质和小脑的神经元也受波及。Bcl-XL 是另一个拮抗凋亡的 Bcl-2 家族成员,也在神经系统中表达丰富。Bcl-XL 缺乏的胚胎在神经系统发育过程中出现广泛的凋亡。Bcl-2 与促凋亡因子可以相互作用,共同调节细胞凋亡。一旦细胞接收到死亡信号,Bax/Bak 将负责控制内源性线粒体通路的入口,从而影响线粒体细胞色素 C 的释放。Bax 在胎脑和成熟脑组织均有较高的表达,它能与 Bcl-XL 形成异二聚体。Bax 的基因突变鼠基本上不引起神经发育过程中病理性改变,但可以明显减少神经营养因子依赖性神经元凋亡的发生。

3. 死亡受体的调节作用:坏死因子可通过激活特异性的死亡受体导致细胞凋亡,这些死亡受体属于肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)和神经生长因子(nerve growth factor, NGF)超家族^[18]。这些死亡受体以其特有的细胞内死亡区域为特征(death domain, DD),这一死亡区域对于死亡配体诱导的凋亡是至关重要。当死亡配体与死亡受体相结合就可以导致这些受体三聚体化。死亡受体三聚体化以及接下来的与 3 个死亡区域的结合导致了死亡诱导信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC)的形成,DISC 导致了 caspase-8 前体的激活。除此之外,激活的死亡受体同样能够产生另外的死亡信号,如神经酰胺(ceramide)。这一信号能够直接调节死亡受体水平从而影响细胞凋亡,例如对 Fas 受体的糖基化表现出调节 FasL 诱导的凋亡通路。另外,死亡受体信号可以在转录水平上得到调节,现在已观察到肿瘤抑制物 P53 可以上调 Fas 的表达。有丝分裂剂(mitogen)和生长因子也同样可以诱导凋亡。促分裂激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路可以被有丝分裂剂,生长因子和环境激活。MAPK 最少由 3 个级联构成,它们是 ERK1/2, JNK 和 P38 激酶通路。

4. 其他调节作用:NF- κ B 是一种核转录因子,

是存在于细胞质中的一种多向性转录调节蛋白,它可以和多种启动子结合,从而启动该基因的转录。NF- κ B 不仅在免疫调节、炎症反应中发挥作用,而且参与细胞生长调控,尤其是神经系统发生、发育及神经元退行性疾病衍变无不和 NF- κ B 的激活息息相关。越来越多的证据表明,NF- κ B 可以调节神经细胞的凋亡,NF- κ B 靶向性作用于不同的凋亡调节基因,这些基因包括 TP53, RB1, TNF, TRAF-1 和 TRAF-2。另外,NF- κ B 可以和 P53 转录活动展开竞争,这种竞争方式为 NF- κ B 调节细胞凋亡的机制提供了解释。还有一种解释,认为 NF- κ B 可以被 TNFR 通路所激活,故可以认为 NF- κ B 能卷入 TNF 诱导的神经细胞凋亡的调节。

五、神经元退行性疾病与神经细胞凋亡

除了正常的发育过程中生理性神经细胞凋亡外,神经细胞也见于某些神经退行性疾病。在多种神经性疾病的发展过程中 caspase 扮演了一个关键性的角色。尽管这些疾病的病因不尽相同,但细胞死亡的机制在许多神经性疾病是相同的。然而,caspase 异常激活在大多数这些疾病中并不明了。在急性神经性疾病,坏死和 caspase 介导的凋亡都可以发生。相比之下,慢性神经元退行性疾病,caspase 介导的凋亡通路在调节细胞功能丧失和细胞死亡中具有显著性作用。急性神经性疾病常常是一次性刺激导致大量的细胞死亡,而持续性温和的刺激引发慢性神经细胞凋亡^[19]。缺血性脑卒中是典型的激活 caspase 为特征的急性神经性疾病,抑制 caspase 可以减轻脑组织的损伤并显著改善神经系统症状。caspase-1,3,8,9 和 11 的激活以及细胞色素 C 的释放都可发现在脑缺血区域,同时 Bcl-2 家族也被牵涉进去。caspase-1 失活小鼠或者 caspase-3/caspase-11 缺失小鼠具有对缺血性损伤的保护作用。caspase 抑制剂或半选择性 caspase-1 和 caspase-3 抑制剂能保护来自缺血性损伤的脑组织。除了神经细胞凋亡外,缺血性脑卒中还表现了神经细胞坏死,故其病理改变常常是凋亡与细胞坏死混合存在。慢性神经元退行性疾病也常伴有神经细胞凋亡,其病因往往是一种或数种基因突变的结果。这些基因变化改变了基因产物的功能,从而对细胞产生损害。环境因素同样是与慢性神经退变有关。caspase 家族对肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 和亨廷顿病 (Huntington's) 有至关重要的作用。证据还表明,caspase 在阿尔茨海默病、帕金森病的产生起着至关重要的作用,牛脑

丽等^[20]的研究资料表明,细胞凋亡的变化规律与阿尔茨海默病的发生、发展及临床表现过程极为吻合,有理由认为阿尔茨海默病的发生、发展与 caspase-3 依赖性神经细胞凋亡之间有一定的关系。胎儿酒精综合征是由于母体在妊娠过程中持续性酒精暴露对胎儿发育产生的多脏器多组织的损害,可以波及脑、肝脏、心血管系统、免疫系统等。胎儿酒精综合征以胎儿颜面部畸形、生长迟滞和神经系统功能异常为主要特征。据称神经系统功能异常是患儿学习障碍,记忆力下降,注意力分散,交流障碍的主要原因。在中枢神经系统异常中,常见有神经细胞丧失,皮质板片层结构紊乱,有丝分裂后神经迁移障碍和皮质锥体细胞树突分支增加和延长。严重者甚至可产生无脑儿,小脑和脊髓脊柱裂等畸形。最近的研究还表明母体妊娠时酒精暴露可产生视皮质和海马的锥体细胞凋亡。这种神经细胞凋亡具有剂量依赖性和长时程效应。这种神经细胞的凋亡形式也是属于 caspase 依赖性的。

自噬也在神经变性疾病的发生发展中起着重要作用,它既可加速疾病的进展,在某些条件下又起保护作用。在阿尔茨海默病、亨廷顿病和帕金森病中,溶酶体系统的形态学特征发生了显著变化,调控自噬的信号转导系统也同时发生改变。神经营养因子撤除的小脑普肯野神经元死于自噬性程序性细胞死亡。在神经变性疾病中起重要作用的神经递质多巴胺也可引起自噬性程序性细胞死亡。最近,有报道称自噬在神经变性疾病中还可起保护性作用。在神经变性疾病早期阶段,激活自噬加速变性蛋白的清除阻止了疾病的进一步发展。例如亨廷顿病中,通过自噬途径对突变蛋白小片段的降解就阻止了它们的进一步聚集。激活自噬可加速细胞内蛋白聚合物的清除,而这种蛋白聚合物的存在是神经变性疾病典型特点之一。神经变性疾病受累神经元两个最主要的特征是:胞质中蛋白聚集物的存在和大的蛋白裂解体系活性的改变。尽管不同神经变性疾病突变蛋白的种类不同,但蛋白聚集物形成的过程却极为相似。首先,受损蛋白错误折叠、构象改变,暴露出那些在正常情况下隐藏于蛋白内部的疏水性残基;然后,细胞活化分子伴侣系统和胞质蛋白酶体系,促进这些错误折叠蛋白的再折叠或清除。最初,分子伴侣和蛋白酶可以逆转或在一定程度上延缓蛋白聚集物的形成;然而,随着受损蛋白的不断增多,当上述机制不足以完全清除时,这些分子伴侣和蛋白酶则被蛋白聚集物捕获,成为其中的一部分。尽管蛋白聚集

可能是细胞对抗疏水残基暴露的保护机制,这同时使聚集的蛋白更加不易被蛋白酶降解,因此自噬成为降解这些变性蛋白的唯一机制。激活自噬加速新合成的蛋白聚集物清除已经得到实验证实。然而,随着疾病的进展,蛋白聚集物越来越多,它们对溶酶体蛋白酶降解的敏感性下降,自噬的持续性激活导致细胞最终发生自噬性程序性细胞死亡。

参考文献

- 1 Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2004, 36: 2405 - 2419
- 2 Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45: 528 - 537
- 3 张松龄, 唐宏. 自体吞噬——II型程序性死亡[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32: 1011 - 1015
- 4 Juhász G, Csikós G, Sinka R, *et al.* The Drosophila homolog of Atg1 is essential for autophagy and development[J]. *FEBS Lett*, 2003, 543: 154 - 158
- 5 Klionsky DJ, Meijer AJ, Codogno P. Autophagy and p70S6 kinase[J]. *Autophagy*, 2005, 1: 59 - 60
- 6 Mills KR, Reginato M, Debnath J, *et al.* Tumor necrosis factor - related apoptosis - inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 3438 - 3443
- 7 Naegele J, Lombroso PJ. Development of the cerebral cortex: VIII. Apoptosis: neuronal Hari - Kari[J]. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, 1998, 37: 890 - 892
- 8 Ferri KF, Kroemer G. Organelle - specific initiation of cell death pathways[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: E255 - 263
- 9 李泽桂, 蔡文琴, 陈活彝. 神经管发生中的形态事件和分子机制

[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21: 613 - 616

- 10 Glucksmann A. Cell deaths in normal vertebrate ontogeny[J]. *Biol Rev*, 1951, 26: 59 - 86
- 11 Thomaidou D, Mione MC, Cavanagh JF, *et al.* Apoptosis and its relation to the cell cycle in the developing cerebral cortex[J]. *J Neurosci*, 1997, 17: 1075 - 1085
- 12 程相树, 杜耀武, 蒋杞英, 等. 小鼠小脑皮质发育的神经元凋亡[J]. *解剖学报*, 2008, 39: 470 - 474
- 13 Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system[J]. *Annu Rev Neurosci*, 1991, 14: 453 - 501
- 14 Jiang Q, Hu Y, Wu P, *et al.* Prenatal alcohol exposure and the neuroapoptosis with long - term effect in visual cortex of mice[J]. *Alcohol Alcohol*, 2007, 42(4): 285 - 290
- 15 Levi - montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mouse sarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo[J]. *J Exp Zool*, 1951, 116: 321 - 361
- 16 Ernfors P. Local and target - derived actions of neurotrophins during peripheral nervous system development[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2001, 58: 1036 - 1044
- 17 Tashiro A, Sandler VM, Toni N, *et al.* NMDA - receptor - mediated, cell - specific integration of new neurons in adult dentate gyrus[J]. *Nature*, 2006, 442: 929 - 933
- 18 Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor - mediated apoptosis pathways[J]. *Int J biochem Cell Biol*, 2000, 32: 1123 - 1136
- 19 Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases[J]. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1365 - 1375
- 20 牛艳丽, 张维娟, 于东明, 等. Caspase - 3 和 NF - (B 在 APPSWE 转基因小鼠海马内的表达[J]. *解剖学报*, 2009, 40: 385 - 389

(收稿:2010 - 01 - 29)

(接第 92 页)

3. 目前对于食管癌手术路径研究较多,不管何种路径均有利弊。在颈胸腹三切口手术中我们建议行左颈吻合,其理由如下:①考虑颈部食管在解剖位置上偏左,颈胸腹三切口手术行左颈吻合术野显露良好,易于解剖游离和止血;②随着吻合器的普遍使用,吻合侧喉返神经损伤较多,左侧喉返神经变异少,经左侧胸锁乳突肌前缘切口,在气管食管沟内暴露出喉返神经加以保护,喉返神经损伤的机会较右侧少;③重建消化道行左颈食管胃吻合接近于生理解剖位置;④左侧吻合可确保右侧喉返神经不受损伤,不会引起双侧喉返神经损伤的严重并发症。

综上所述,我们认为中上段食管癌颈胸腹三切口手术中行左颈吻合,暴露出喉返神经能较好地降低喉返神经损伤,提高病人的生活质量和利于进一步康复,并有利于清扫喉返神经旁淋巴结。至于远期疗效尚需进一步研究探讨。

参考文献

- 1 白学义,夏志明,等.三切口治疗食管癌的临床分析[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2006, 27(18): 2208 - 2209
- 2 何金涛,陈利华,任光国,等.食管癌术中左喉返神经淋巴结切除及临床意义[J]. *泸州医学院学报*, 2003, 26(3): 235 - 237
- 3 夏李明,陈奇勋,周星明,等.胸段食管癌喉返神经旁淋巴结转移的影响因素[J]. *中国肿瘤*, 2006, 15(11): 782 - 784
- 4 Skiozaki H, Yao M, Tsujinaka T, *et al.* lymph node metastasis along the recurrent nerve chain is an indication for cervical lymph node dissection in thoracic esophageal cancer[J]. *Dis Esophagus*, 2001, 14(3 - 4): 191 - 196
- 5 耿明飞,刘春林,周福有,等.食管癌术后喉返神经损伤 33 例临床分析[J]. *医药论坛杂志*, 2003, 24(13): 41 - 42
- 6 Nishihira T, Sayama J, Ueda H, *et al.* lymph flow and lymph node metastasis in esophageal cancer[J]. *Surg Today*, 1995, 25: 307 - 317
- 7 王建华.胸腹二野淋巴结清扫治疗胸段食管鳞癌的中期疗效[J]. *中国肿瘤临床*, 2007, 34(10): 592 - 592
- 8 张合林,何明,张方林,等.淋巴结转移数对食管癌预后和国际 TNM 分期的影响[J]. *中国肿瘤临床*, 2008, 35(5): 252 - 255

(收稿:2010 - 03 - 24)

(修回:2010 - 05 - 28)