

腺苷及 A_{2A} 腺苷受体与缺氧缺血性脑病

范海玲 陈翔

细胞外腺苷浓度的增加是对脑缺血缺氧而引起的一种内源性神经作用,腺苷以及 A_{2A}R 可以作为脑缺血缺氧潜在的治疗靶点,现就近年来关于腺苷及 A_{2A}R 在脑缺血缺氧中的作用机制做一综述。

一、腺苷及腺苷受体

腺苷作为一种内源性嘌呤核苷,在生理和病理条件下都具有重要作用。目前,已成功克隆出 4 种腺苷受体,分别是 A₁、A_{2A}、A_{2B}、A₃ 腺苷受体。腺苷结合的受体亚型不同,所产生的效应也不同。腺苷可以激活高亲和力的 A₁、A_{2A} 腺苷受体或低亲和力的 A_{2B} 和 A₃ 腺苷受体,产生一系列病理生理效应^[1,2]。

1. 腺苷的来源:生理状况下,细胞外腺苷不仅可由神经末梢或胶质细胞释放^[3,4],也可来自三磷酸腺苷(adenosine triphosphate,ATP)的代谢。细胞处于缺血、缺氧等应激状态下,细胞内大量外流的 ATP 迅速代谢成腺苷,致使细胞外腺苷浓度升高近 1000 倍(从 100nmol/L ~ 100μmol/L),一方面指数级增长的内源性腺苷发挥着神经保护作用;另一方面,又介导了细胞毒性过程^[5]。脑缺血时神经元主要增加细胞内腺苷浓度,而神经胶质细胞则是把腺嘌呤核苷酸运送到细胞外从而增加细胞外腺苷水平^[6]。

2. 腺苷在脑缺血中的作用:脑缺血发生后,细胞的自稳态遭到破坏,腺苷浓度急剧升高,发挥神经保护作用的同时,又介导了细胞毒性过程。其主要的机制有以下 3 个方面:①细胞兴奋性毒性和 Ca²⁺ 超负荷;②炎症反应程度;③腺苷大量生成的同时,也强化了其代谢过程,在一系列酶的作用下,腺苷依次转化为肌苷、次黄嘌呤、黄嘌呤和尿酸,此过程伴随大量活性氧(reactive oxygen species,ROS)的生成。

3. 突触内的腺苷调节机制:实验发现,突触的腺苷主要由星形胶质细胞调节,生理条件下突触的腺苷主要来源于星形胶质细胞囊泡释放的 ATP,其次才是

来源于细胞外的 ATP 分解代谢,因而在星形胶质细胞缺陷的成年转基因小鼠中发现突触的 ATP 及腺苷水平明显下降^[4]。研究发现,在成年小鼠大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion,MCAO)后 3h 内就下调了星形胶质细胞 ADK 的水平,导致了细胞外腺苷浓度的明显上升,这可能是腺苷的急性内源性保护机制^[7]。实际上,ADK 的表达水平在调节神经元对抗脑损伤中起着重要作用,ADK 过度表达的成年转基因小鼠增加了 MCAO 诱导的海马神经元死亡^[8]。而在 MCAO 造模前 1 周的成年小鼠纹状体种植 ADK 缺陷的神经或胶质祖细胞,发现小鼠脑梗死体积明显减少^[9]。这些研究表明由脑缺血诱导的细胞死亡与细胞外腺苷的水平密切相关,ADK 是中枢神经系统内腺苷的上游调节因子,因此如何调节 ADK 是治疗脑缺血的新策略。

二、A_{2A} 腺苷受体在脑缺血中的作用

1. A_{2A} 腺苷受体的分布:成年小鼠中枢神经系统的 A_{2A}R 在纹状体中高表达,在海马、皮质等处亦发现了 A_{2A}R 的低水平表达,阻断 A_{2A}R 有神经保护作用,而且还能抑制成年小鼠海马神经元凋亡^[10-14]。

2. A_{2A} 腺苷受体与 MAPK 信号通路:有研究表明,成年 Wistar 大鼠脑缺血 24h 后,通过 A_{2A}R 能够激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,P38MAPK)和 c-jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase,JNK)的活性,进而介导神经元的死亡。在脑缺血中,A_{2A}R 拮抗剂通过阻断神经细胞的 A_{2A}R 发挥重要的神经保护作用,在成年 Wistar 大鼠 MCAO 后 24h 后发现,选择性 A_{2A}R 拮抗剂 {7-(2-Phenylethyl)-5-amino-2-(2-furyl)-pyrazolo-[4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]-pyrimidine,SCH 58261} 能够通过限制小胶质细胞活性来抑制 P38MAPK 的激活^[15],而通过限制神经元和少突胶质细胞的活性,抑制了 JNK 的磷酸化,减少了前炎症因子释放,上调了抗炎因子的表达,减少了脑梗死的体积,发挥了保护脑组织的作用。研究发现在 MCAO 后的 5min、6h、20h 给予 SCH 58261,改善了大鼠急性神经行为学障碍,如旋转;还发现 SCH 58261 在 MA-

基金项目:2010 年浙江省科技厅钱江人才项目(2009R10024)

作者单位:325027 温州医学院附属第二医院暨育英儿童医院康复中心

通讯作者:陈翔,博士,教授,硕士研究生导师,主任医师,电子邮箱:chen1962xiang@sina.com

CO 中具有剂量依赖性,小剂量(0.01mg/kg)有明显的保护作用。Melani 等^[15,16]研究发现 $A_{2A}R$ 拮抗剂的神经保护作用可能涉及了转录和翻译后的蛋白水平调节机制。而 $A_{2A}R$ 拮抗剂 {4 - (2 - [7 - Amino - 2 - (2 - furyl) (1,2,4) Triazolo (2,3 - a) - (1,3,5) Triazin - 5 - yl amino] ethyl) phenol, ZM 241385} 通过减少成年 Wistar 大鼠脑缺血后星形胶质细胞激活,上调神经元的存活,进而起到保护脑组织的作用^[17]。Yu 等^[18]研究表明,在前脑 $A_{2A}R$ 基因表达失活的成年小鼠移植入野生型小鼠的骨髓源性细胞 (bone marrow - derived cells, BMDCs),不能对抗缺血性脑损伤;而在野生型成年小鼠移植入 $A_{2A}R$ 不表达的 BMDCs,却能够减少脑梗死体积和前炎症因子的释放。

三、 $A_{2A}R$ 腺苷受体在脑缺血后的病理生理

抑制 $A_{2A}R$ 表达的神经保护作用有共同的病理生理过程,即脑缺血后抑制谷氨酸兴奋性毒性和神经炎症反应。

1. 抑制兴奋性氨基酸的释放:实验证实,无论是对神经元还是胶质细胞,成年小鼠中激活 $A_{2A}R$ 都可增加兴奋性氨基酸的释放,促进钙离子内流及钙超载,引起神经细胞损害^[19]。无论是在正常生理状态下还是在脑缺血的情况下,SD 成年大鼠中腺苷通过激活 $A_{2A}R$ 促进谷氨酸释放的机制都与神经元或胶质细胞有关^[20]。在大鼠 MCAO 模型中,Trincavelli 等^[21]发现,成年 Wistar 大鼠脑缺血后皮质和纹状体小胶质细胞上的 $A_{2A}R$ 的表达上调。Melani 等^[15]研究表明 $A_{2A}R$ 拮抗剂 SCH 58261 是在成年大鼠局灶性脑缺血最初的几个小时减少兴奋性氨基酸谷氨酸的释放而减轻脑缺血损伤。在病理条件下,阻断 $A_{2A}R$ 的表达也会影响谷氨酸的释放,Corsi 等^[22]实验发现,在用 6 - 羟多巴胺处理 SD 成年大鼠帕金森疾病 (parkinson's disease, PD) 模型上,纹状体的谷氨酸释放增加,而应用 SCH 58261 处理后,减少了谷氨酸的释放。减少谷氨酸的释放或是降低谷氨酸受体的敏感性起着重要的神经保护作用,但增加谷氨酸的释放会导致运动障碍,这可能与破坏纹状体突触兴奋性的传递有关。Pepponi 等^[23]在大鼠孕 17 ~ 18 天龄取出神经元进行细胞培养,发现 ZM 241385 能够阻止纹状体谷氨酸摄取抑制剂导致的谷氨酸水平上升,提示神经元在 $A_{2A}R$ 拮抗剂减轻兴奋性毒性的作用中起重要作用。Li 等^[24]研究表明, $A_{2A}R$ 基因敲除的成年小鼠在 MCAO 后,谷氨酸的释放明显低于野生组,该研究还发现 $A_{2A}R$ 基因敲除小鼠的脑梗死体积比野生

组小鼠脑梗死体积要小,同时神经功能缺损也有所改善, $A_{2A}R$ 基因敲除在缺血性脑损伤中的保护作用在于抑制了谷氨酸的神经毒性。

2. $A_{2A}R$ 腺苷受体与小胶质细胞:Trincavelli 等^[21]研究表明成年 Wistar 大鼠脑缺血后 24h,双标免疫组化法发现神经元和胶质细胞的 $A_{2A}R$ 过度表达。作为脑损伤的早期敏感的反应措施,成年小鼠中反应性小胶质细胞在脑内的分布发生改变,并且分泌一些前炎症介质如自由基、细胞因子、前列腺素、进而促发神经炎症反应^[25]。静止小胶质细胞的 $A_{2A}R$ 低表达,但炎症的刺激会诱导 $A_{2A}R$ 的高表达,而大脑中 $A_{2A}R$ 的活化则可以促进小胶质细胞的增殖活化,进而释放大量的炎性递质,如增加一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的合成,而 $A_{2A}R$ 拮抗剂 ZM - 241385 却能够抑制成年小鼠 NOS 的合成。药理学实验证明,成年小鼠中 cAMP 的聚集水平在很大程度上影响着胶质细胞上 $A_{2A}R$ 的表达和功能。

$A_{2A}R$ 活化后对中枢免疫炎症反应的调节呈现矛盾现象。既有研究表明,激活 $A_{2A}R$ 可以通过抑制免疫炎症反应,发挥与外周组织损伤类似的保护效应;而在中枢损伤中,成年小鼠 $A_{2A}R$ 的活化则可以促进小胶质细胞的增殖活化,进而释放大量的炎性递质,产生的是促炎作用。各种脑损伤后,外周的免疫细胞经过血脑屏障迁移至损伤的脑组织,研究发现骨髓源性细胞表面的 $A_{2A}R$ 是缺血性脑损伤的关键因素,将这些细胞的 $A_{2A}R$ 选择性去活化,能够对抗 MCAO 引起的缺血性脑损伤,这种保护效应伴随脑组织内巨噬细胞源性致炎介质 (如 IL - 1、IL - 6 和 IL - 12) 的释放减少以及抗炎因子 IL - 10 表达的增加,从而使脑梗死范围显著减小,提示缺血性脑损伤后 $A_{2A}R$ 活化具有致炎效应^[18]。TNF - α 和 IL - 1 β 能够通过 NF - κ B 信号通路促进 $A_{2A}R$ 基因的表达,成年雌性 Wistar 大鼠脑外伤后在大脑海马区 IL - 1 β 能够增加细胞外腺苷和 ATP 的浓度,加重了腺苷 - $A_{2A}R$ 所致的炎症反应,从而加重了脑损伤。

四、新生鼠脑缺血后腺苷受体的变化

对新生大鼠纹状体上 G 蛋白偶联的 $A_{2A}R$ 进行研究,发现 CGS 21680 的结合位点从出生后到成年逐渐增多,此结合位点越少, $A_{2A}R$ 的亲合力越高。出生时 CGS 21680 的结合位点是成年鼠的 3%,5 天龄是成年鼠的 15.5%,15 天龄是成年鼠的 1/3,25 天龄是成年鼠的 75%,所以新生大鼠 $A_{2A}R$ 的亲合力明显高于成年鼠,推测早期的 $A_{2A}R$ 在脑纹状体发育过程中

起重要作用。许多研究表明,脑缺血后腺苷受体下调,Aden 等对 7 天龄大鼠进行单侧颈总动脉结扎,采用定量原位杂交和受体放射自显影观察脑缺血后短时间内腺苷受体含量的变化,结果显示,脑缺血缺氧后 0h、1h 和 2h,皮质及海马的 A_1 受体 mRNA 表达减少, A_1 受体对选择性拮抗剂结合力降低,结扎侧大脑半球 A_2 受体 mRNA 表达也减少。Bona 等对 7 天龄大鼠进行脑缺氧缺血后,给予非选择性腺苷受体拮抗剂茶碱, A_1 腺苷受体拮抗剂 (1,3 - dipropyl - 8 - cyclopentylxanthine, DPCPX), A_2 腺苷受体拮抗剂 SCH 58261, 14 天后发现茶碱和 SCH 58261 有保护缺氧缺血性脑损伤的作用。腺苷作为一种内源性神经保护剂,在 7 天龄新生小鼠脑缺氧缺血后,与野生型小鼠相比较, A_{2A} R 敲除的小鼠加重了脑损伤和远期行为学障碍,说明 A_{2A} R 在新生小鼠脑缺氧缺血过程中起保护作用。下一步我们要做的是研究 A_{2A} R 敲除对新生小鼠缺氧缺血性脑损伤后神经细胞的影响以及作用机制。

综上所述,内源性腺苷通过 A_{2A} R 发挥自稳态调节作用及神经调质作用而起到保护缺血性脑组织的作用,而且 ADK 的表达水平在调节神经元对抗脑损伤中起着重要作用。 A_{2A} R 拮抗剂第 1 步可能通过阻止 c AMP 的聚集来抑制小胶质细胞的活性,第 2 步通过限制胶质细胞和神经元的活性来抑制 P38MAPK、JNK 的激活从而阻止缺氧缺血的兴奋性级联反应。 A_{2A} R 拮抗剂和 A_{2A} R 基因敲除能够减轻脑缺血损伤,与兴奋性氨基酸的释放、小胶质细胞活性、炎症因子以及 MAPK 密切相关。但 A_{2A} R 在新生鼠中的作用机制还不明确,是我们下一步的研究方向。腺苷 - A_{2A} R 抗炎轴能被用作治疗缺血性和炎症性组织损伤的内源性手段,有望应用于临床;因此,如何控制炎症反应和 A_{2A} R 的表达是缺氧缺血性脑损伤新的治疗方向。研发 A_{2A} R 的合适配体将成为开发炎症、脑缺血损伤治疗药物的新突破点。

参考文献

- Chen JF, Pedata F. Modulation of ischemic brain injury and neuroinflammation by adenosine A_2A Receptors [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(15):1490 - 1499
- Jacobson KA, Gao ZG. Adenosine receptors as therapeutic targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5(3):247 - 264
- Abbracchio MP, Burnstock G, Verkhratsky A, et al. Purinergic signalling in the nervous system: an overview [J]. *Trends Neurosci*, 2009, 32(1):19 - 29
- Pascual O, Casper KB, Kubera C, et al. Astrocytic purinergic signalling coordinates synaptic networks[J]. *Science*, 2005, 310(5745):113 - 116
- Fredholm BB, Chen JF, Cunha RA, et al. Adenosine and brain function[J]. *Int Rev Neurobiol*, 2005, 63(1):191 - 270
- Parkinson FE, Xiong W, Zamzow CR. Astrocytes and neurons: different roles in regulating adenosine levels[J]. *Neurol Res*, 2005, 27(2):153 - 160
- Pignatario G, Maysami S, Studer FE, et al. Downregulation of hippocampal adenosine kinase after focal ischemia as potential endogenous neuroprotective mechanism[J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(1):17 - 23
- Pignatario G, Simon RP, Boison D. Transgenic overexpression of adenosine kinase aggravates cell death in ischemia [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(1):1 - 5
- Pignatario G, Studer FE, Wilz A, et al. Neuroprotection in ischemic mouse brain induced by stem cell - derived brain implants [J]. *Cereb Blood Flow Metab*, 2007, 27(5):919 - 927
- Yin HH, Knowlton BJ. The role of the basal ganglia in habit formation [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2006, 7(6):464 - 476
- Marcoli M, Raiteri L, Bonfanti A, et al. Sensitivity to selective adenosine A_1 and A_2A receptor antagonists of the release of glutamate induced by ischemia in rat cerebrocortical slices[J]. *Neuropharmacology*, 2003, 45(2):201 - 210
- Zhou AM, Li WB, Li QJ, et al. A short cerebral ischemic preconditioning up - regulates adenosine receptors in the hippocampal CA1 region of rats[J]. *Neurosci Res*, 2004, 48 (4) : 397 - 404
- Cunha RA. Neuroprotection by adenosine in the brain: from A_1 receptor activation to A_2A receptor blockade [J]. *Purinergic Signal*, 2005, 1(2):111 - 134
- Silva CG, Porciuncula LO, Canas PM, et al. Blockade of adenosine $A(2A)$ receptors prevents staurosporine - induced apoptosis of rat hippocampal neurons[J]. *Neurobiol Dis*, 2007, 27(2):182 - 189
- Melani A, Gianfriddo M, Vannucchi MG, et al. Giovannini MG., Pedata F. The selective $A(2A)$ receptor antagonist SCH 58261 protects from neurological de? cit, brain damage and activation of p38 MAPK in rat focal cerebral ischemia [J]. *Brain Res*, 2006, 1073 - 1074:470 - 480
- Melani A, Cipriani S, Vannucchi MG, et al. Selective adenosine A_2A receptor antagonism reduces JNK activation in oligodendrocytes after cerebral ischaemia[J]. *Brain*, 2009, 132(6):1480 - 1495
- Pugliese AM, Traini C, Cipriani S, et al. The adenosine A_2A receptor antagonist ZM241385 enhances neuronal survival after oxygen - glucose deprivation in rat CA1 hippocampal slices[J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 157(5):818 - 830
- Yu L, Huang Z, Mariani J, et al. Selective inactivation or reconstitution of adenosine A_2A receptors in bone marrow cells reveals their significant contribution to the development of ischemic brain injury[J]. *Nat Med*, 2004, 10(10):1081 - 1087
- Yu L, Haverly PM, Mariani J, et al. Genetic and pharmacological inactivation of adenosine A_2A receptor reveals an Egr - 2 - mediated transcriptional regulatory network in the mouse striatum[J]. *Physiol Genomics*, 2005, 23(1):89 - 102

(转第 9 页)