

节方式基本清楚,但其在不同的细胞事件如何发挥功能,成骨细胞与 ECM 的相互作用中非 MAPK 转导途径怎样,MAPK 的几条信号途径交叉性如何,特定胞外信号与成骨细胞标志物的对应关系怎样等均未阐明,尚需进一步研究证实。

### 参 考 文 献

- 1 Aplin AE *et al* *Pharmacol Rev*, 1998; 50: 197
- 2 Tang K *et al* *Mol Pharmacol*, 1998; 54: 59
- 3 King WG *et al* *Mol Cell Biol*, 1997; 17: 4406
- 4 Ellington JK *et al* *Infect Immun*, 2001; 69(9): 5235
- 5 Lai CF *et al* *J Biol Chem*, 2001; 276(17): 14443
- 6 Cook SJ *et al* *Mol Cell Biol*, 1999; 19: 330
- 7 Oyama M *et al* *Histol Histopathol*, 1998; 13: 671
- 8 Jochum W *et al* *Nat Med*, 2000; 6: 980
- 9 Sabatakos G *et al* *Nat Med*, 2000; 6: 985
- 10 Xiao G *et al* *J Biol Chem*, 1998; 273(49): 32988
- 11 Ducy P *et al* *Cell*, 1997; 89(5): 747
- 12 Harada H *et al* *J Biol Chem*, 1999; 274(11): 6972
- 13 Xiao G *et al* *J Biol Chem*, 2000; 275(6): 4453
- 14 Suzuki A *et al* *Bone*, 2002; 30(1): 91
- 15 Miyuki S *et al* *Endocrinology*, 1999; 140(5): 2125
- 16 Gallea S *et al* *Bone*, 2001; 28(5): 491
- 17 Lai CF *et al* *J Biol Chem*, 2002; 277: 15514
- 18 Hatakeyama D *et al* *Biochim Biophys Acta*, 2002; 1589(1): 15
- 19 Carpio L *et al* *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2001; 281(3): E489
- 20 Swarthout J *et al* *J Biol Chem*, 2001; 276: 7586
- 21 Miao D *et al* *J Biol Chem*, 2001; 276(34): 32204
- 22 Hulley PA *et al* *Endocrinology*, 1998; 139(5): 2423
- 23 Schwartz Z *et al* *J Biomed Mater Res*, 2001; 56(3): 417
- 24 Peverali FA *et al* *Mol Med*, 2001; 7(1): 68
- 25 Kletsas D *et al* *J Cell Physiol*, 2002; 190(3): 313

(2002-04-26 收稿)

## 神经退行性疾病神经细胞死亡机理

王建枝 刘世杰

华中科技大学同济医学院病理生理学系 (武汉, 430030)

**摘要** 神经退行性疾病患者的神经细胞籍退化而死,虽然至今对神经细胞退化尚无明确的定义和检测指标,但根据现有研究资料,可知神经细胞退化的形态、生化改变,发生的时间窗和参与的调节系统等均与细胞凋亡有显著差异。这种细胞死亡可能与细胞凋亡分享相同的部分上游细胞信号转导系统,但决不等于经典的细胞凋亡。本文将这种神经细胞退行性变暂定为“非凋亡性程序化细胞死亡”,并对与这一细胞死亡有关的资料进行综述。

**关键词** 神经退行性疾病; 神经细胞退化; 细胞凋亡; 非凋亡性程序化细胞死亡

神经退行性疾病是一类严重影响人类健康的常见病,虽然象肌萎缩性侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等极少数病种的病程进展较快 (2~3 年),绝大多数神经退行性疾病的发病缓慢,如阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD)、帕金森氏病 (Parkinson disease, PD)、亨廷顿病 (Huntington disease, HD) 等的病程可长达 20 年或更长。因此,阐明神经退行性疾病中神经细胞死亡的机制,对早期诊断、预防或阻断疾病进程以及开发有效治疗药物具有重要意义。然而,对神经退行性疾病中神经细胞死亡的机制至今仍知之甚少。大量研究资料表明:这类疾病的共同病理特征是细胞内特定蛋白质的异常聚积,这些有特征性病理改变的神经元的细胞体并没有明显减少,而细胞的突起部分却明显

变短或消亡。这种处于病态的神经元可长期存活,逐步丧失其生物功能,用目前经典的细胞死亡理论,即坏死或凋亡,不能解释在神经退行性疾病中这种极其缓慢的神经元丢失和大量具特征性病理改变的细胞胞体不消失的现象。然而,这种细胞死亡方式可能与细胞凋亡一样具有内在的规律和程序,是一种非凋亡性程序化细胞死亡。

### 1 神经退行性疾病的脑病理特征

神经退行性疾病共同的脑病理特征是特定细胞群的进行性丢失,同时,不同类型的神经退行性疾病各具其特征性的脑病理改变。如 AD 患者表现为皮质神经元的丢失,同时伴有大量细胞内异常过度磷酸化 tau 蛋白聚积并以双螺旋丝形式形成的神经原

纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)和大量细胞外  $\beta$  淀粉样肽(amyloid  $\beta$  peptide, A $\beta$ ) 沉积形成的老年斑。PD 表现为黑质多巴胺能神经元的丢失, 以及细胞内以纤维状  $\alpha$ -synuclein 和过度磷酸化神经细丝所形成的 Lewy 小体。HD 的神经细胞核包涵体含有变异的亨廷顿蛋白和泛素。肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 表现为丝球样泛素包涵体。还有一些神经退行性疾病, 如多系统萎缩病(multiple system atrophy, MSA), 进行性核上瘫(progressive supranuclear palsy, PSP), 皮质基底退化(corticobasal degeneration, CBD), 某些罕见的锥体外系病(rare extrapyramidal disorders), 多系统神经退行性疾病(multisystemic neuronal degeneration) 等, 则表现为神经胶质细胞浆包涵体(glial cytoplasmic inclusions, GCI), 这些包涵体中含有  $\alpha$ -synuclein 和不同于 AD 患者的 tau 蛋白(基因突变的 tau 蛋白)<sup>[1]</sup>。

## 2 神经退行性疾病神经细胞死亡与细胞凋亡的关系

关于细胞凋亡在神经退行性疾病的细胞死亡中所占分量的有关报道相互矛盾。虽然有研究资料表明, 在 AD 和其他神经退行性疾病中可检测到细胞凋亡样特征性改变, 然而, 越来越多的证据表明, 细胞凋亡不是神经退行性疾病患者神经细胞死亡的主要方式, 可能有其他机制介导神经退行性疾病中神经元的死亡。

在 AD 患者, 支持凋亡参与 AD 发病的证据主要来自对体外培养细胞和转基因动物的研究。根据转突变的淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP) 基因的细胞 A $\beta$  水平升高, DNA 片段化增多, 以及在原代神经元<sup>[2]</sup> 或细胞株<sup>[3]</sup> 培养基中加入 A $\beta$  可导致细胞凋亡; 在诱导 SY5Y 神经瘤细胞凋亡过程中观察到 tau 蛋白过度磷酸化; caspase-12 (内质网应激凋亡蛋白水解酶) 敲除小鼠可对抗过量 A $\beta$  引起的细胞凋亡等资料, 研究者提出细胞凋亡与 A $\beta$  沉积和 tau 蛋白过度磷酸化有关<sup>[4]</sup>。此外, 还有人报道 AD 患者脑中 TUNEL 阳性细胞数和激活的 caspase-3 高于年龄匹配对照组<sup>[5]</sup>。但是, 从另一方面的研究资料却显示, A $\beta$  沉积和 tau 蛋白过度磷酸化非但不引起细胞凋亡, 可能还有对抗凋亡的作用。其主要依据为: 在原代神经元或细胞株培养基中加入 A $\beta$  不引起细胞凋亡<sup>[6]</sup>; 亚毒性剂量的 A $\beta$  增加抗凋亡蛋白 Bcl-XL 的表达, 对抗氧自由基对神经元的损伤<sup>[7]</sup>; 在 SY5Y 细胞中抑制细胞凋亡可导致 tau

蛋白的持续过度磷酸化(提示过度磷酸化与细胞凋亡的非共存关系); 在大鼠大脑持续激活 GSK-3 可导致 tau 蛋白的持续磷酸化, 但同时未观察到明显的细胞凋亡<sup>[8]</sup>; 在 SY5Y 或 N2a 细胞株中采用冈田酸(okadaic acid, OA) 或 calyculin A 诱导 tau 蛋白过度磷酸化, 也未见明显细胞凋亡的产生(本室待发表资料)。更直接的证据是由国际权威病理学家对大量 AD 尸检标本的研究结果显示, AD 患者神经细胞胞体没有明显减少, 而神经元的神经纤维消失<sup>[9]</sup>。在 AD 海马中仅 0.02% ~ 0.05% 的神经元有某些凋亡的特征性改变, 如表达激活的 caspase-3<sup>[10]</sup>。含 NFT 的细胞 TUNEL 反应阴性, 不表达激活的 caspase-3, 在 NFT 形成和演变的不同阶段均未检测到细胞凋亡的特征性改变<sup>[11]</sup>。在 AD 患者, 抗凋亡蛋白表达增加, 并且有细胞周期的不完全激活, 可能有助于对抗细胞凋亡<sup>[12]</sup>。Smith 等认为 AD 患者脑中 TUNEL 阳性细胞不能说明是细胞凋亡的结果, 因为在尸体停放过程中本身就有 DNA 的降解<sup>[13, 14]</sup>。

Synuclein 病, 如 PD、DLB 和 MSA, 的共同特征是神经元和神经胶质细胞中存在含  $\alpha$ -synuclein 的包涵体, 因此, 将这类神经退行性病统称为 synuclein 病。研究发现: 在 synuclein 病患者大脑中仅 1% ~ 2% 的黑质多巴胺能神经元有 DNA 片段化, 且与正常人群没有显著差异<sup>[15]</sup>。在 PD 患者黑质多巴胺能神经元没有发现 DNA 片段化, 只有极少黑质神经元表现出细胞皱缩, 核染色质浓聚, 少量表达“促凋亡蛋白”c-Jun、API 和 Bax 等, 偶见细胞表达激活的 caspase-3。另一方面, 在这类神经退行性疾病脑中反应性星形胶质细胞和微胶质细胞发现 DNA 片段化和凋亡相关蛋白(apoptosis related protein, ARP); 在 PD 病人的黑质纹状体和 MPTP 急性损毁模型中均可见进行性神经细胞丢失和微胶质细胞包裹的黑质神经元同时存在; 而有 Lewy 小体的神经细胞却没有这些变化<sup>[16]</sup>。这一方面显示胶质细胞可能参与神经退行性疾病的发病过程, 另一方面也提示细胞内蛋白质聚积可能阻止细胞凋亡。在 DLB 也有类似的变化。与上述尸检报告相反, PD 动物模型研究结果强烈支持凋亡参与疾病的病理过程。造模剂 MPTP 通过激活 caspase-3 增加 DNA 片段化, 同时抑制 caspase-3 的下游底物多聚 ADP 核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP] 而对抗 MPTP 介导的细胞凋亡。MPTP 可增加黑质纹状体 c-Jun 和 c-Jun N-末端激酶的活力<sup>[17]</sup>。MPP<sup>+</sup> 通过特异抑制线粒体复合物 I, 导致 ATP 产生的减少, 从而增加线粒体活性氧, 损伤线粒体导致

细胞凋亡。

ALS 病的病理特征是脊髓运动神经元含有 Bunina 小体和其他不同类型的细胞内包涵体,如嗜银性、透明的(hyaline)聚积物和束状(skein-like)包涵体,这些包涵体的本质是过度磷酸化的神经细丝,提示 ALS 可能与神经细丝功能异常有关。最近有人报道:一类罕见的家族性 ALS 与  $\text{Cu}^{2+}$ - $\text{Zn}^{2+}$ -依赖性超氧化物歧化酶(SOD 1)基因突变有关,这类患者脊髓运动神经元内的包涵体呈现抗 SOD 1 抗体阳性反应。由于 SOD 1 的作用是清除自由基,有研究者提出 ALS 患者的神经元死亡可能与 SOD 活力下降有关。然而,无论在病人或转基因动物均未观察到 SOD 1 基因缺陷和运动神经元丢失之间的相关性。此外,家族遗传性仅占 ALS 发病人群中极少数,散发性 ALS 与 SOD 无关。此外, PSP 和 CDB 是两种少见的 tau 疾病,虽然这类疾病中许多表达 tau 蛋白的寡突星形胶质细胞可见凋亡反应,但仅有极少数神经元呈 TUNEL 阳性反应,表达 ARP 和激活的 caspase-3<sup>[18]</sup>。

### 3 神经退行性疾病神经细胞退化与“流产的细胞凋亡”

虽然在神经退行性疾病的动物模型和细胞模型中的确有细胞凋亡,还有研究表明 AD 和其他神经退行性疾病患者大脑的 DNA 片段化明显增多,但是典型的细胞凋亡过程只需 15 h,而这些神经退行性疾病病程漫长,因此,采用细胞凋亡来解释这些慢性疾病中极其缓慢的神经元丢失,似乎难以自圆其说。根据目前的资料,综述者认为在神经退行性疾病的某一阶段或整个病程中可能的确有细胞凋亡的启动,从而使少量神经元出现明显的凋亡样形态学改变,如 DNA 片段化和细胞核浓聚、异位,细胞浆出现异常染色颗粒等。然而,在大部分细胞中,这种启动的凋亡反应通过信号转导途径的交叉对话(cross talk),使细胞逃避凋亡而进入其他代谢过程,最近已有人在肿瘤细胞的研究中发现类似现象,并将这种“凋亡逃避”现象称为“流产凋亡”(aborted apoptosis 或 abortosis)<sup>[19]</sup>。关于神经细胞怎样逃避凋亡,逃避凋亡后进入什么样的代谢途径,后者又怎样引起神经细胞退化的机制尚不清楚。根据在神经退行性疾病的神经细胞中存在丰富的异常修饰的不溶性蛋白,如在 NFT 中异常磷酸化的 tau 蛋白,在 LB 中异常磷酸化的神经细丝等,提示“骨架蛋白异常过度磷酸化系统的启动”至少是细胞逃避凋亡途径后的代谢去向之一。

### 4 细胞骨架蛋白异常与神经退行性疾病的神经细胞退化

从目前积累的大量研究资料表明,神经退行性疾病的病理特征都有特异蛋白质在细胞浆或细胞核内的聚积,如 AD 患者是过度磷酸化的 tau 蛋白聚积在细胞浆内形成 NFT; PD 是  $\alpha$ -synuclein 的构象从正常的  $\alpha$ -螺旋变为  $\beta$ 片层,形成 Lewy 小体; ALS 病的 Bunina 小体的主要成分是过度磷酸化的神经细丝, HD 病则表现为变异亨廷顿蛋白等的细胞核内聚集。这些异常蛋白质的聚积一方面使神经细胞代谢异常影响神经元的功能,神经元的突起逐渐消失;另一方面细胞不能降解异常聚积的蛋白质,从而死亡的细胞胞体不消失。神经退行性疾病中蛋白质的异常聚积在神经细胞内形成特征性的形态学特征,其形成的机制目前并不清楚,从已有的研究资料来看,蛋白质异常聚积的原因有 3 类: 基因突变导致蛋白质一级发生改变而形成聚积,如亨廷顿蛋白基因突变导致 HD 病,  $\alpha$ -synuclein 蛋白基因突变导致家族性遗传性 PD, tau 蛋白基因突变导致家族性额颞叶痴呆(frontal-temporal dementia); 蛋白质翻译后修饰异常,导致蛋白质构象改变而形成聚积,如 ALS 病过度磷酸化的神经细丝聚积形成 Bunina 小体, AD 患者 tau 蛋白异常磷酸化和糖基化形成 NFT; 蛋白质的折叠错误,改变了蛋白质的构象而导致蛋白质的异常聚积,此时蛋白质一级结构和翻译后修饰都没有改变,如散发性 PD 患者  $\alpha$ -synuclein 没有一级结构的异常,但由于错误的折叠使正常的  $\alpha$ -螺旋转变为  $\beta$ 片层结构,从而聚集形成 Lewy 小体。关于导致蛋白异常修饰、异常折叠的机制以及蛋白异常聚积后细胞功能的改变和细胞死亡的程序的更深层的分子机制目前尚不清楚。

### 5 结语

大量研究表明,用经典的细胞死亡方式,即凋亡和坏死,不足以描述所有已观察到的细胞死亡的形态和生化特征,如胰岛素样生长因子受体诱导的 293 细胞死亡没有凋亡小体,没有细胞出芽,没有细胞核碎片,不受凋亡抑制剂影响。这种细胞死亡也有新蛋白质的合成,也受某些第二信使的调控<sup>[20]</sup>。这种“非凋亡性程序化细胞死亡”的现象在发育生物学研究领域已经引起了越来越多学者的注意,从而提出了“发育性细胞死亡”(developmental cell death)的概念。近年来随着对神经系统结构、功能和疾病研究的积累,对神经退行性疾病神经细胞死亡的机制

已有大量研究报道。归纳这些研究资料,部分学者认为神经退行性疾病中细胞籍凋亡而死,而另一些学者则认为凋亡不是神经退行性疾病中神经细胞死亡的主要方式。笔者认为:神经退行性疾病神经细胞籍退化而死,虽然至今对神经细胞退化尚无明确的定义,但**退化不等于凋亡。阐明神经细胞退化的机制不但具有重要理论意义,还将为神经退行性疾病的药物治疗提供新的靶点。**

### 参 考 文 献

- 1 Dicson DW *et al* Brain Pathol, 1999; 9: 721
- 2 Tanaka S *et al* J Neurochem, 2002; 82(2): 305
- 3 Zhang Y *et al* J Cell Biol, 2002; 156(3): 519
- 4 Nakagawa T *et al* Nature, 2000; 403(6765): 98
- 5 Rohn TT *et al* Am J Pathol, 2001; 158: 189
- 6 Bursztain S *et al* J Neurosci, 1998; 18(23): 9790
- 7 Luetjens CM *et al* Neuroscience, 2001; 102(1): 139
- 8 Liu SJ, Wang JZ Acta Pharmacol Sin, 2002; 23(2): 183
- 9 Braak H, Braak E Cerebral Cortex, Volume 14, New York: Plenum Publishers, 1999; p475~ 512
- 10 Jellinger KA, Stedemann C. J Neural Transm, 2000; 60: 365
- 11 Ghoshal N *et al* Am J Pathol, 1999; 155: 1163
- 12 Stedemann C *et al* Am J Pathol, 1999; 155: 1459
- 13 Perry G *et al* Science, 1998; 282(5392): 1268
- 14 Perry G *et al* Am J Pathol, 2001; 158(1): 1
- 15 Wülner U *et al* Acta Neuropathol, 1999; 97: 408
- 16 Jellinger KA *et al* J Neurol Transm, 2000; 107: 1
- 17 Saportio M S *et al* J Neurochem 2000; 75: 1200
- 18 Jellinger KA *et al* J Cell Mol Med, 2001; 5(1): 1
- 19 Smith MA *et al*, Brain Pathol, 2000; 10: 797
- 20 Sperandio S *et al*, Proc Natl Acad Sci U SA, 2000; 97(26): 14376

(2002-11-30 收稿)

## DFF 和 CDE 介导细胞凋亡的分子机制

刘斌剑综述 王建民 陈 林审阅

第三军医大学野战外科研究所大坪医院创伤中心实验室 临床分子遗传学研究室 (重庆, 400042)

**摘要** DNA 裂解因子(DFF)是由分子量分别为 45 kD 和 40 kD 两个亚单位组成的异源二聚体。在细胞凋亡信号启动的 caspase 级联活化过程中作为下游 caspase 的底物被活化并形成脱氧核糖核酸酶(DNase),从而介导并调节DNA 断裂和染色质凝聚。DFF 作为细胞凋亡信号传递的主要途径在细胞凋亡中起着关键作用。诱导细胞死亡的 DFF45 样效应因子(CDE)是与 DFF 同源的诱导凋亡因子,CDE 与 DFF 在结构、功能和作用上有很大的相似性,可发挥诱导凋亡的作用。本文阐述了 DFF 和 CDE 在诱导细胞凋亡过程中担当的角色和它们相互作用的机制,从而揭示 DFF 和 CDE 在细胞凋亡过程中作为传递凋亡信号——caspase 级联反应的下游因子在诱导凋亡时所处的关键地位和重要功能。

**关键词** 细胞凋亡; caspase; DNA 裂解因子; DFF45 样效应因子

细胞程序化死亡即细胞凋亡是细胞自我毁灭的生理过程。作为参与细胞凋亡的重要成员——caspase 超家族在细胞的发育、内环境的维持和细胞组织的宿主防御等生理和病理过程中扮演重要的角色<sup>[1,2]</sup>。哺乳动物细胞中激活 caspase 的信号途径主要有两条:一是线粒体/细胞色素-C (cytochrome C, Cyt-C)途径<sup>[7]</sup>,另一是死亡受体 (death receptors, DR)途径<sup>[2]</sup>。这两条途径都引起 caspase 级联激活,最终产生具有蛋白水解酶活性的 caspase-3/6/7<sup>[3~5]</sup>。DNA 裂解因子(DNA fragmentation factor, DFF)广泛存在于各种细胞之中,在正常情况下由分子量分别为 45 kD (即 DFF45)和 40 kD (即 DFF40)

两个亚单位伴随结合在一起。caspase-3 可裂解 DFF45,释放出 DFF40,并使 DFF40 形成 DNA 酶 (DNase),该酶可引起 DNA 裂解和染色质凝聚,进而产生凋亡小体,引起细胞凋亡<sup>[3]</sup>。诱导细胞死亡的 DFF45 样效应因子 (cell death-inducing DFF45-like effector, CDE)是与 DFF45 同源的细胞死亡效应因子。它包括 CDE-A 和 CDE-B 两个亚类。CDE-B 可结合 DFF45 和 DFF40,调节 DFF40 活化为 DNase;而 CDE-A 可单独引起 DNA 断裂的发生<sup>[6]</sup>。本文就目前关于 DFF 和 CDE 亚单位的分子结构及它们之间的相互作用;DFF 和 CDE 参与 DNA 裂解和染色质凝聚的机制等几个方面的研究

