

PI3K/Akt 信号通路在脑缺血神经元凋亡中作用的研究进展

许艺超 综述 石松生 审校

福建医科大学附属协和医院神经外科/福建省神经外科研究所,福建省福州市 350001

摘要:脑缺血发生早期的神经元凋亡与 PI3K/Akt 信号通路密切相关,通过多种途径干预此信号通路可调控神经元的凋亡,为脑缺血的治疗研究提供靶点,本文就其可能的调控神经元凋亡机制作一综述。

关键词:丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶;PI3K/Akt 信号通路;细胞凋亡;脑缺血

脑缺血是一个常见的病症,它可发生在心搏骤停、脑卒中、蛛网膜下腔出血以及伴发于外伤性脑损伤,缺血发生后几个小时内,缺血半暗带区或梗死区周围的神经元死亡主要以凋亡为主,因此脑缺血后神经元凋亡机制以及基于细胞凋亡为靶点的抗脑缺血研究成为研究的热点。研究发现,磷脂酰肌醇-3 激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3K)/丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase, Akt)信号通路是重要的细胞存活信号通路,与脑缺血过程中的细胞凋亡密切相关,多种神经营养因子、缺血预处理和缺血后处理及中药通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制细胞凋亡,发挥神经保护作用。

1 缺血性脑损伤

急性脑缺血发生后,缺血半暗带区(ischemic penumbra)由于存在侧支循环,一般认为,如果在治疗时间窗内恢复缺血半暗带的血流,该区的脑组织损伤是可逆的,主要发生细胞凋亡^[1]。细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,人们有可能通过干预死亡程序挽救缺血半暗带区的神经细胞,因此,了解缺血性脑损伤导致神经元凋亡的机制显得非常重要。

研究认为,缺血性脑损伤可能通过能量代谢障碍、自由基损伤和细胞内钙超载等机制单独启动或联合作用导致神经细胞凋亡:①能量代谢障碍:缺血时线粒体出现能量代谢障碍,继而导致线粒体跨膜电位消失、通透性转换孔(MPTP)开放并导致线粒体膜通透性增大,细胞色素 C(CytC)伴随内膜蛋白等释入胞质,从而激活 caspase 级联反应,诱导细胞凋亡^[2];相关研究表明,缺血后处理可减少 CytC

从线粒体释放至细胞浆,从而抑制 CytC 诱导的凋亡级联反应^[3]。②自由基损伤:缺血时 O_2^- 、 $HO\cdot$ 等自由基生成增多,可通过影响凋亡相关基因如 c-jun, c-fos 等表达而影响凋亡进程;此外,自由基还可启动 caspase 级联激活,触发细胞凋亡^[4]。③细胞内钙超载:缺血时 ATP 生成不足, Ca^{2+} 内流增加,激活 Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶,引起 DNA 片段化,同时还可激活多种凋亡相关激酶,并促进氧自由基生成,诱导细胞凋亡。④Bcl-2 家族相关蛋白: Bcl 家族成员在脑缺血的早期和晚期均表达上调^[5];Bcl-2 家族主要是控制线粒体外膜的通透性从而促进或抑制凋亡^[6]。⑤Caspase-3:脑缺血半暗带区细胞通过内源性、外源性细胞凋亡途径以及内质网应激途径活化 caspase-3,诱导细胞凋亡^[7];研究表明,激活的 caspase-3 可切割 PARP-1,抑制受损的 DNA 修复,从而诱导脑缺血时神经元细胞凋亡^[8];另外,过度活化的 caspase-3 同时可降解 Akt,消除了 Akt 的抑制凋亡作用,导致细胞凋亡增多^[9]。

2 PI3K/Akt 信号通路与细胞凋亡

2.1 PI3K/Akt 信号通路

PI3K 能特异性催化磷脂酰肌醇 3-位羟基磷酸化,产生具有第二信使作用的肌醇脂物质,使 Akt 从胞质转移至胞膜,并在 PI(3, 4, 5)P3 依赖性蛋白激酶 1(PDK1)的辅助下,使 Akt 蛋白上的苏氨酸(Thr³⁰⁸)位点磷酸化,然后在 PDK2 的作用下, Akt 蛋白上的丝氨酸(Ser⁴⁷³)位点发生磷酸化,此时 Akt 即成为有活性的激酶^[10]。在特定条件下,PI3K 抑制剂能有效地抑制 Akt 上的 Thr³⁰⁸ 和 Ser⁴⁷³ 位点磷

收稿日期:2012-09-11;修回日期:2012-11-26

作者简介:许艺超,男,在读硕士研究生,主要从事脑血管病的研究。

通讯作者:石松生,男,博士,硕士研究生导师,科主任,主要从事脑肿瘤及脑血管病的基础及临床研究。

酸化^[11]。活化的 Akt 通过磷酸化作用激活或抑制下游靶蛋白,进而调节细胞的凋亡、增殖、分化、迁移等过程。

2.2 Akt 与细胞凋亡

PI3K/Akt 信号通路对细胞的存活具有重要作用,其中发挥作用的是 Akt。PI3K 激活的 Akt 可以通过磷酸化 Bad、Caspase-9、Forkhead、NF- κ B 等抑制细胞凋亡,因此,Akt 是重要的抗凋亡调节因子。

2.2.1 Akt 激活 I κ B 激酶 (IKK α),导致 NF- κ B 的抑制剂 I κ B 降解,从而使 NF- κ B 从细胞质中释放出来进行核转位,激活其靶基因而促进细胞的存活。

2.2.2 Akt 磷酸化 Bcl-2 家族成员 Bad,使其与 14-3-3 结合,从而阻止 Bad 与 Bcl-X_L 结合起始的凋亡。

2.2.3 Akt 能抑制蛋白水解酶 caspase-9 的活性而阻止凋亡级联反应的激活。

2.2.4 肿瘤抑制因子 p53 为转录因子,能调控凋亡、DNA 修复和细胞周期的停滞;Akt 能通过磷酸化 p53 结合蛋白 Mdm2 影响 p53 的活性,磷酸化的 Mdm2 转位到细胞核与 p53 结合,通过增加 P53 蛋白的降解而促进细胞存活^[12]。

3 缺血性脑损伤与 PI3K/Akt 信号转导通路

3.1 PI3K/Akt 信号通路与脑缺血损伤的关系

近年相关研究表明,PI3K/Akt 信号通路与脑缺血损伤有关。1999 年 Kitagawa 等^[13]首次在大鼠中动脉闭塞后缺血灶周边区的神经元内检测到磷酸化的 Akt,而缺血灶中心区仅有轻微表达,表明 PI3K/Akt 信号通路参与脑缺血的病理过程,且与脑缺血损伤程度有关。脑缺血可分为弥漫性脑缺血和局灶性脑缺血,弥漫性脑缺血可反映神经元对缺血易感性的内在差异。Jover-Mengual 等^[14]研究雌激素对全脑缺血后大鼠神经元保护作用时发现,全脑缺血后立即注射外源性雌激素,可以通过激活 PI3K/Akt 通路磷酸化下游 GSK-3 β 和 FOXO3A 分子,抑制 caspase-3 活性而发挥抗凋亡作用,保护缺血敏感区海马 CA1 区神经元不受损害。

局灶性脑缺血亦很常见,Ishrat 等^[15]研究大鼠在大脑中动脉阻塞后分别先后腹腔和皮下注射黄体酮后发现,与对照组相比,治疗组 Akt 磷酸化水平明显升高,血管内皮生长因子 (VEGF) 在早期表达减小、晚期增加,脑源性神经生长因子 (BDGF) 表达增加,结果表明治疗组脑缺血面积明显缩小,

水肿减轻,细胞凋亡减少,提示黄体酮可激活 PI3K/Akt 信号通路影响 VEGF 和 BDGF 的表达,在缺血性脑卒中起神经保护作用。选择性的 PI3K 抑制剂 wortmannin 可以中和黄体酮引起的神经保护作用,降低缺血半暗带区 Akt 磷酸化水平,促凋亡发生。Shehadah 等^[16]研究烟酸对脑缺血的神经保护作用,发现应用烟酸组 TNF- α 、VEGF、p-PI3K、p-Akt 等各指标均有升高,并且神经元凋亡减少,而抑制 Akt 磷酸化可阻断烟酸的神经保护作用,表明烟酸通过 PI3K/Akt 通路作用于 VEGF 可减少神经元凋亡,从而对海马神经元起神经保护作用。

Humanin (HN) 是一种抗凋亡肽,可通过 PI3K/Akt 信号通路,介导下游的 Akt 磷酸化,从而减少局灶性脑缺血导致的凋亡性神经元坏死以及脑梗死体积,最终起神经保护作用。Xu 等^[17]对鼠皮质神经元给予氧糖剥夺 (OGD),结果表明甘氨酸 14-HN (HNG) 可使 Akt 迅速磷酸化,增加神经元存活。动物实验提示,在大脑中动脉阻塞前脑室内注射 HNG,HNG 治疗组 p-Akt 水平明显升高,脑梗死体积明显减少。HNG 体内外神经保护作用可被 wortmannin 和 Akti-1/2 抑制,提示 HNG 通过激活 PI3K/Akt 信号通路在脑缺血/再灌注损伤过程中起神经保护作用。

3.2 缺血预处理及缺血后处理在脑缺血时抗凋亡的机制

1990 年,Kitagawa 等^[18]在沙鼠脑缺血模型中首次发现亚致死性短暂性脑缺血能诱导耐受,从而减少致死性脑缺血诱导的迟发性神经元死亡,提出了脑缺血预处理 (IPeC) 的概念。近年来,体内外研究结果普遍认为,缺血预处理可能通过 PI3K/Akt 信号通路减轻缺血性脑损伤诱导的细胞凋亡。Mohammad 等^[19]建立体外 SD 大鼠皮质神经元缺血预处理模型,给予亚致死量 OGD 预处理组细胞存活数较对照组升高,Akt、Bad、GSK-3 β 磷酸化水平亦较对照组明显升高,而应用 PI3K 抑制剂 wortmannin 可阻断 Akt 的活化,并且阻断 Akt 下游的 Bad、GSK-3 β 磷酸化,提示缺血预处理具有抗凋亡效应。

此外,缺血后再灌注前,采用反复、短暂的再灌注处理,称为缺血后处理 (IPostC),IPostC 和 IPeC 具有类似的减轻缺血-再灌注损伤作用,但是其作用机制、缺血和再灌注处理时间和节奏等还有待进一步研究^[20]。Prasad 等^[21]研究缺血预处理和缺血后处理介导 PI3K/Akt 信号通路激活后抗凋亡基因

的表达情况。大鼠皮质神经元在致死性 OGD 处理前,分别施与 15 min、30 min、45 min OGD 处理后,在复灌后 3 h 和 16 h 利用 RT-PCR 检测 PI3K/Akt 信号通路相关基因表达,结果表明,缺血预处理组再灌注后 3 h 检测提示抗凋亡途径和促存活途径的激活是起神经保护作用的主要原因,再灌注后 16 h 检测提示主要是调节凋亡途径起保护作用。促存活和抗凋亡基因 Akt、Bcl2、Birc4、Birc5、Mcl1 和 Nol3 表达均上调。而缺血后处理组在 2 h OGD 处理,施与 15 min 再灌注和 15 min OGD 处理,连续 3 个循环,然后在再灌注后的 3 h 和 16 h 利用 RT-PCR 检测 PI3K/Akt 信号通路相关基因表达,结果表明,缺血后处理组 3 h 和 6 h 的神经保护作用主要来源于促存活途径的激活,特别是再灌注后 16 h 检测提示促凋亡基因 caspase-3 的表达被抑制。

Yuan 等^[22]研究大鼠大脑中动脉阻塞后予缺血后处理,结果表明缺血后处理能明显降低 C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 的表达和抑制 caspase-12 的激活,增加 caspase-12 分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 的表达,从而减少脑梗死面积和细胞凋亡,减轻缺血再灌注损伤。当缺血后处理组注射 Akt 抑制剂 LY294002 时,缺血后处理对 CHOP、caspase-12 和 GRP7 的效应可被抵消,提示缺血后处理可通过激活 PI3K/Akt 信号通路抑制内质网应激引起的细胞凋亡。Peng 等^[23]研究大鼠全脑四血管阻塞后施与双侧股动脉的远程缺血后处理 (RIPoC),结果表明,RIPoC 组凋亡相关蛋白 Bcl-2/Bax 比例明显增大,海马 CA1 区 eNOS、pNOS、Akt 及 pAkt 的表达较对照组明显增高,导致 RIPoC 组凋亡细胞较少,再灌注后的空间学习和记忆缺陷得到明显改善;而用 N- ω -硝基-L-精氨酸预处理能明显解除 RIPoC 所起的神经保护作用,LY294002 处理后不但可以逆转 RIPoC 起的神经保护作用,而且可以抑制 eNOS 的表达上调减轻缺血性脑损伤的作用。此研究表明,RIPoC 对全脑缺血/再灌注损伤具有保护作用,这作用是通过 PI3K/Akt 信号通路介导的 eNOS 表达上调实现的。

3.3 中药治疗与脑缺血时抗凋亡的关系

传统中药因其具有的神经保护作用被广泛用于治疗脑缺血。川芎是最常用于治疗缺血性脑损伤的中药,其发挥主要抗炎作用的组分是四甲基吡嗪,其可增加血液灌流,并抑制 ADP 诱导的血小板聚集,缺血后 4 h 内使用还可减轻缺血性脑损伤,

减少梗死体积^[24]。Chern 等^[25]研究右侧大脑中动脉短暂阻塞后应用穿心莲内酯时发现,治疗组 p-Akt、Akt、NOX-2、iNOS、NF- κ B、HIF-1 α 表达降低,脑梗死的面积减小,提示穿心莲内酯可通过抑制 PI3K/Akt 依赖的 NF- κ B 和 HIF-1 α 的激活,下调 iNOS 和 NOX-2 的表达,达到清除大量的活性氧,抑制缺氧反应和促炎症反应,从而减轻脑梗死面积和神经功能缺失。

Yu 等^[26]研究发现,去甲乌药碱可通过 PI3K/Akt/Nrf-2 信号通路诱导血红素氧化酶-1 (HO-1) 表达上调,减低高迁移率族蛋白-1 (HMGB1) 表达减轻缺氧性脑损伤。体外研究表明,去甲乌药碱可在常氧和缺氧条件下激活 PI3K/Akt 信号通路,增加 Akt 的磷酸化水平,并能提高 Nrf-2 荧光素酶活性,促使下游的 Nrf-2 从胞浆转位至胞核,从而诱导 C6 细胞中 HO-1 的表达,HO-1 可明显减少体内外炎症诱导的 HMGB1 的释放以及葡萄糖氧化酶 (GOX) 诱导产生的活性氧,产生抗氧化、清除活性氧、抗炎等作用,最终抵抗缺氧性脑损伤,这种效应在缺氧环境下更明显。动物实验表明,在大鼠大脑中动脉阻塞前腹腔注射去甲乌药碱,能明显降低单胺氧化酶 (MPO) 的活性、HMGB1 的组织表达,减少脑梗死面积,降低死亡率。

4 前景与展望

PI3K/Akt 信号通路作为一种促细胞存活信号通路,在脑缺血时的神经保护作用受到越来越多的关注,以 Akt 为靶点的神经保护剂对脑缺血治疗有深远的意义。很多药物在细胞及实验动物模型上已见很好的疗效,但临床上抗脑缺血的药物却很少,疗效并不很乐观。因此,需要我们不断总结前人经验,更深入地研究、了解 PI3-K/Akt 信号通路在脑缺血时神经元凋亡的作用机制,在脑缺血发生过程中,更好地完善、利用神经细胞凋亡机制,筛选出更有效的抗脑缺血药物,为脑缺血性疾病的临床治疗提供更多的选择。

参 考 文 献

- [1] Ran L, Hui Y, Fang Y, et al. Neuroprotection targeting ischemic penumbra and beyond for the treatment of ischemic stroke. *Neurol Res*, 2012, 34: 331-337.
- [2] Hüttemanna M, Helling S, Sanderson TH. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: Cytochrome oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation. *Biochim Biophys Acta*, 2012,

1817(4): 598-609.

- [3] Wang JY, Shen J, Gao Q, et al. Ischemic postconditioning protects against global cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats. *Stroke*, 2008, 39: 983-990.
- [4] Jalil EC. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: Considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investigat Drugs*, 2009, 10(7): 644-654.
- [5] Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 34-66.
- [6] Bajwa N, Liao C, Nikolovska-Coleska Z. Inhibitors of the anti-apoptotic Bcl-2 proteins: a patent review. *Expert Opin Ther Patents*, 2012, 22(1): 37-55.
- [7] Ghavamil S, Hashemi M, Ande SR, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J Med Genet*, 2009, 46: 497-510.
- [8] Sairanen T, Szepesi R, Liisa M, et al. Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke. *Acta Neuropathol*, 2009, 118: 541-552.
- [9] Jo J, Whitcomb DJ, Olsen KM, et al. Abeta(1-42) inhibition of LTP is mediated by a signaling pathway involving caspase-3, Akt1 and GSK-3beta. *Nat Neurosci*, 2011, 14: 545-547.
- [10] Andjelkovic M, Alessi DR, Meier R, et al. Role of translocation in the activation and function of protein kinase B. *J Biol Chem*, 1997, 272: 31515-31524.
- [11] Duronio V. The life of a cell: apoptosis regulation by the PI3K/PKB pathway. *Biochem J*, 2008, 415: 333-344.
- [12] Wang H, Zhang Q, Wen Q, et al. Proline-rich Akt substrate of 40 kDa (PRAS40): A novel downstream target of PI3k/Akt signaling pathway. *Cell Signal*, 2012, 24: 17-24.
- [13] Kitagawa H, Arita H, Sasaki C, et al. Immunoreactive Akt, PI3K and ERK protein kinase expression in ischemic rat brain. *Neurosci Lett*, 1999, 274(1): 45-48.
- [14] Jover-Mengual T, Miyawaki T, Latuszeka A, et al. Acute estradiol protects CA1 neurons from ischemia-induced apoptotic cell death via the PI3K/Akt pathway. *Brain Res*, 2010, 19: 1-12.
- [15] Ishrat T, Sayeed I, Atif F, et al. Progesterone is neuroprotective against ischemic brain injury through its effects on the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B signaling pathway. *Neuroscience*, 2012, 210: 442-450.
- [16] Shehadeh A, Chen J, Zacharek A, et al. Niaspan treatment induces neuroprotection after stroke. *Neurobiol Dis*, 2010, 40(1): 277-283.
- [17] Xu X, Chua CC, Gao J, et al. Neuroprotective effect of humanin on cerebral ischemia/reperfusion injury is mediated by a PI3K/Akt pathway. *Brain Res*, 2008, 28: 12-18.
- [18] Kitagawa H, Matsumoto M, Tagaya M, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res*, 1990, 528: 21-24.
- [19] Bhuiyan MI, Jung SY, Kim HJ, et al. Major Role of the PI3K/Akt Pathway in Ischemic Tolerance Induced by Sublethal Oxygen-Glucose Deprivation in Cortical Neurons In Vitro. *Arch Pharm Res*, 2011, 34: 1023-1034.
- [20] Pignataro G, Scorziello A, Di Renzo G, et al. Postischemic brain damage: effect of ischemic preconditioning and postconditioning and identification of potential candidates for stroke therapy. *FEBS*, 2009, 276: 46-57.
- [21] Prasad SS, Russell M, Nowakowska M. Neuroprotection Induced In Vitro by Ischemic Preconditioning and Postconditioning: Modulation of Apoptosis and PI3K-Akt Pathways. *J Mol Neurosci*, 2011, 43(3): 428-442.
- [22] Yuan Y, Guo Q, Ye Z, et al. Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway. *Brain Res*, 2011, 1367: 85-93.
- [23] Peng B, Guo QL, He ZJ. Remote ischemic postconditioning protects the brain from global cerebral ischemia/reperfusion injury by up-regulating endothelial nitric oxide synthase through the PI3K/Akt pathway. *Brain Res*, 2012, 1445: 92-102.
- [24] Chen YF. Traditional Chinese herbal medicine and cerebral ischemia. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2012, 4: 809-817.
- [25] Chern CM, Liou KT, Wang YH, et al. Andrographolide Inhibits PI3K/AKT-Dependent NOX2 and iNOS Expression Protecting Mice against Hypoxia/Ischemia-Induced Oxidative Brain Injury. *Planta Med*, 2011, 77: 1669-1679.
- [26] Ha YM, Kim MY, Park MK, et al. Higenamine reduces HMGB1 during hypoxia-induced brain injury by induction of heme oxygenase-1 through PI3K/Akt/Nrf-2 signal pathways. *Apoptosis*, 2012, 17: 463-474.