

- two models of diabetic-neuropathy in rats and its mechanism [J]. *Life Sci*, 1996,59(9):PL105 - PL110.
- [8] Zhao Z, Chen SR, Eisenach JC, *et al.* Spinal cyclooxygenase-2 is involved in development of allodynia after nerve injury in rats[J]. *Neuroscience*, 2000,97(4):743 - 748.
- [9] Ma W, Eisenach JC. Morphological and pharmacological evidence for the role of peripheral prostaglandins in the pathogenesis of neuropathic pain [J]. *Eur J Neurosci*, 2002,15(6):1037 - 1047.
- [10] Zhu X, Eisenach JC. Cyclooxygenase-1 in the spinal cord is altered after peripheral nerve injury [J]. *Anesthesiology*, 2003,99(5):1175 - 1179.
- [11] Schwab JM, Schluessener HJ, Laufer S. COX-3: just another COX or the solitary elusive target of paracetamol [J]? *Lancet*, 2003,361(9362):981 - 982.
- [12] Ma W, Eisenach JC. Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury[J]. *Neuroscience*, 2003, 121(3):691 - 704.
- [13] Ma W, Eisenach JC. Intraplantar injection of a cyclooxygenase inhibitor ketorolac reduces immunoreactivities of substance P, calcitonin gene-related peptide, and dynorphin in the dorsal horn of rats with nerve injury or inflammation[J]. *Neuroscience*, 2003,121(3):681 - 690.
- [14] Herrero JF, Romero-Sandoval EA, Gaitan G, *et al.* Antinociception and the new COX inhibitors: research approaches and clinical perspectives [J]. *CNS Drug Rev*, 2003,9(3):227 - 252.

抗凋亡在神经退行性疾病治疗中的作用

蒋兴凯编译

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 目前,神经退行性疾病的治疗方法主要是对症治疗,因为人们对该病的致病原因还不十分了解。但是,已经证实大多数神经退行性疾病中,凋亡可以促进神经元的损失。因此,阻断联系神经元损伤与神经元凋亡降解的信号转导网络有可能成为一种新的治疗方法。目前,有几个作用于凋亡通道不同位点的化合物正在开发之中,还有几个化合物正在进行临床试验。

关键词: 凋亡; 神经退行性疾病; 治疗

中图分类号: Q255 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)05-0278-04

神经退行性疾病(ND)的治疗费用占医疗卫生费用支出的很大部分,而且随着老龄人口的增多将会持续增加。目前,ND的治疗措施主要是改善疾病症状,且治疗效果一般,所以开发可以延缓伴随ND的神经功能降低的药物是一项十分紧迫和重要的任务。使用小分子阻止或干扰导致ND中神经元损失的信号转导机制有可能达到此目的。

1 神经元的损失及功能紊乱

进行性神经元损失是ND的主要特征。根据损失的神经表型及伴随这种损失的神经功能不足可对ND进行分类。单纯的神经元损失并不能完全说明ND患者的神经功能不足,因为目前还发现ND患者的神经元细胞体积减少,神经元树突萎缩,轴突末端区减少,这些变化可以减少神经元之间的复杂性及

相关神经元维持其电生理和连接功能的能力。因此,神经元的进行性损失和功能紊乱共同导致了ND。有些患者体内的神经元发生功能紊乱并死亡后,其他神经元还可以通过扩大其连接和功能来补偿这种损失,使ND的临床进展更加复杂。因此,在ND发展过程中与特定神经功能相关的神经元回路重组,可以部分地说明在正常人群中只有50%~70%的神经元已经损失时,神经功能不足才具有临床意义或可以通过神经生理检测到。

2 导致神经退化的病因

研究发现,ND是由多种不同原因导致的,包括邻近的神经元或神经胶质细胞不能提供充分的营养,轴突传递功能受损,谷氨酸受体活性过高,活性氧水平过高,代谢通路受损,线粒体能量产生减少,折叠错误的蛋白质形成增加或降解不充分,炎症过程,病毒或朊病毒感染,细胞核或线粒体DNA突变

或删除,以及 RNA 或蛋白质的加工过程不正确导致的特殊蛋白质或脂质部分功能的损失或增加等因素。另外,遗传也是小部分 ND 患者的病因。由于目前还不能精确地阐述导致 ND 的原因,因此难以直接对症治疗。

3 可能的治疗方法

根据动态的进展-补偿过程及最近临床出现的 ND,有许多治疗方法可供采用:(1)支持受损的神经元功能,特别是神经传递;(2)通过清除影响因素,阻止或减慢神经损失的进程;(3)干扰神经元死亡过程的关键步骤;(4)诱导残存的但是功能紊乱的神经元恢复正常;(5)通过移植或诱导多功能祖细胞产生新的神经元来取代损失的神经元。本文主要讨论前3种方法。

3.1 支持神经传递功能

目前,ND 的治疗方法主要是对症治疗,其目的是增强神经传递功能,例如,使用左旋多巴或多巴胺受体激动剂来增强多巴胺受体的功能,在 5~15 年内可使帕金森病(PD)患者的症状得到很好的控制,胆碱酯酶抑制剂在 3 年内可以改善轻度到中度的阿尔茨海默病(AD)患者的症状,但是对于其他 ND,如肌萎缩性侧索硬化症(ALS)或亨廷顿舞蹈病(HD)来说,目前尚没有有效的对症治疗药物。

3.2 清除致病因素

目前,研究的许多药物其目的都是为了清除上述致病因素,包括减少活性氧(ROS)的产生,通过促进呼吸链的活性提高线粒体 ATP 的产生及通过阻断钙离子通道或减少兴奋性神经传递来减少细胞内钙离子水平。但是,除了 3 个化合物具有一定的临床疗效之外,其他大多数均无疗效。这 3 个化合物分别是谷氨酸释放抑制剂利鲁唑(riluzole)、非竞争性 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)拮抗剂美金刚,以及线粒体复合物 I 和 II 的电子受体及抗氧化剂泛癸利酮(辅酶 Q₁₀)。

3.3 干预神经元的死亡过程

神经元主要通过两种过程死亡:坏死和程序性死亡(PCD)。由于坏死过程发生迅速,并涉及二级死亡,难以干扰,所以能阻止其开始的治疗十分重要。而程序性死亡是一种进行性的、需要能量的过程,通常只涉及单个细胞,而非一组相邻的细胞,因此比较容易干预。目前,共发现了 2 种 PCD 形式,即凋亡(PCD1)和自体吞噬(PCD2)。

3.4 半胱天冬酶及其抑制剂

目前,在哺乳动物神经组织中共发现了 14 种半胱天冬酶,主要分为 3 类:凋亡启动子、凋亡执行子和炎症介导子。在脑卒中(半胱天冬酶-3)、PD(半胱天冬酶-3 和半胱天冬酶-8)、ALS(半胱天冬酶-3)和 AD(半胱天冬酶-9 和半胱天冬酶-3)中均可以观察到半胱天冬酶的激活。研究表明,半胱天冬酶抑制剂在某些细胞或动物神经退行性模型中具有保护作用。因此,选择性抑制半胱天冬酶能够减少 ND 中神经元的凋亡。

3.5 线粒体在神经退化过程中的作用

在凋亡信号转导过程中,线粒体介导了关键的限速步骤。线粒体膜通透性增加可以诱导凋亡过程中降解阶段的各种因子的释放,包括细胞色素 C、半胱天冬酶-2 和半胱天冬酶-9,凋亡诱导因子(AIF)和核酸内切酶-G 等。前凋亡蛋白 Bax, Bak 和 Bid 向线粒体移动可以促进通透性增加,而线粒体抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-X_L 可以阻止通透性增加,某些特殊因子(如 Bad)与 Bcl-2 或 Bcl-X_L 异二聚化后能阻碍它们降低通透性的能力,从而促进通透性增加和凋亡性降解。研究发现,AD, PD 和 ALS 患者的神经元中 Bax 水平均升高,表明这些疾病均伴有线粒体膜通透性增加。

许多信号转导途径可以增加或降低前凋亡蛋白或抗凋亡蛋白 Bcl-2 家族因子的线粒体膜作用,因此它们本身也是促凋亡或抗凋亡影响因素。多种因素可以引起肿瘤抑制蛋白 p53 的水平升高,包括低氧、DNA 损伤、兴奋毒素及蛋白质组活性不足等,而在 PD, AD 和 ALS 中均并发这些现象。p53 可以引起 Bax 上调及线粒体移位,还可以上调和诱导甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)核移位,而 GAPDH 核移位又可以引起许多抗凋亡和保护性因子的增加,包括 Bcl-2, Cu²⁺/Zn²⁺ 和 Mn²⁺ 超氧化物歧化酶,谷胱甘肽过氧化酶,热休克蛋白 70,以及影响营养因子和生长因子的利用。激酶磷酸化可以引起一些因子的磷酸化,如可以促进 AD 和 ALS 中线粒体膜通透性增加的 c-jun 的磷酸化。TNF-α 及 TNF 受体超家族 6 (FAS)死亡受体激活半胱天冬酶依赖的级联效应,包括诱导凋亡性降解,研究证实这些因子的磷酸化在 PD 和 AD 中具有重要作用。儿茶酚胺受体、卵巢类固醇受体及营养因子受体可以作用于磷肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B(PI3K-Akt) 通路,从而诱导基因转录或蛋白磷酸化,可以促进 Bcl-2 或 Bcl-X_L 维持线

粒体膜的不通透性,抵抗 Bax 或 Bad 介导的通透性增加。

4 正在开发中的抗凋亡化合物

研究开发干预凋亡的化合物用于治疗 ND 是一个新领域。目前,研究范围非常广泛,包括半胱天冬酶抑制剂、JNK 或其他激酶抑制剂、基因疗法、反义寡核苷酸和小分子化合物等,但是,具有口服活性,可以穿过血脑屏障而且值得进行临床试验的化合物还非常少。

4.1 半胱天冬酶抑制剂

目前,许多生物技术公司都在进行半胱天冬酶抑制剂的研究,但是,仅有一个化合物 IDN-6556(半胱天冬酶-8 抑制剂)正处于 II 期临床试验阶段。靛红磺胺也是一类作用较强的、非选择性的非肽类半胱天冬酶-3 和半胱天冬酶-7 抑制剂,但是有关的一步研究尚未见报道。

第二代四环类抗生素米诺环素可以降低半胱天冬酶-1 和半胱天冬酶-3 的活性,据认为是干预了酶的上行激活。米诺环素还能阻止线粒体膜通透性增加介导的细胞色素 C 释放,这两种抑制作用可以说明,米诺环素的神经保护作用与抑制凋亡有关。动物模型也证实米诺环素可以延迟疾病的进程。II 期临床试验表明,用于治疗 HD 的效果较好,用于治疗 ALS 的 III 期临床试验也正在进行之中。但是,最近研究表明,米诺环素可以加速 1-甲基-4-苯基-1,2,3,4-四氢吡啶(MPTP)引起的多巴胺神经系统的损伤。

4.2 p53 抑制剂

pifithrin- α 是一个合成的 p53 抑制剂,可以抑制 p53 诱导的转录激活,研究表明具有神经保护作用。在 MPTP PD 模型中,也具有神经保护作用,并可以抑制野生型和突变型早老素(presenilin)-2 引起的半胱天冬酶激活和凋亡。短期使用可以有效地治疗伴有中风或神经系统损伤的凋亡,但是,长期使用可能引起不良反应,因为已有研究证实 pifithrin- α 能够导致基因的不稳定性。

4.3 JNK 抑制剂

目前,至少有四家公司正在从事该方面的研究,而且他们研究的化合物结构均不相同,分别针对 JNK1, JNK2 或 JNK3。这些化合物主要用于治疗各种外周症状,也用于神经系统症状如多发性硬化症(MS)。CEP-1347 是目前唯一的一个正在进行临床试验的化合物,可以抑制 JNK 通路。体内外实验表

明,CEP-1347 可以促进各种神经元存活,减少其死亡。它也可以用于治疗 AD,在培养的胚胎间隔神经元中可以增加胆碱乙酰转移酶(CAT)的活性,拮抗 β -淀粉样蛋白诱导的 JNK 激活和培养细胞的死亡,保护胆碱能神经元,特别是保护 CAT 的活性。目前,正在进行用于治疗 PD 的 II 和 III 期临床试验。

4.4 GAPDH 配体

糖酵解酶 GAPDH 的功能之一是参与 p53 依赖的凋亡。p53 介导 GAPDH 的上调和核移位,可以影响抗凋亡蛋白 Bcl-2 和其他保护性因子的下调,从而加强了 Bax 诱导的促凋亡效果。三环类化合物 TCH346 可以抑制各种细胞凋亡和促进多种 ND 动物模型神经元存活。通过与 GAPDH 结合, TCH346 可以稳定该酶的二聚化形式,阻止凋亡相关的 GAPDH 上调和核移位,从而减少凋亡和阻止线粒体膜通透性的增加。目前, TCH346 正在进行 II 期临床试验,用于治疗 PD 和 ALS。其他衍生物,通过抑制单胺氧化酶 B,在某些模型中也表现出神经保护作用。

4.5 多巴胺、去甲肾上腺素和卵巢类固醇受体激动剂

D2 多巴胺受体、 α_2 -受体和卵巢类固醇受体激动剂可以降低各种培养或动物神经系统模型的凋亡水平。研究表明,PD 患者长期使用 D2 多巴胺受体激动剂后,纹状体多巴胺神经末端损失速率减慢,但是尚未有直接的临床或病理证据来证实其神经保护作用。同样,尽管神经系统模型表明 α_2 -受体激动剂和卵巢类固醇受体激动剂具有较强的神经保护作用,但尚未经临床试验证实。

4.6 抗炎性介导子的化合物

CPI-1189 具有抗凋亡作用。在脑细胞中,它可以减少由 TNF- α , HIV 壳糖蛋白 gp120, 神经毒因子及坏死等引起的凋亡。另外, CPI-1189 还可以抑制 IL-1 β 诱导的 p38 MAPK 磷酸化,提高细胞外信号相关激酶(ERK)激活, ERK 激活可以诱导 Bcl-2,被认为是 CPI-1189 具有拮抗 TNF- α 诱导凋亡作用的原因。初期临床试验用于治疗 AIDS 痴呆、AD 和 PD,但 II 期临床试验表明无效,因此终止了进一步开发。

5 结语

虽然研究表明凋亡在 ND 中具有重要作用,而且干预凋亡也可能成为一种新的治疗方法,但是目前仍然存在很多因素对其发展具有一定的影响。例

如:(1)虽然动物模型可以复制 ND 表型的某些行为和病理特征,但是目前还不能确定动物模型体内的凋亡信号转导通路与患者体内是否相同或相似。因为动物模型通常是通过急性损伤造成的,而进行性疾病中的神经元损失是长期暴露于致病因素导致的。(2)临床试验困难,时间长而且费用高。因为抗凋亡的药物不可能立即产生治疗效果,所以研究周期必须足够长,以保证治疗效果检测具有可靠性。另外,由于疾病发展速率的变异性和非线性,需要大量的患者和许多医疗中心参与。(3)生物标志物的重要性。使用不同类型的、合适的生物标志物可以极大地加速抗凋亡药物的开发。对于抗凋亡药物来说,理想的 I 型生物标志物应该是靶蛋白自身或凋亡标志物[如膜联蛋白 V(annexin V)],但是,目前这个领域的研究才刚刚开始。O 型和 II 型生物标志物目前也正在研究之中,特别是与 AD 和 PD 相关的标志物,包括蛋白和生化参数,但是目前所研究的各种

O 型标志物用于药物评价时效果均不甚理想。(4)存在的风险。目前有关抗凋亡药物的风险主要是理论性的,因为能够获得的实际治疗效果的信息非常有限。这些风险包括可能阻碍功能紊乱的细胞发生正常凋亡;阻碍凋亡后可能引起继发坏死,使炎性死亡加重。这些风险主要取决于具体药物的作用机制,但目前动物实验尚未表明存在这些风险。另外一个风险就是可能诱导或促进癌症的发生,因为在某些癌症中的确存在凋亡信号转导因子的调节紊乱,但是,目前对许多化合物进行的长期动物毒性实验同样表明其没有致癌性,尽管如此,仍然需要长期致癌性实验进一步确证。

总之,开发抗凋亡药物用于治疗 ND,是一个非常有前景的领域,尽管目前仍存在一定的困难和限制,但是一旦有药物开发成功,则意味着可以大大减少患者家庭与国家卫生保健费用的开支,同时也将大大提高患者的生存质量和尊严。

JAK/STAT 和激酶抑制剂:一组可能的新药

李 哲, 庞乐君编译

(军事医学科学院卫生勤务与医学情报研究所, 北京 100850)

摘要: JAK/STAT 通过蛋白质酪氨酸位点特异性磷酸化作用传递细胞因子信号。近几年,在癌细胞和转染癌基因的细胞中发现, JAK/STAT 的表达增高,并且发现它们与同种异体移植物的免疫排斥反应及自身免疫疾病的炎症形成过程有关。本文探讨了 JAK/STAT 和激酶抑制剂的筛选和理论设计策略。这些抑制剂有天然的也有合成的,同时也包括其他一些特殊的抑制剂或类似物,可用于不同的适应证。

关键词: Janus 酪氨酸激酶; 信号转导及转录活化蛋白; 激酶抑制剂

中图分类号: R979.1; R979.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)05-0281-04

Janus 酪氨酸激酶(JAK)是许多细胞因子、生长因子及干扰素的重要信号传感器。JAK 包含 7 个不同的结构域, JAK 同源区(JH1)为激酶区域,较近端的激酶类似区域为 JH2,其功能相当于负调控因子,另外还有 5 种 N 端结构域(JH3~JH7),主要参与受体结合。最初是在促红细胞生成素(EPO)介导的造血作用过程中鉴定出 JAK, EPO 用于治疗晚期肾病贫血已有很长一段历史,这暗示着 JAK 有可能参与髓细胞的活化和增殖。因此,抑制 JAK 激酶可能是治疗白血病的一种新方法。JAK 传递细胞外刺激物

经由相关受体产生的信号。受体和(或)JAK 通过识别靠近磷酸化位点的 SH2 区域选择性地活化信号转导及转录活化因子(STAT)蛋白。STAT 为胞质内游离的可溶性蛋白(77~80 ku),它通过磷酸化作用二聚化,随后转移到细胞核,在核内与 DNA 增强子区域结合转录细胞因子应答基因。

1 Src 同源区

Src 同源(SH)区域有激酶的磷酸化作用位点和 STAT 的停泊位点。酪氨酸激酶主要包括 SH1, SH2, SH3 和 SH4 区域。SH1 为激酶结构域, SH2 结构域