

Caspase 抑制药物在缺血性脑血管病治疗中的应用^Δ

牟杰*,申建宇,孔德杰,罗云,李康,姚逢,刘元,裴冬生[#](徐州医学院药学院,江苏徐州 221004)

中图分类号 R96;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)03-0276-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.03.30

摘要 目的:为开发 Caspase 抑制剂提供参考。方法:查询国内、外相关文献,对有关 Caspase 抑制药物在缺血性脑血管病治疗中对脑神经保护作用的研究进行综述。结果:以 Caspase 为靶点的抑制药物可明显抑制脑缺血损伤引起的脑神经细胞凋亡,产生十分明显的脑神经保护作用。结论:应加大 Caspase 抑制剂的研究,为临床上提供更加安全、有效的药物。

关键词 Caspase 抑制药物;细胞凋亡;缺血性脑血管病

脑血管病已成为我国目前最主要的病死原因之一,其中又以缺血性脑中风(Ischemic stroke)的发病率居首位。脑缺血后的再灌注损伤危害极大,缺血再灌注后的迟发性神经元死亡与细胞凋亡关系密切。因此,积极探索缺血性脑中风导致神经元损伤和死亡的分子机制及有效防治措施,有着极其重要的医学价值和社会意义。

Caspase 全称为含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶,是一种高度保守的半胱氨酸蛋白酶家族,在细胞凋亡的过程中起着关键性作用。Caspase 参与凋亡过程主要有 3 条通路:(1)“细胞外”通路。细胞表面死亡受体[如 Fas/CD95 或肿瘤坏死因子(TNF)受体]通过形成死亡-诱导信号复合体激活 Caspase-8,进而激活下游效应 Caspase。(2)“细胞内”通路。Cyto-c 由线粒体内膜间隙释放入胞浆,在 dATP/ATP 存在的条件下,Cyto-c 与胞浆蛋白 Apaf-1 结合,形成 Cyto-c-ADaf-1 复合物,以凋亡体的形式激活 Caspase-9。(3)内质网钙离子稳态的破坏和 Caspase-12 的激活。神经元损伤后,细胞质内钙超载,影响内质网对钙的摄取和释放,造成内质网的应激。内质网应激诱导 Caspase-12 表达,进一步激活 Caspase-3 而引发细胞凋亡。Caspase-3 是凋亡过程中最关键的蛋白酶,是多种死亡受体介导的凋亡途径的共同下游效应部分。

总之,细胞凋亡是由特殊的死亡信号激活 Caspase,导致蛋白溶解系统发生活化而产生的。Caspase 是引起细胞凋亡的核心,级联反应被认为是不可逆反应,所以抑制 Caspase 至关重要。

1 Caspase-1 抑制药物及其作用机制

Caspase-1 被激活后形成 P20 和 P10 两个结构域,两个 P20 和两个 P10 构成四聚体,形成有活性的 Caspase-1。只有活性 Caspase-1 参与,才能激活炎性细胞因子前体 proIL-1 β ,形成有活性的 IL-1 β 介导组织的损伤。作为启动炎症反应网络中的关键分子,IL-1 β 通过多种途径介导神经元的损伤。IL-1 β 可上调细胞间黏附分子(ICAM)-1 的表达,促进中性粒细胞向损伤区的聚集,导致神经元的损伤。但在 IL-1 β 促进星形细胞和小胶

质细胞增生的同时,会释放和(或)分泌一系列潜在的神经毒性物质和炎性因子,如氧自由基、NO、超氧化物、TNF- α 等。

YVAD-FMK 作为 Caspase 家族中 Caspase-1 的特异性抑制剂,能抑制 Caspase-1 有活性的四聚体的形成。王涛等^[1]发现,YVAD-FMK 能够减少脑组织 IL-1 β 的含量,减轻脑水肿及显著降低血清神经烯醇化酶(NSE)升高的幅度。

当前,人们发现 Caspase-1 只与炎症有关,通过抑制 Caspase-1 的表达,可很好抑制炎症的发生,但无法抑制 Caspase 级联反应的发生,不能从根本上保护脑神经,所以此作用途径已很难再进行深层次的突破。目前此途径已转向与抑制其他的 Caspase 药物联合应用。

2 Caspase-3 抑制药物及其作用机制

Caspase-3 是目前公认的最有前景的药物作用靶点之一,Caspase-3 抑制药物研究是近年来的热点,相关药物非常多。

2.1 抑制 Caspase-3 的化学药

茈菔碱类药物可以改善脑微循环血流,改善缺血后神经细胞的电活动,提高神经细胞对缺血缺氧的耐受性。长托宁(盐酸戊乙奎醚)是新型抗胆碱药。陈胜等^[2]研究发现,长托宁能抑制多种促细胞凋亡信号(线粒体损害、钙超载、兴奋性氨基酸毒性、氧自由基等)的表达,使线粒体细胞色素 C(CytC)与线粒体内膜的松散或紧密结合状态不受到破坏,间接抑制 Caspase-3 的表达,从而减少细胞凋亡的发生,发挥脑保护作用。

依达拉奉是一种新型自由基清除剂。龚筱倩等^[3]研究发现,依达拉奉可抑制 Caspase-3 表达,对脑缺血再灌注损害有明显的保护作用。

血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)是一类普遍存在于中枢神经系统的生长因子。应用外源性 VEGF 可促进新生血管的形成,减少脑梗死面积,缓解脑水肿,对神经细胞具有直接保护作用^[4]。杨冀萍等^[5]发现,在有效时间窗内应用 VEGF 可抑制 Caspase-3 介导的细胞凋亡,达到神经保护作用。

近年来研究证实,阿司匹林具有直接的神经保护作用^[6]。李泽东等^[7]发现,阿司匹林可以抑制脑组织中 Caspase-3 表达,起到脑神经保护作用。

2.2 抑制 Caspase-3 的中药有效成分提取物

研究^[8]发现,三七中含有的三七三醇皂苷可降低 Caspase-3 水平,有抗血栓形成和抗神经细胞凋亡作用。

粉防己碱(Tetrandrine, Tet)对多种细胞膜钙通道有抑制作用。张平等^[9]研究发现,Tet 可降低 Caspase-3 水平,减轻脑缺血再灌注后的炎症反应和细胞凋亡,拮抗脑缺血再灌注损伤。

^Δ 基金项目:江苏省高校自然科学基金资助课题(No.10KJB350005);江苏省高等学校大学生实践创新训练计划立项项目(No.2010-783);徐州医学院校长人才专项基金资助课题(No.09KJZ20);徐州医学院药学院教育教学改革课题(No.0912xyjg008)

* 副教授,博士。研究方向:临床药学。电话:0516-83262137。E-mail:mou.jie@126.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:细胞信号转导。电话:0516-85588513。E-mail:dspei@xzm.edu.cn

2.3 抑制 Caspase-3 的复方中药

丹星通络煎剂主要由黄芪、三七、丹参、胆南星等药味组成,具有益气活血的功效,是临床治疗缺血性脑血管病及其后遗症的有效方剂。史佳巍等^[10]研究发现,丹星通络煎剂能抑制 Caspase-3 蛋白表达,从而减轻脑组织的缺血再灌注损伤。

黄连解毒汤由黄连、黄柏、黄芩、栀子组成,4 种中药均含有小檗碱。付晓春等^[11]研究发现,黄连解毒汤可通过下调 Caspase-3 的表达而抑制脑细胞凋亡,具有脑保护作用。

养血清脑颗粒能改善动物软脑膜微循环,增加脑血流量,缓解血管痉挛。李建华等^[12]发现,养血清脑颗粒能选择性抑制 Glu、Caspase-3 的表达,减少神经细胞死亡,发挥神经保护作用。

夏韵等^[13]研究发现,复方蒲黄颗粒可下调 Caspase-3 的表达,从而抑制神经元凋亡,对脑缺血再灌注损伤有保护作用。

2.4 抑制 Caspase-3 的中药注射剂

脑栓通注射液是在银杏叶、人参等中药组成的复方制剂基础上,利用现代制剂技术研制而成的注射剂,是具有多重脑保护功效的新型药物。实验^[14]表明,脑栓通注射液可下调 Caspase-3 的表达。

3 Caspase-8 抑制药物及其作用机制

死亡受体通路是细胞凋亡的主要信号转导通路,以 Caspase-8 蛋白的激活为其重要特征。多种调节细胞凋亡的细胞外刺激(死亡信号)通过位于细胞表面的死亡受体转入细胞内,启动细胞凋亡。死亡受体主要包括细胞凋亡因子(Fas/Apo-1)和 TNF 受体。通过细胞外结构域与相应的死亡配体(FasL 和 TNF- α)相结合,细胞外凋亡信号传入细胞内,激活 Caspase-8 蛋白,最终激活下游的 Caspase-3 蛋白,启动细胞凋亡。脑缺血再灌注后缺血半暗带、Caspase-8 蛋白的表达均明显增加,说明 Caspase-8 在 Fas、TNF 受体 1 等死亡受体介导的细胞凋亡中起着极为重要的作用,是死亡受体介导的凋亡途径关键的启动子。Caspase-8 启动后可以激活效应 Caspase 的级联反应,诱导细胞 Caspase-3、Caspase-6 的活化,也可以诱导线粒体膜电位的丧失和 Cyt C 的释放,启动线粒体下游 Caspase 效应酶的激活,最终诱导细胞凋亡。重组 Caspase-8 能激活几乎所有的 Caspase,表明它位于凋亡级联反应的顶点。所以,Caspase-8 抑制药物作用效果很强,研究前景很好,但是较 Caspase-3 抑制药物研究困难。

银杏叶可清除氧自由基,增加脑血流量,改善脑组织缺血、缺氧状态,拮抗血小板活化因子,保护脑神经。近年来,银杏叶制剂被临床广泛用于缺血性脑血管病的治疗。宋利春等^[15]研究发现,银杏叶萃取物金纳多注射液可使大鼠脑组织中的神经元凋亡数目明显减少,Caspase-8 蛋白表达水平也降低。

黄芪和红花是中医治疗缺血性脑血管病的常用药物,黄芪有益气固表、利水消肿、托毒生肌功效,红花有活血通经、祛瘀止痛功效。赖真等^[16]发现,红花、黄芪、黄芪加红花均能下调 Caspase-8 的表达,而黄芪加红花较单用黄芪和红花下降作用更为明显,表明益气活血法比单纯的益气法或活血法具有更好的治疗缺血性脑中风的作用。

4 Caspase-9 抑制药物及其作用机制

CytC 在 dATP/ATP 存在的条件下,可与胞质蛋白 Apaf-1、procaspase-9 结合,形成 CytC-Apaf-1-procaspase-9 凋亡小体,凋亡小体内的 procaspase-9 自身激活形成有活性的 Caspase-9,继而激活其下游的 procaspase,从而启动 Caspase 级联反应,诱导凋亡;而活化的 Caspase-9 也可促进线粒体释放 CytC,形成正

反馈环路,促进更大规模 Caspase 激活和细胞凋亡。因此,抑制 Caspase-9 的表达,对脑缺血再灌注保护具有良好的效果。

盐酸法舒地尔(Fasudil)是一种新型的细胞内钙离子拮抗剂,能够双重抑制磷酸化,临床主要用于急性脑血管病的治疗。陈晓春等^[17]研究发现,盐酸法舒地尔可抑制 Caspase-9 的表达,并从细胞超微结构上得到验证。

原花青素(Procyanidins)是一类在植物界广泛存在的多酚化合物,具有极强的抗氧化、清除氧自由基的能力。张义军等^[18]发现,葡萄籽原花青素(Grape seed proanthocyanidins, GSP)对 CytC 的释放及对 Caspase-9 具有明显抑制作用。

芪椴煎剂主要成分为黄芪、三棱、水蛭、桑椹、天花粉等,是治疗缺血性脑中风的经验方。黎巍威等^[19]发现,芪椴煎剂与芪椴煎剂去养阴药通过抑制 Caspase-9 的释放和激活可减少脑缺血再灌注损伤,且芪椴煎剂疗效优于芪椴煎剂去养阴药。

5 Caspase-12 抑制药物及其作用机制

缺血再灌注导致的缺血缺氧、葡萄糖/营养物质缺乏、ATP 耗竭、自由基蓄积及 Ca²⁺稳态破坏等都可能引起内质网功能障碍,触发内质网应激。应激过强时,可激活 Caspase-12,启动 Caspase 级联反应,细胞凋亡信号从 Caspase-12 传到 Caspase-9 再到效应分子 Caspase-3,启动 DNA 降解,形成恶性循环,最终导致细胞凋亡;而 Caspase-12 基因敲除小鼠模型无明显发育或行为缺陷,肿瘤发生率以及发育过程中各种生理所需凋亡也都正常,提示 Caspase-12 是较理想的抗凋亡治疗靶标。

杨冀萍等^[20]研究发现,神经生长因子(NGF)可通过抑制 Caspase-12 减少脑缺血再灌注损伤细胞凋亡。

米诺环素是第 2 代四环素类抗生素,可高效通过血脑屏障。多项动物、临床试验表明,高剂量米诺环素具有神经毒性作用,中、低剂量在脑缺血中有神经保护作用^[21-22]。冯燕等^[23]发现,米诺环素可抑制 Caspase-12 的表达,能显著缓解凋亡神经元的增加。

6 Caspase 多重抑制效应药物

对 Caspase 具有多靶点的药物是近年来研究的热点,其效果优于单一靶点,治疗效果十分明显,具有很好的前景。其机制为多靶点同时抑制,出现协同效应。

补虎纹毒素(HWTX)-I 是从我国珍稀动物虎纹捕鸟蛛的粗毒中分离纯化的一种天然多肽类神经毒素,能可逆地阻断小鼠膈神经膈肌的神经传导,是一种作用于突触前膜的 N 型钙离子通道阻滞剂。刘仁仪等^[24]发现,HWTX-I 可抑制 Caspase-3、Caspase-8 的表达。

三七总皂苷(PNS)是从传统名贵药材三七中提纯的有效活性成分,是三七主要药理活性成分。药理学研究表明,PNS 能增加脑血流量,改善微循环;抑制血小板聚集,降低血液黏稠度;阻滞钙通道,抑制细胞内钙超载,缓解脑水肿等,对脑缺血及其后遗症有确切疗效。李花等^[25]发现,PNS 能下调 Caspase-1、Caspase-3 的表达,但对 Caspase-8 的表达无影响。

补阳还五汤是中医治疗缺血性脑血管疾病的有效方剂,以黄芪为君药,当归为臣药,川芎、赤芍、桃仁、红花、地龙为佐使药。该方中生物碱、苷、多糖、苷元类成分是其主要有效成分。陈瑞芬等^[26]发现,补阳还五汤中生物碱、苷、多糖和苷元类成分可抑制 Caspase-1、Caspase-3 的表达。

7 讨论

目前,国内、外研究的脑神经保护药物很多,如钙离子拮抗剂、抗氧化剂、降胆固醇药物等,但应用于临床上相对较少,

且疗效不确切。近年来 Caspase 抑制药物,尤其是 Caspase-3 抑制药物,在临床研究中开始崭露头角。虽然 Caspase 是很好的药物靶点,但它一般位于凋亡信号传导通路的下游,比起位于调节传导通路的上游因子来说,较难获得特异性强的药物。由于信号传导主要依赖于蛋白与蛋白间的相互作用,因此了解蛋白结构和功能信息对于开发 Caspase 抑制剂是至关重要的。随着对其作用机制的深入了解,将会使我们以全新角度去认识其脑神经保护作用,为临床提供新的治疗思路和更加有效安全的药物。

参考文献

- [1] 王涛,陈莉,文亮. Caspase-1 抑制剂对大鼠局灶性脑缺血再灌注后神经元损伤的影响[J]. 脑与神经疾病杂志, 2005, 13(5):348.
- [2] 陈胜,许喜泳,瞿星光,等. 长托宁对急性全脑缺血再灌注损伤大鼠细胞色素和 Caspase-3 表达的影响[J]. 武汉大学学报:医学版, 2009, 30(1):47.
- [3] 龚筱倩,徐汉荣. 依达拉奉对局灶性脑缺血再灌注损伤大鼠 Caspase-3、Bcl-2 表达的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2008, 25(1):53.
- [4] Lee HJ, Kim KS, Park IH, *et al.* Human neuralstem cells over-expressing VEGF provide neuroprotection, angiogenesis and functional recovery in mouse stroke model[J]. *PLoS One*, 2007, 2(1):e156.
- [5] 杨冀萍,刘新峰,刘怀军,等. VEGF 降低家兔脑缺血再灌注损伤与 Caspase-3 表达的关系[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(1):29.
- [6] Fredduzzi S, Mariucei G, Tantucei M, *et al.* Nitrospirin (NCX4016) reduces brain damage induced by focal ischemia in the rat[J]. *Neurosci Lett*, 2001, 302(2/3):121.
- [7] 李泽东,马静萍. 阿司匹林预处理对大鼠脑缺血再灌注后 Caspase-3 和 AIF 表达的影响[J]. 中国神经免疫学和神经病学杂志, 2009, 16(4):281.
- [8] 张利军,白宇,侯郁青,等. 三七三醇皂苷对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑梗死体积及 Caspase-3 表达的影响[J]. 中医药导报, 2007, 13(9):68.
- [9] 张平,张本恕,苏立凯,等. 粉防己碱对大鼠脑缺血再灌注后 ICAM-1 和 Caspase-3 表达的作用[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(5):527.
- [10] 史佳巍,刘耘,袁翔宇. 丹星通络汤对脑缺血再灌注大鼠 Caspase-3 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(5):1021.
- [11] 付晓春,徐哲,何影,等. 黄连解毒汤对大鼠局灶性脑缺血再灌注后的保护作用及其对 Caspase-3 表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(14):1598.
- [12] 李建华,周长满,韩晶岩,等. 养血清脑颗粒对蒙古沙鼠全脑缺血再灌注后 Glu 和 Caspase-3 表达的影响[J]. 青海医学院学报, 2007, 28(3):165.
- [13] 夏韵,向军,刘小雨,等. 复方蒲黄颗粒对局灶性脑缺血再灌注大鼠神经元凋亡及 Caspase-3 mRNA 表达的影响[J]. 中国药房, 2009, 20(3):168.
- [14] 张涓,刘邦民,黄国钧. 脑栓通注射液对局灶性脑缺血再灌注 Caspase-3 和细胞色素 C 表达的影响[J]. 华西药学杂志, 2008, 23(6):661.
- [15] 宋利春,张鸿,贾春红,等. 金纳多注射液对大鼠局灶性脑缺血-再灌注后神经元凋亡及 Caspase-8 蛋白表达的影响[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2008, 8(1):67.
- [16] 赖真,李丽珊,程少冰. 黄芪和红花对脑缺血再灌注后大鼠神经细胞凋亡和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 8 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志, 2008, 16(11):885.
- [17] 陈晓春,刘星亮. 盐酸法舒地尔对脑缺血再灌注大鼠神经元形态和 Caspase-9 mRNA 表达的影响[J]. 疑难病杂志, 2009, 8(3):138.
- [18] 张义军,马文明,王政平. 原花青素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后海马线粒体 CytC 的释放和 Caspase-9 的影响研究[J]. 中国药房, 2008, 19(22):1701.
- [19] 黎巍威,余琴华,蒋红玉. 芪棱汤对脑缺血再灌注大鼠 Caspase-9 蛋白的影响[J]. 中国中医急症, 2007, 16(4):450.
- [20] 杨冀萍,刘怀军,李英,等. NGF 抑制兔脑缺血/再灌注损伤时 Caspase-12 的表达[J]. 基础医学与临床, 2007, 27(4):408.
- [21] Liu Z, Fan Y, Won SJ, *et al.* Chronic treatment with minocycline preserves adult new neurons and reduces functional impairment after focal cerebral ischemia[J]. *Stroke*, 2007, 38(11):146.
- [22] Lampl Y, Boaz M, Gilad R, *et al.* Minocycline treatment in acute stroke[J]. *Neurology*, 2007, 69(14):1404.
- [23] 冯燕,刘瑞珍,谢宝明. 米诺环素抑制大鼠脑缺血再灌注后海马 CA1 区神经元凋亡及 Caspase-12 的表达[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2009, 17(6):686.
- [24] 刘仁仪,陈嘉勤,毛海峰,等. 全脑缺血再灌注大鼠海马 Caspase-3、Caspase-8 表达及 HWTX-I 神经保护机制的研究[J]. 北京体育大学学报, 2008, 31(10):1368.
- [25] 李花,邓常清,陈北阳,等. 三七总皂苷对大鼠脑缺血再灌注后 Caspase 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(2):189.
- [26] 陈瑞芬,邓常青,陈北阳,等. 补阳还五汤四类有效部位对大鼠脑缺血再灌注后 Caspase 表达的作用[J]. 中医药导报, 2009, 15(6):4.

(收稿日期:2012-02-05 修回日期:2012-06-25)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅