

## • 综述 •

## 调节神经元凋亡信号转导途径的关键酶:死亡相关蛋白激酶

梁敏(综述) 王宇田(审校)

【关键词】 死亡相关蛋白激酶; 凋亡; 信号转导; 缺血-再灌注损伤, 脑

细胞的信号转导系统控制着包括细胞凋亡在内的细胞内几乎所有的生命活动。脑损伤是诱导凋亡信号转导基因表达的最强烈刺激之一。研究显示急性脑损伤后缺血脑组织内的神经元在一系列基因调控下可发生凋亡<sup>[1,2]</sup>。死亡相关蛋白激酶(death associated protein kinase, DAPK)是一类新型的、由钙调节蛋白(CaM)调节的丝氨酸/苏氨酸激酶(protein serine/threonine kinase, PSTK)<sup>[3]</sup>。近年研究发现,DAPK 可出现于脑缺血和创伤性脑损伤后神经元凋亡启动阶段信号转导级联反应定型之前<sup>[4,5]</sup>。其基因表达与多种促凋亡信号转导的生物分子作用有关。将 DAPK 作为神经变性疾病限时性治疗“时间窗”的潜在治疗靶点,可望为脑缺血-再灌注损伤早期的脑保护治疗提供新思路。现将有关研究进展综述如下。

## 1 DAPK 参与脑缺血后神经元凋亡的分子机制

DAPK 是一种参与细胞凋亡的正调控子,由 Kimchi 及其同事在功能性基因克隆中首先发现<sup>[6]</sup>。现在已经确认 DAPK 家族至少有 DAPK、DAPK 相关蛋白(DRP1)/DAPK2、死亡相关蛋白样激酶(DLK)/链接相互作用蛋白激酶(ZIPK)、DAPK 相关蛋白凋亡诱导激酶 1 和 2(DRAK1、DRAK2) 5 个成员<sup>[7]</sup>。DAPK 存在着一系列凋亡系统,可以在细胞变成不可逆地定向性自我破坏之前被激活。DAPK 的“死亡区域”可触发凋亡的级联反应,导致细胞定向性自杀、正常代谢关闭,其内容物被细胞周围吸收,但不触发机体的内在自我防御系统。这对于颅脑这样紧闭的区域特别重要<sup>[8]</sup>。DAPK 的“激酶区域”功能是从 ATP 夺

基金项目:海南省自然科学基金指导项目(2004-80462)

作者单位:570311 海口,海南省人民医院麻醉科  
作者简介:梁敏(1955-),女(汉族),天津市人,医学硕士,教授,主任医师,主要从事神经外科麻醉脑保护治疗的研究。

取磷酸盐并且攻击其底物从而触发凋亡,但其作用机制尚不清楚。测定区域结构及估计 DAPK 的活性对于进一步探索这个问题提供了重要基础。含半胱氨酸的天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)蛋白家族是细胞凋亡执行过程中的关键分子<sup>[9]</sup>。p53 作为转录因子参与多种基因的转录与诱导细胞凋亡。而 Fas 作为一种重要促凋亡的调控基因和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )/转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )受体超家族,其表达产物具有传递凋亡信号的作用。

被称为死亡受体的肿瘤坏死因子受体-1(TNFR-1)和 Fas,其对应的配体分别是 TNF- $\alpha$  和 FasL。配体与死亡受体结合后,能介导死亡受体形成三聚体,后者通过与其连接的多种接头蛋白激活 caspase 家族酶,引发细胞凋亡。Cohen 等<sup>[10]</sup>发现,DAPK 能介导 TNF/Fas 受体的下游凋亡,参与由 TNF- $\alpha$  和 FasL 诱导的细胞凋亡过程。

TGF- $\beta$  是一类能调节细胞分化的细胞因子,其受体家族成员是具有活性的 PSTK 受体。研究发现,TGF- $\beta$  能刺激发育神经元和其他组织的凋亡,具有多种与 DAPK 调节途径相关的生物作用<sup>[11]</sup>。TGF- $\beta$  通过细胞表面 PSTK 受体引发细胞活动导致 DAPK 基因表达上调;TGF- $\beta$  通过从线粒体释放的细胞色素 C 诱导凋亡过程,可以造成凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)激活和前 caspase-3 分裂。

p53 能促进 Fas 诱导的凋亡;特异性 caspase 抑制剂能抑制这种 p53 依赖的凋亡,表明 p53 对死亡受体通路和线粒体通路均有影响<sup>[12]</sup>。细胞培养模型证实,通过 p53 途径,DAPK 在细胞因子依赖的细胞凋亡中对神经元生长和调解有激活功能<sup>[13]</sup>。研究证实 DAPK 与癫痫致神经元死亡期间的 p53 途径有关<sup>[14]</sup>。提示 DAPK 可在 p53 途径级联定型的上游行使功能而调节 p53 介导的凋亡。

凋亡信号转导通常被划分为 3 个途

径,即死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径,它们均以 caspase 激活开始,以蛋白底物裂解、细胞解体为结局<sup>[15-17]</sup>。Krupinski 等<sup>[18]</sup>用免疫组化及 Western 杂交法,在持续性脑缺血大鼠模型中检测到 caspase-1、2、3、6、8 的表达水平几乎都上调,高峰出现在缺血后 12~24 h,且主要位于缺血半暗带区。最近研究发现,DAPK 可被下游位于 B 淋巴细胞 Bcl-2 caspase 相关途径的死亡受体激活<sup>[12]</sup>。Bcl-2 能抑制由 DAPK 过度表达所启动细胞凋亡,表明 DAPK 参与由线粒体释放的凋亡因子所激活的内源性凋亡途径。

虽然神经酰胺与脑缺血所致细胞死亡的直接关系尚未被阐明,但脑缺血动物模型研究发现,短时前脑缺血时神经酰胺产物被反应性上调且和 DAPK 基因同时表达<sup>[19]</sup>,并与脑组织损伤区域相关<sup>[8]</sup>。这一表达的增高发生在脑损伤后 24 h 内,提示 DAPK 可能是一个对脑组织损伤迅速反应的激酶,其可能机制是神经酰胺能激活 DAPK 从而导致神经元凋亡<sup>[19]</sup>。

根据以上研究结果推测,DAPK 在脑缺血-再灌注损伤诱发细胞凋亡信号转导途径中的作用可能是:DAPK 作用在线粒体-细胞色素 C 途径的上游,并在 caspase-蛋白家族的上游行使功能,最终激活 caspase 家族级联反应介导细胞凋亡。它使底物蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化,启动信号转导通路,快速调节和控制信号转导途径中其他酶类或蛋白质的活性、功能和生物效应,促进转录因子的转录活性进而调节基因表达。

## 2 DAPK 在脑缺血-再灌注损伤中的作用

基础研究发现,DAPK 家族成员在各种组织中均有表达,以肺组织和脑组织最强。Yamamoto 等<sup>[8]</sup>用 4-血管栓塞(four-vessel occlusion)致鼠短时性前脑缺血模型导致神经细胞死亡之前发现组织损害区域 DAPK mRNA 表达增加,

缺血后 24 h 大约比空白对照组高 3 倍。DAPK 的功能依赖于其激酶区域的催化活性。Schumacher 等<sup>(4)</sup>检测了大鼠神经元低氧-缺血模型的 DAPK 催化活性发现,与未受伤侧比较,动物脑缺血 7 d 后伤侧海马 DAPK 活性增高。DAPK 基因表达和活性上调先于显著的凋亡形态学变化<sup>(5)</sup>。推测 DAPK 可能在神经病学疾病中有重要性作用。提示脑缺血后 DAPK 活性以时间和定位的方式强烈增高可以诱导神经元凋亡。抑制 DAPK 催化活性具有防止神经元死亡的潜在可能。癫痫能够导致神经元死亡,其特征包括前凋亡 Bcl-2 家族蛋白上调 p53、caspase、TNFR1 和 (或) Fas 诱导和激活<sup>(20)</sup>。Henshall 等<sup>(14)</sup>发现 SD 大鼠癫痫模型海马及大脑皮质 DAPK 蛋白表达增加,癫痫后 DAPK 被激活;数据支持 DAPK 作为对癫痫后损伤细胞反应的一种新的调节因子,在癫痫导致神经元死亡机制中起重要作用,提示 DAPK 可能成为治疗癫痫性脑损伤的新靶点。

### 3 展望

2001 年 Valentza 等<sup>(21)</sup>发表了成年鼠脑 DAPK 催化的区域结构酶分析方法。酶分析技术定量和选择的发展及可穿过血-脑屏障的低分子 CaM 激酶抑制剂的发现,使得将 DAPK 作为脑梗死和创伤性脑损伤等快速神经变性疾病治疗靶点的可能性得到提高。DAPK 可在脑缺血-再灌注损伤神经元凋亡定型之前显示功能。深入探讨 DAPK 与缺血性和创伤性脑损伤的关系,有望为进一步认识神经细胞凋亡时信号转导及调控机制、开发小分子 DAPK 催化活性抑制剂提供新靶点,为脑保护治疗开辟一个崭新的领域。

### 参考文献:

- Guimaraes C A, Linden R. Programmed cell death apoptosis and alternative death styles [J]. Eur J Biochem, 2004, 271: 1638-1650.
- 扬新宇,扬树源,白景文,等.大鼠急性脑损伤后神经元类凋亡的观察[J].中华创伤杂志,2003,19:139-141.
- Sanjo H, Kawai T, Akira S. DRAKs, novel serine/threonine kinases related to death-associated protein kinase that trigger apoptosis [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 29066-29071.
- Schumacher A M, Valentza A V, Watter-son D M. Death-associated protein kinase as a potential therapeutic target, Expert Opin [J]. Ther Targets, 2002, 6: 497-506.
- Schumacher A M, Valentza A V, Watter-son D M, et al. DAPK catalytic in the hippocampus increases during the recovery phase in an animal model of brain hypoxic-ischemic injury [J]. Biochem Biophys Acta, 2002, 1600(1-2): 128-137.
- Deiss L P, Feinstein E, Berissi H, et al. Identification of a novel serine/threonine kinase and a novel 15-kD protein as potential mediators of the  $\gamma$  interferon-induced cell death [J]. Genes Dev, 1995, 9: 15-30.
- Kogel D, Prehn J H M, Scheidtmann K H. The DAP kinase family of pro-apoptotic proteins: novel players in the apoptotic game [J]. Bio Essays, 2001, 23: 352-358.
- Yamamoto M, Takahashi H, Nakamura T, et al. Developmental changes in distribution of death-associated protein kinase mRNAs [J]. J Neurosci Research, 1999, 58: 674-683.
- Lorenzo H K, Susin S A. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death [J]. FEBS Letters, 2004, 557: 14-20.
- Cohen O, Inbal B, Kissil J L, et al. DAP-kinase participates in TNF- $\alpha$ - and Fas-induced apoptosis and its function requires the death domain [J]. J Cell Biol, 1999, 146: 141-148.
- Schuster N, Kriegelstein K. Mechanisms of TGF- $\beta$ -mediated apoptosis [J]. Cell Tissue Res, 2002, 307: 1-14.
- Burns T F, Bernhard E J, Eldeiry W S. Tissue specific expression of p53 target gene suggests a key role for killer/DR5 IN P53 dependent apoptosis in vivo [J]. Oncogene, 2001, 20: 4601-4612.
- Araki T, Shinoda S, Schindler C K. Expression, interaction, and proteolysis of death-associated protein kinase and p53 within vulnerable and resistant hippocampal subfields following seizures [J]. Hippocampus, 2004, 14: 326-336.
- Henshall D C, Araki T, Schindler C K, et al. Expression of death-associated protein kinase and recruitment to the tumor necrosis factor signaling pathway following brief seizures [J]. J Neurochem, 2003, 86: 1260-1270.
- Lorenzo H K, Susin S A. Mitochondrial effectors in caspase-independent cell death [J]. FEBS Letters, 2004, 557: 14-20.
- Larner S F, Hayes R L, McKinsey D M, et al. Increased expression and processing of caspase-12 after traumatic brain injury in rats [J]. J Neurochem, 2004, 88: 78-90.
- Graham M, Jennifer Z, Jorge G, et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat [J]. Neuroreport, 2003, 14: 183-186.
- Krupinski J, Jopez E, Marti E, et al. Expression of caspases and the irsubstrates in the rat model of focal cerebral ischemia [J]. Neurobiol Dis, 2000, 7: 332-342.
- Pelled D, Raveh T, Riebeling C, et al. Death-associated protein (DAP) kinase plays a central role in ceramide-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 1957-1961.
- Bengzon J, Mohapel P, Ekdahl C T, et al. Neuronal apoptosis after brief and prolonged seizures [J]. Prog Brain Res, 2002, 135: 111-119.
- Valentza A V, Schumacher A M, Weiss C, et al. A protein kinase associated with apoptosis and tumor suppression structure, activity, and discovery of peptide substrates [J]. J Biol Chem, 2001, 276: 38956-38965.

(收稿日期:2004-10-30)

修回日期:2005-02-28)

(本文编辑:郭方)

• 读者 • 作者 • 编者 •

## 《中国危重病急救医学》杂志 2005 年 6~9 期重点内容

第 6 期 感染与多器官功能衰竭

第 8 期 创伤与修复

第 7 期 呼吸系统疾病与机械通气

第 9 期 呼吸系统疾病及感染

(本刊编辑部)