

综述

环孢素 A 应用于急性脊髓损伤治疗的研究进展

陈勇忠¹, 许卫红²

(1 解放军第 476 医院骨科 350002 福州市; 2 福建医科大学附属第一医院 350004 福州市)

中图分类号: R683.2, R976 文献标识码: A 文章编号: 1004-406X(2007)-07-0546-04

环孢素 A(cyclosporine A, CsA)是一种特效免疫抑制剂,是目前公认的抗器官移植排斥反应最有效的药物之一。急性脊髓损伤(acute spinal cord injury, ASCI)是一种易导致残疾的疾病,而阻断继发性脊髓损伤是急性脊髓损伤治疗的关键之一。众多研究表明, CsA 能在多种神经系统损伤和神经疾病中发挥神经保护作用。笔者就 CsA 用于脊髓损伤治疗的研究进展作一综述。

1 CsA 的生物学特性及药理作用机制

1.1 CsA 与 CsA 结合蛋白

CsA 是从真菌的代谢产物中分离出来的含有 11 个氨基酸的环状多肽,包括 10 个含氮原子甲基化的脂肪族氨基酸和一个极性氨基酸。后者是 N-甲基-L-苏氨酸,其决定了 CsA 分子的免疫活性。CsA 与细胞内免疫亲和素相结合而发挥其生物学效应,细胞内免疫亲和素即环孢素 A 结合蛋白(cyclophilin, CyP), CyP 是 CsA 的细胞内蛋白受体。目前已发现多种 CyP 异构体存在,构成 CyP 家族。人类细胞中已发现 16 种 CyP^[1]。按 CyP 在细胞中的分布及氨基酸序列等特征分类, CyP 家族有 cyclophilin A (CyPA), cyclophilin B (CyPB), cyclophilin C (CyPC), cyclophilin D (CyPD), cyclophilin 40 (CyP40), cyclophilin 160 (CyP160) 6 个亚族。其中 CyPA 分布于细胞浆内,是 CsA 的主要受体, CsA 通过特异性识别 CyPA, 并与其结合形成复合物。CsA-CyP 复合体通过与 $Ca^{2+}/CaM/Calcineurin/NFAT$ 信号转导途径中的神经钙调磷酸酶(Calcineurin)的催化亚单位结合,使其不能脱去底物 NF-ATP 分子上的磷酸根,造成 NFAT 的激活和转移失败,影响白介素-2(IL-2)、IL-3、粒-巨细胞集落刺激因子(GM-CSF)、肿瘤坏死因子(TNF)、肿瘤坏死因子受体配体(FasL)等多种基因的转录,妨碍 T 细胞活化扩增及其免疫应答的产生,这是 CsA 发挥免疫抑制的主要机制。当存在 Ca^{2+} 负载或氧化压力时, CyPD 从线粒体基质移位到线粒体膜并激活线粒体膜非特异性通透性转变孔道(permeability transition pore, PTP), PTP 开放。若 PTP 持续开放则引起线粒体膜电位的降低,甚至于完全崩解,致凋亡因子、细胞色素 C(cyt-C)、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF) 等的释放, 活性氧类(reactive oxygen species, ROS)生成, 基质 Ca^{2+} 外流, 线粒体内膜肿

胀,引起细胞凋亡^[2]。CyPD 分布于线粒体基质中,是 PTP 的重要组成部分。Nicoli 等^[3]研究发现 CyPD 能与 CsA 特异性相结合,抑制 CyPD 的肽酰脯氨酸顺反异构酶(peptidyl propyl cis-trans isomerase, PPIase)活性(PPIase 是蛋白质肽三维构象形成的限速酶),从而抑制 PTP 的构象改变与开放。

1.2 CsA 与血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)

一般认为正常情况下, CsA 不能透过 BBB,但在损伤因素的作用下 BBB 受到破坏并产生对 CsA 的通透性,而且其通透性呈现一个动态变化过程:即伤后即刻 BBB 广泛破裂开放;伤后 6h BBB 功能恢复,包括 CsA 在内的小分子蛋白质不能通过;但伤后 24h BBB 又重新开放。Sullivan 等^[4]的研究也证实这一点,在大鼠创伤性脑损伤(tramatic brain injured, TBI)后 15min、1h、6h 和 24h 腹腔注射 CsA (20mg/kg),结果表明, 15min、1h、24h 用药组脑皮质损害明显减轻($P<0.01$),其中 15min 用药组脑保护作用最强($P<0.01$);但是 6h 用药组无明显的治疗保护作用。

1.3 CsA 剂量、用药方式及用药时间与脊髓损伤后保护效应之间的关系

Sullivan 等^[4]采用大鼠单侧皮质损伤后腹腔注射 CsA,观察剂量与效应之间的关系并确定最佳治疗剂量,发现剂量与效应之间有密切的关系, 20mg/kg 组治疗效果明显优于 40mg/kg、5mg/kg、1mg/kg 组 ($P<0.01$); 40mg/kg、5mg/kg、1mg/kg 各组间的治疗效果差异无统计学意义。

Diaz-Ruiz 等^[5,6]在大鼠脊髓挫伤模型中研究发现,损伤后早期给予腹腔注射 CsA (2.5mg/kg)能明显抑制脊髓损伤后的脂质过氧化反应,并减轻继发性脊髓损伤。

CsA 用药方式的不同决定了它的生物利用度会有所差异,因此, CsA 在神经中枢组织中的浓度和保护作用会因剂量和用药方式的不同而不同。Okonkwo 等^[7]分别给大鼠静脉内和鞘内注射 CsA,观察其在轴索损伤中的剂量效应关系,将大鼠分为对照组、5 个静脉给药组(3、10、20、30、50mg/kg)和 1 个鞘内给药组(10mg/kg),结果发现,鞘内给药组脑组织中药物浓度明显高于 10mg/kg 静脉给药组($P<0.01$);但与对照组比较, 10mg/kg 静脉给药组损伤轴索的密度最低($P<0.01$),明显优于 20、30mg/kg 组,而 30、50mg/kg 组损伤轴索未见明显减少,并且 50mg/kg 组中 50% 的动物出现癫痫发作,鞘内给药组疗效明显差于 10mg/kg 静脉给药组。结果表明, 10mg/kg 静脉给药对损伤脑组织的保护作用最强,但是剂量与效应之间不存在正向关

第一作者简介:男(1969-),主治医师,医学硕士,研究方向:脊柱脊髓

电话:(0591)28376477 E-mail:cyzhong3609@163.com.cn

系,大剂量 CsA 反而会产生神经毒性作用。

2 CsA 对 ASCI 的保护作用及机理

在脊髓继发性损伤过程中,其病理发展过程涉及微血管改变、水肿、能量代谢和多样化的生化改变及细胞凋亡等^[8-9]。目前认为有多种机制参与 CsA 对 ASCI 后神经保护作用,包括抑制炎症反应、抑制脂质过氧化反应、抗细胞凋亡、阻断小神经胶质细胞的激活、神经营养、促进轴突再生等。在大鼠压迫性脊髓损伤模型中,Ibarra 等^[10]通过对大鼠脊髓损伤后免疫学、形态学和功能变化的研究,发现 CsA 可以抑制损伤部位特异性淋巴细胞反应,还可以减轻 ASCI 后脱髓鞘反应,促进运动功能恢复和红核神经的存活。在兔的脊髓缺血动物模型中,Tachibana 等^[11]通过对神经功能评分和组织病理学评估研究表明,CsA 具有显著的神经保护作用。

2.1 抑制炎症反应作用

炎症反应是 SCI 主要继发性病理改变之一。中性粒细胞是急性炎症反应中的主要炎症细胞。活化的中性粒细胞聚集于内皮细胞表面,通过释放炎症介质如中性粒细胞弹性蛋白酶和氧自由基等介导炎症反应,加重损伤段脊髓的缺血。王立勋等^[12]通过对大鼠损伤节段脊髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)活性的测定,观察伤后脊髓局部中性粒细胞的聚集变化,发现局部中性粒细胞聚集增加,急性损伤后 3h 达高峰,24h 仍较高。Suzuki 等^[13]研究表明,CsA 能减轻中性粒细胞的组织浸润而发挥抗炎作用。此外,在炎症反应发生发展的过程中,细胞因子发挥着重要作用,其中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 是起关键作用的炎症介质。Yang 等^[14]认为这些细胞因子在 ASCI 早期主要由神经元和神经胶质细胞产生,而不是来源于血液中的粒细胞;CsA 能通过对小神经胶质细胞的激活抑制途径减少炎症介质产生,从而减轻炎症反应。

2.2 抑制脂质过氧化反应

ASCI 继发性损伤过程中,自由基攻击细胞膜被认为是重要的机制之一。自由基作用于游离或不饱和脂肪酸后形成脂质过氧化反应(lipid peroxidation,LP),导致细胞损伤。而超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)则是超氧自由基的特异性清除酶,它能明显减少自由基介导的脂质过氧化损伤,稳定溶酶体膜,从而对细胞起保护作用。中枢神经系统由于代谢快以及脂肪酸含量高而对自由基损害特别敏感。此外,中枢神经系统抗氧化酶活性较其他组织低^[15]。因此,ASCI 后自由基对神经组织的损害更加突出,抑制自由基形成脂质过氧化反应成为治疗 ASCI 继发性损伤重点之一。目前认为 CsA 抗脂质过氧化反应的可能机制为:(1)CsA 减少中性粒细胞的组织浸润,从而使脂质过氧反应明显减少^[13]。(2)通过直接减少一氧化氮(nitric oxide,NO)的产生而减少脂质过氧化反应。在脊髓挫伤动物模型中,Diaz-Ruiz 等^[16]发现,损伤后脊髓组织中存在脂质过氧化反应,在损伤后 1h、2h、6h、12h 分别给予 CsA(2.5mg/kg

腹腔注射),24h 后脊髓组织中脂质过氧化反应明显减少,且在脊髓损伤后 1h 给予 CsA 脂质过氧化反应减少最为显著。表明 ASCI 后早期给予 CsA 有明显抗脂质过氧化反应作用。

NO 是由一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase,NOS)催化左旋精氨酸(L-Arg)产生,NO 是中枢神经系统的一种重要的神经递质,一方面具有扩张血管、增加血流、减少血小板聚集、粘附,避免血栓形成,增加损伤区及其周围组织血供,起到组织保护的作用。但其本身也是一种小分子的活跃自由基,过量的 NO 可介导兴奋性神经毒性,与氧自由基反应生成过氧化硝基阴离子及羟自由基,引起广泛的脂质过氧化及蛋白质酪氨酸硝基化反应。NOS 广泛存在于包括中枢神经系统在内全身各系统中,有 3 种同工酶,即 nNOS、eNOS 和 iNOS,磷酸化状态无活性。在生理条件下,nNOS 和 eNOS 维持 NO 于相对的低水平,而在炎症、创伤等条件下,iNOS 则可大量产生 NO,在 ASCI 后,iNOS 表达明显增加^[17]。CsA 对 NOS 的抑制机理可能为:(1)CsA 对钙调磷酸酶(Calcineurin)的抑制。Calcineurin 可使 NOS 去磷酸化而活化。而 CsA 与 CyP-A 结合后抑制 Calcineurin,使 NOS 不能去磷酸化而失去活性;(2)CsA 对炎症介质的抑制而下调 NOS 合成;(3)CsA 影响核转录因子 κ B 而减少 NOS 基因表达。在大鼠脊髓挫伤模型中,Diaz-Ruiz 等^[5]在损伤后 12h 给予 CsA(2.5mg/kg 腹腔注射),iNOS 表达明显减少;在损伤后 2h 给予 CsA (2.5mg/kg 腹腔注射),nNOS 和 eNOS 表达减少^[16]。

2.3 抗细胞凋亡作用

细胞凋亡在 ASCI 继发性损伤过程中亦起重要作用。Irwin 等^[18]实验研究表明,CsA 具有抗细胞凋亡作用。CsA 减少 ASCI 后细胞凋亡可能机制:(1)通过抑制 PTP 的开放发挥抗凋亡作用。CsA 与 CyPD 特异性地结合,抑制 CyPD 的 PPIase 活性,抑制 PTP 的开放及其引起细胞色素 C(cyt C)的释放及 caspases 活化,从而抑制细胞凋亡^[13];(2)通过对 Calcineurin 抑制而发挥抗细胞凋亡。Calcineurin 是一种细胞死亡信号通路。Calcineurin 可使促凋亡因子 Bad 去磷酸化而活化,活化下游促凋亡因子 Bad,使线粒体释放细胞色素 C 而诱导凋亡。Wang 等^[19]研究表明,Calcineurin 通过活化促凋亡蛋白 Bad 而直接影响细胞的存活。

2.4 对小神经胶质细胞、神经营养及神经再生的作用

ASCI 后存在小神经胶质细胞的激活^[20]。小神经胶质细胞的激活后可产生多种氧自由基及 NO,直接损伤神经细胞。同时,激活的小神经胶质还会产生多种神经毒性细胞因子:FasL、TNF- α 等,以及促炎症性细胞因子:IL-1 β 、IL-6、INF- γ 等^[21]。这些细胞因子通过自分泌途径而进一步活化小神经胶质,加重神经细胞的损伤。Pyrzynska 等^[22]研究认为,CsA 能够抑制小神经胶质细胞的活化及细胞因子的表达,阻断小神经胶质细胞的激活。

Miyata 等^[23]在大鼠前脑局灶性缺血模型中发现,CsA

治疗后海马回 CA1 区脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)mRNA 表达增加, BDNF 及其受体 TrkB 表达增加。BDNF 是一种神经营养因子, 属神经营养家族, 在 ASCI 动物模型中, BDNF 具有促进神经功能恢复作用^[24, 25]。CsA 通过上调 BDNF 的表达, 从而发挥神经营养作用。

ASCI 后, 神经再生是近年来研究的热点。Skene^[26, 27]认为 CsA 能通过对 Calcineurin 的抑制, 使生长相关蛋白-43 (growth associated protein-43, GAP-43) 在损伤后保持活性, 促进轴突生长。

众多的研究表明, CsA 是可通过影响多种因素和多种途径对脊髓损伤发挥神经保护作用的药物, 为脊髓损伤治疗提供了新的方法。有必要对其进行更深入的研究。

3 参考文献

- Wang P, Heitman J. The cyclophilins [J]. *Genome Biology*, 2005, 6 (7): 226.
- Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, et al. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (34): 12005-12010.
- Nicolli A, Basso E, Petronilli V, et al. Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, and cyclosporine A sensitive channel [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271 (4): 2185-2192.
- Sullivan PC, Rabchevsky AG, Hicks RR, et al. Dose-response curve and optimal dosing regimen of cyclosporin A after traumatic brain injury in rats [J]. *Neuroscience*, 2000, 101 (2): 289-295.
- Diaz-Ruiz A, Verarab P, Perez-Severiano F, et al. Cyclosporin-A inhibits inducible nitric oxide synthase activity and expression after spinal cord injury in rats [J]. *Neuroscience Letters*, 2004, 357 (1): 49-52.
- Diaz-Ruiz A, Verarab P, Perez-Severiano F, et al. Cyclosporin-A inhibits constitutive nitric oxide synthase activity and neuronal and endothelial nitric oxide synthase expressions after spinal cord injury in rats [J]. *Neurochemical Research*, 2005, 30 (2): 245-251.
- Okonkwo DO, Melon DE, Pellicane AJ, et al. Dose-response of cyclosporine A in attenuating traumatic axonal injury in the rat [J]. *Neuroreport*, 2003, 14 (3): 463-466.
- Dumont RJ, Okonkwo DO, Verma S, et al. Acute spinal cord injury part 1: pathophysiologic mechanisms [J]. *Clin Neuropharmacol*, 2001, 24 (5): 254-264.
- Whalley K, O'Neill P, Ferretti P. Changes in response to spinal cord injury with development: vascularization, hemorrhage and apoptosis [J]. *Neuroscience*, 2006, 137 (3): 821-832.
- Ibarra A, Correa D, Willms K, et al. Effects of cyclosporine A on immune response, tissue protection and motor function of rats subjected to spinal cord injury [J]. *Brain Res*, 2003, 979 (1-2): 165-178.
- Tachibana T, Shiiya N, Kuniyama T, et al. Immunophilin ligands FK506 and cyclosporine A improve neurologic and histopathologic outcome after transient spinal cord ischemia in rabbits [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2005, 129 (1): 123-128.
- 王立勋, 黄煌渊, 姜建元, 等. 中性粒细胞在急性脊髓损伤中作用的实验研究 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2003, 13 (9): 544-546.
- Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, et al. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury: modulating effects of FK506 and cyclosporine [J]. *Transplantation*, 1993, 55 (3): 1265-1272.
- Yang L, Bumbergs PC, Jones NR, et al. Early expression and cellular localization of proinflammatory cytokines interleukin-1 β , interleukin-6 and tumor necrosis factor- α in human traumatic spinal cord injury [J]. *Spine*, 2004, 29 (9): 966-971.
- Aspberg A, Tottmar O. Oxidative stress decreases antioxidant enzyme activities in reaggregation cultures of brain cells [J]. *Free Radical Biol Med*, 1994, 17 (4): 511-516.
- Diaz-Ruiz A, Riosse C, Duarte I, et al. Cyclosporin-A inhibits lipid peroxidation after spinal cord injury in rats [J]. *Neuroscience Letters*, 1999, 266 (1): 61-64.
- Liu C, Jin A, Zhou C, et al. Nitric oxide synthase gene expression in injured spinal cord tissue [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2002, 115 (5): 740-742.
- Irwin WA, Bergamin N, Sabatelli P, et al. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency [J]. *Nat Genet*, 2003, 35 (4): 367-371.
- Wang HG, Pathan N, Ethell IM, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin in dephosphorylation of Bad [J]. *Science*, 1999, 284 (5412): 339-343.
- Hains BC, Waxman SG. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury [J]. *J Neurosci*, 2006, 26 (16): 4308-4317.
- Rothwell NJ. Cytokines-killers in the brain [J]. *J Physiol*, 1999, 514 (1): 3-17.
- Pyrzynska B, Lis A, Mosieniak G, et al. Cyclosporin A-sensitive signaling pathway involving calcineurin regulates survival of reactive astrocytes [J]. *Neurochem Int*, 2001, 38 (5): 409-415.
- Miyata K, Omori N, Uchino H, et al. Involvement of the brain derived neurotrophic factor/TrkB pathway in neuroprotective effect of cyclosporine A in forebrain ischemia [J]. *Neuroscience*, 2001, 105 (3): 571-578.
- Vavrek R, Girgis J, Tetzlaff W, et al. BDNF promotes connections of corticospinal neurons onto spared descending interneurons in spinal cord injured rats [J]. *Brain*, 2006, 129 (6): 1534-1545.
- Koda M, Hashimoto M, Murakai M, et al. Adenovirus vector-mediated in vivo gene transfer of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes rubrospinal axonal regeneration and functional recovery after complete transection of the adult rat spinal cord [J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21 (3): 329-337.
- Skene JH. Axonal growth-associated proteins [J]. *Annu Rev Neurosci*, 1989, 12 (3): 127-156.
- Skene JH. GAP-43 as 'calmodulin sponge' and some implications for calcium signaling in axon terminals [J]. *Neurosci Resuppl*, 1990, 13 (2): 112-125.

(收稿日期: 2007-01-22 修回日期: 2007-03-26)

(本文编辑 彭向峰)