

## · 综述 ·

## 组织型纤溶酶原激活剂对神经血管单元功能影响的研究进展

巫嘉陵<sup>1</sup> 综述 王纪佐<sup>2</sup> 审校

1. 天津市环湖医院神经内科,天津市 300060

2. 天津医科大学第二医院神经内科,天津市 300211

**摘要:**组织型纤溶酶原激活剂(tPA)是体内重要的丝氨酸蛋白酶,已被美国FDA批准用于急性缺血性脑卒中超早期溶栓治疗。tPA也在神经血管单元中广泛表达,通过与不同细胞表面受体相互作用介导细胞信号传导,在不同的病理过程中发挥重要作用,影响神经元、胶质细胞和血脑屏障的功能。本文就近年来该领域的研究进展做一综述。

**关键词:**组织型纤溶酶原激活剂;神经血管单元;脑卒中

组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, tPA)的重要功能就是溶解血栓<sup>[1]</sup>。tPA激活纤溶酶原使其转化为有蛋白酶活性的纤溶酶,后者促使血栓主要基质水不溶性纤维蛋白水解,形成可溶性肽段,使血栓溶解,血管再通。因为tPA的血栓溶解功能,所以它被用于治疗急性心肌梗死和脑卒中<sup>[2]</sup>。tPA的蛋白水解活性主要由I型纤溶酶原激活剂抑制剂(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)和neuroserpin来调控<sup>[3]</sup>。

脑的海马区、杏仁核、小脑、下丘脑、皮质和脊髓等均可检出tPA的表达,参与调控学习与记忆、情绪、内分泌等多种生理功能。tPA与不同细胞表面受体如低密度脂蛋白受体相关蛋白1(low density lipoprotein receptor related protein-1, LRP1)<sup>[4]</sup>和膜联蛋白II等相互作用介导细胞信号传导。所以,tPA在中枢神经系统的作用受到广泛关注。

血和脑之间的屏障由神经血管单元(neurovascular units, NVU)组成,包括内皮细胞、基底膜、管周星形胶质细胞和神经元<sup>[5]</sup>。NVU的主要作用是对脑和血管腔物质交换双向调控,NVU的屏障作用即我们所知的血脑屏障,主要取决于内皮细胞的紧密联接和血管周围星形胶质细胞和基底膜的相互作用。在中枢神经系统中,神经元、胶质细胞和内皮细胞等都可分泌tPA,病理状态下tPA对神经血管单元的功能有重要的调控作用,直接影响了各种疾病的预后。

## 1 tPA的神经保护作用 and 神经毒性

tPA在脑实质中参与诸如突触重塑、细胞死亡等多种病理生理功能。近年来,对tPA究竟是神经保护剂还是具有神经毒性一直存在争论,但显然tPA对预后的影响与实验模型的选择,刺激方式的不同有很大关系。

在兴奋性氨基酸受体激活介导的细胞损伤中,tPA有神经毒性,tPA基因敲除或给予PAI-1或neuroserpin抑制tPA活性都有神经保护作用。Wang等<sup>[6]</sup>用tPA<sup>-/-</sup>小鼠与野生型小鼠对比作脑缺血实验时,发现tPA<sup>-/-</sup>小鼠可以减少脑缺血后的脑损伤。tPA<sup>-/-</sup>小鼠在脑缺血后脑梗死范围比野生型小鼠小50%。用野生型小鼠和tPA<sup>-/-</sup>小鼠的大脑皮质原代神经元细胞作培养时发现,给予OGD后tPA<sup>-/-</sup>小鼠的神经元死亡数明显比野生型小鼠少,向培养的tPA<sup>-/-</sup>小鼠的神经元细胞中加入tPA后,该神经元对OGD的耐受性降低,死亡数增多。Tabrizi等<sup>[7]</sup>得出的结论却正好相反。与对照组相比,tPA<sup>-/-</sup>小鼠脑血管纤维蛋白沉积和脑梗塞面积分别增加了8.2和6.7倍,脑血流下降了58%,运动神经功能评分下降70%。与Wang等<sup>[6]</sup>实验不同的是Tabrizi等<sup>[7]</sup>使用遗传背景相同的tPA<sup>-/-</sup>小鼠和对照组。梗塞模型使用的是没有用硅胶包被的线栓。解释两种结果差异性除了遗传背景外,线栓使用的差异也是主要原因。Wang等<sup>[6]</sup>用硅胶包被的线栓,不溶性硅胶栓子机械作用阻塞了大脑中动脉,对照组小

收稿日期:2011-05-09;修回日期:2011-07-16

作者简介:巫嘉陵(1974-),男,副主任医师,博士,主要从事脑血管病方向的基础与临床研究。

鼠内源性 tPA 无法对阻塞的线栓产生降解作用,所以不能从血栓溶解中获得益处。而 Tabrizi 等<sup>[7]</sup>使用的是没有用硅胶包被的线栓,从而造成脑微血管的栓塞,对照组小鼠内源性 tPA 可以对微血管的栓塞产生降解作用,使血管再通,能从血栓溶解中获得益处。Armstead 等<sup>[8]</sup>研究显示,在不溶性硅胶栓子机械性阻塞大脑中动脉的模型中 tPA 展示出加重神经损伤的神经毒性作用,而在非机械性栓子阻塞大脑中动脉的模型中 tPA 展示出减轻神经损伤的神经保护作用。

脑缺血后, tPA 可以与 NMDAR 作用介导兴奋性毒性造成神经元死亡。有研究显示, tPA 裂解 NMDAR 的 NR1 亚基,增强 NMDA 介导的  $\text{Ca}^{2+}$  内流和神经元退化<sup>[9]</sup>。但 Martel 等<sup>[10]</sup>发现 tPA 与 NR2B 亚基相互作用而不是 NR1 亚基。tPA 的神经毒性作用可以通过其蛋白水解活性即由纤溶酶介导产生<sup>[11]</sup>,也可以通过激活小胶质细胞<sup>[12]</sup>或破坏血脑屏障<sup>[13]</sup>来产生。纤溶酶的产生可以破坏细胞外基质的层粘连蛋白和其他组分,导致神经元丧失与赖以生存的环境的联系从而启动凋亡程序。

Emmetsberger<sup>[14]</sup>发现, tPA 是通过上调锌流入转运体 ZIP4 增加神经元锌内流来保护神经细胞的。Echeverry 等<sup>[15]</sup>近来利用预处理的体内和体外模型发现 tPA 对鼠脑海马神经元有保护作用。海马神经元在亚致死性缺血发作时快速释放 tPA,可以减少致死性缺血损害后海马神经元死亡,而海马 tPA 的缺乏增加海马神经元死亡。在致死性缺血损害的同时,若给予高浓度的外源性 tPA 可以保护神经元。tPA 的早期预处理作用独立于纤溶酶原/纤溶酶系统,而需与 LRP1 相互作用激活细胞信号通路介导早期神经保护。另外,在致死性缺血损害发生前 24 h,给予 tPA 也可以保护神经元。tPA 的延迟预处理作用需要他的蛋白水解活性,通过纤溶酶激活 NMDA 受体介导 Akt 磷酸化起到神经保护作用。因为多年以来一直认为 neuroserpin 在缺血脑组织中的神经保护作用是通过抑制 tPA 的有害作用来实现的。但上述结果显然质疑了 neuroserpin 神经保护作用的机制。Wu 等<sup>[16]</sup>继续对 neuroserpin 在缺血脑组织中的神经保护作用进行了研究发现, neuroserpin 的神经保护作用至少部分不依赖其抑制 tPA 的能力,而与其抑制纤溶酶介导的细胞死亡有关。

## 2 tPA 与小胶质细胞

在中枢神经系统中小胶质细胞和神经元均可

以对 tPA 表达和转录的增加产生应答。利用酶谱分析发现只有含有激活的小胶质细胞的培养基中有 tPA 的存在。用 tPA 刺激小胶质细胞后,可以诱导海马神经元凋亡。该体系中加入 PAI-1 或者 tPA 的中和抗体可以阻止凋亡的出现<sup>[17]</sup>,说明了激活的小胶质细胞产生的 tPA 可以造成神经元死亡。Zhang 等<sup>[18]</sup>发现,急性缺血后 tPA 与小胶质细胞的 LRP1 受体相互作用导致小胶质细胞激活,内生型一氧化氮合成酶生成增加,从而介导脑缺血后的炎症反应。这种增高的炎症反应在 tPA<sup>-/-</sup>或小胶质细胞 LRP 受体基因缺陷( macLRP-)小鼠有明显下降,但给予外源性 tPA 后,只能增加 tPA<sup>-/-</sup>小鼠的炎症反应而对 macLRP-小鼠则无明显影响。

兴奋性毒性可以导致 tPA 转录的增加,而且 tPA 又在兴奋性毒性的过程中扮演了重要的角色。在线栓法大脑中动脉中断(MCAO)模型中 tPA 在梗死侧的表达增加,从而导致了梗死区域边缘激活的小胶质细胞数量增加。Siao 等<sup>[19]</sup>用两种特定部位转基因表达的 tPA 小鼠,一种是 tPA 只在神经元中表达(NF-L-tPA),另一种是 tPA 只在小胶质细胞中表达(fms-tPA),利用这两种小鼠可以进一步明确 tPA 在不同细胞中的作用。fms-tPA 小鼠与野生型小鼠神经元变性的过程和小胶质细胞的激活程度相似,与野生型或者 fms-tPA 小鼠相比, NF-L-tPA 小鼠显示出相对缓慢的损伤反应和更早的小胶质细胞的激活。这种神经元变性时间的延迟并不是因为有较低的 tPA 表达,因为 fms-tPA 小鼠的 tPA 活性甚至低于 NF-L-tPA 小鼠。NF-L-tPA 小鼠小胶质细胞的激活和神经元变性产生时间上的差异可能是由于小胶质细胞激活的不同阶段产生了不同的作用。当小胶质细胞基因表达改变产生 NO 或 TNF- $\alpha$ ,从而增加了小胶质细胞的招募和激活,产生神经毒性,而当损害发生早期,小胶质细胞清除有害的物质时,它们起到的是神经保护作用。

## 3 tPA 与星形胶质细胞

tPA 与星形胶质细胞上的受体相互作用主要调控 NVU 的通透性。tPA 可能通过星形胶质细胞上 LRP 受体从血管内到达脑实质,从而产生脑水肿和脑出血转化。An 等<sup>[20]</sup>研究发现,在脑缺血发作早期星形细胞表面 LRP 表达增加,与 tPA 作用导致 Akt 磷酸化增加 NVU 的通透性。

在血管周围星形细胞上 tPA 与 LRP 作用介导了 P65 的磷酸化与核转运说明存在 NF- $\kappa$ B 通路的

活化。活化的 NF- $\kappa$ B 在胶质细胞中导致细胞死亡,而在神经元中有保护作用。Polavarapu 等<sup>[13]</sup>发现,在脑缺血发作早期星形细胞、基底膜、内皮细胞屏障周围 tPA 增多,星形胶质细胞上的 LRP 表达增加,与 tPA 作用导致 LRP 细胞外区域脱落到基底膜,脱落的胞外区被 LRP 跨膜区蛋白水解后所调控,这个过程导致 LRP 胞浆区释放,通过 NF- $\kappa$ B 激活调控的细胞信号过程并伴随着 iNOS 和 MMP-9 表达增加,使得 NVU 通透性增高。中枢神经系统 NF- $\kappa$ B 激活增加 MMP-9 和内生型一氧化氮合酶的表达与活性,后二者被认为与脑缺血时 NVU 通透性增高有关。

#### 4 tPA 与血脑屏障(BBB)

生理情况下,tPA 即可调控 NVU 的通透性,向无脑缺血的脑室中注射 tPA 可以产生剂量依赖的通透性增高。如果向脑室中注入 tPA,并没有发现 BBB 通透性改变,显示 tPA 与 LRP 相互作用,介导 BBB 通透性增加<sup>[4]</sup>。

NVU 通透性的调控是维持正常生理功能所必需的,一些病理情况下,NVU 通透性增高导致过多体液从血管内侧到血管外,造成血管源性脑水肿<sup>[21]</sup>。tPA 对微血管床和 BBB 通透性有不容忽视的影响<sup>[4]</sup>。脑缺血早期即有 NVU 部件包括紧密连接蛋白和基底膜的降解,伴随而来的是血管腔中液体向脑组织通过增加而致脑水肿和出血形成。脑缺血后 BBB 的开放有两个时相,第一次 BBB 开放与血流动力学因素有关,包括酸性物质导致的血管扩张和再灌注导致的血管自动调节能力丧失,脑血管压力升高改变通过内皮细胞运输的过程并且打开了内皮细胞间的联接。后一个 BBB 开放是因为 NVU 损伤,造成血管源性脑水肿<sup>[22]</sup>。tPA 与这两个时相的 BBB 开放均有关系。MCAO 后 1 h,核心坏死区周围 tPA 活性上升,5 h 后 BBB 通透性增高,说明 tPA 介导了脑缺血导致的 NVU 通透性增高<sup>[3]</sup>。而且,往脑脊液中注射 tPA 导致剂量相关的 NVU 通透性增高,这种趋势可被 LRP 拮抗剂 RAP 和抗 LRP 抗体抑制。

除了 LRP 依赖机制,tPA 也能通过局部激活血小板来源的生长因子-CC(PDGF-CC)和星形胶质细胞上 PDGF- $\alpha$  受体致 NVU 通透性增高,这种作用不受 RAP 抑制<sup>[23]</sup>。在栓塞性卒中的动物模型中,应用 tPA 导致 BBB 通透性增高和 MMP-9 表达和活性增加<sup>[24]</sup>。MMPs 在 MCAO 后上升可以加速血管

基底膜的蛋白水解,随后导致 BBB 通透性上升和血管源性水肿,所以 MMP-9 基因敲除小鼠对脑缺血耐受性好的原因之一是 BBB 相对完整。MCAO 栓塞模型显示,给予 tPA 治疗后 MMP-9 表达上升,BBB 通透性升高,加重血管源性水肿,而在应用 tPA 之前给予 neuroserpin 则显著降低 BBB 通透性,由脑缺血介导的 MMP-9 活性在 tPA 基因敲除小鼠或给予 neuroserpin 治疗后显著下降<sup>[4]</sup>。用不同体细胞系的体外实验表明 tPA 与 LRP 结合致 LRP 胞浆区短暂的酪氨酸磷酸化,可导致 MMP-9 合成增加<sup>[25]</sup>。也有研究认为 BBB 通透性的增高与 MMP-9 的变化无关。tPA 与 MMP-9 相互关系并不依赖于纤溶酶原系统,因为纤溶酶原基因敲除小鼠与野生型小鼠一样,在 MCAO 后 MMP-9 活性上升<sup>[2]</sup>,而且纤溶酶原、MMP-9 和 tPA 三种基因敲除小鼠在 MCAO 后并没有显示 BBB 通透性较野生型下降,故认为 tPA 破坏 BBB 通透性是独立于纤溶酶原和 MMP-9。那些 MMP-9 在 MCAO 后升高可能是因为其经过损坏的血脑屏障漏至缺血脑组织的原因。

随着人们对 tPA 的研究更加深入、系统,研究的重点除了提高他的溶栓作用外,还要尽可能减少其神经毒性,增加神经保护作用。

#### 参 考 文 献

- [1] Armstead WM, Ganguly K, Kiessling JW, et al. Signaling, delivery and age as emerging issues in the benefit/risk ratio outcome of tPA For treatment of CNS ischemic disorders. *J Neurochem*, 2010, 113(2): 303-312.
- [2] Hatcher MA, Starr JA. Role of tissue plasminogen activator in acute ischemic stroke. *Ann Pharmacother*, 2011, 45(3): 364-371.
- [3] Ricagno S, Caccia S, Sorrentino G, et al. Human neuroserpin: structure and time-dependent inhibition. *J Mol Biol*, 2009, 388(1): 109-121.
- [4] Yepes M, Sandkvist M, Moore EG, et al. Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor-related protein. *J Clin Invest*, 2003, 112(10): 1533-1540.
- [5] del Zoppo GJ. The neurovascular unit, matrix proteases, and innate inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1207: 46-49.
- [6] Wang YF, Tsirka SE, Strickland S, et al. Tissue plasminogen activator (t-PA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and t-PA deficient mice. *Nat Med*, 1998, 4(2): 228-231.
- [7] Tabrizi P, Wang L, Seeds N, et al. Tissue plasminogen ac-

- tivator ( tPA ) deficiency exacerbates cerebrovascular fibrin deposition and brain injury in a murine stroke model ; studies in tPA-deficient mice and wild-type mice on a matched genetic background. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* , 1999 , 19 ( 11 ) : 2801-2806 .
- [ 8 ] Armstead WM , Nassar T , Akkawi S , et al . Neutralizing the neurotoxic effects of exogenous and endogenous tPA . *Nat Neurosci* , 2006 , 9 ( 9 ) : 1150-1155 .
- [ 9 ] Macrez R , Bezin L , Le Mauff B , et al . Functional occurrence of the interaction of tissue plasminogen activator with the NR1 Subunit of N-methyl-D-aspartate receptors during stroke. *Stroke* , 2010 , 41 ( 12 ) : 2950-2955 .
- [ 10 ] Martel MA , Wyllie DJ , Hardingham GE . In developing hippocampal neurons , NR2B-containing N-methyl-D-aspartate receptors ( NMDARs ) can mediate signaling to neuronal survival and synaptic potentiation , as well as neuronal death. *Neuroscience* , 2009 , 158 ( 1 ) : 334-343 .
- [ 11 ] Sheehan JJ , Zhou C , Gravanis I , et al . Proteolytic activation of monocyte chemoattractant protein-1 by plasmin underlies excitotoxic neurodegeneration in mice. *J Neurosci* , 2007 , 27 ( 7 ) : 1738-1745 .
- [ 12 ] Yepes M , Roussel BD , Ali C , et al . Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain ; more than a thrombolytic. *Trends Neurosci* , 2009 , 32 ( 1 ) : 48-55 .
- [ 13 ] Polavarapu R , Gongora MC , Yi H , et al . Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. *Blood* , 2007 , 109 ( 8 ) : 3270-3278 .
- [ 14 ] Emmetsberger J , Mirrione MM , Zhou C , et al . Tissue plasminogen activator alters intracellular sequestration of zinc through interaction with the transporter ZIP4. *J Neurosci* , 2010 , 30 ( 19 ) : 6538-6547 .
- [ 15 ] Echeverry R , Wu J , Haile WB , et al . Tissue-type plasminogen activator is a neuroprotectant in the mouse hippocampus. *J Clin Invest* , 2010 , 120 ( 6 ) : 2194-2205 .
- [ 16 ] Wu J , Echeverry R , Guzman J , et al . Neuroserpin protects neurons from ischemia-induced plasmin-mediated cell death independently of tissue-type plasminogen activator inhibition. *Am J Pathol* , 2010 , 177 ( 5 ) : 2576-2584 .
- [ 17 ] Flavin MP , Zhao G , Ho LT . Microglial tissue plasminogen activator ( tPA ) triggers neuronal apoptosis in vitro. *Glia* , 2000 , 29 ( 4 ) : 347-354 .
- [ 18 ] Zhang C , An J , Strickland DK , et al . The low-density lipoprotein receptor-related protein 1 mediates tissue-type plasminogen activator-induced microglial activation in the ischemic brain. *Am J Pathol* , 2009 , 174 ( 2 ) : 586-594 .
- [ 19 ] Siao CJ , Fernandez SR , Tsirka SE . Cell type-specific roles for tissue plasminogen activator released by neurons or microglia after excitotoxic injury. *J Neurosci* , 2003 , 23 ( 8 ) : 3234-3242 .
- [ 20 ] An J , Zhang C , Polavarapu R , et al . Tissue-type plasminogen activator and the low-density lipoprotein receptor-related protein induce Akt phosphorylation in the ischemic brain. *Blood* , 2008 , 112 ( 7 ) : 2787-2794 .
- [ 21 ] 侯景明 , 黎海涛 . 血脑屏障破坏与脑水肿发生研究进展 . *国际神经病学神经外科学杂志* , 2010 , 37 ( 3 ) : 260-263 .
- [ 22 ] Huang ZG , Xue D , Preston E , et al . Biphasic opening of the blood-brain barrier following transient focal ischemia : effects of hypothermia. *Can J Neurol Sci* , 1999 , 26 ( 4 ) : 298-304 .
- [ 23 ] Su EJ , Fredriksson L , Geyer M , et al . Activation of PDGFR-CC by tissue plasminogen activator impairs blood-brain barrier integrity during ischemic stroke. *Nat Med* , 2008 , 14 ( 7 ) : 731-737 .
- [ 24 ] Lee SR , Guo SZ , Scannevin RH , et al . Induction of matrix metalloproteinase , cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators. *Neurosci Lett* , 2007 , 417 ( 1 ) : 1-5 .
- [ 25 ] Hu K , Yang J , Tanaka S , et al . Tissue-type plasminogen activator acts as a cytokine that triggers intracellular signal transduction and induces matrix metalloproteinase-9 gene expression. *J Biol Chem* , 2006 , 281 ( 4 ) : 2120-2127 .