

DOI: 10.13376/j.cblls/2024028

文章编号: 1004-0374(2024)02-0258-08

儿茶素抑制脑缺血再灌注诱导细胞死亡的研究进展

沈海英¹, 谢露², 陈蒙华^{1*}

(1 广西医科大学第二附属医院, 南宁 530007; 2 广西医科大学基础医学院生理学教研室, 南宁 530021)

摘要: 脑缺血再灌注 (ischemic/reperfusion, I/R) 最常见于缺血性脑卒中恢复血流再通后以及心脏骤停/心肺复苏 (cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation, CA/CPR) 后, 在再灌注的病理因素条件下引起的脑功能损伤, 最终会导致细胞死亡。大量研究表明, 脑 I/R 诱导的细胞死亡形式包括凋亡、焦亡、自噬、坏死性凋亡、铁死亡等, 研究细胞死亡可以揭示脑 I/R 损伤的病理机制, 从而为寻找治疗靶点来改善神经功能提供线索。儿茶素作为抗氧化剂能够抑制因氧化应激引起的细胞死亡, 而脑 I/R 诱导细胞死亡的形式存在多样性表明其病理机制具有多样性。因此, 本文对其进行归纳总结, 旨在揭示其规律, 以期能为研究开发治疗脑 I/R 损伤的药物提供新思路。

关键词: 儿茶素; 脑缺血再灌注; 凋亡; 焦亡; 自噬

中图分类号: R743 **文献标志码:** A

Research progress of catechins inhibiting cell death induced by cerebral ischemia/reperfusion

SHEN Hai-Ying¹, XIE Lu², CHEN Meng-Hua^{1*}

(1 Second Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530007, China; 2 Department of Physiology, College of Basic Medical Sciences, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract: Cerebral ischemia/reperfusion (I/R) is most commonly observed following the restoration of blood flow after ischemic stroke and during cardiac arrest/cardiopulmonary resuscitation (CA/CPR). Under the pathological conditions of reperfusion, functional damage ultimately results in cell death in the brain. Extensive research has demonstrated that cerebral I/R induces various forms of cell death, including apoptosis, pyroptosis, autophagy, necroptosis, and ferroptosis. Investigating these cell death mechanisms can unveil the underlying pathological processes of cerebral I/R injury, providing valuable insights for identifying therapeutic targets to improve neurological function. Catechins, as antioxidants, have the ability to suppress cell death induced by oxidative stress. The presence of diverse forms of cell death in cerebral I/R highlights the heterogeneous nature of its pathological mechanisms. Therefore, in this review we aim to summarize and identify the patterns of these mechanisms, offering new perspectives for the development of treatments for cerebral I/R injury in both basic and clinical research.

Key words: catechins; cerebral ischemia/reperfusion; apoptosis; pyroptosis; autophagy

脑血管疾病是目前世界上严重威胁人类健康的常见疾病之一。据最新估计, 脑卒中是目前全球第二主要死因, 也是致残的第三大原因^[1-2], 而缺血性脑卒中占有所有卒中的 60% 以上^[3], 给社会造成了巨大的经济负担。大脑是人体中对缺血缺氧极其敏感的重要器官, 缺血性脑卒中发生时, 急性再灌注是目前最有效的治疗方法。短暂或持续的缺血缺氧

会导致脑细胞在不同程度上出现结构破坏和功能障碍, 但在再灌注后神经功能未见改善反而出现更为严重的脑机能损害现象, 我们称之为脑缺血再灌注

收稿日期: 2023-07-20; 修回日期: 2023-09-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(82160372)

*通信作者: E-mail: cmhnn@sina.com

损伤 (cerebral ischemia/reperfusion injury, CIRI)^[4-5]。根据死亡的不同机制以及不同形态, 可把脑 I/R 诱导的细胞死亡分为凋亡、焦亡、自噬、坏死性凋亡以及铁死亡等多种死亡形式^[6](表 1), 其病理机制十分复杂, 而氧化应激被认为是 I/R 诱导细胞死亡发生的早期事件和关键病理机制^[7-8]。氧化应激以机体氧化还原失衡, 产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和大量消耗内源性抗氧化物为其特征^[9]。过量 ROS 加速线粒体功能障碍, 通过激活胱天蛋白酶 (Caspase) 家族促进线粒体依赖性凋亡途径的发生^[4, 9]; 同时, 大量 ROS 攻击正常组织细胞, 激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体从而诱导细胞焦亡发生^[10]; 此外, I/R 导致 ROS 增多可调控自噬相关基因的转录和蛋白表达, 从而介导自噬途径的激活^[11-12]。鉴于机体内 ROS 积累与脑 I/R 诱导的多种死亡形式紧密相关, 因此众多研究学者都试图通过开发抗氧化剂来抑制脑 I/R 因氧化应激而诱导的细胞死亡, 从而发挥神经保护作用。

在众多抗氧化药物中, 儿茶素在拮抗脑 I/R 损伤领域得到广泛研究。儿茶素作为绿茶中茶多酚发挥生物活性的主要有效成分, 其单体主要包括 4 种: 表儿茶素 (epicatechin, EC)、表儿茶素没食子酸酯 (epicatechin gallate, ECG)、表没食子酸儿茶素 (epigallocatechin, EGC) 和表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate, EGCG), 其中 EGCG 又被认为最具有生物活性^[13]。既往 Misaka 等^[14] 研究显示 EC、ECG、EGC 和 EGCG 在大鼠体内的口

服生物利用度分别为 6.7%、0.5%、6.2% 和 1.0%。儿茶素能够抑制脑 I/R 诱导的不同类型细胞死亡, 其可能通过多种作用机制对脑 I/R 损伤的不同病理过程进行干预。因此本文对其进行归纳总结并寻找规律, 以期能为基础和临床上研究挖掘治疗脑 I/R 损伤的药物靶点提供新思路。

1 儿茶素抑制脑 I/R 诱导的细胞死亡

已有大量研究证实儿茶素可通过调控死亡信号通路参与脑 I/R 下神经细胞存亡过程, 具有拮抗脑 I/R 损伤的作用。

1.1 儿茶素抑制脑 I/R 诱导的细胞凋亡

细胞凋亡 (apoptosis) 是机体在生理或者病理条件下由细胞内外微环境紊乱引起依赖 Caspase 家族激活级联反应的一种程序性细胞死亡方式, 其形态特征 (表 1) 主要表现为细胞收缩、膜起泡、染色质收缩、DNA 片段化等^[6, 15]。凋亡主要通过外在途径和内在途径两种方式参与脑 I/R 损伤的病理生理过程^[16-17], 是脑 I/R 诱导的主要细胞死亡方式之一。凋亡外在途径主要与死亡受体相关, 当机体受到 I/R 刺激, 死亡受体激活后募集和活化 Caspase-8, 随后进一步激活 Caspase-3, 活化后的 Caspase-3 负责裂解众多死亡底物, 从而启动凋亡外在途径^[18]。而内源性凋亡途径则主要由线粒体调节, 当脑 I/R 发生时, 大量 ROS 攻击线粒体造成线粒体膜电位发生改变和线粒体通透性转换孔开放, 导致细胞色素 C (cytochrome c, CytC) 和凋亡诱导因子的释放, 然后在 ATP 存在的情况下, CytC 与凋亡蛋白酶激活因子 1 和 Caspase-9 前体 (proCaspase-9) 结合形成凋

表1 不同类型程序性死亡的特点比较

	凋亡	焦亡	细胞自噬	坏死性凋亡
诱因/病因	基因调控下的程序性死亡, 主动进行(自杀性)	病理因素刺激, 如 LPS、ROS等	营养缺乏能量耗竭或者激素诱导	病理性损伤等
细胞形态	细胞收缩、不规则	细胞肿胀变形	细胞质广泛空泡化	细胞肿胀
细胞膜	质膜完整、起泡	质膜破裂成孔洞	质膜完整	质膜破裂
细胞器	细胞核固缩	细胞核固缩	形成自噬小体, 最后被溶酶体降解	胞核与胞质分离, 细胞器肿胀
通路重要蛋白分子	Caspase-3/8/9、Bax、Bcl-2、PARP等	NLRP3、ASC、Caspase-1/4/5/11、GSDMD/GSDMD-N、IL1β、IL18等	ATG、mTOR、LC3、Beclin-1、p62等	TNFα、RIPK1、RIPK3、Caspase-8、MLKL等

注: LPS: 脂多糖; ROS: 活性氧; Caspase家族: 胱天蛋白酶家族; Bcl-2: B细胞淋巴瘤2; Bax: Bcl-2相关蛋白; PARP: 聚(ADP-核糖)聚合酶; NLRP3: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3; ASC: 受体蛋白的凋亡相关斑点样蛋白; GSDM家族: gasdermin家族; ATG: 自噬相关基因; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; LC3: 微管相关蛋白1轻链3; TNFα: 肿瘤坏死因子α; RIPK1: 受体相互作用蛋白激酶1; RIPK3: 受体相互作用蛋白激酶3; MLKL: 混合谱系激酶结构域样蛋白

亡小体, 后者激活 Caspase-9 并随后活化凋亡执行蛋白 Caspase-3, 诱导 DNA 损伤和启动内源性凋亡发生^[9, 16-17, 19-20]。另外, B 细胞淋巴瘤 2 (B cell lymphoma-2, BCL-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 是线粒体内在凋亡途径中的关键调节因子, 两者在凋亡调控功能上相互对立, Bcl-2 是最主要的凋亡抑制基因, 而 Bax 则主要促进凋亡发生, 二者相互作用, 共同决定细胞是否进入凋亡程序^[6, 15, 21]。

脑 I/R 时, 过量 ROS 导致 Bcl-2/Bax 比率降低, 促使细胞凋亡发生^[9], 而儿茶素单体 EGCG 和 EC 在大鼠大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 模型中能够逆转上述变化, 提高 Bcl-2/Bax 比率^[22-24]; 同时降低凋亡级联反应中关键蛋白 Caspase-3 和聚 (ADP-核糖) 聚合酶 (poly (ADP-ribose) polymerase, PARP) 的表达^[23-25], 这也是抑制凋亡的先决条件之一。在体外细胞氧糖剥夺/再灌注 (oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, OGD/R) 实验中, 儿茶素单体 ECG 和 EGCG 显著减弱 OGD/R 诱导的神经细胞凋亡, 逆转 OGD/R 诱导的 Bcl-2/Bax 比值变化, 并拮抗 Caspase-3 和 PARP 蛋白表达^[26-27], 这也与动物体内实验一致。大量研究表明在动物 MCAO 模型中儿茶素具备抗凋亡作用^[28-30], 由于大量 ROS 能诱导凋亡发生, 因此在进一步的机制探讨方面, 大部分研究又集中在儿茶素的抗氧化作用。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor-2, Nrf2) 通路是一条经典抗氧化通路, Nrf2 作为对氧化还原敏感的转录因子, 被认为是细胞中抵御氧化应激的最关键调节因子^[31], 它与谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX)、血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和硫氧化蛋白 (thioredoxin, TRX) 等抗氧化物质构成上下游抗氧化网络^[31]。尽管有研究报道, 大鼠 MCAO 模型腹腔注射 50 mg/kg EGCG 可能会增加急性脑出血的概率, 但不可否认的是, 它对缺血性脑卒中中仍然具备显著的神经保护作用^[32]。因此, 绝大多数研究选取 50 mg/kg EGCG 剂量进行探索, 发现儿茶素单体 EGCG 能够增加抗氧化物质生成, 如 GSH; 也提高 SOD、GPX 活性, 同时能够降低大鼠体内一氧化氮 (nitric oxide, NO) 活性、ROS 水平、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性以及氧化型谷胱甘肽/还原型

谷胱甘肽 (oxidized glutathione/ glutathione, GSSG/GSH) 的比值^[33-35]; 其机制可能与 EGCG 整合诱导 ROS 生成的铁、铜、铅等金属元素^[36]、抑制凋亡信号激酶 1 (apoptosis signaling kinase 1, ASK1) 与 TRX 相互作用有关^[37]。这也与我们前期对儿茶素的相关研究相似: 大鼠 MCAO 后分别腹腔注射 5、10、20 mg/kg EC 可剂量依赖性地增加脑组织 SOD 活力和减少 MDA 含量, 从而拮抗神经细胞凋亡, 减轻脑 I/R 损伤^[24, 38]。在进一步对上游机制通路的研究中发现, EGCG 可能通过促进上游转录因子 Nrf2 的蛋白表达来发挥抗凋亡作用^[39]; 而在另一项研究中, EGCG 显著减弱神经细胞凋亡, 其机制与磷酸肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/ 丝氨酸苏氨酸蛋白激酶 (serine-threonine protein kinase, Akt)/ 内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 信号通路有关^[35]; 与之相似的机制是, Shah 等^[40] 研究证明 EGCG 可以上调蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 表达发挥神经保护作用, PP2A 作为丝氨酸/苏氨酸磷酸酶, 被认为是拮抗脑损伤的重要神经保护剂之一。与动物模型趋势一致的是, 在体外实验中, 给予 4 $\mu\text{mol/L}$ ECG 和 3 mg/L EGC 可以影响 OGD/R 诱导的 ROS、LDH、MDA 和 SOD 变化^[26, 41]; EGCG 减轻 OGD/R 诱导的细胞凋亡, 其机制可能与上调 Nrf2/HO-1 信号通路有关^[27, 42]。这表明儿茶素抗凋亡可能与抗氧化有关。另一方面, 由于细胞凋亡途径可以由线粒体启动, 因此在对儿茶素抗凋亡抗氧化进行探讨的同时, 有学者也对线粒体的结构和功能进行了同步观察。脑 I/R 时, 氧自由基增多导致线粒体膜电位降低, 加速线粒体结构紊乱^[43]; 同时, 受损的线粒体因复合物 I 和 III 发生构象改变, 大量电子从呼吸链泄露, 氧自由基进一步增多, 导致 ROS 恶性循环^[44-46]。在 MCAO 模型中, Sutherland 等^[47] 观察到 EGCG 显著保留了脑 I/R 诱导后的线粒体复合物 I、II、III、VI、V 以及呼吸链关键酶柠檬酸合酶的活性。与之相似的是, 在我们之前研究的 CA/CPR 大鼠模型中, 大鼠 CA/CPR 后静脉注射 9 mg/kg EGCG 能减少脑 I/R 诱导的线粒体通透性转换孔的开放以及维持线粒体膜电位, 实现保护线粒体功能, 其机制可能与 EGCG 抑制细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinases, ERK) 通路有关^[48]; 然而与之不同的是, Yao 等^[49] 对大鼠 MCAO 模型脑室内注射 5 μL EGCG (1 mg/ μL), 发现 EGCG 可以激活 ERK 通路、抑制内质网应激从而发挥抗凋亡作用。

EGCG 对 ERK 通路调控作用不同的原因, 我们猜测可能与疾病模型、给药途径、给药剂量等多种因素有关。由此可见, 尽管儿茶素单体对不同信号通路的调控存在争议, 但其拮抗脑 I/R 诱导的细胞凋亡作用至少是明确的, 且目前研究表明其主要通过抗氧化和维持线粒体功能两方面来发挥抗凋亡作用。

1.2 儿茶素抑制脑 I/R 诱导的细胞焦亡

细胞死亡除了涉及与凋亡密切相关的氧化应激机制之外, 同时还会伴随炎症反应, 而细胞焦亡 (pyroptosis) 又是与炎症反应紧密相连的一种死亡方式。最早于 2001 年 Cookson 等^[50]首次将细胞焦亡定义为促炎性程序性细胞死亡; 2015 年被定义为由 gasdermin (GSDM) 蛋白家族介导^[51], 主要依赖于 GSDM 蛋白家族成员形成质膜孔, 引起细胞内容物释放导致炎症和焦亡的发生^[6]。焦亡在形态学上 (表 1) 兼备了细胞凋亡 (DNA 断裂和染色质收缩) 和坏死 (质膜破坏) 的特征, 并伴随着级联放大的炎症反应。焦亡主要有两种调控方式: 依赖 Caspase-1 的经典通路和依赖 Caspase-4/5/11 的非经典通路。I/R 刺激下, 依赖 Caspase-1 的经典通路中过量 ROS 攻击组织或细胞, 刺激特定模式识别受体损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 促使 NLRP3 与含有受体蛋白的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 相互作用, 并招募效应蛋白 Caspase-1 前体 (proCaspase-1), 形成 NLRP3 炎症小体, 从而使 proCaspase-1 被切割成成熟的 Caspase-1p20, 活化后的 Caspase-1 将白细胞介素-1 β 前体 (proIL-1 β) 和 gasdermin D (GSDMD) 裂解为成熟的 IL-1 β p17 和 GSDMD-N, GSDMD-N 作为焦亡的参与者作用于细胞膜上形成孔洞, IL-1 β 和 IL18 等促炎因子经孔洞漏出, 离子和水进入细胞, 从而诱导细胞焦亡和炎症的发生^[52-53]。而非经典途径则主要由脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导, 直接激活 Caspase-4/5/11, 活化后的 Caspase-4/5/11 将 GSDMD 裂解为 GSDMD-N, 从而诱导细胞焦亡发生^[6, 52]。细胞焦亡信号通路参与脑 I/R 损伤的病理生理过程, 脑 I/R 时氧化应激下大量 ROS 激活 NLRP3 炎症小体从而诱导细胞焦亡的发生, 同时伴随着 IL-1 β 和 IL18 等多种促炎因子释放, 引起炎症级联反应^[10, 54-59]。在大鼠 MCAO 模型中, 腹腔注射 50 mg/kg 的儿茶素单体 EGCG 能够抑制脑组织炎症因子 (如 IL-1 β 、IL18、IL-6) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的

蛋白表达, 促进抗炎因子如 IL-10 的释放^[60-61]; 同时, 50 mg/kg 茶儿茶素抑制髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 和一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的活性^[62], 减轻 I/R 后脑组织中中性粒细胞的浸润, 抑制炎症级联反应; 这可能与抑制核因子- κ B/p65 (nuclear factor-kappa B/p65, NF- κ B/p65) 通路有关, 同时还与抑制诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS)、环氧合酶 2 (cyclooxygenase 2, COX-2) 表达有关^[60, 63-64]。与动物实验效果一致的体外细胞实验显示, 缺氧刺激下 200 μ mol/L EGCG 能抑制神经细胞促炎因子如 IL-6、iNOS 和 COX-2 的表达, 这也与抑制 NF- κ B 的磷酸化有关^[27]。综上, 儿茶素在脑 I/R 损伤方面具有明确的抗炎作用, 细胞焦亡与炎症反应密切相关, 因此儿茶素减轻炎症反应可能与抑制细胞焦亡有关。然而, 目前对于儿茶素在脑 I/R 诱导细胞焦亡方面的研究仍缺乏直接证据, 需要进一步的研究来探索其具体机制。

1.3 儿茶素抑制脑 I/R 诱导的细胞自噬

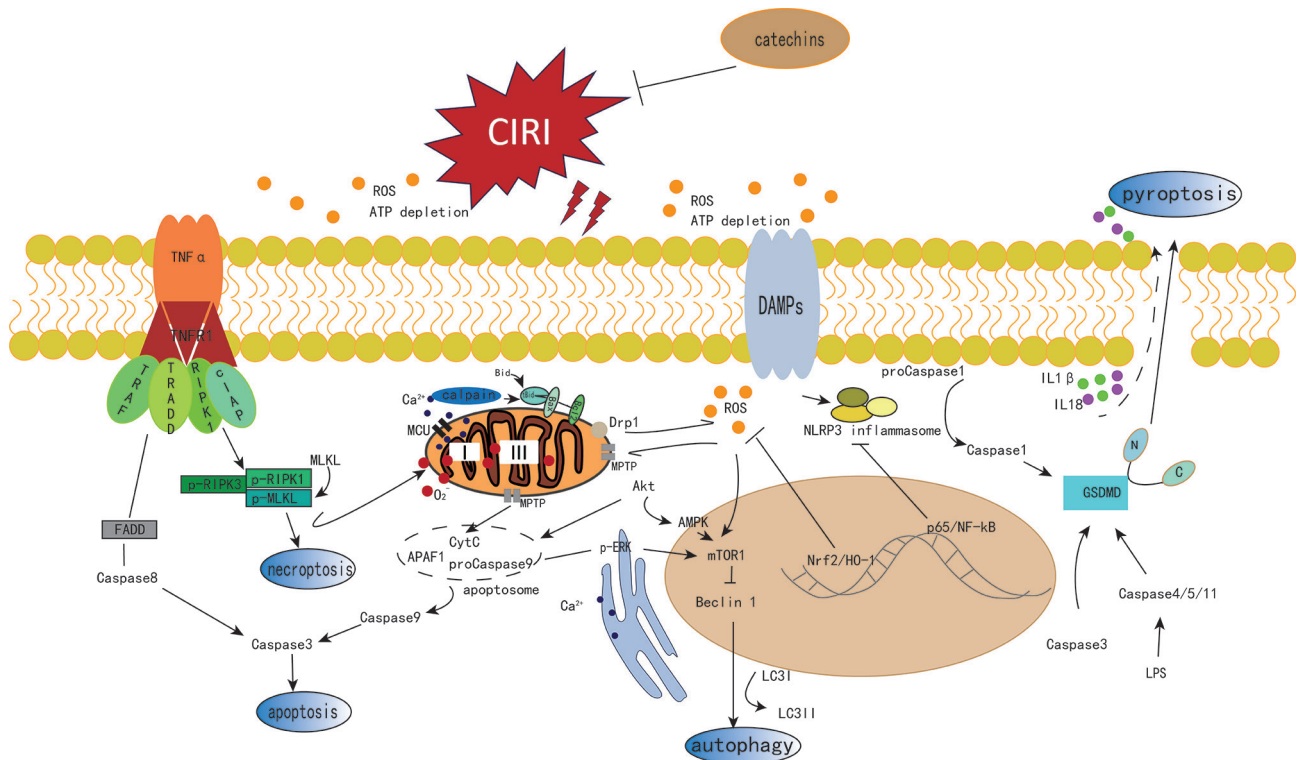
自噬 (autophagy) 是一种保守的细胞分解代谢途径, 指在自噬相关基因 (如 ATG) 调控下通过清除受损蛋白质和细胞器维持细胞内稳态的过程^[6, 12]。脑 I/R 后, 损伤的神经元涉及自噬过程。而自噬是一把“双刃剑”, 既能促进神经细胞的生存, 也可以诱导细胞死亡, 其存亡关键主要取决于自噬诱导的速率以及自噬激活的持续时间^[65]。在生理状态下, 自噬活性处于低水平状态。而脑 I/R 时, 神经细胞的自噬水平会发生变化, 脑 I/R 后线粒体结构功能紊乱、线粒体动力学异常, 导致异常线粒体明显增多, 此时适度激活自噬水平有助于清除变性蛋白质和受损细胞器, 因此认为激活自噬可改善脑 I/R 损伤^[66-67]; 然而, 目前更多研究认为在 I/R 持续刺激下自噬会被过度激活, 从而消化机体正常的蛋白质和细胞器, 促进神经元死亡, 进一步加重脑 I/R 损伤^[68-72]。哺乳动物雷帕霉素复合物 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1) 的营养传感器靶标和能量传感器 AMP 依赖性蛋白激酶 (AMP-dependent protein kinase, AMPK) 感应细胞缺血缺氧的刺激, 充当自噬通路的上游调节剂, 并诱导自噬发生^[72]。在自噬起始阶段 Beclin-1 作为关键调节因子诱导自噬体形成, 在激活过程中微管相关蛋白 1 轻链 3-I (microtubule-associated protein 1 light chain 3-I, LC3-I) 被水解为 LC3-II, 因此, Beclin-1 和 LC3-II/LC3-I 比值被广泛用作自噬激活水平的标记^[72-73]。儿茶素则能通过改变上述分子蛋白的表达水平来抑

制脑 I/R 诱导的自噬水平, 在小鼠 MCAO 模型上发现, 脑室内注射 4 μL 的儿茶素单体 EGCG (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) 能降低 Beclin-1 和 LC3-II 的表达^[74], 表明 EGCG 抑制自噬。在细胞层面的研究中, 儿茶素单体 EGCG、ECG 以及儿茶素混合物均能降低 OGD/R 诱导的神经细胞自噬蛋白 Beclin-1、mTOR 的表达水平以及 LC3-II/LC3-I 比值^[26, 74-76]。尽管各个体外研究之间儿茶素的药物浓度在 2~200 $\mu\text{mol}/\text{L}$, 但总体而言其自噬抑制作用是明确的, 药物剂量与药效的差别可能与体外培养的细胞株、OGD/R 时间以及药物来源不同等多种因素有关。由于 mTORC1 和 AMPK 是自噬通路的上游调节剂, 因此大多数学者集中探讨了儿茶素对 AMPK/mTOR 通路的影响机制。研究表明, 儿茶素显著增加 I/R 期间神经

细胞 Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化, 表明其抑制自噬活性的机制可能与上调 PI3K/Akt/mTOR 通路有关^[75]; 另外, 儿茶素单体 EGCG 也能增加 AMPK 磷酸化, 通过激活 Akt/AMPK/mTOR 通路磷酸化发挥自噬抑制作用^[74]。总而言之, 儿茶素拮抗脑 I/R 诱导细胞自噬的相关研究较少, 但可以肯定的是, 目前研究证据支持儿茶素主要通过激活 mTOR 相关通路磷酸化以发挥抑制细胞自噬的作用。

2 总结与展望

儿茶素可以通过调控细胞死亡信号通路发挥神经保护作用。各种细胞死亡信号通路之间是串联的, 当一种死亡方式启动时, 它会诱导另一种死亡发生 (图 1)。例如, 凋亡可通过细胞内 Caspase 活化和线



在脑 I/R 损伤时, 细胞发生钙超载, 一方面, 细胞可通过内质网肌浆网钙 ATP 酶 (SERCA) 吸收胞质 Ca^{2+} 从而缓解胞内 Ca^{2+} 超载; 另一方面, 过量的钙还可以通过线粒体钙单向转运蛋白 (MCU) 转运至线粒体内从而缓解胞内 Ca^{2+} 浓度, 导致线粒体 Ca^{2+} 超载。线粒体 Ca^{2+} 超载和 ROS 爆发诱导线粒体通透性转换孔 (MPTP) 开放以及线粒体动力学异常, 促使线粒体分裂增加从而进一步诱导细胞凋亡和自噬发生; 同时, MPTP 开放导致线粒体内容物释放和大量 ROS 产生, 激活 NLRP3 炎症小体诱导细胞焦亡发生。LPS: 脂多糖; ROS: 活性氧; Caspase 家族: 胱天蛋白酶家族; Bcl-2: B 细胞淋巴瘤 2; Bax: Bcl-2 相关蛋白; APAF1: 凋亡蛋白酶激活因子 1; CytC: 细胞色素 C; MPTP: 线粒体通透性转换孔; NLRP3: 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3; GSDM 家族: gasdermin 家族; mTOR: 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; LC3: 微管相关蛋白 I 轻链 3; TNF α : 肿瘤坏死因子 α ; DAMPs: 损伤相关分子模式; FADD: FAS 相关死亡结构域蛋白; TNFR: TNF 受体; TRAF: TNFR 相关因子; TRADD: TNF 受体相关死亡域; cIAP: 细胞凋亡抑制蛋白; Akt: 蛋白激酶 B; AMPK: 能量传感器 AMP 依赖性蛋白激酶; calpain: 钙依赖蛋白酶; RIPK1: 受体相互作用蛋白激酶 1; RIPK3: 受体相互作用蛋白激酶 3; MLKL: 混合谱系激酶结构域样蛋白。

图 1 儿茶素调控脑 I/R 诱导细胞死亡的分子机制

粒体通透性转换孔开放等机制介导焦亡发生^[77-78]; 焦亡又可因自噬过度激活从而导致细胞内容物释放引起炎症反应^[78]; 自噬可由线粒体分裂蛋白1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 介导, 而线粒体分裂又是促使细胞凋亡发生的前提^[68]。因此, 脑 I/R 刺激下细胞死亡信号通路错综复杂, 当儿茶素抑制一种死亡时, 往往伴随着其他类型死亡形式。然而, 目前大部分儿茶素拮抗脑 I/R 诱导细胞死亡的研究主要集中在抗凋亡方面, 而抗焦亡和自噬研究较少, 铁死亡、坏死性凋亡等死亡方式尚缺乏研究, 并且是否在各种死亡方式之间存在儿茶素的共同干预靶点有待进一步研究; 另外, 在儿茶素拮抗脑 I/R 作用机制的探讨上, 目前主要集中在抗氧化应激和抗炎反应两方面, 而酸中毒、内质网应激、钙超载等涉及的脑 I/R 损伤主要病理机制研究不多。尽管目前已有的一项随机双盲对照临床试验报道^[79]: 成人缺血性脑卒中后静脉滴注 500 mg EGCG 可以延长重组组织型纤溶酶原激活剂 (recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA) 的狭窄时间窗, 随后连续 7 天口服 500 mg EGCG 可改善患者中风后神经功能恢复。但是, 儿茶素要真正实现应用于临床的目标, 就目前而言证据远远不足。因此, 挖掘脑 I/R 涉及的死亡机制以及儿茶素所干预的靶点仍道阻且长, 积极寻找儿茶素干预脑 I/R 损伤的靶点, 将对拮抗脑 I/R 损伤的临床治疗具有积极意义。

[参 考 文 献]

- [1] Feigin VL, Brainin M, Norrving B, et al. World Stroke Organization (WSO): global stroke fact sheet 2022. *Int J Stroke*, 2022, 17: 18-29
- [2] Owolabi MO, Thrift AG, Mahal A, et al. Primary stroke prevention worldwide: translating evidence into action. *Lancet Public Health*, 2022, 7: 74-85
- [3] Feigin VL, Grant N, Kelly C, et al. Global, regional, and country-specific lifetime risks of stroke, 1990 and 2016. *N Engl J Med*, 2018, 379: 2429-37
- [4] Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46: 1650-67
- [5] Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion -- from mechanism to translation. *Nat Med*, 2011, 17: 1391-401
- [6] Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*, 2018, 25: 486-541
- [7] Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs*, 2009, 10: 644-54
- [8] Rodrigo R. Oxidative stress and pathophysiology of ischemic stroke: novel therapeutic opportunities. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2013, 12: 698-714
- [9] Orellana-Urzua S, Rojas I, Libano L, et al. Pathophysiology of ischemic stroke: role of oxidative stress. *Curr Pharm Des*, 2020, 26: 4246-60
- [10] Minutoli L, Puzzolo D, Rinaldi M, et al. ROS-mediated NLRP3 Inflammasome activation in brain, heart, kidney, and testis ischemia/reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 2183026
- [11] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology. *Trends Biochem Sci*, 2011, 36: 30-8
- [12] Chan CM, Huang DY, Sekar P, et al. Reactive oxygen species-dependent mitochondrial dynamics and autophagy confer protective effects in retinal pigment epithelial cells against sodium iodate-induced cell death. *J Biomed Sci*, 2019, 26: 40
- [13] Kochman J, Jakubczyk K, Antoniewicz J, et al. Health benefits and chemical composition of matcha green tea: a review. *Molecules*, 2020, 26: 85
- [14] Misaka S, Kawabe K, Onoue S, et al. Development of rapid and simultaneous quantitative method for green tea catechins on the bioanalytical study using UPLC/ESI-MS. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27: 1-6
- [15] Vitale I, Pietrocola F, Guilbaud E, et al. Apoptotic cell death in disease -- current understanding of the NCCD 2023. *Cell Death Differ*, 2023, 30: 1097-154
- [16] Saad MA, Abdelsalam RM, Kenawy SA, et al. Ischemic preconditioning and postconditioning alleviates hippocampal tissue damage through abrogation of apoptosis modulated by oxidative stress and inflammation during transient global cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Chem Biol Interact*, 2015, 232: 21-9
- [17] Gao YG, Chen T, Lei XH, et al. Neuroprotective effects of polydatin against mitochondrial-dependent apoptosis in the rat cerebral cortex following ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep*, 2016, 14: 5481-8
- [18] Zhang Y, Li YW, Wang YX, et al. Remifentanyl preconditioning alleviating brain damage of cerebral ischemia reperfusion rats by regulating the JNK signal pathway and TNF- α /TNFR1 signal pathway. *Mol Biol Rep*, 2013, 40: 6997-7006
- [19] Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007 35: 495-516
- [20] 莫燕资, 袁张莉, 谢露, 等. 脑缺血再灌注损伤中线粒体动力学的研究进展. *生命科学*, 2022, 34: 702-10
- [21] Ke X, Yu S, Situ S, et al. Morroniside inhibits Beclin1-dependent autophagic death and Bax-dependent apoptosis in cardiomyocytes through repressing BCL2 phosphorylation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2023, 59: 277-88
- [22] 胡宗礼, 黄晓萍, 陈珺霞. 表没食子儿茶素没食子酸酯对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. *中国现代医学杂志*, 2010, 20: 1627-30
- [23] Machin A, Susilo I, Purwanto DA. Green tea and its active compound epigallocatechin-3-gallate (EGCG) inhibit

- neuronal apoptosis in a middle cerebral artery occlusion (MCAO) model. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2021, 32: 319-25
- [24] 黄凡, 李德丽, 蒋嫦月, 等. 表儿茶素对大鼠缺血再灌注后神经元凋亡及Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白的影响. *岭南急诊医学杂志*, 2021, 26: 109-12
- [25] Park DJ, Kang JB, Koh PO. Epigallocatechin gallate alleviates neuronal cell damage against focal cerebral ischemia in rats. *J Vet Med Sci*, 2020, 82: 639-45
- [26] Fu B, Zeng Q, Zhang Z, et al. Epicatechin gallate protects HBMVECs from ischemia/reperfusion injury through ameliorating apoptosis and autophagy and promoting neovascularization. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 7824684
- [27] Kim SR, Seong KJ, Kim WJ, et al. Epigallocatechin gallate protects against hypoxia-induced inflammation in microglia via NF- κ B suppression and Nrf-2/HO-1 activation. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 4404
- [28] Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, et al. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull*, 2000, 53: 743-9
- [29] Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, et al. Protective effect of green tea extract on ischemia/reperfusion-induced brain injury in Mongolian gerbils. *Brain Res*, 2001, 888: 11-8
- [30] Xue R, Wu G, Wei X, et al. Tea polyphenols may attenuate the neurocognitive impairment caused by global cerebral ischemia/reperfusion injury via anti-apoptosis. *Nutr Neurosci*, 2016, 19: 63-9
- [31] Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29: 1727-45
- [32] Rahman RM, Nair SM, Helps SC, et al. (-)-Epigallocatechin gallate as an intervention for the acute treatment of cerebral ischemia. *Neurosci Lett*, 2005, 382: 227-30
- [33] 方芳, 韩永晶, 崔志清. 茶儿茶素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用. *中国中药杂志*, 2001, 26: 55-8
- [34] Choi YB, Kim YI, Lee KS, et al. Protective effect of epigallocatechin gallate on brain damage after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Brain Res*, 2004, 1019: 47-54
- [35] Wang N, Xu ZH, Chen KY, et al. Epigallocatechin-3-gallate reduces neuronal apoptosis in rats after middle cerebral artery occlusion injury via PI3K/AKT/eNOS signaling pathway. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 6473580
- [36] Lin MC, Liu CC, Lin YC, et al. Epigallocatechin gallate modulates essential elements, Zn/Cu ratio, hazardous metal, lipid peroxidation, and antioxidant activity in the brain cortex during cerebral ischemia. *Antioxidants (Basel)*, 2022, 11: 396
- [37] Park DJ, Kang JB, Shah MA, et al. Epigallocatechin gallate alleviates down-regulation of thioredoxin in ischemic brain damage and glutamate-exposed neuron. *Neurochem Res*, 2021, 46: 3035-49
- [38] 黄凡, 胡婉湘, 蒋嫦月, 等. 表儿茶素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化能力的影响. *天津医药*, 2021, 49: 933-7
- [39] Han J, Wang M, Jing X, et al. (-)-Epigallocatechin gallate protects against cerebral ischemia-induced oxidative stress via Nrf2/ARE signaling. *Neurochem Res*, 2014, 39: 1292-9
- [40] Shah MA, Kang JB, Park DJ, et al. Epigallocatechin gallate restores the reduction of protein phosphatase 2 A subunit B caused by middle cerebral artery occlusion. *Lab Anim Res*, 2023, 39: 3
- [41] 尹雄章, 肖珊, 马郁文, 等. 表没食子儿茶素对小鼠离体脑片及氧糖剥夺损伤HT-22细胞系的保护作用. *医药导报*, 2019, 38: 1259-63
- [42] He F, Zhang Y, Chen S, et al. Effect of EGCG on oxidative stress and Nrf2/HO-1 pathway in neurons exposed to oxygen-glucose deprivation/reperfusion. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2018, 43: 1041-7
- [43] Chen Y, Liu C, Zhou P, et al. Coronary endothelium no-reflow injury is associated with ROS-modified mitochondrial fission through the JNK-Drp1 signaling pathway. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6699516
- [44] Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: the evolution of a concept. *Redox Biol*, 2015, 6: 524-51
- [45] Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, et al. Ischemia reperfusion. *Compr Physiol*, 2017, 7: 113-70
- [46] Sun MS, Jin H, Sun X, et al. Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: an obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3804979
- [47] Sutherland BA, Shaw OM, Clarkson AN, et al. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin gallate after hypoxia-ischemia-induced brain damage: novel mechanisms of action. *FASEB J*, 2005, 19: 258-60
- [48] Qin SN, Chen MH, Fang W, et al. Cerebral protection of epigallocatechin gallate (EGCG) via preservation of mitochondrial function and ERK inhibition in a rat resuscitation model. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2759-68
- [49] Yao C, Zhang J, Liu G, et al. Neuroprotection by (-)-epigallocatechin-3-gallate in a rat model of stroke is mediated through inhibition of endoplasmic reticulum stress. *Mol Med Rep*, 2014, 9: 69-76
- [50] Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol*, 2001, 9: 113-4
- [51] Shi J, Zhao Y, Wang K, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 2015, 526: 660-5
- [52] Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42: 245-54.
- [53] Zheng M, Kanneganti TD. The regulation of the ZBP1-NLRP3 inflammasome and its implications in pyroptosis, apoptosis, and necroptosis (PANoptosis). *Immunol Rev*, 2020, 297: 26-38
- [54] Dong ZF, Pan K, Pan JR, et al. The possibility and molecular mechanisms of cell pyroptosis after cerebral ischemia. *Neurosci Bull*, 2018, 34: 1131-6
- [55] Kelley N, Jeltema D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 3328

- [56] Poh L, Kang SW, Baik SH, et al. Evidence that NLRC4 inflammasome mediates apoptotic and pyroptotic microglial death following ischemic stroke. *Brain Behav Immun*, 2019, 75: 34-47
- [57] Zhang DP, Qian JH, Zhang P, et al. Gasdermin D serves as a key executioner of pyroptosis in experimental cerebral ischemia and reperfusion model both *in vivo* and *in vitro*. *J Neurosci Res*, 2019, 97: 645-60
- [58] Liu X, Zhang M, Liu H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate cerebral ischemia-reperfusion injury-induced neuroinflammation and pyroptosis by modulating microglia M1/M2 phenotypes. *Exp Neurol*, 2021, 341: 113700
- [59] Zou XS, Xie L, Wang WY, et al. Pomelo peel oil alleviates cerebral NLRP3 inflammasome activation in a cardiopulmonary resuscitation rat model. *Exp Ther Med*, 2021, 21: 233
- [60] Zhang FJ, Li N, Jiang LL, et al. Neuroprotective effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate against focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats through attenuation of inflammation. *Neurochem Res*, 2015, 40: 1691-8
- [61] 贺芳, 叶蓓, 陈建珍, 等. EGCG对脑缺血再灌注损伤大鼠炎症反应的影响. *中南大学学报(医学版)*, 2021, 46: 1325-31
- [62] 刘珊珊, 刘宗文, 卢沛琦, 等. 儿茶素对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及机制. *中国药理学通报*, 2010, 26: 255-7
- [63] Ashafaq M, Raza SS, Khan MM, et al. Catechin hydrate ameliorates redox imbalance and limits inflammatory response in focal cerebral ischemia. *Neurochem Res*, 2012, 37: 1747-60
- [64] Wu KJ, Hsieh MT, Wu CR, et al. Green tea extract ameliorates learning and memory deficits in ischemic rats via its active component polyphenol epigallocatechin-3-gallate by modulation of oxidative stress and neuroinflammation. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012: 163106
- [65] Zhang Y, Cao Y, Liu C. Autophagy and ischemic stroke. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1207: 111-34
- [66] Zha H, Fan YD, Yang L, et al. Autophagy protects against cerebral ischemic reperfusion injury by inhibiting neuroinflammation. *Am J Transl Res*, 2021, 13: 4726-37
- [67] Deng YH, Guo T, Wu ZY, et al. Ginkgo biloba leaf extract (EGb-761) elicits neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury by enhancement of autophagy flux in neurons in the penumbra. *Iran J Basic Med Sci*, 2021, 24: 1138-45
- [68] Zheng JH, Xie L, Li N, et al. PD98059 protects the brain against mitochondrial-mediated apoptosis and autophagy in a cardiac arrest rat model. *Life Sci*, 2019, 232: 116618
- [69] Gu C, Yang JQ, Luo Y, et al. ZNRF2 attenuates focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting mTORC1-mediated autophagy. *Exp Neurol*, 2021, 342: 113759
- [70] Wang XY, Fang YJ, Huang QX, et al. An updated review of autophagy in ischemic stroke: from mechanisms to therapies. *Exp Neurol*, 2021, 340: 113684
- [71] Zhao YM, Ma XJ, Yu WT, et al. Protective effect of Buyang Huanwu decoction on cerebral ischemia reperfusion injury by alleviating autophagy in the ischemic penumbra. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 9937264
- [72] Su PW, Zhai Z, Wang T, et al. Research progress on astrocyte autophagy in ischemic stroke. *Front Neurol*, 2022, 13: 951536
- [73] Quiles JM, Najor RH, Gonzalez E, et al. Deciphering functional roles and interplay between Beclin1 and Beclin2 in autophagosome formation and mitophagy. *Sci Signal*, 2023, 16: eabo4457
- [74] Wang L, Dai MS, Ge YY, et al. EGCG protects the mouse brain against cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the AKT/AMPK/mTOR phosphorylation pathway. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 921394
- [75] Chen CM, Wu CT, Yang TH, et al. Green tea catechin prevents hypoxia/reperfusion-evoked oxidative stress-regulated autophagy-activated apoptosis and cell death in microglial cells. *J Agric Food Chem*, 2016, 64: 4078-85
- [76] 曹锦霞, 王浩, 王红卫, 等. EGCG通过mTOR通路拮抗低氧诱导的PC12细胞的凋亡与自噬. *中国病理生理杂志*, 2014, 30: 1960-6
- [77] Orzalli MH, Prochera A, Payne L, et al. Virus-mediated inactivation of anti-apoptotic Bcl-2 family members promotes Gasdermin-E-dependent pyroptosis in barrier epithelial cells. *Immunity*, 2021, 54: 1447-62
- [78] Liu WN, Gan YJ, Ding Y, et al. Autophagy promotes GSDME-mediated pyroptosis via intrinsic and extrinsic apoptotic pathways in cobalt chloride-induced hypoxia reoxygenation-acute kidney injury. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2022, 242: 113881
- [79] Wang XH, You YP. Epigallocatechin gallate extends therapeutic window of recombinant tissue plasminogen activator treatment for brain ischemic stroke: a randomized double-blind and placebo-controlled trial. *Clin Neuropharmacol*, 2017, 40: 24-8