

卒中后痉挛相关生物标志物的研究进展

区家源^{一作} 朱美英^{一作} 张建博^{二作} 苏浩强^{三作} 吕政^{通讯作者}

广东省深圳市龙岗中心医院, 518000;

摘要: 卒中后痉挛 (PSS) 作为脑卒中后常见的并发症, 其确切定义及机制至今尚未充分揭示, 同时也因动物实验研究的匮乏, PSS 相关生物标志物的确立面临重大挑战。因此, 探讨 PSS 相关生物标志物, 在寻找有效治疗 PSS 的途径上具有极其重要的作用。本综述旨在从 GABA-Glu 能系统、氯离子稳态以及 BDNF-TrkB 方面入手, 深入探讨 PSS 的相关生物标志物, 通过揭示其相关性, 尝试整理其在 PSS 研究中的作用, 为研究 PSS 提供参考。

关键字: 卒中后痉挛; GABA; Glu; 氯离子稳态; BDNF-TrkB; KCC2

DOI:10.69979/3029-2808.24.6.048

1 前言

卒中是全球第二大死因, 也是致残的主要原因, 而中国是脑卒中负担最重的国家之一, 其病死率虽降低, 但患病率和发病率却呈上升趋势。卒中后痉挛 (post-stroke spasticity, PSS) 是脑卒中后最常见的并发症之一, 其患病率随病程不一, 早期病程 (卒中后 1-4 周) 为 4% - 27%, 急性后期 (卒中后 1-3 个月) 为 19% - 26.7%, 慢性期 (卒中后 >3 个月) 17%-42.6%^[1], 然而其具体机制复杂且尚未明确^[2], 由此可见, PSS 随病程阶段其涉及了复杂的阶段性神经网络病生改变。

正常神经网络活动所依赖的突触兴奋-抑制 (E/I) 平衡是完成肢体屈伸节律性激活所必需的基础, 而卒中后神经网络 E/I 失衡是 PSS 的关键环节^[3]。目前研究认为 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能系统和谷氨酸 (Glutamate, Glu) 系统、离子稳态及神经重构与卒中后痉挛的关系较为密切。因此, 围绕 E/I 平衡相关标志物的探讨可为研究 PSS 相关生物标志提供线索。

2 递质失衡

2.1 γ -氨基丁酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 能系统

GABA 能系统是中枢神经系统 (CNS) 中起主要抑制作用的体系。GABA 的代谢过程主要包括生成、降解及转运 3 个部分^[4]。首先, GABA 可分别由谷氨酸 (Glu) 经两种谷氨酸脱羧酶 (GAD) 脱羧而成, 即 GAD65 或 GAD67, 这两种酶在 CNS 中将 Glu 转化为 GABA。在大脑中, GABA 作为递质在 20% 至 50% 中枢突触中发挥作用, 通过激

活 GABA 受体 (GABAAR), 驱动 Cl⁻ 内流, 突触后膜超极化并诱发快速抑制性突触后电位, 产生突触后抑制效应, 进而缓解痉挛。可见 GABA 通过调节胞内 Cl⁻ 含量发挥抑制性功能, 以维持兴奋-抑制神经环路平衡。卒中后 GABA 的释放和作用机制尤为重要。大量释放的 GABA 与 GABAAR 结合后, 可产生神经保护作用, 但抑制了损伤区周边神经元兴奋性; 而后随着 GAD 阳性反应逐渐降低甚至消失, GABA 含量降低, 抑制作用逐步减弱, 进而影响 GABA 合成。因此, 早期引起神经元兴奋性增加诱发痉挛的可能机制之一是 GABA 释放减少, 而后期则是 GABA 含量下降, 对损伤同侧神经元的抑制作用减弱^[5]。其次, GABA 的转运主要依赖于 GABA 转运体 (GAT) 的逆化学梯度转运至胞内。卒中后 GAT-1 表达增加, GABA 数量减少, 影响了 Glu-GABA 平衡, 诱发痉挛^[6]。最后, GABA 的释放和作用时间还受到 GAD 合成、VGAT 包装和 GAT 再摄取等因素影响。同时 GABA 可再摄取回收至突触囊泡以维持后续需要。此外, GABA 可参与 TCA 循环。而胞外 GABA 不易分解, GAT 通过控制细胞外空间 (ECS) 的 GABA 水平进而影响 E/I 平衡成为终止突触抑制性神经传递的主要机制。

2.2 谷氨酸 (Glutamate, Glu) 体系

谷氨酸 (Glu) 是 CNS 中最广泛的神经递质^[3]。如前所述, 谷氨酸是 GABA 合成的底物, 也是 TCA 循环参与者。合成后的 GABA 被包装成 GABA 特异性囊泡转运蛋白 (VGAT) 释放到突触囊泡中, 而星形胶质细胞利用 Cl⁻ 浓度 ([Cl⁻]_i) 进行递质摄取。此外, 维持低细胞外 Glu 浓度对维持突触 E/I 的平衡是必要的, 而不成比例的 Glu 释放和/或长时间的 Glu 受体激活会导致过

度兴奋。然而,递质、离子平衡是由神经元-星形胶质细胞复合体共同完成。因此,CNS对Glu的摄取可保护神经元免受其兴奋毒性影响。与此同时,卒中缺血再灌注后细胞仍能产生动作电位并对Glu反应,这表明突触后兴奋性得以保留,但由于突触前缺陷,突触传递被阻断,而在梗死周围幸存神经元再循环24小时后,突触传递仍被抑制。因此,一旦平衡被打破,即兴奋抑制信号异常,痉挛就会发生或加重^[7]。

2.3 γ -氨基丁酸 A 型受体

GABA受体分为A、B、C三个亚型,其分布在大脑皮层和脊髓中各不相同^[4]。GABA_A受体(GABA_AAR)是一种离子型配体门控氯离子通道受体,它允许阴离子(尤其是Cl⁻)流动,从而影响离子浓度梯度。GABA_AAR遍布于大脑中20~50%的突触,可对GABA在毫秒级的时间尺度上作出响应。当激活时,取决于表达这些受体的突触后神经元细胞内的[Cl⁻]_i,它可引发从膜去极化-兴奋到超极化-抑制一系列连续反应。Cl⁻稳态受到多种蛋白联合活动的动态调节,这赋予了GABA能神经元显著的功能可塑性,特别是GABA_AAR,它受到KCC2蛋白的显著影响。研究表明,提高KCC2在神经元中的表达水平可以增加GABA受体的密度和数量,以及GABA诱导的抑制性突触后电位的频率和幅度。因此,KCC2通过改变细胞内氯离子稳态,进而影响GABA_AAR的功能状态,从而改变神经元的兴奋性,诱发脑和脊髓损伤后的痉挛状态^[8]。

3 离子稳态

3.1 氯化物(Cl⁻)

氯化物(Cl⁻)是一种丰富的阴离子,参与多种生理过程,包括电位生发。E/I平衡需要动作电位的触发,以实现信号的快速传播,而氯离子稳态失衡可影响信号传导,进而引起E/I失衡^[3]。与离子转运蛋白不同,氯离子通道提供快速响应,以有效调节离子通量。部分氯离子通道还渗透特定有机阴离子,如GABA和Glu,表明在门控时具有神经兴奋和抑制功能。因此,通过氯离子通道调节氯离子稳态被认为是神经疾病的潜在疗法。

CNS中,神经元抑制主要是通过GABA与GABA_AAR结合来实现的,从而触发Cl⁻超极化流入突触后神经元产生突触后抑制效应。成熟CNS胞内[Cl⁻]_i通常维持在低浓度,作为抑制性、超极化的GABA能信号传导

的基础,这决定了Cl⁻、GABA在CNS神经传递中的主要作用。因此,Cl⁻通过GABA调节参与突触后抑制,其浓度梯度直接影响神经元兴奋和抑制,即[Cl⁻]_i在神经系统疾病中的潜在功能障碍具有重要意义^[9]。此外,选择性抑制剂布美他尼(Na⁺-K⁺-2Cl⁻协同转运蛋白1(NKCC1)抑制剂)可通过恢复和维持神经元Cl⁻稳态并介导大鼠脑缺血后轴突生长抑制变化来创造促进恢复的微环境,进而促进中风后轴突发芽并伴随改善的行为结果^[10]。综上所述,调节中枢神经系统中的Cl⁻稳态被认为是解决Cl⁻紊乱和相关神经病理障碍的一种有前途的治疗方法。

3.2 KCC2

PSS被认为是牵张反射的速度依赖性增强,是由于卒中相关脑损伤导致 α 运动神经元兴奋性增加所致,即运动神经元的过度兴奋性是PSS的主要病理学,氯离子稳态与运动神经元兴奋性的维持有关,而K⁺-Cl⁻协同转运蛋白2(KCC2)是维持氯离子稳态的关键,因此,KCC2与卒中后神经元兴奋性有关

KCC2是一种阳离子-氯化物协同转运蛋白,仅沿神经细胞体和树突的质膜表达,由Payne等人在1996年发现^[11]。在突触中,KCC2以每10min/次更新在于突触后神经元的突触周围区域,与GABA信号转导和Cl⁻稳态中的转运蛋白表达一致。利用Na/K/ATP酶产生的Na⁺梯度,NKCC1驱动Cl⁻内流;与之相反,KCC2是唯一的Cl⁻挤出装置。在神经发育过程中,NKCC1和KCC2表达模式发生变化。未成熟的CNS中,NKCC1占主导地位诱发细胞内高[Cl⁻]_i。而随着成熟的进行,KCC2表达增加,而NKCC1水平下降,[Cl⁻]_i随之改变。因此,[Cl⁻]_i受NKCC1和KCC2的调节,成熟神经元具有胞内低[Cl⁻]_i,具备导致突触后膜从去极化转变为超极化条件。与此同时,提高KCC2在未成熟海马神经元中的表达水平可以增加GABA密度、突触后膜中GABA受体数量,以及GABA诱导的抑制性突触后电位频率和幅度^[12]。因此,KCC2是GABA介导的超极化的关键调节因子,是超极化神经元回路的E/I平衡至关重要。卒中后脑损伤会降低KCC2水平,导致细胞内[Cl⁻]_i升高。而参与的GABA受体导致Cl⁻无法流出到ECS,导致神经元兴奋,兴奋性运动神经元导致过度拉伸反射,导致偏瘫肢体痉挛。换言之,KCC2通过影响神经元兴奋性,诱发脑和脊髓损伤后痉挛状态。Be

verungen 等人发现,在脊髓损伤 (SCI) 大鼠模型中,持续 4 周自行车康复训练增加了运动神经元膜中 BDNF 和 KCC2 的表达水平,而 KCC2 的下调导致细胞内 Cl^- 的升高和 GABA 信号去极化作用的重现,从而导致神经元的高兴奋性。该团队认为这与反射亢进和痉挛减少有关,康复通过 BDNF-KCC2 通路缓解痉挛^[13]。与此同时, KCC2 的适当表达是正常神经元形态、生长和突触连接建立所必需的。此外, KCC2 的调节取决于 BDNF 对 TrkB 的激活。BDNF 的过表达可显著提高体内 KCC2 mRNA 的表达水平,而 BDNF 受体 TrkB 的基因敲除强烈抑制 KCC2 mRNA 表达水平^[14]。因此,阐明 BDNF/TrkB-KCC2 通路机制将为 PSS 的治疗提供新的方向。

4 重构标志物 BDNF-TrkB

脑源性神经营养因子 (BDNF) 在神经生成、修复中的作用已被证实,因此, BDNF 已作为神经再生和恢复指标而被用于卒中评估^[15]。有研究报道了 BDNF 与卒中后恢复的正相关关系。尽管如此,因评估 BDNF 效用的研究大部分来自动物实验, BDNF 在临床卒中患者中的确切作用,特别是在血清中的作用仍有待商榷。研究发现卒中致内源性 BDNF 及其下游信号转导的下调延缓神经修复,而 BDNF-sEVs 联合治疗增强了 sEVs 对 tMCAO 后功能恢复和神经修复,通过与 TrkB 受体结合,激活下游分子,促进细胞存活和神经可塑性^[16]。与此同时, BDNF-TrkB 信号转导是运动训练中的关键通路,可促进不完全 SCI 大鼠神经功能的恢复^[17]。SCI 后抑制性突触传递的改变受 KCC2 (和/或 NKCC1) 的变化。而运动训练后腰椎脊髓中 BDNF 水平升高,可提高运动功能,并增加 Glu 能和 GABA 能神经传递。此外,尾节脊髓 GABA、GAD67、GAD65 和谷氨酸囊泡转运蛋白 2 (VGluT2) 表达异常,表明在损伤影响 E/I 失衡。而在 AAV-BDNF 治疗的动物中, GABA 失衡以及 KCC2 持续低表达可能是运动神经元过度活跃的基础,而这些阵挛运动出现时间点较晚,表明 CNS 损伤后 BDNF 的时间控制应用的重要性^[18]。此外, BDNF 还可以增加树突分支形成和树突间连接,并促进 CNS 的发育和成熟。因此, BDNF 在神经可塑性中的作用使其成为 PSS 治疗的绝佳候选者。

5 总结

生物标志物在信号通路中扮演着重要角色,但目前尚缺乏足够证据支持以生物标志物为核心的治疗策略

可用于改善 PSS,导致无法明确其在 PSS 预测与治疗中的实际应用价值。因此,有必要深入理解生物标志物对 PSS 的影响以便于寻找更有效的治疗方案。本综述尝试探讨 PSS 相关的生物标志物,分析其在疾病进展中的作用及其对神经功能的影响。此外,部分动物模型已显示 PSS 不同程度缓解,这一现象值得进一步的深入研究,以探索临床缓解 PSS 的新方法。

参考文献

- [1]Wissel J,Manack A, Brainin M. Toward an epidemiology of poststroke spasticity[J]. Neurology, 2013,80(3 Suppl2):S13-S19.
- [2]陈楠,华艳,白玉龙.卒中后痉挛状态发生机制的研究进展[J].中国康复理论与实践,2021,27(5):588-594.
- [3]Sears S M, Hewett S J. Influence of glutamate and GABA transport on brain excitatory/inhibitory balance[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2021,246(9):1069-1083.
- [4]李静雯冯晓东胡延超李瑞青郝文雪. γ -氨基丁酸能系统在脑卒中后痉挛状态中的研究进展[J].中国老年学杂志,2023(43(04)):994-997.
- [5]Han X,Guo F, Chen L, et al. The Effects of GABAergic System under Cerebral Ischemia: Spotlight on Cognitive Function[J]. Journal of neural transplantation & plasticity,2020,2020(2020):1-9.
- [6]Shahsavari A, Wellendorph P. GABA transport cycle:beyond a GAT feeling[J]. Nat Struct Mol Biol,2023,30(7):863-865.
- [7]Wang J,Fidimanantsoa O L, Ma L. New insights into acupuncture techniques for poststroke spasticity[J]. Frontiers in public health,2023,11:1155372.
- [8]Duy P Q, He M, He Z, et al. Preclinical insights into therapeutic targeting of KCC2 for disorders of neuronal hyperexcitability[J]. Expert opinion on therapeutic targets,2020,24(7):629-637.
- [9]Tillman L, Zhang J. Crossing the Chloride Channel: The Current and Potential Therapeutic Va

- lue of the Neuronal K(+)-Cl(-) Cotransporter KCC2[J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 8941046.
- [10] Cote M, Gandhi S, Zambrotta M, et al. Exercise modulates chloride homeostasis after spinal cord injury[J]. J Neurosci, 2014, 34(27): 8976-8987.
- [11] Xie L, Xie Y, Mao G, et al. Decreased spasticity of Baishaoluoshi Decoction through the BDNF/TrkB-KCC2 pathway on poststroke spasticity rats[J]. Neuroreport, 2021, 32(14): 1183.
- [12] Awad P N, Amegandjin C A, Szczurkowska J, et al. KCC2 Regulates Dendritic Spine Formation in a Brain-Region Specific and BDNF Dependent Manner[J]. Cerebral cortex (New York, N.Y. 1991), 2018, 28(11): 4049-4062.
- [13] Beverungen H, Klaszky S C, Klaszky M, et al. Rehabilitation Decreases Spasticity by Restoring Chloride Homeostasis through the Brain-Derived Neurotrophic Factor-KCC2 Pathway after Spinal Cord Injury[J]. J Neurotrauma, 2020, 37(6): 846-859.
- [14] Lee-Hotta S, Uchiyama Y, Kametaka S. Role of the BDNF-TrkB pathway in KCC2 regulation and rehabilitation following neuronal injury: A mini review[J]. Neurochem Int, 2019, 128: 32-38.
- [15] Karantali E, Kazis D, Papavasileiou V, et al. Serum BDNF Levels in Acute Stroke: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. Medicina (Kaunas, Lithuania), 2021, 57(3): 297.
- [16] Zhou X, Deng X, Liu M, et al. Intranasal delivery of BDNF-loaded small extracellular vesicles for cerebral ischemia therapy[J]. J Control Release, 2023, 357: 1-19.
- [17] Bilchak J N, Caron G, Cote M. Exercise-Induced Plasticity in Signaling Pathways Involved in Motor Recovery after Spinal Cord Injury[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(9).
- [18] Ziemińska E, Kugler S, Schachner M, et al. Overexpression of BDNF increases excitability of the lumbar spinal network and leads to robust early locomotor recovery in completely spinalized rats[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88833.