

神经酰胺与细胞凋亡

金朝晖 李 薇¹⁾ 潘华珍²⁾

(上海市第六人民医院血液科, 上海 200233)

摘要 细胞凋亡 (apoptosis) 又称细胞的程序性死亡, 参与机体许多生理和病理过程. 近年来的研究表明细胞凋亡与鞘脂代谢有密切的关系, 鞘脂的水解产物神经酰胺作为脂质第二信使在诱导和抑制细胞凋亡中起着重要的作用.

关键词 细胞凋亡, 鞘脂, 神经酰胺

学科分类号 Q73

以往人们认为脂质只是细胞膜脂质双层结构的一个组成部分, 而对于它们的功能研究得很少. 近20年来, 由于磷脂酶 C (phospholipase C, PLC)、磷脂酶 D (phospholipase D, PLD) 及磷脂酶 A₂ (phospholipase A₂, PLA₂) 等磷脂酶的不断发现, 人们观察到磷脂酶作用于磷脂后的水解产物具有多方面的生物活性作用, 这使人们逐渐认识到了膜脂质的重要生理意义. 目前人们将脂质经特异性的酶水解后产生的具有信息传递作用的生物活性物质统称为脂质第二信使 (lipid second messenger, LSM).

长期以来, 鞘脂 (sphingolipid) 被认为只是大多数哺乳动物细胞 (尤其是神经细胞) 细胞膜外层的一个结构成分. 直到 1989 年 Okazaki 等^[1]发现在用 1 α , 25 双羟基维生素 D₃ (1 α , 25-dihydroxy-vitamin D₃) 诱导细胞分化的过程中伴有鞘磷脂 (sphingomyelin, SM) 的水解和水解产物神经酰胺 (ceramide, Cer) 的增多, 进一步的研究发现, 外源性的鞘磷脂酶 (sphingomyelinase, SMase) 和细胞可通过性神经酰胺均可模仿维生素 D₃ 诱导 HL-60 细胞分化, 这提示神经酰胺有着脂质第二信使的功能. 1994 年召开的脂质第二信使国际会议中确认了神经酰胺为脂质第二信使, 并认为这一发现是近20年来该领域最重要的研究进展之一^[2]. 本文仅着重介绍神经酰胺的生理活性及其与细胞凋亡 (apoptosis) 的关系.

1 神经酰胺的结构及代谢

在哺乳动物中至少存在 300 种以上的鞘脂 (sphingolipid), 在结构上, 鞘脂通常由长链鞘氨醇 (sphingosine) 作为碱性骨架、加上一个通过酰

基连接的脂肪酸和在第一位碳原子处的一个有极性的基团 (碳水化合物基团) 组成. 神经酰胺和鞘磷脂均属鞘脂类. 但是在第一位碳原子处, 神经酰胺为羟基, 而鞘磷脂为磷酸胆碱 (图 1)^[3].

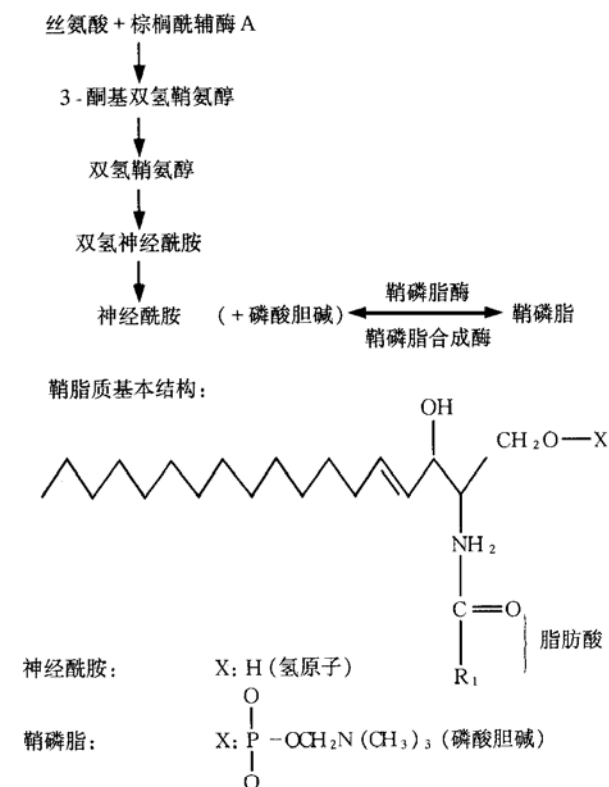


图 1 神经酰胺结构与代谢

1.1 神经酰胺的生成

a. 由小分子化合物合成: 首先经过丝氨酸

¹⁾ 上海市闵行区中心医院肿瘤科, 上海 201100.

²⁾ 中国医学科学院 基础医学研究所, 北京 100005.
中国协和医科大学

收稿日期: 1998-10-13, 修回日期: 1999-03-08

(serine) 与棕榈酰辅酶 A (palmitoyl CoA) 结合成 3-酮基双氢鞘氨醇 (3-ketosphinganine), 随后降解为双氢鞘氨醇 (dihydrosphingosine), 再通过酰胺键连接双氢鞘氨醇和脂质酰基形成双氢神经酰胺 (dihydroceramide), 最后在 4, 5 位形成反式双键 (*trans* double bond) 而合成了神经酰胺。b. 通过鞘磷脂水解: 鞘磷脂可通过三种鞘磷脂酶 (SMase) 水解生成神经酰胺。神经酰胺形成后也可作为鞘脂类的前体参与其他所有鞘脂质的合成。例如通过磷脂酰胆碱-神经酰胺胆碱磷酸转移酶 (phosphatidylcholine: ceramide choline phosphotransferase) 的作用使磷酸胆碱 (phosphorylcholine) 与神经酰胺结合成鞘磷脂 (sphingomyelin, SM)。由鞘磷脂水解为神经酰胺, 再由神经酰胺与磷酸胆碱合成鞘磷脂的过程就被称为鞘磷脂循环 (sphingomyelin cycle)^[3]。

1.2 神经酰胺的分解

神经酰胺在体内的分解是通过三种不同的神经酰胺酶 (ceramidase) 将神经酰胺分解为鞘氨醇 (图 1)。

2 神经酰胺在诱导细胞凋亡中的作用

2.1 神经酰胺作为第二信使启动细胞凋亡

在 TNF α 、Fas、电离辐射及柔红霉素 (daunorubicin) 等诱导细胞凋亡的过程中, 早期即发现有神经酰胺的增加, 同时, 细胞可通过性的神经酰胺类似物如 C₂-Cer 等也可模仿这些因子直接诱导细胞凋亡。这提示 TNF α 等因子使细胞内的神经酰胺增多, 而神经酰胺作为第二信使将细胞外的信息传递到细胞内启动细胞凋亡^[4]。

通过外界刺激提高细胞内神经酰胺水平的途径可能有两类:

2.1.1 激活鞘磷脂特异性磷脂酶 C (sphingomyelin-specific phospholipase C, 简称鞘磷脂酶 sphingomyelinase)。绝大多数刺激因子均利用这一途径。目前已知有三种鞘磷脂酶, 二种主要分布于细胞膜表面, 最适于中性环境, 因此称为中性鞘磷脂酶 (neutral sphingomyelinase, NSMase), 并分为镁离子依赖性 (Mg²⁺-dependent) 和镁离子非依赖性 (Mg²⁺-independent) 两大类。另一种则主要位于溶酶体内, 最适于酸性环境称为酸性鞘磷脂酶 (acid sphingomyelinase, ASMase)。其中人们已成功地克隆了 ASMase 并确认其为单个基因的产物, 而 NSMase 的分子特性尚在研究中, 但无 ASMase

活性的小鼠仍有 NSMase 活性, 这说明 NSMase 和 ASMase 系由二个不同的基因编码的。进一步的研究发现 NSMase 与胞外信息调控激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 通路及促使细胞增殖、发生炎症反应相关, 而 ASMase 则与刺激活化的蛋白激酶 (stress activated protein kinase, SAPK) 通路及细胞凋亡密切相关。

目前认为各种外界的刺激因子激活鞘磷脂酶的途径有所不同, 离子辐射、紫外辐射等刺激因子可直接作用于细胞膜激活鞘磷脂酶, 其具体的作用途径尚未明确。而 TNF α 、CD95 等细胞因子则是通过一系列的配体形成从而激活鞘磷脂酶, 这一激活机制目前已了解较多。在 55 ku 的 TNF α 受体中有二个截然不同的区域分别与 NSMase 和 ASMase 相连, TNF α 受体近膜区有一个由 11 个氨基酸组成的区域称为 NSMase 活化域 (NSMase activating domain, NAD), 这一结构通过一个名为 NSMase 活化因子 (factor activating NSMase, FAN) 与 NSMase 相连接, 从而介导细胞增殖与炎症反应。TNF α 受体的远膜端则有一个由 75 个氨基酸组成的称为死亡域 (death domain, DD) 的结构与 ASMase 相连而介导细胞凋亡, 在 CD95 中也同样有着这一死亡域结构。这一死亡域的突变不仅能阻断 TNF α 、CD95 诱导的细胞凋亡, 而且也阻断了 ASMase 的激活^[5]。

2.1.2 激活神经酰胺合成酶 (ceramide synthase)。Ron Bose 于 1995 年在用柔红霉素这一化疗药物诱导 P388 和 U937 细胞凋亡时发现, 柔红霉素引起的神经酰胺的增高是通过激活神经酰胺合成酶而实现的。从念珠形镰刀菌中提取的 Fumonisin B1 是神经酰胺合成酶强有力而特异的抑制剂, Fumonisin B1 能有效地抑制柔红霉素诱导的细胞凋亡, 进一步证明了柔红霉素是通过激活神经酰胺合成酶提高神经酰胺水平以诱导细胞凋亡的。柔红霉素是目前仅知的通过此途径提高细胞内神经酰胺含量的刺激因子^[6]。

2.2 神经酰胺的作用机制

外界的刺激因子通过激活鞘磷脂酶或神经酰胺合成酶使细胞内神经酰胺含量增高, 神经酰胺作为第二信使再作用于细胞内的神经酰胺靶物质 (ceramide target), 从而将细胞外的信息传递到细胞内, 再通过某些与神经酰胺相关的通路引起细胞凋亡。

2.2.1 神经酰胺的直接靶物质有: a. 神经酰胺活

化的蛋白激酶 (ceramide-activated protein kinase, CAPK): 神经酰胺能活化一种特殊的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 称为神经酰胺活化的蛋白激酶 (ceramide-activated protein kinase, CAPK). 进一步的研究表明这种在细胞膜表面广泛分布的 CAPK 的最短识别序列是 Leu-Thr-Pro , 且 CAPK 依赖镁离子且有丝氨酸残端自磷酸化的功能, 体外实验表明 CAPK 在神经酰胺的作用下磷酸化和自磷酸化的活性增强了 5~10 倍^[7]. 目前认为 CAPK 与细胞增殖及炎症反应有关. b. 神经酰胺活化的蛋白磷酸化酶 (ceramide-activated protein phosphatase, CAPP): 1992 年 Dobrowsky 发现 Cer、 $\text{C}_2\text{-Cer}$ 、 $\text{C}_6\text{-Cer}$ 均可激活一种丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸化酶, 称为神经酰胺活化的蛋白磷酸化酶 (CAPP). 进一步的研究发现 CAPP 是丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸化酶 PP2A 族的一员. 从许多组织中分离出的 PP2A 由结构亚基 A、调控亚基 B 和催化亚基 C 三个亚基组成, 此外, PP2A 也可以 C 亚基单体或 AC 亚基二聚体的形式存在, 但是神经酰胺只能激活由 ABC 三个亚基组成的 PP2A 三聚体^[8].

c. 蛋白激酶 C- ζ : 核内因子 κB (nuclear factor κB , NF- κB) 是包含 50 ku (p50 NF κB1) 和 65 ku (p65-relA) 这两个亚基的二聚体, 通常通过 p65 亚基与抑制蛋白 (inhibitory protein, I- κB) 结合成无活性状态分布在胞浆中. 在 $\text{TNF}\alpha$ 作用下蛋白激酶 C- ζ 被激活, 使 I- κB 磷酸化而不再与 NF- κB 结合, NF- κB 进入细胞核内使 NF- κB 依赖性启动子 (NF- κB dependent promotor) 活化. 在 NIH-3T3 细胞中, 鞘磷脂酶能激活 PKC- ζ , 而神经酰胺则能在体外激活 PKC- ζ 从而活化 NF- κB ^[9].

但是究竟是以上三种靶物质中的哪一种或几种在神经酰胺介导的细胞凋亡中起作用仍是目前研究的热点.

2.2.2 神经酰胺的下游效应系统: 蛋白激酶链 (protein kinase cascade) 一直被认为是第二信使介导细胞活性过程中的下游效应系统 (downstream effector system). 这些蛋白激酶链由一系列的蛋白激酶组成, 通过这些蛋白激酶依次地磷酸化从而将信息从细胞表面传入胞浆中. 现发现刺激激活的蛋白激酶 (stress activated protein kinase, SAPK, 又称 c-Jun kinase, JNK) 途径及胞外信息调控的激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERK) 途径与神经酰胺诱导的细胞凋亡过程有较密切的关系.

离子辐射、热休克及 TNF 等刺激因子在诱导

细胞凋亡的过程中, 都有神经酰胺的快速生成及在此之后的 SAPK/JNK 途径的激活, 同时神经酰胺的类似物也能激活 SAPK/JNK 途径, 而阻断 SAPK/JNK 途径能有效地阻断神经酰胺诱导的细胞凋亡, 这些研究结果表明 SAPK/JNK 途径是神经酰胺诱导细胞凋亡过程中的不可缺的一个下游效应系统.

有研究表明 ERK 途径在细胞凋亡中有着抗凋亡的作用, 如果在 P12 细胞培养中去除神经生长因子 (nerve growth factor) 可引起细胞凋亡, 在这一凋亡过程中除了有 SAPK/JNK 途径的激活以外还同时有 ERK 途径的失活, 而且 SAPK/JNK 的激活与 ERK 的失活都是必不可少的. 这提示 SAPK/JNK 途径与 ERK 途径间的平衡可能是细胞凋亡中的又一关键所在^[10].

2.2.3 神经酰胺的终末效应系统 (final effector mechanism): 各种因素引起的细胞凋亡可以通过不同的信号传递系统得以实现, 但是各种信号传递系统最终都要激活一个共同的终末效应系统, 目前认为这一终末效应系统主要是白介素 1β 转化酶 (interleukin 1β -converting enzyme, ICE) 族的蛋白酶, 这类蛋白酶能顺序分解细胞结构引起细胞凋亡. 现在了解较多的是 ICE 族中的三种蛋白酶, 分别称为: caspase-8、caspase-3 及 caspase-7. 同样, 神经酰胺介导的细胞凋亡也要通过这一终末效应系统. 目前人们仅了解到水溶性的神经酰胺类似物能够直接激活 caspase-3, 而 $\text{TNF}\alpha$ 受体、CD95 则是通过它们的死亡域结构间接激活 caspase-8, 然后再激活 caspase-3、caspase-7 而介导凋亡, 但是神经酰胺诱导的细胞凋亡与 ICE 蛋白酶间的进一步的关系则尚不明^[11].

3 神经酰胺在抑制细胞凋亡中的作用

神经酰胺不仅有诱导细胞凋亡的作用, 在不同的细胞不同的条件下又可抑制细胞凋亡. 感觉与交感神经元的存活依赖神经生长因子 (nerve growth factor, NGF), 去除 NGF 通常会引起交感神经元的凋亡, 1995 年 Ito^[12] 实验证明 $\text{C}_2\text{-Cer}$ 和鞘磷脂酶 (SMase) 能有效地防止或延迟去除 NGF 所引起的交感神经元的凋亡. 这是目前仅有的关于神经酰胺在抑制细胞凋亡中的作用的报道. 为何神经酰胺在此有抑制细胞凋亡中的作用, 目前认为这与 NGF 的作用机制有关, 当 NGF 与神经元的低亲和性 NGF 受体 (low-affinity NGF

receptor, LNGFR) 结合时激活了鞘磷脂通路, 使细胞内神经酰胺含量增高从而使神经元细胞得以存活, 同时外源性神经酰胺能模仿 NGF 的作用, 这说明作为一种特殊类型的细胞, 神经元细胞的存活依赖 NGF 的存在, 更必须有一定水平的神经酰胺的存在。

综上所述, 神经酰胺作为第二信使在细胞凋亡

中的作用非常复杂 (图 2), 它同时参与了诱导和抑制细胞凋亡, 此外神经酰胺作为第二信使如何将细胞外信息传递到细胞和细胞核内的具体机制仍不清楚。因此需要更深入的研究以阐明神经酰胺作为第二信使在细胞凋亡中所起的作用。这对于认识细胞的生长发育和老化、恶性肿瘤的形成治疗等均有重大意义。

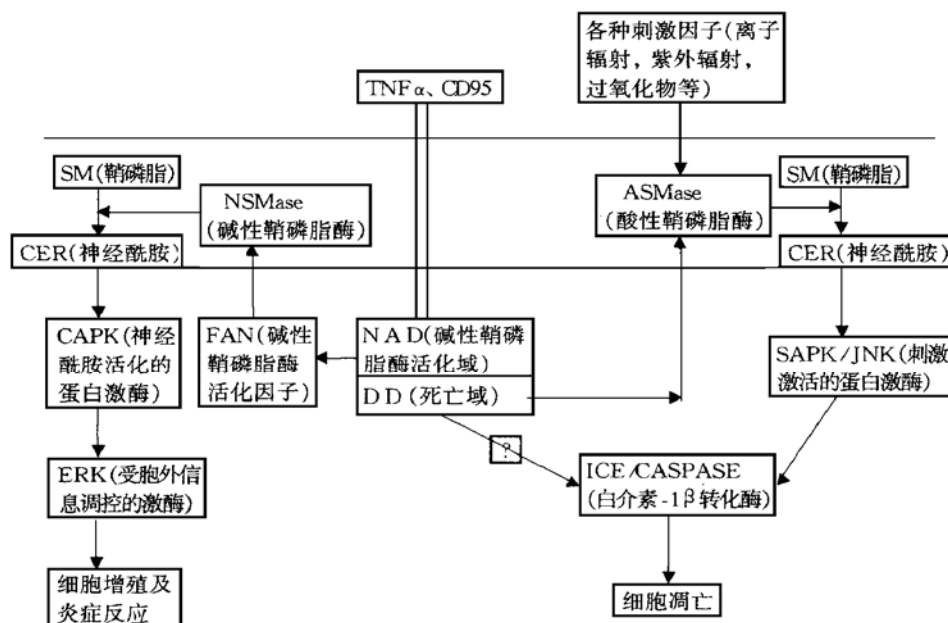


图 2 神经酰胺在细胞凋亡过程中的作用

参 考 文 献

- Okazaki T, Bielawska A, Bell A M, *et al.* Role of ceramide as a lipid mediator of 1 α , 25-dihydroxyvitamin D $_3$ -induced HL-60 cell differentiation. *J Biol Chem*, 1990, **265** (26): 15823~ 15831
- Liscovitch M, Cantley L C. Lipid second messengers. *Cell*, 1994, **77** (3): 329~ 334
- Hannun Y A, Bell R M. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science*, 1989, **243** (4890): 500~ 507
- Obeid L M, Linardic C M, Karolak L A, *et al.* Programmed cell death induced by ceramide. *Sciences*, 1993, **259** (5102): 1769 ~ 1771
- Haimovitz-Friedman A, Kolesnick R N, Fuks Z. Ceramide signaling in apoptosis. *British Medical Bulletin*, 1997, **53** (3): 539~ 553
- Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, *et al.* Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals. *Cell*, 1995, **82** (3): 405 ~ 414
- Spiegel S, Forster D, Kolesnick R N. Signal transduction through lipid second messenger. *Current Opinion of Cell Biology*, 1996, **8** (2): 159~ 167
- Wolff R A, Dobrowsky R T, Bielawska A, *et al.* Role of ceramide activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J Biol Chem*, 1994, **269** (30): 19605~ 19609
- Lozano J, Berra E, Municio M M, *et al.* Protein kinase C- ζ isoform is critical for κ B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J Biol Chem*, 1994, **269** (30): 19200~ 19202
- Peña L A, Fuks Z, Kolesnick R. Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. *Biochemical Pharmacology*, 1997, **53** (5): 615~ 621
- Monney L, Oliver R, Otter I, *et al.* Role of acidic compartment in tumor necrosis factor- α -induced production of ceramide, activation of caspase 3 and apoptosis. *Eur J Biochem*, 1998, **251** (1-2): 295~ 303
- Ito A, Horigome K. Ceramide prevents neuronal programmed cell death induced by nerve growth factor deprivation. *J Neurochem*. 1995, **65** (1): 463~ 466

Ceramide and Apoptosis. JIN Zhao-Hui (Department of Hematology, Shanghai Sixth Hospital, Shanghai 200233, China); LI Wei (Department of Oncology, Shanghai Minhang District Hospital, Shanghai 201101, China); PAN Hua-Zhen (National Laboratory of Medical Molecular Biology, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China).

Abstract Apoptosis is a highly organized mechanism by which cells undergo programmed cell death. Apoptosis participates in many physiological and pathological processes. Recent experimental approaches suggest that sphingolipid metabolites

participate in key events of apoptosis. Being a lipid second messenger, sphingomyelin lysis product-ceramide play an important role in inducing and preventing apoptosis.

Key words apoptosis, sphingolipid, ceramide

NMDA 受体和长时程增强

朱洪波 罗建红

(浙江大学医学院医学分子生物学实验室, 杭州 310031)

摘要 近年来, N-甲基-D-门冬氨酸 (NMDA) 受体在突触可塑性形式——长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 中的作用及该受体被激活后的细胞内级联反应备受人们的关注。人们利用拮抗剂技术和基因敲除的方法, 对其进行了广泛的研究, 并且就 LTP 的诱导和维持方面获得了一些进展。已获得的这些研究结果为 LTP 的突触前及突触后机制提供了有力的证据。

关键词 NMDA 受体, LTP, Ca^{2+} , 逆行信使

学科分类号 R338

NMDA 受体是谷氨酸受体的一种亚型。近年来, 随着特异性拮抗剂技术的发展和基因敲除方法的运用, NMDA 受体在突触可塑性形式 LTP 中的作用已越来越受到人们的关注。LTP 作为学习和记忆的突触生理机制, 人们对其研究也主要集中于 NMDA 受体的特性及该受体被激活后的细胞内级联反应。随着研究的进一步深入, 人们获得了大量的实验资料, 为 NMDA 受体介导的 LTP 形成及调节机制提供了有力的证据。

1 NMDA 受体对 LTP 诱导的作用

自从 NMDA 受体被确定后, 人们发现兴奋性氨基酸可以通过 NMDA 受体参与中枢神经系统复杂的生理过程及突触可塑性变化, 包括 LTP 的诱导和维持。

1.1 从拮抗剂来的证据

随着特异性拮抗剂的发展, 人们围绕 NMDA 受体和 LTP 作了大量的研究。众多的实验结果表明, NMDA 受体的激活在 LTP 的诱导中有着重要的作用。Murphy 和 Glanzman 在加利福尼亚海兔的隐鳃反射建立中, 发现运用 NMDA 受体的选择性抑制剂 AP5 (aminor-5-phosphonovaleric acid), 可以抑制海兔的 LTP 诱导, 证实了 NMDA 受体的激活在 LTP 诱导中的作用^[1]。Murphy 和 Reid 等^[2]在

大鼠海马切片 CA1 区使用 D-AP5 也同样证实了在 LTP 的诱导中, NMDA 受体的激活是必要的。

1.2 基因水平的证据

基因敲除方法是近年发展起来的一种新的实验方法。部分运用该法的实验也证实了 NMDA 受体在 LTP 中的作用。1995 年, 有人敲除了小鼠 CA1 区 NMDA 受体 $\epsilon 1$ 亚单位基因。结果发现在基因敲除的小鼠当中, 通过 NMDA 受体通道的电流显著下降, 进而影响了小鼠海马区 LTP 的诱导^[3]。后来, Tsien 等^[4]发展了基因敲除的方法, 准确地敲除了小鼠 CA1 区 NMDA 受体 R1 基因, 发现突变后小鼠的 CA1 区缺失 LTP^[5], 从而进一步证实了 NMDA 受体在 LTP, 尤其是在海马区的 LTP 中有着至关重要的作用。

2 LTP 的诱导和维持

2.1 NMDA 受体的激活特征

NMDA 受体的激活对 LTP 的诱导是必要的^[2]。在突触传递的过程中, NMDA 受体的激活需要非 NMDA 亚型谷氨酸受体的参与, 其中主要是 AMPA 受体的参与。AMPA 受体在树突中的分布邻近于 NMDA 受体。在一般的突触传递中, 突触前膜释放的谷氨酸同时作用于 NMDA 和 AMPA