

## 重金属诱导细胞凋亡的分子机制

刘欣梅, 项黎新, 邵健忠\*, 周庆军

(浙江大学生命科学学院, 杭州 310012)

**摘要:** 重金属诱导的细胞凋亡是一个十分复杂的过程, 不同种类的重金属以及同类重金属离子的不同价态所诱导的凋亡效应及其分子机制不尽相同。目前的研究表明, 重金属与DNA形成加合物而导致DNA损伤可能是引发细胞凋亡的重要步骤: 多种重金属能通过激活内质网、线粒体钙通道, 使 $\text{Ca}^{2+}$ 释放进入细胞质而引发凋亡; 重金属还能使细胞中ROS升高, 在直接导致DNA损伤的同时, 启动与线粒体相关的细胞凋亡信号通路。此外, ROS还能通过MAPKs增强JNK介导的FasL和Fas表达, 最终使caspase-3和caspase-7激活, 从而促进凋亡的发生。重金属诱导细胞凋亡还涉及一系列重要基因和蛋白质的参与, 包括促进凋亡的Src家族酪氨酸激酶、bax、fas和p53等基因及相关蛋白, 抑制凋亡的Sp1锌指转录因子、bcl-2和myc等基因及相关蛋白。部分重金属如镉、锌等对细胞凋亡具有诱导和拮抗双重效应, 其中拮抗效应主要是通过自由钙离子协同进行的, 而诱导效应则可能是通过调节caspase-3活性而实现的。

**关键词:** 重金属; 细胞凋亡; 分子机制

中图分类号: Q28 文献标识码: A 文章编号: 0253-9977(2004)03-235-06

细胞凋亡是细胞受到内、外因子刺激后发生的由自身基因调控的生理性死亡行为, 是一个主动和高度有序的生命活动过程。由于其在个体正常生长发育中所扮演的重要角色以及细胞凋亡紊乱在病理学上的重要意义, 引起了人们对其机制的广泛而深入研究。细胞凋亡可由生物、物理和化学等因素诱导产生, 在众多的凋亡诱导因子中, 重金属是较早被认识的典型诱导因子之一<sup>[1,2]</sup>。由于重金属具有独特的生理学效应, 在正常情况下, 对细胞的生长发育具有特殊的调节作用, 同时随着工农业生产的发展, 重金属又成为环境中最为严重的污染因子之一, 它们对机体的重要组织器官如肝、肾、神经系统等均会造成严重的毒性, 影响机体正常的生理生化代谢、遗传发育、甚至造成癌变。因此, 对重金属的细胞和分子毒理学效应和机制的研究长期以来一直受到重视, 特别是近年来发现包括镉、铬、镍、铅、砷、汞等在内的几乎各种有毒重金属均可诱导或影响细胞凋亡<sup>[3,4]</sup>, 因此重金属的凋亡毒理学研究迅速兴起, 并成为细胞凋亡及其机制研究的模型和热点。本文对近年来该领域的研究进展作一综述。

### 1 DNA损伤与重金属诱导细胞凋亡

重金属的一个重要毒理学效应就是能够与DNA结合形成加合物而导致DNA损伤, 近年来许多学者认为, DNA损伤是重金属引发细胞凋亡的重要步骤。Flores<sup>[5]</sup>等在研究铬酸钾Cr(VI)的细胞毒理学效应时发现, Cr(VI)是一种很强的凋亡诱导剂, 它能诱导Pam 212-ras细胞发生典型的凋亡特征。为了深入探讨重金属诱导细胞凋亡与DNA加合及损伤的关系, Flores等用pBR322质粒超螺旋DNA作为研究模型, 发现在抗坏血酸存在下, 铬酸能够使pBR322 DNA从超螺旋形式向开环形式转变, 这种转变表明了Cr(VI)和抗坏血酸使pBR322 DNA链发生了断裂。同时, 他们还运用CD spectroscopy技术分析铬酸钾对人工合成的多聚脱氧寡核苷酸链的影响, 发现铬酸钾能够与poly(dG-dC)·poly(dG-dC)结合并使其构象发生扭曲, 而且这个过程能够被抗坏血酸所强化。Voitkun等<sup>[6]</sup>发现,  $\text{Cr}^{6+}$ 本身并不能与DNA相互作用, 只有在其被细胞内抗坏血酸

还原成 $\text{Cr}^{5+}$ 、 $\text{Cr}^{4+}$ 和 $\text{Cr}^{3+}$ 等还原态铬后才能与DNA发生作用。因此分析， $\text{Cr(VI)}$ 之所以能够诱导细胞凋亡，可能与其和DNA发生加合反应而导致DNA损伤有关。在抗坏血酸作用下，铬酸钾( $\text{Cr(VI)}$ )能迅速被还原，形成抗坏血酸- $\text{Cr(III)}$ -DNA三联加合物<sup>[7]</sup>，引起DNA链间交叉结合，同时在还原反应中产生特定的活性基团，导致DNA超螺旋产生缺口，使DNA双螺旋结构发生强烈的变形，最后导致DNA片段化结构产生，促进细胞凋亡的发生。

## 2 $\text{Ca}^{2+}$ 与重金属诱导细胞凋亡

$\text{Ca}^{2+}$ 是细胞内重要的第二信使，它不仅参与细胞的运动、增殖、分泌和多种代谢，而且还参与细胞凋亡。目前的研究表明，在许多细胞的凋亡过程中，都伴随胞内自由 $\text{Ca}^{2+}$ 的大幅度增加，特别是在凋亡早期， $\text{Ca}^{2+}$ 往往表现出急剧增加，提示 $\text{Ca}^{2+}$ 是启动细胞凋亡的早期信号<sup>[8]</sup>。近年来，已有较多的研究显示，在铅、汞等重金属诱导的细胞凋亡过程中，也伴随着胞内自由 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的升高<sup>[9,10]</sup>。Schanne<sup>[11]</sup>等发现，用 $1\text{mmol/L}$ 和 $5\text{mmol/L}$   $\text{Pb}^{2+}$ 处理成骨细胞时，胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度从 $125\text{nmol/L}$ 分别上升到 $170\text{nmol/L}$ 和 $230\text{nmol/L}$ ，通过PKC激活和抑制试验发现，PKC抑制剂能显著抑制 $\text{Pb}^{2+}$ 引起的胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 的升高，因此推测细胞外 $\text{Pb}^{2+}$ 可替代 $\text{Ca}^{2+}$ 激活钙通道， $\text{Pb}^{2+}$ 经 $\text{Ca}^{2+}$ 通道进入细胞，细胞内微量的 $\text{Pb}^{2+}$ 即可激活PKC，后者通过激活内质网、线粒体的钙通道，使 $\text{Ca}^{2+}$ 释放进入细胞质。Gasso<sup>[12]</sup>等则用 $\text{Ca}^{2+}$ 阻断剂、ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶阻断剂(inhibitor of endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase)和 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换器( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger)阻断剂分别作用于经汞处理的细胞，发现它们均能阻断由汞引起的 $\text{Ca}^{2+}$ 升高，由此判断，汞可能通过促进 $\text{Ca}^{2+}$ 通道、ER  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP酶和 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换器的作用，导致胞外 $\text{Ca}^{2+}$ 内流和内质网 $\text{Ca}^{2+}$ 释放等途径转移到细胞质中，进而诱导细胞凋亡。

## 3 线粒体与重金属诱导细胞凋亡

线粒体是维持细胞内离子平衡和能量代谢的重要细胞器，是对许多外源性化合物最敏感和最早受到影响的损伤靶点，特别是氧化损伤中主要的靶细胞器<sup>[13]</sup>。近年来的大量研究还表明，它在许多因子引起的细胞凋亡的信号传递和调控等过程中发挥着中枢作用。目前，对汞、铅等诱导的细胞凋亡机

制研究表明，线粒体在重金属诱导细胞凋亡的发生、发展和信号转导中也发挥着重要作用。2002年，Shenker<sup>[14]</sup>等开展了汞诱导人T-细胞凋亡的研究，他们分别采用 $\text{MeHgCl}$ 和 $\text{HgCl}_2$ 处理人T-细胞并分析线粒体的活性变化，结果发现，两种汞化合物均能通过引起线粒体膜通透性变化而影响线粒体活性。在两种汞化合物处理的细胞中，均出现线粒体膜电位下降、细胞内pH发生变化、ROS产生、GSH含量下降，但是在 $\text{MeHgCl}$ 处理的细胞中，细胞色素C含量显著增加，而Bcl-2含量并未见变化；而在 $\text{HgCl}_2$ 处理的细胞中，细胞色素c并没有显著增加，但Bcl-2大量增加。实验说明了在汞诱导的细胞凋亡中，线粒体发挥了重要作用，但不同的汞化合物能引起线粒体的不同变化，从而启动不同的凋亡途径。近年来，大量实验报道了 $\text{As}_2\text{O}_3$ 能够诱导许多癌细胞凋亡<sup>[15,16]</sup>，而在这个过程中，含巯基基团的蛋白质可能是作用的主要靶分子，巯基是 $\text{As}_2\text{O}_3$ 诱导线粒体跨膜电位( $\Delta\Psi_m$ )下降和细胞凋亡的重要化学感受器。线粒体 $\Delta\Psi_m$ 的下降，使ATP合成过程无法正常完成，从而不能为细胞提供充足的能量，引起细胞凋亡。

最近，He等<sup>[17]</sup>又研究了铅、镉诱导细胞凋亡与线粒体的关系，观察到 $\text{Pb}^{2+}$ 能够导致小鼠视网膜细胞中钙离子浓度增加、Bax从细胞质中流入线粒体以及细胞色素c从线粒体释放，释放的细胞色素c通过活化caspase-9和caspase-3启动细胞凋亡。此外，He等还观察到在铅引起的小鼠杆状光感受细胞凋亡过程中Bcl- $X_L$ 过度表达的现象。他们通过三维电子断层摄影术，观察了线粒体嵴的解剖图以及通透性、线粒体基质容量、接触位点等的变化，结果发现在铅的作用下，细胞中出现了 $\text{Ca}^{2+}$ 超载、视紫质损失、Bax从细胞质流入线粒体、线粒体呼吸作用下降、膜电位降低、细胞色素c释放、caspase-3活化、大量的线粒体结合位点暴露等一系列变化，从而导致柱状细胞发生选择性凋亡。然而，在选择性凋亡过程中并没有出现线粒体基质肿胀、外膜破裂、caspase-8活化以及Bid分解现象，而当Bcl- $X_L$ 过量表达事件出现时，除了钙离子超载现象依然存在外，其他所有的凋亡事件均被阻断，说明过量表达的Bcl- $X_L$ 在整个成年期维持了线粒体的正常功能。Cai等<sup>[18]</sup>在镉诱导的细胞凋亡中发现，镉离子首先造成线粒体膜电位下降，再通过渗透性交换孔道释放细胞色素c，细胞色素c通过激活caspase-9

启动细胞凋亡。Kim 等<sup>[19]</sup>则通过 bcl-2 基因转染试验, 证明了线粒体参与了镉诱导的 Rat-1 纤维母细胞凋亡, 而且证明这个凋亡过程能够被 Bcl-2 所抑制。

目前大量的研究显示, 重金属能够使细胞中 ROS(reactive oxygen species)升高, 或者引起内源性抗氧化剂如 SOD 和 GSH 的耗竭。如低剂量的汞能使人淋巴细胞、肝细胞、脑细胞中的 ROS 升高, 并导致 GSH 的损耗和脂肪过氧化<sup>[20]</sup>。ROS 的升高, 一方面可以直接导致 DNA 损伤, 同时还可以启动线粒体相关的凋亡信号通路, 如通过激活 p53 引发 Bax 和 Noxa 的表达, 后两种凋亡蛋白可以使线粒体膜电位增加, 导致线粒体内的细胞色素 c 释放进入细胞质, 与 Apaf1 结合, 其结果是 caspase-9 被激活。另外, 损伤的线粒体也能释放 AIF 和 Smc, AIF 能够诱导非 caspase 依赖性的凋亡, Smc 则能抵消 IAP 蛋白所产生的抗凋亡效应。此外, ROS 也可能通过 MAP 蛋白激酶增强非固有的凋亡途径, 特别是 JNK 介导的 FasL 和 Fas 表达。FasL 和 Fas 与死亡结构域(如 FADD 和 TRADD)结合, 形成受体复合物, 激活 caspase-8。caspase-8 和 caspase-9 的激活导致了 caspase 效应子 caspase-3 和 caspase-7 的激活, 最终促进细胞凋亡的发生<sup>[21]</sup>(图 1)。

#### 4 MAPKs 信号通路与重金属诱导细胞凋亡

2001 年, Namgungl 等最早研究了重金属诱导的细胞凋亡与 MAPKs(mitogen-activated protein kinases)介导的信号通路的关系, 发现亚砷酸盐的神

经毒性可能是归咎于由 p38 和 JNK3 MAPKs 激活而引起的凋亡<sup>[22]</sup>, 因为应用抑制剂 SB203580 或 CEP1347 阻断 p38 和 JNK 信号途径后, 能够保护小脑神经元免受亚砷酸盐诱导而产生凋亡。2003 年, Chuan 等<sup>[23]</sup>报道了在镉诱导产生的细胞凋亡中, 3 种主要的 MAPKs 即 JNK(c-JUN N-terminal kinase)、p38 和 ERK(extracellular signal-regulated kinase)参与了细胞凋亡过程的调节, 他们还首次发现过氧化氢酶对由镉引起的 JNK 活化过程很重要, 由镉引起的持久的 JNK 凋亡信号激活过程需要功能性过氧化氢酶的参与, 因为过氧化氢酶可能阻止对冈田酸(okadaic acid)敏感的蛋白磷酸酶对 JNK 活性的阻断, 过氧化氢酶活性短期缺失, 能够使细胞逃避凋亡, 并可能使细胞发生癌变。在重金属激活的 MAPKs 凋亡信号通路中, Fas(APO1/CD95)发挥了重要作用。Fas 是一种跨膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子受体(TNFR)/神经生长因子受体(NGFR)超家族成员, 是细胞凋亡过程中一种重要的信号传递分子, 在多种细胞凋亡的初始阶段发挥重要作用。它与 Fas 配体(FasL)结合后可以进一步激活 caspase 蛋白酶家族、bcl-2 家族、p53 等凋亡相关基因, 从而诱导细胞凋亡。Fricsen 等<sup>[24]</sup>认为 Fas 抗原表达上调会使向细胞传导的死亡信号增强, 从而触发细胞凋亡。程云会等<sup>[25]</sup>的研究表明, Fas 在铅诱发大鼠脑细胞凋亡的起始阶段起着十分重要的作用, 他们通过检测醋酸铅染毒大鼠脑细胞中凋亡受体 Fas 含量的变化, 发现在一定的剂量范围内, 随着铅浓度增高, Fas 抗原表达量增加, 其介导的脑细胞凋亡率随之升高。而在启动细胞凋亡的级联反应后 Fas 开始衰减, 但凋亡率依然保持上升趋势。Kim 等<sup>[26]</sup>使用 T 细胞杂交瘤作为 T 细胞凋亡研究的模型, 发现经过醋酸镍处理后, T 细胞杂交瘤细胞迅速发生凋亡, 其中二价镍处理杂交瘤细胞后, 细胞中的 FasL 在 mRNA 和蛋白质水平都有明显表达, 并且伴随着 caspase-3 活性的增加, 在 FasL 蛋白质水平被检测到后大约 10 小时, caspase-3 活性水平达到最高峰, 这暗示二价镍通过或者至少是部分通过激活 Fas/FasL 信号通道而导致细胞凋亡。

#### 5 重金属诱导细胞凋亡中涉及的重要基因和蛋白质

重金属诱导的细胞凋亡是一个十分复杂的过程, 涉及一系列重要基因和蛋白质的参与, 其中包

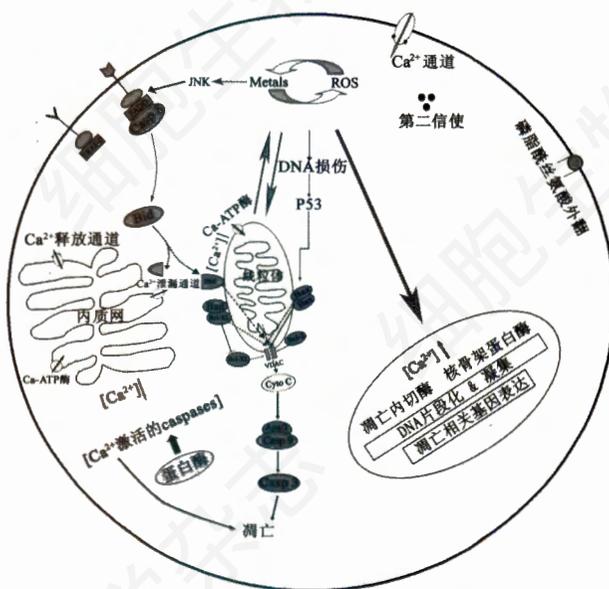


图1 重金属诱导细胞凋亡机制示意图<sup>[21]</sup>

括促进凋亡的 Src 家族酪氨酸激酶、bax、fas 和 p53 等基因及相关蛋白；抑制凋亡的 Sp1 锌指转录因子、bcl-2 和 myc 等基因及相关蛋白。如 Chen 等报道，在 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)细胞株 NB4 凋亡的过程中，bcl-2 基因表达出现下调，并且在这个过程中，PML-RAR $\alpha$  嵌合蛋白(promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor alpha chimeric protein)也扮演着重要的角色<sup>[27,28]</sup>。而牛玉杰等<sup>[29]</sup>在醋酸铅诱导的大鼠脑细胞凋亡研究中发现，bcl-2 和 bax 的表达均发生了显著变化，铅使大鼠大脑皮层、海马及小脑部位的 bcl-2 基因表达下降，而 bax 基因表达增强，提示了铅可能通过抑制 bcl-2 基因表达和促进 bax 基因过度表达，使 Bcl-2/Bax 降低，致使细胞凋亡和存活信息平衡失调，从而导致细胞凋亡。

尽管 p53 被认为是神经细胞死亡调节中一种必需的蛋白质，但长期来未见其在重金属引起的神经毒性可能机理方面的报道。最近，Jarkko 等<sup>[30]</sup>在 Pb<sup>2+</sup> 诱导的 GT1-7 神经细胞中发现了 p53 的表达，但未见其功能的发挥，他们认为这可能是由于 p53 和该细胞中的巨型 T 抗原相结合，从而不可逆地阻止了 p53 功能的正常发挥。因此认为，Pb<sup>2+</sup> 引起的神经毒性可能是通过非 p53 依赖性凋亡途径实现的，而且这个过程能被谷氨酸所强化。而在 Liang 等<sup>[31]</sup>人通过 DDRT-PCR(differential display reverse transcriptase PCR)方法，发现在低剂量 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导实体瘤细胞 MGC-803 凋亡的过程中，由 p53 作用的一种下游靶基因 PIG11 的表达量明显的上调。

原癌基因家族 myc 被认为是一类参与包括重金属在内的多种因子诱导的细胞凋亡的重要调节基因，然而 Ishido 等<sup>[32]</sup>在镉诱导的肾上皮 LLC-PK1 细胞凋亡研究中发现，c-myc 并不一定涉及镉诱导的细胞凋亡。因为用放线菌 D 或通过反义寡核苷酸阻断 c-myc 转录后，镉依然能够诱导细胞凋亡的发生。但在 Deng 等<sup>[33]</sup>人的研究中，明确表示了 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导 Ec109 细胞凋亡的过程中，c-myc 基因表达降低。

Src 家族蛋白酪氨酸激酶(Src-family tyrosine kinase)是一类重要的、具有高度同源性的蛋白酪氨酸激酶(PTKs)。作为连接许多细胞外和细胞内重要信号途径的膜结合开关分子，Src 激酶在受体介导的信号传递及细胞间通讯中具有中心调节作用。Balamurugan 等<sup>[34]</sup>通过免疫印迹试验和免疫复合物激

酶分析法，发现在 Cr(III)诱导淋巴细胞凋亡的过程中，Src 家族酪氨酸激酶中 p56lck, p59fyn 和 p53/56lyn 等的表达显著增加，说明 Src 家族酪氨酸激酶直接参与了细胞凋亡的诱导。进一步的研究表明，Src 家族酪氨酸激酶的表达和活化是受 ROS 介导的。

Zhu 等<sup>[35]</sup>人在研究 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导 3 种白血病细胞株和淋巴瘤细胞株 HL-60、RL、K562 凋亡的分子机制中发现，CD95/CD95L 的表达量增加，并且 caspase-8 和 caspase-3 均被激活。三种细胞间的不同之处是，在 HL-60 和 RL 细胞中，与未经 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 处理组相比，Bcl-2 表达量增加，而在 K562 细胞中，Bcl-2 表达量并无变化。该研究暗示了 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 诱导白血病或淋巴瘤细胞凋亡的部分机制是通过 CD96/CD95L 途径介导的。最近 Watkin 等发现，当成体鼠的肺泡上皮细胞置于含氯化镉的培养基中时，该细胞中与 DNA 结合的特异性蛋白 Sp1 的活性明显下降<sup>[36]</sup>，并且镉对 Sp1 活性的抑制作用呈现时间和剂量依赖效应，Sp1 活性的抑制作用发生在细胞凋亡早期，在一定的时间内，当去掉培养基中的镉时，被抑制的 Sp1 活性能够得到还原。该研究表明，Sp1 作为一种锌指转录因子，它不仅在真核生物基因表达、内环境稳定、细胞周期运行和末端分化过程中发挥调节作用，而且在重金属诱导细胞凋亡的过程中也扮演重要角色。

## 6 重金属对细胞凋亡的诱导和拮抗双重作用机制

研究表明，重金属镉和锌对细胞凋亡具有诱导和拮抗双重效应，其中后者主要是通过与自由钙离子协同进行的。体外实验表明，镉和锌可以依靠自由钙离子(100 $\mu$ M Ca<sup>2+</sup>)抑制分离的牛肝细胞核 DNA 发生断裂<sup>[37]</sup>。有人认为与 Ca<sup>2+</sup> 共存时，镉甚至是一种比锌还强的核酸内切酶抑制剂。这暗示了镉对核酸内切酶的双重角色，即低浓度时，镉通过与核酸内切酶上的一个 Ca<sup>2+</sup> 结合位点结合而激活核酸内切酶，而高浓度时，镉与 Ca<sup>2+</sup> 相连，对核酸内切酶产生强的抑制作用<sup>[38]</sup>。Yuan 等<sup>[39]</sup>利用中国仓鼠作为模型，研究了镉对由铬引起的凋亡的抑制作用。他们发现，一定剂量的镉能对 Caspase-3 活性产生强的抑制作用，这种作用既表现出直接的 caspase-3 抑制，也表现出对前 Caspase-3 转变成活性形式的抑制。这一现象的发现，提供了一个镉抗凋亡效应的合理解释，因为 Caspase-3 是凋亡过程中的一种关

键酶。另外由于镉和锌拥有相似的蛋白质结合位点, 镉可能通过在稳定的细胞内位点中取代锌而发挥作用(至少部分发挥作用), 从而直接或间接地抑制 caspase-3。锌在体内主要以  $Zn^{2+}$ 、锌依赖酶或其它锌蛋白的形式存在, 参与基因的转录和复制、蛋白质生物合成、激素与受体的特异性结合以及信号转导等。锌对细胞凋亡影响的双重性, 主要取决于细胞内的锌含量和作用时间。现在已经知道, 在不同的体内和体外系统中, 一定剂量的锌的可表现出抗凋亡特性、抗氧化特性或抑制  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  依赖性的凋亡核酸内切酶, 其抗凋亡特性可能也是通过抑制 caspase-3 的活性来实现的。

## 7 结语与展望

重金属诱导细胞凋亡是当前重金属细胞和分子毒理学研究的热点, 研究重金属诱导的细胞凋亡机制, 对揭示重金属特有的生理和病理学效应具有重要的理论意义。近年来, 国内外对重金属作用的细胞和分子生物学机理已经取得了一些可喜的进展, 但是由于重金属与细胞的相互作用是一个极其复杂的过程, 已有的研究显示, 不同的重金属, 甚至同一种重金属的不同价态, 对细胞的凋亡的诱导机制不尽相同, 而且不同的重金属间存在复杂的相互作用如拮抗等, 因此对其普遍规律的认识仍然存在很多亟待解决的问题。如何在现有基础上, 深入阐明重金属诱导细胞凋亡的信号转导和基因调控中的普遍规律, 揭示重金属诱导机体细胞凋亡的生物学意义将是今后研究的重点, 人们也必将为此付出艰苦的努力。

## 参 考 文 献

- [1] WOLFE J T, ROSS D, COHEN G M. A role for metals and free radicals in the induction of apoptosis in thymocytes [J]. *FEBS Lett*, 1994, **352**: 58 — 62.
- [2] RAJARAM R, NAIR B U, RAMASAMI T. Chromium III-induced abnormalities in human lymphocytes cell proliferation: evidence for apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, **210**: 434 — 440.
- [3] HABBEEBU S S, LIU J, KLAASSEN C D. Cadmium-induced apoptosis in mouse liver [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, **149**(2): 203 — 209.
- [4] LEE S H, KIM D K, SEO Y R, et al. Nickel(II)-induced apoptosis and G2/M enrichment [J]. *Exp Mol Med*, 1998, **30**: 171 — 176.
- [5] FLORES A, PEREZ J M. Cytotoxicity, Apoptosis, and *in vitro* DNA Damage Induced by Potassium Chromate [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1999, **161**: 75 — 81.
- [6] VOITKUN V, ZHITKOVICH A, COSTA M. Cr(III)-mediated crosslinks of glutathione or aminoacids to the DNA phosphate backbone are mutagenic in human cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26**: 2024 — 2030.
- [7] QUIEVRYN G, PETERSON E, MESSER J, et al. Genotoxicity and mutagenicity of chromium(VI)/ascorbate-generated DNA adducts in human and bacterial cells [J]. *Biochemistry*, 2003, **42**(4): 1062 — 1070.
- [8] ORRENIUS S, ZHIVOTOVSKY B, NICOTERA P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**: 552 — 565.
- [9] FOX D A, HE L, POBLENZ A T, et al. Lead-induced alterations in retinal cGMP phosphodiesterase trigger calcium overload, mitochondrial dysfunction and rod photoreceptor apoptosis [J]. *Toxicol Lett*, 1998, **102/103**: 359 — 361.
- [10] KIM S H, SHARMA R P. Cytotoxicity of inorganic mercury in murine T and B lymphoma cell lines: involvement of reactive oxygen species,  $Ca^{2+}$  homeostasis, and cytokine gene expression [J]. *Toxicol In Viro*, 2003, **17**: 385 — 395.
- [11] SCHANNE F A, LONG G J, ROSEN J F. Lead induced rise in intracellular free calcium is mediated through activation of protein kinase C in osteoblastic bone cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1360**(3): 247 — 254.
- [12] GASSP S, CRISTOFOL R M, SELEMA G, et al. Antioxidant compounds and  $Ca^{2+}$  pathway blockers differentially protect against methylmercury and mercuric chloride neurotoxicity [J]. *J Neurosci Res*, 2001, **66**(1): 135 — 145.
- [13] RAHN C A, BOMBICK D W, DOOLITTLE D J. Assessment of mitochondrial membrane potential as an indicator of cytotoxicity [J]. *J Fund Appl Toxicol*, 1991, **16**(3): 435 — 438.
- [14] SHENKER B J, GUO T L, SHAPIRO I M. Mercury-induced apoptosis in human lymphoid cells: evidence that the apoptotic pathway is mercurial species dependent [J]. *Environ Res*, 2000, **84**(2): 89 — 99.
- [15] OKETANI M, KOHARA K, TUVDENDORJ D, et al. Inhibition by arsenic trioxide of human hepatoma cell growth [J]. *Cancer Lett*, 2002, **183**: 147 — 153.
- [16] KATY P Y, SIU A, JUDY Y W, CHAN N, et al. Effect of arsenic trioxide on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis [J]. *Life Sci*, 2002, **71**: 275 — 285.
- [17] HE L H, PERKINS G A, POBLENZ A T. Bcl-x<sub>L</sub> overexpression blocks bax-mediated mitochondrial contact site formation and apoptosis in rod photoreceptors of lead-exposed mice [J]. *Cell Biol*, 2003, **100**(3): 1022 — 1027.
- [18] CAI J, YANG J, JONES D P. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome C [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1366**(1-2): 139 — 149.
- [19] KIM M S, KIM B J, WOO H N. Cadmium induces caspase-mediated cell death: suppression by Bcl-2 [J]. *Toxicology*, 2000, **145**(1): 27 — 37.
- [20] SHENKER B J, PANKOSKI, L, ZEKAVAT A, et al. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status [J]. *Antioxidants and Redox Signaling*, 2002, **4**: 379 — 389.
- [21] CHEN F, SHI X L. Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals [J]. *Oncology Hematology*, 2002, **42**: 105 — 121.
- [22] NAMGUNG U, XIA Z. Arsenic Induces Apoptosis in Rat Cerebellar Neurons via Activation of JNK3 and p38 MAP Kinases [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, **174**: 130 — 138.
- [23] CHUANG S M, WANG I C, HWUA Y S, et al. Short-term depletion of catalase suppresses cadmium-elicited c-Jun N-

- terminal kinase activation and apoptosis: role of protein phosphatases [J]. *Carcinogenesis*, 2003, **24**:7 – 15.
- [24] FRIESEN C, FULDA S. Deficient activation of the CD95 (Apo1/Fas) system in drug-resistant cells[J]. *Leukemia*, 1997, **11**: 1822 – 1841.
- [25] 程云会, 牛玉杰, 张 荣等. 醋酸铅对大鼠脑细胞凋亡及对 Fas 抗原表达的影响[J]. *卫生毒理学杂志*, 2002, **16**(4): 226 – 227.
- [26] KIM K, LEE S H, SEO Y R, *et al.* Nickel(II)-Induced Apoptosis in Murine T Cell Hybridoma Cells Is Associated with Increased Fas Ligand Expression [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, **185**: 41 – 47.
- [27] CHEN G Q, SHI X G, TANG W, *et al.* Use of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> exerts dose dependent dual effects on APL cells [J]. *J Blood*, 1997, **89**(9): 3345.
- [28] CHEN G Q, ZHU J, SHI X G, *et al.* In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins [J]. *J Blood*, 1996, **88**(3): 1052 – 1061.
- [29] 牛玉杰, 张 荣, 程云会. 醋酸铅对大鼠脑细胞凋亡及 bcl-2、bax 基因表达的影响[J]. *中华预防医学杂志*, 2002, **36**(1): 30 – 33.
- [30] LOIKKANEN J, CHVALOVA K, NAARALA J. Pb<sup>2+</sup>-induced toxicity is associated with p53-independent apoptosis and enhanced by glutamate in GT1<sub>7</sub> neurons [J]. *Toxicol Lett*, 2003, **144**: 235 – 246.
- [31] LIANG X Q, CAO E H, ZHANG Y, QIN J F. p53-induced gene 11 (PIG11) involved in arsenic trioxide-induced apoptosis in human gastric cancer MGC-803 cells [J]. *Oncol Rep*, 2003, **10**(5): 1265 – 1269.
- [32] ISHIDO M, TOHYMA C, SUZUKI T. c-myc is not involved in cadmium-elicited apoptotic pathway in porcine kidney LLC-PK1 cells [J]. *Life Sci*, 1998, **63**: 1195 – 1204.
- [33] 邓友平, 林 晨, 张艳雪等. 三氧化二砷诱导人食管癌 Ec109 细胞凋亡伴随 c-myc 基因的降调节[J]. *中国医学科学院学报*, 2000, **22**(1): 67 – 70.
- [34] BALAMURUGAN K, RAJARM R, RAMASAMI T, NARAYANAN S. Chromium(III)-induced apoptosis of lymphocytes: death decision by ROS and Src-family tyrosine kinases [J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, **33**(12): 1622 – 1640.
- [35] ZHU J, OKUMURA H, OHTAKE S, *et al.* The molecular mechanism of arsenic trioxide-induced apoptosis and oncosis in leukemia/lymphoma cell lines [J]. *Acta Haematol*, 2003, **110**(1): 1 – 10.
- [36] WATKIN R D, NAWROT T, POTTS R J, *et al.* Mechanisms regulating the cadmium-mediated suppression of Sp1 transcription factor activity in alveolar epithelial cells [J]. *Toxicology*, 2003, **184**: 157 – 178.
- [37] LOHMANN R, BEYERSMANN D. Cadmium and zinc mediated changes of the Ca<sup>2+</sup>-dependent endonuclease in apoptosis [J]. *Biochem Biophys Res Comm*, 1993, **190**: 1097 – 1103.
- [38] WATJEN W, COX M, BIAGIOLI M, *et al.* Cadmium-induced apoptosis in C6 glioma cells: Mediation by caspase 9-activation [J]. *BioMetals*, 2002, **15**: 15 – 25.
- [39] YUAN C, KADIISKA M, ACHANZAR W E, *et al.* Possible Role of Caspase-3 Inhibition in Cadmium-Induced Blockage of Apoptosis [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2000, **164**: 321 – 329.

## The Molecular Mechanisms of Apoptosis Induced by Heavy Metals

LIU Xin Mei, XIANG Li Xin, SHAO Jian Zhong\*, ZHOU Qing Jun  
(College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China)

**Abstract:** Apoptosis induced by heavy metals is a complex process, in which apoptotic effects and molecular mechanisms vary with different ions or different electrovalence of same ions. Recent researches indicated that DNA damage by adduction of DNA and ions may play an important role in apoptosis. Many heavy metal ions can activate the calcium channels on endoplasmic reticulum and mitochondria to release calcium into cytosol where calcium act as a second message to trigger the apoptotic cascades and induce apoptosis. Meantime, heavy metal ions can elevate the level of ROS to activate relevant apoptotic pathway in cells, as a result the expression of JNK-mediated FasL and Fas through MAPKs were upregulated, and eventually caspase-3 and caspase-7 were activated to promote apoptosis. Exposure of cells to heavy metals also may trigger numerous expression of genes and proteins involved in apoptosis, which include the pro-apoptotic members such as Src-family tyrosine kinase, bax, fas, p53 and the anti-apoptotic members like Sp1 zinc-finger transcription factor, bcl-2, c-myc. Some heavy metals like cadmium and zinc were of dual effects of both inducing apoptosis by activating caspase-3 and antagonizing apoptosis synergized by free calcium.

**Key words:** heavy metals; apoptosis; molecular mechanisms

\*Corresponding author, E-mail: lscshaoj@mail.hz.zj.cn