

微囊藻毒素的毒性效应与蛋白磷酸酶 2A

孟冠敏 徐立红*

(浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

摘要 蛋白磷酸酶2A (protein phosphatase 2A, PP2A)是蛋白磷酸酶家族的主要成员,在蛋白质可逆磷酸化过程中与蛋白激酶一样起着举足轻重的作用。自然界存在很多天然毒素可特异性地作用于PP2A从而影响体内蛋白质的可逆磷酸化,其中微囊藻毒素由于急性肝毒性和强促癌活性日益引起关注。尽管确切的机制仍未探明,但从目前的研究来看,微囊藻毒素产生毒性的机制可能与其引起细胞氧化应激、DNA损伤、细胞骨架的破坏以及诱导细胞凋亡相关。而PP2A在氧化应激、DNA损伤修复及维持细胞骨架稳态中起着重要作用,并能调控凋亡相关激酶CaMKII和Bcl-2家族蛋白,这对更好地理解微囊藻毒素LR如何通过影响PP2A而产生毒作用提供了新思路。

关键词 蛋白磷酸酶2A; 微囊藻毒素; 毒性效应; 致毒机制

蛋白磷酸酶2A (protein phosphatase 2A, PP2A)是体内的一种高丰度蛋白,占细胞内总蛋白的1%,生物化学及遗传学研究揭示PP2A是一个分布广泛且进化保守的蛋白酶^[1]。作为蛋白磷酸酶家族的主要成员,PP2A和蛋白磷酸酶1 (protein phosphatase 1, PP1)一起执行真核细胞内超过90%的磷酸丝氨酸/苏氨酸蛋白的去磷酸化功能,调节多条信号转导通路,在细胞中起着调控细胞周期、细胞生长、细胞骨架动力学及维持细胞稳定性等多重作用。

自然界存在的很多天然毒素,如冈田酸(okadaic acid, OA)、花萼海绵诱癌素(calyculin A, CA)、互变霉素(tautomycin)、微囊藻毒素(microcystins)、节球藻毒素(nodularin)等可特异性地作用于蛋白磷酸酶从而影响体内蛋白质的磷酸化水平。其中,微囊藻毒素由于急性肝毒性和强促癌活性日益引起人类的关注^[2]。研究表明,微囊藻毒素可导致氧化应激态、DNA损伤、细胞骨架崩解乃至诱导凋亡而产生毒作用,然而到目前为止微囊藻毒素的毒性机制仍未明朗。值得关注的是,微囊藻毒素是极强的PP2A抑制剂,而底物众多的PP2A在氧化应激、DNA损伤修复及维持细胞骨架稳态、调控细胞凋亡中起着重要作用,因此微囊藻毒素或许通过影响PP2A活性和功能导致细胞内磷酸化和去磷酸化水平的失衡进而产生毒性效应,这对更好地理解微囊藻毒素的毒性作用机制提供了新思路。

环(D-丙氨酸-L-X-赤-β-甲基-D-异天冬酸-L-Y-Adda-D-异谷氨酸-N-甲基脱氢丙氨酸),其中Adda为一种特殊氨基酸,毒性实验显示Adda结构改变则毒性丧失,证明Adda是微囊藻毒素发挥毒性所必需。X、Y为两种可变的氨基酸,由于X、Y不同而产生至少60种同类物,微囊藻毒素LR (microcystin-LR, MC-LR)是微囊藻毒素中最常见的一种,其中L、R分别代表亮氨酸、精氨酸。微囊藻毒素由于其急性肝毒性和强促癌活性而对人类的公共卫生安全造成威胁^[2,3]。从目前的研究来看,微囊藻毒素暴露后细胞处于氧化应激态、DNA损伤以及细胞骨架的破坏、凋亡可能是其损伤细胞的主要原因。

1.1 微囊藻毒素引起氧化应激

生物体内产生的自由基通常是超氧阴离子自由基O₂⁻和羟基自由基OH·、过氧化氢H₂O₂等,它们统称为反应性活性氧(reactive oxygen species, ROS)。当内源性抗氧化系统和ROS保持平衡态时,ROS不会对机体造成损伤,然而一旦此平衡被打破,就会出现氧化应激反应,导致脂质过氧化和DNA损伤等从而使细胞损伤甚至死亡。目前已发现微囊藻毒素能使不同物种发生氧化应激,包括小鼠、大鼠、鱼,等等^[4-7]。研究发现,将小鼠以腹腔注射的方式染毒MC-LR (55 μg/kg), 0.5 h后即出现ROS生成增加,2 h后脂质过氧化产物MDA的水平也升高,而且ROS生成、

1 微囊藻毒素的毒性作用

微囊藻毒素是一组单环七肽物质,一般结构为:

收稿日期: 2008-10-30 接受日期: 2009-10-28

国家自然科学基金资助项目(No.30771827, No.20777067)

* 通讯作者。Tel: 0571-88208265, Fax: 0571-88208265, E-mail:

xulihong@zju.edu.cn

MDA 水平的升高与 MC-LR 的染毒时间成正比^[4]。除了诱导 ROS 的大量生成, 另一发面, MC-LR 还使抗氧化酶系统(如 GPx、GR、SOD 和 CAT)的活性降低, 从而削弱机体的抗氧化防御能力^[5]。

研究发现, 抗氧化剂如柚苷、GSH 合成前体 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)、硒等通过减少 ROS 生成和降低 MDA 水平、保护抗氧化酶的活性、减轻细胞骨架的破坏, 从而能有效预防和对抗微囊藻毒素引起的氧化应激反应^[4,6,7]。

1.2 微囊藻毒素造成 DNA 损伤, 并抑制 DNA 修复

细胞遭遇氧化损伤后线粒体、膜脂质、蛋白质、DNA 均可成为 ROS 攻击的目标, 其中 ROS 与 DNA 中的碱基或脱氧核糖作用, 造成 DNA 链断裂即 DNA 损伤。许多研究发现, 离体条件和活体状态下, MC-LR 均造成组织或细胞的 DNA 损伤^[3,8-11]。本课题组对 MC-LR 暴露后的细胞做彗星试验发现有很明显的拖尾现象^[8], 其他课题组的活体染毒实验也发现相同现象^[3], 表明 MC-LR 引起 DNA 链断裂。此外, 有研究发现 DNA 氧化损伤的标志物 8-oxo-dG 的水平显著升高, 并与 MC-LR 存在时间和剂量依赖关系^[9]。DNA 损伤之后细胞本能地对其进行修复, 然而 MC-LR 诱导 DNA 损伤之后的修复过程可能被 MC-LR 抑制^[10,11]。有研究将人类成胶质瘤细胞 MO59K 和 DNA-PK 催化亚基缺失的 MO59J 细胞用 MC-LR 预处理后接受 γ 辐射, 发现 MC-LR 只抑制 MO59K 细胞系的 DNA 修复而非同源的 MO59J 细胞, 提示 DNA 双链修复系统的关键酶 DNA-PK 可能受到了 MC-LR 的攻击^[11]。由此 MC-LR 造成 DNA 损伤及抑制其后续修复过程可能跟其强大的促癌作用密切相关。

1.3 微囊藻毒素破坏细胞骨架

微囊藻毒素暴露后, 在组织水平导致肝小叶结构紊乱、大面积肝出血, 在细胞水平使细胞形态改变、失去完整性、膜出泡乃至凋亡小体的形成, 这些都是细胞骨架解体、重组的结果。因此, 微囊藻毒素造成细胞骨架的紊乱是其损伤肝、肾等脏器的细胞基础。研究发现, MC-LR 可造成细胞骨架系统的微丝、微管和中间丝成分的广泛损伤^[2,12,13]。将原代培养的肝细胞暴露于 4 $\mu\text{mol/L}$ 的 MC-LR 30 min 之后, 中间丝和微丝网络解体、塌陷, 并且同步发生结构重组乃至融合, 共聚焦显微镜观察到中间丝角蛋白像项圈一样围绕在浓缩聚集的肌动蛋白球状核心外周^[12]。将中国仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 暴露于

MC-LR 后, 除了出现类似的微丝网瓦解之外, 微管系统也发生解聚^[2]。研究发现, MC-LR 对微管的解体作用可能由微管相关蛋白(microtubule-associated proteins, MAPs)的过度磷酸化介导^[13]。

1.4 微囊藻毒素诱导细胞凋亡

凋亡是机体保持组织内平衡态的必要手段, 机体借由凋亡过程来清除受损或衰老的细胞, 但发生于该过程的缺陷往往跟疾病相关, 如癌症、艾滋病、退化性神经紊乱和自体免疫性疾病。微囊藻毒素具有强大的细胞毒性源于它是一个很强的凋亡诱导剂。首先, MC-LR 诱导凋亡的出现非常迅速。将大鼠肝细胞分离后暴露于 MC-LR, 2 min 之内就可以出现细胞表面出芽(budding)或细胞质和细胞核浓缩等系列凋亡形态学变化及 caspase 激活现象^[14], 快过其他任何经典凋亡通路如 Fas/Apo-1/CD95 死亡受体介导的凋亡、生长因子缺乏(如撤走 IL-3)诱导的凋亡, 甚至向细胞直接显微注射细胞色素 c 诱导的凋亡。其次, MC-LR 诱导凋亡的作用非常广泛。虽然在体内受限于肝特异的摄取系统, MC-LR 特异作用于肝细胞, 然而将水溶性的 MC-LR 显微注射到肝组织以外的众多细胞类型, 如小鼠胚胎成纤维细胞 Swiss3T3、人胚肾细胞 HEK293、大鼠肾 NRK 细胞等, 也会出现凋亡现象^[14]。

本实验室在证实微囊藻毒素能诱导细胞凋亡并呈现良好剂量反应关系的基础上^[15], 进一步对不同浓度微囊藻毒素染毒时不同细胞株的凋亡相关基因 bcl-2、Bax、p53 的表达水平和凋亡执行者 caspase-3 的酶活性做研究, 发现在不同浓度和不同时间作用下, 微囊藻毒素都使凋亡过程关键酶 caspase-3 被激活, p53 和促凋亡蛋白 Bax 表达升高, 同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降^[16,17], 提示微囊藻毒素诱发细胞凋亡的可能途径: MC-LR 改变 Bcl-2、Bax 的表达水平, 促使线粒体膜通透性增加, 释放细胞色素 c 和凋亡蛋白酶激活因子 Apaf-1 释放到胞浆, 最终激活 caspase-3 引起凋亡。

2 PP2A 与微囊藻毒素致毒机制的联系

丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 PP1、PP2A 可被一系列自然界的天然小分子化合物所抑制, 包括海洋甲藻来源的冈田酸、蓝藻来源的微囊藻毒素和节球藻毒素、陆生真菌来源的花萼海绵绉癌素和土壤细菌来源的互变霉素及有毒昆虫产生的斑蝥素(cantharidin)等^[18]。其中疏水性的 C38 脂肪酸聚醚类物质 OA 是

一种辅助致癌物及强诱癌剂, OA 在细胞内的首个攻击靶标就是 PP2A, 而且 OA 对 PP2A 的抑制作用专一性很强, 它对 PP2A 的抑制效应是 PP1 的 100 倍^[1]。最近 Xing 等^[19]对晶体结构的研究发现, 这是由于 PP2A 与毒素的结合口袋中有一个疏水笼状区域恰好包绕 OA 的疏水末端, 而 PP1 在同一部位则呈开放性的凹槽, 从而解释了为何 OA 与这两个酶结合的亲和力相差百倍。目前 OA 已成为研究 PP2A 作用的常用工具药, 微囊藻毒素也是极强的 PP1、PP2A 抑制剂, 并且其作用方式与 OA 相似, 两者都靶向攻击 PP2A 的催化亚基, 它们往往占据位于催化亚基活性位点正上方的结合口袋, 结合位点完全重叠。而且催化亚基与这两个毒素结合方式也非常相似, 在结合口袋的一端 PP2A 的四个氨基酸 Gln122、Ile123、His191 和 Trp200 形成一个疏水的笼状结构, 正好包容 MC-LR 的 Adda 疏水侧链或 OA 的疏水末端(图 1)。

PP2A 作为一类重要的细胞内可逆磷酸化的调节蛋白, MC-LR 对 PP2A 的专一抑制可能与 MC-LR 产生的毒性作用密切相关, 由此 PP2A 本身在机体中的作用值得受更多关注。目前研究发现 PP2A 在氧化应激态、DNA 损伤修复及保持细胞骨架稳态、调控细胞凋亡中起到相当重要的作用, 这对于更好地理解 MC-LR 如何通过影响效应分子的磷酸化水平产生毒性作用有重要价值。

2.1 PP2A 受氧化应激的影响

在不同细胞和亚细胞结构中, ROS 可以发挥截然不同的生理功能: 对细胞成分产生损伤或是激活特异信号通路, 与之对应, PP2A 的活性可以下降^[20-22]、不变甚至升高^[23,24], 具体取决于 PP2A 所处的组织细胞类型及所在的氧化还原状态。研究发现, PP2A 对细胞氧化应激非常敏感, 在体外模拟氧化应激态的实验

中, 将人白血病 Jurkat 细胞用 1 mmol/L 的 H₂O₂ 处理 10 min 对 PP2A 产生的抑制效应与用 500 nmol/L 的 MC-LR 处理 30 min 基本相当^[20]。有研究用 H₂O₂^[21] 或镉^[22]诱导神经细胞 PC12 和 SH-SY5Y 的氧化应激, 也发现氧化应激产生的 ROS 对磷酸酶 PP2A 具有抑制效应, 从而使原本受 PP2A 负调控的 MAPK 通路激活, 细胞走向凋亡。然而, 另有研究发现氧化应激能上调 PP2A 的活性。将大鼠海马组织片暴露于 H₂O₂ 20 min, 却发现 PP2A 的活性增强, 并且与 H₂O₂ 呈现剂量依赖性^[23]。此外, 将人脐静脉内皮细胞 HUVEC 暴露于 800 μmol/L H₂O₂ 后, PP2A 的活性也被上调, 而受 PP2A 调控的视网膜母细胞瘤蛋白家族成员 pRb、p107 和 p130 由原来的高磷酸化状态很快转至低磷酸化状态^[24], 由于 pRb、p107 和 p130 的磷酸化有助于细胞从 G₁ 期进入 S 期, 此种情况下 PP2A 活性增强使细胞周期停滞、S 期减缓, DNA 的继续合成受阻, 有利于细胞争取宝贵时间修复受损 DNA, 从而积极对抗氧化损伤。

氧化应激会引发信号转导, 当氧化应激信号激活上游激酶时, 如果蛋白磷酸酶被抑制, 那么该信号通路阈值就下降, 这种情况下抑制蛋白磷酸酶就为应激相关信号通路的激活和放大起了推波助澜的作用。由此, 微囊藻毒素一方面对 PP2A 产生极强的抑制作用, 另一方面可能同时诱导过量的 ROS 生成而改变 PP2A 活性, 此双重效应通过相关信号系统进一步放大, 导致众多下游效应分子的过度磷酸化, 使细胞和组织发生功能紊乱。

2.2 PP2A 在 DNA 损伤的修复中的作用

PP2A 可调节众多 DNA 修复相关酶的活性, 积极应对 DNA 损伤, 由此 PP2A 的抑制可能和 MC-LR 诱导的 DNA 损伤及 DNA 修复的抑制有关。PP2A 介

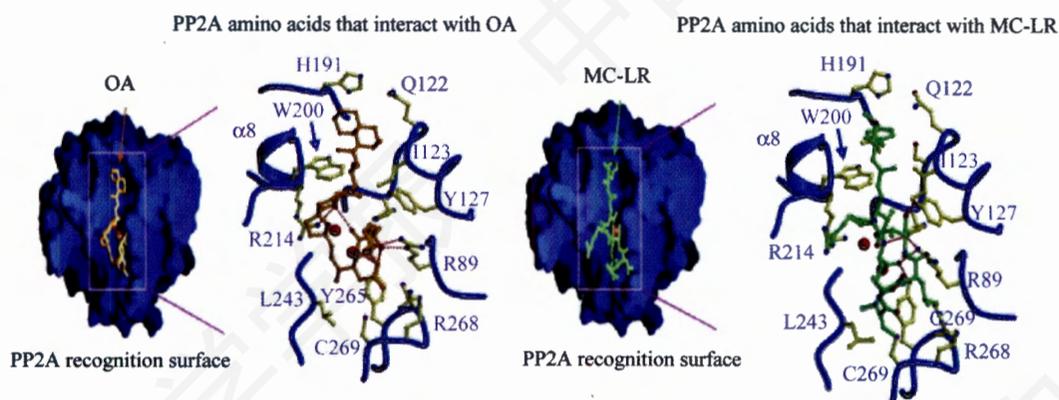


Fig.1 OA and MC-LR share the same binding surface right above the active site of the catalytic subunit of PP2A^[19]

导DNA损伤修复主要通过调节DNA损伤修复系统的关键成员的活性,主要有 ATM/ATR、DNA-PK、p53 和 γ -H2AX。

毛细管扩张失调症突变激酶 (ataxiatangiectasia mutated, ATM)、ATM 相关激酶 (ataxiatangiectasia related, ATR) 和 DNA 依赖的蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinase, DNA-PK) 都是磷脂酰肌醇 3- 激酶相关蛋白激酶 (phosphatidylinositol-3 kinase-related protein kinase, PIKK) 超家族的主要成员, 活性都受可逆磷酸化的调控。ATM/ATR 在 DNA 损伤的检控通路中处于上游, 扮演检控点感受器的角色。在 DNA 损伤的信号通路中, 作为检查点调控因子的蛋白激酶 ATM/ATR 和蛋白磷酸酶 PP2A 亲密合作, 共同调控下游细胞周期检查点和 DNA 修复, 然而有趣的是, ATM/ATR 本身的磷酸化状态和活性也受 PP2A 控制。ATM 的 Ser1981 位点本身具有自体磷酸化的倾向, 在未发生 DNA 损伤的细胞中, PP2A 与 ATM 组成复合物, PP2A 能逆转 Ser1981 位点的自体磷酸化, 使 ATM 保持去磷酸化状态; 而一旦细胞遭受 DNA 损伤 (如电离辐射), ATM 和 PP2A 的复合物解体, 自体磷酸化状态的 ATM 催化下游底物的磷酸化级联反应而激活损伤检控信号通路^[25]。DNA-PK 由异二聚体的 Ku70/Ku80 以及催化亚基 DNA-PKcs 这 3 个亚基组成, 主要通过非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 方式来修复 DNA 双链断裂, 3 个亚基中只要一个发生磷酸化就会失去酶活性。体外实验中, 发现 PP2A 可以使 DNA-PKcs、Ku70 和 Ku8 去磷酸化以恢复 DNA-PK 蛋白激酶的活性^[26]。

p53 处于 ATM/ATR 和 DNA-PK 的下游, 也是 DNA 损伤检验系统的一个重要因子, 可介导细胞周期阻滞、DNA 修复或诱发细胞凋亡。在正常生长的细胞中, p53 保持一个低水平有利于细胞生长, 一旦细胞遭受 DNA 损伤, p53 高表达并且进行磷酸化修饰以增加其活性。最近一些研究发现, 当细胞发生 DNA 损伤后, PP2A 对 p53 关键位点如 Thr55^[27]、Ser46^[28] 执行去磷酸化的功能, 使得 p53 稳定性增加, 并阻止损伤细胞的增生、转化以及凋亡。

当 DNA 发生双链断裂后, 位于断裂点附近的组蛋白 H2AX 的 C 端 139 位丝氨酸残基被 ATM、ATR 或 DNA-PK 磷酸化生成 γ -H2AX, γ -H2AX 募集其他 DNA 修复蛋白到损伤位点形成焦点 (foci) 结构, 可作为检测 DNA 损伤的一个新的特异指标。在体外实验中发现, PP2A 的催化亚基与 γ -H2AX 共定位于 DNA

损伤位点并去磷酸化 γ -H2AX, 沉默 PP2A 基因的表达后发现 γ -H2AX 焦点不能及时从损伤灶移除因此阻碍了 DNA 修复, 说明 PP2A 对 γ -H2AX 的去磷酸化作用有利于细胞充分进行 DNA 损伤修复^[29]。

2.3 PP2A 保持细胞骨架稳态

许多细胞骨架蛋白的功能都受到可逆磷酸化的调控, 众多研究证实 PP2A 在维持细胞骨架完整性、协助细胞骨架组装中起至关重要的作用^[1,12,13,30-32]。PP2A 活性受到抑制后, 激酶对细胞骨架蛋白的磷酸化增强, 可能是 MC-LR 导致细胞骨架破坏的原因。目前研究最多的 PP2A 作用于细胞骨架的底物是微管相关蛋白 MAPs 成员之一的 tau、小热休克蛋白 27 (small heat-shock protein 27, HSP27) 和 F- 肌动蛋白。

正常情况下, tau 处于非磷酸化状态, 能促进微管组装、抑制微管解聚, 起到稳定微管的作用。当 tau 被体内多种蛋白激酶 (如 GSK23、Cdk5 和 MAPK) 磷酸化后跟微管结合能力下降, 而 PP2A 可对其去磷酸化恢复其活性^[1]。如果 PP2A 发生异常修饰——如脱甲基化、磷酸化——酶活性下调, 则会出现类似于阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 发病时的 tau 过度磷酸化现象^[30]。HSP27 是微丝肌动蛋白代谢和微丝构成的重要调节因素, 当它以非磷酸化的单体形式存在时可以有效抑制肌动蛋白纤维的多聚化从而维持微丝的稳定性, 而当它被 p38 MAPK 激酶激活的 MAPKAPK2 磷酸化后则导致微丝多聚化。在人肺动脉内皮细胞 HPAEC 内, 通过使用 PP2A 的特异抑制剂 OA, 发现 PP2A 可以对抗凝血酶和微管蛋白抑制剂诺考达唑引起的 HSP27 和 tau 磷酸化增加, 从而抵消凝血酶和诺考达唑对微丝和 β - 微管蛋白骨架的破坏作用, 证实了 PP2A 在保持细胞骨架结构稳态的作用^[31]。此外, 研究发现 PP2A 还可以和 F- 肌动蛋白组成功能复合物, 将犬肾脏上皮细胞 MDCK 转染 SV40 的小 t 蛋白后, 细胞微丝结构网变得紊乱, 因为小 t 蛋白可通过取代 PP2A 的 B 亚基与 PP2A 核心酶形成复合物而下调 PP2A 的活性, 推测 SV40 小 t 蛋白对细胞骨架的破坏可能源于抑制了 PP2A 和 F- 肌动蛋白的相互作用^[32]。

2.4 PP2A 参与细胞凋亡的调控

本实验室前期研究发现, Bcl-2 家族成员 Bcl-2 和 Bax 参与了 MC-LR 诱导的细胞凋亡^[16]。此外, 还有研究发现, 在 MC-LR 诱导的细胞凋亡过程中, 激酶 CaMK II 介导的蛋白质磷酸化升高现象始终存在^[6,33]。因此, CaMKII 是放大 MC-LR 的凋亡信号的关键激

酶。由于 Bcl-2 家族蛋白和凋亡相关激酶 CaMKII 均受到 PP2A 的调控, 推测 PP2A 可能在 MC-LR 诱导的凋亡过程中起关键作用。

2.4.1 PP2A对Bcl-2家族蛋白的调控 Bcl-2 蛋白家族跟线粒体结构的完整和功能的稳定密切相关, 可分为即抗凋亡成员(Bcl-2、Bcl-X1)和促凋亡成员(Bax、Bad、Bid等)两群, 抗凋亡和促凋亡家族成员双方共同调节线粒体跨膜电位、操控线粒体 MPT 孔开放和促凋亡因子的释放, 从而跟线粒体途径的凋亡相关。

抗凋亡成员 Bcl-2 和致凋亡因子 Bax 的活性都受 PP2A 调控。PP2A 对 Bcl-2 的去磷酸化作用跟具体的磷酸化位点和细胞类型有关, 对细胞凋亡过程产生的影响也可能不同。譬如, 在人正常血细胞中 Bcl-2 的 Ser87 以磷酸化状态存在, 而在人肿瘤细胞中是去磷酸化的, 进一步研究发现这是因为在肿瘤细胞中被 ERK 磷酸化的 Ser87 马上被 PP2A 去磷酸化, 此时 PP2A 介导的去磷酸化作用有助于保持 Bcl-2 抗凋亡活性^[34]; 然而, Bcl-2 的 Ser70 位点被 PP2A 去磷酸化后, 却导致 caspase-2 活化, 使细胞走向凋亡^[35]。最近有研究者认为, PP2A 除了调控 Bcl-2 的磷酸化水平, 还可调节 Bcl-2 的蛋白质水平, PP2A 对 Bcl-2 的去磷酸化作用可使其免受蛋白酶体介导的降解, 保持其蛋白质水平、增加稳定性, 从而更好地对抗细胞凋亡^[36]。致凋亡因子 Bax 的活性也受可逆磷酸化的调控。Xin 等^[37]在探索催化 Bax 去磷酸化的磷酸酶的实验中, 发现 PP2A 在体外和体内实验情况下均可去磷酸化 Bax 而激活其促凋亡活性, 并推测 PP2A 去磷酸化激活 Bax 后, 发生了一系列后续过程, 即 Bax 暴露 N 末端 6A7 表位、向线粒体转位并形成寡聚体、在线粒体膜上形成孔道、线粒体释放细胞色素 c, 最终导致凋亡发生。此外, PP2A 还可以直接破坏 Bcl-2/Bax 异二聚体的形成以阻止 Bcl-2 对 Bax 促凋亡功能的抑制。

2.4.2 PP2A与凋亡相关激酶CaMKII的关系 激酶 CaMKII 在 MC-LR 诱导的凋亡过程中起关键作用。研究发现, 在 MC-LR 诱导的凋亡早期就发生了磷蛋白数量明显增加的现象^[38], 而加入蛋白激酶 CaMKII 的抑制剂后, 蛋白质磷酸化现象乃至凋亡都被阻滞^[6,33], 证实激酶 CaMKII 介导的蛋白质磷酸化升高现象作用贯穿于 MC-LR 诱导的整个凋亡过程。

一般情况下, CaMKII 的激活要借由 caspase 活化来剪切掉其自身抑制区域或者依赖胞浆 Ca²⁺ 浓度的升高。此外, 激酶 CaMKII 本身也受到蛋白质可逆磷

酸化的调控, 发生于 Thr286 的自体磷酸化作用可激活 CaMKII, 而 PP2A 则可以对 Thr286 去磷酸化而快速逆转 CaMKII 的自体激活作用。MC-LR 可能通过抑制 PP2A 的活性直接放大了 CaMKII 的自体激活作用, 从而诱导 CaMKII 的活化^[6,38]。由此, 微囊藻毒素一方面抑制 PP2A, 另一方面激活 CaMKII, 使下游蛋白磷酸化, 凋亡信号得以放大。

3 小结与展望

虽然目前已经开展了大量对微囊藻毒素毒性的研究, 但是仍然存在很多问题未明了, 比如, 微囊藻毒素的肝毒性应该归因为先出现细胞骨架紊乱, 接着抑制 PP1、PP2A 以致肝脏出血继发血供不足、肝组织坏死呢^[12], 还是因为一开始就诱发细胞凋亡过程? 此外, 微囊藻毒素究竟怎样打破细胞死亡和存活的平衡? 此外, 由于微囊藻毒素的毒性作用具有强烈、急性并且不可逆的特点, 要对其进行预防及治疗存在相当难度。目前为止, 研究人员已经在加强微囊藻毒素的检测及开发有效解毒剂和对抗药物等方面做了很多努力, 包括开发灵敏的 MC-LR 的抗体来检测^[39], 使用特异性的肝脏摄取阻滞剂如免疫抑制剂利福平、环孢霉素 A 以抑制 MC-LR 对肝脏的毒性作用^[40], 补充抗氧化物质^[4,6,7]来预防和保护, 等等。从目前的研究来看, 微囊藻毒素暴露后造成的 DNA 损伤、氧化损伤、细胞骨架结构的破坏及诱导凋亡等毒性作用, 可能是通过影响 PP2A 活性和功能而使细胞内蛋白质出现异常磷酸化, 因此关注 PP2A 在 MC-LR 致毒中的作用, 能为深入理解 MC-LR 致毒机制, 并且为微囊藻毒素的治疗和预防提供新思路。另一方面, PP2A 复杂的结构和庞大的调控机制使其活性和功能不一, 因此探明 MC-LR 如何影响 PP2A 的活性和功能而改变细胞稳态, 反过来也有助于进一步探索 PP2A 究竟怎样在众多细胞事件和多种疾病的发生发展中发挥功能。

参考文献(References)

- 1 Shi Y. Assembly and structure of protein phosphatase 2A. *Sci China C Life Sci* 2009; 52(2):135-46.
- 2 Gácsi M, Antal O, Vasas G, Máthé C, Borbély G, Saker ML, et al. Comparative study of cyanotoxins affecting cytoskeletal and chromatin structures in CHO-K1 cells. *Toxicol In Vitro* 2009; 23(4): 710-8.
- 3 Gaudin J, Huet S, Jarry G, Fessard V. *In vivo* DNA damage induced by the cyanotoxin microcystin-LR: comparison of intra-peritoneal and oral administrations by use of the comet assay. *Mutat Res* 2008; 652(1): 65-71.

- 4 Wei Y, Weng D, Li F, Zou X, Young DO, Ji J, *et al.* Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR. *Apoptosis* 2008; 13(8): 1031-42.
- 5 Prieto AI, Pichardo S, Jos A, Moreno I, Cameán AM. Time-dependent oxidative stress responses after acute exposure to toxic cyanobacterial cells containing microcystins in tilapia fish (*Oreochromis niloticus*) under laboratory conditions. *Aquat Toxicol* 2007; 84(3): 337-45.
- 6 Krakstad C, Herfindal L, Gjertsen BT, Bøe R, Vintermyr OK, Fladmark KE, *et al.* CaM-kinase-dependent commitment to microcystin-induced apoptosis is coupled to cell budding, but not to shrinkage or chromatin hypercondensation. *Cell Death Differ* 2006; 13(7): 1191-202.
- 7 Atencio L, Moreno I, Jos A, Prieto AI, Moyano R, Blanco A, *et al.* Effects of dietary selenium on the oxidative stress and pathological changes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to a microcystin-producing cyanobacterial water bloom. *Toxicon* 2009; 53(2): 269-82.
- 8 陈加平, 翁登坡, 傅文字, 徐立红. 微囊藻毒素 LR 对大鼠淋巴细胞 DNA 的损伤效应. *水生生物学报* 2004; 28(6): 677-8.
- 9 Bouaïcha N, Maatouk I, Plessis MJ, Périn F. Genotoxic potential of microcystin-LR and nodularin *in vitro* in primary cultured rat hepatocytes and *in vivo* in rat liver. *Environ Toxicol* 2005; 20(3): 341-7.
- 10 Lankoff A, Krzowski Ł, Głab J, Banasik A, Lisowska H, Kuszewski T, *et al.* DNA damage and repair in human peripheral blood lymphocytes following treatment with microcystin-LR. *Mutat Res* 2004; 559(1-2): 131-42.
- 11 Lankoff A, Białczyk J, Dziga D, Carmichael WW, Gradzka I, Lisowska H, *et al.* The repair of gamma-radiation-induced DNA damage is inhibited by microcystin-LR, the PP1 and PP2A phosphatase inhibitor. *Mutagenesis* 2006; 21(1): 83-90.
- 12 Toivola DM, Goldman RD, Garrod DR, Eriksson JE. Protein phosphatases maintain the organization and structural interactions of hepatic keratin intermediate filaments. *J Cell Sci* 1997; 110(Pt 1): 23-33.
- 13 Toivola DM, Eriksson JE. Toxins affecting cell signalling and alteration of cytoskeletal structure. *Toxicol In Vitro* 1999; 13(4-5): 521-30.
- 14 Fladmark KE, Brustugun OT, Hovland R, Boe R, Gjertsen BT, Zhivotovsky B, *et al.* Ultrarapid caspase-3 dependent apoptosis induction by serine/threonine phosphatase inhibitors. *Cell Death Differ* 1999; 6(11): 1099-108.
- 15 傅文字, 李敏伟, 陈加平, 徐立红. 一种检测微囊藻毒素 LR 诱导大鼠肾细胞凋亡的办法. *水生生物学报* 2004; 28(1): 101-2.
- 16 Fu WY, Chen JP, Wang XM, Xu LH. Altered expression of p53, Bcl-2 and Bax induced by microcystin-LR *in vivo* and *in vitro*. *Toxicon* 2005; 46(2): 171-7.
- 17 Xing ML, Wang XF, Xu LH. Alteration of proteins expression in apoptotic FL cells induced by MCLR. *Environ Toxicol* 2008; 23(4): 451-8.
- 18 Sontag E. Protein phosphatase 2A: the Trojan horse of cellular signaling. *Cell Signal* 2001; 13(1): 7-16.
- 19 Xing Y, Xu Y, Chen Y, Jeffrey PD, Chao Y, Lin Z, *et al.* Structure of protein phosphatase 2A core enzyme bound to tumor-inducing toxins. *Cell* 2006; 127(2): 341-53.
- 20 Howe CJ, Lahair MM, McCubrey JA, Franklin RA. Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 2004; 279(43): 44573-81.
- 21 Chen L, Liu L, Yin J, Luo Y, Huang S. Hydrogen peroxide-induced neuronal apoptosis is associated with inhibition of protein phosphatase 2A and 5, leading to activation of MAPK pathway. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41(6):1284-95.
- 22 Chen L, Liu L, Huang S. Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radic Biol Med* 2008; 45(7):1035-44.
- 23 Maalouf M, Rho JM. Oxidative impairment of hippocampal long-term potentiation involves activation of protein phosphatase 2A and is prevented by ketone bodies. *J Neurosci Res* 2008; 86(15): 3322-30.
- 24 Cicchillitti L, Fasanaro P, Biglioli P, Capogrossi MC, Martelli F. Oxidative stress induces protein phosphatase 2A-dependent dephosphorylation of the pocket proteins pRb, p107, and p130. *J Biol Chem* 2003; 278(21): 19509-17.
- 25 Goodarzi AA, Douglas P, Moorhead GB, Lees-Miller SP. Utilizing protein phosphatase inhibitors to define PP2A as a regulator of ataxia-telangiectasia mutated. *Methods Mol Biol* 2007; 365: 47-59.
- 26 Douglas P, Moorhead GB, Ye R, Lees-Miller SP. Protein phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity. *J Biol Chem* 2001; 276(22): 18992-8.
- 27 Li HH, Cai X, Shouse GP, Piluso LG, Liu X. A specific PP2A regulatory subunit, B56 gamma, mediates DNA damage-induced dephosphorylation of p53 at Thr55. *EMBO J* 2007; 26(2): 402-11.
- 28 Mi J, Bolesta E, Brautigan DL, Larner JM. PP2A regulates ionizing radiation-induced apoptosis through Ser46 phosphorylation of p53. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(1):135-40.
- 29 Chowdhury D, Keogh MC, Ishii H, Peterson CL, Buratowski S, Lieberman J. gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell* 2005; 20(5): 801-9.
- 30 Zhang CE, Tian Q, Wei W, Peng JH, Liu GP, Zhou XW, *et al.* Homocysteine induces tau phosphorylation by inactivating protein phosphatase 2A in rat hippocampus. *Neurobiol Aging* 2008; 29(11):1654-65.
- 31 Tar K, Csontos C, Czikora I, Olah G, Ma SF, Wadgaonkar R, *et al.* Role of protein phosphatase 2A in the regulation of endothelial cell cytoskeleton structure. *J Cell Biochem* 2006; 98(4): 931-53.
- 32 Nunbhakdi-Craig V, Craig L, Machleidt T, Sontag E. Simian virus 40 small tumor antigen induces deregulation of the actin cytoskeleton and tight junctions in kidney epithelial cells. *J Virol* 2003; 77(5): 2807-18.
- 33 Fladmark KE, Brustugun OT, Mellgren G, Krakstad C, Boe R, Vintermyr OK, *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II is required for microcystin-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002; 277(4): 2804-11.
- 34 Simizu S, Tamura Y, Osada H. Dephosphorylation of Bcl-2 by protein phosphatase 2A results in apoptosis resistance. *Cancer*

- Sci 2004; 95(3): 266-70.
- 35 Chen CL, Lin CF, Chiang CW, Jan MS, Lin YS. Lithium inhibits ceramide- and etoposide-induced protein phosphatase 2A methylation, Bcl-2 dephosphorylation, caspase-2 activation, and apoptosis. *Mol Pharmacol* 2006; 70(2): 510-7.
- 36 Lin SS, Bassik MC, Suh H, Nishino M, Arroyo JD, Hahn WC, *et al.* PP2A regulates BCL-2 phosphorylation and proteasome-mediated degradation at the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 2006; 281(32): 23003-12.
- 37 Xin M, Deng X. Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *J Biol Chem* 2006; 281(27): 18859-67.
- 38 Solstad T, Fladmark KE. Algal toxins as guidance to identify phosphoproteins with key roles in apoptotic cell death. *Curr Pharm Biotechnol* 2006; 7(3): 209-15.
- 39 盛建武, 何苗, 施汉昌, 钱易. 微囊藻毒素-LR 多克隆抗体的制备. *环境科学* 2006; 27(4): 783-6.
- 40 Komatsu M, Furukawa T, Ikeda R, Takumi S, Nong Q, Aoyama K, *et al.* Involvement of mitogen-activated protein kinase signaling pathways in microcystin-LR-induced apoptosis after its selective uptake mediated by OATP1B1 and OATP1B3. *Toxicol Sci* 2007; 97(2): 407-16.

Protein Phosphatase 2A and the Toxic Effects of Microcystin

Guan-Min Meng, Li-Hong Xu*

(Department of Biochemistry and Genetics, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Protein phosphatase 2A (PP2A) is a main serine/threonine protein phosphatase responsible for a major portion of the total phosphatase activity, playing an equally important role in the regulation of protein phosphorylation as protein kinases. Microcystin-LR (MC-LR), one of the great deal of natural occurring toxins targeting PP2A, has been highly concerned due to its acute hepatotoxicity and potent tumor promotion activity. Although extensive studies indicate that oxidative stress, DNA damage, cytoskeleton disruption and apoptosis play pivotal role in the toxic effects of MC-LR, the exact mechanisms of MC-LR toxicity need to be fully elucidated. Due to the important functions of PP2A in the processes of oxidative stress, repair of DNA damage, cytoskeleton organization and the regulation of apoptosis related kinase CaMKII and Bcl-2 family members, we propose that MC-LR induces toxic effects by interacting with PP2A, which will shed lights on the molecular toxicity mechanisms of MC-LR.

Key words protein phosphatase 2A; microcystin; oxidative stress; toxic effects; mechanism of toxicity

Received: October 30, 2008 Accepted: October 28, 2009

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30771827, No.20777067)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88208265, Fax: 86-571-88208265, E-mail: xulihong@zju.edu.cn