

一氧化氮诱导细胞凋亡

李 忌 陈俊杰 高小平* 李伯刚*

(华西医科大学基础医学院 *成都地奥制药集团有限公司 成都 610041)

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种自由基性质的气体,为污染空气的常见有毒成分之一。数年前有关 NO 参与诸多生理功能与病理过程的情况还鲜为人知,但目前它已成为自由基生物学与医学研究中的一个新领域。广泛深入的研究在 90 年代开始蓬勃发展,被美国“Science”杂志评为 1992 年的明星分子(star molecule),并继续展示方兴未艾的势头^[1]。NO 成为研究热点主要有两方面原因:① NO 作用具广泛性,它参与体内众多的生理病理过程,并已有临床应用,而且可能有新的临床应用前景^[2],这使生物医学工程领域和制药公司的专家也加入到开发研制 NO 药物的行列中来;② NO 是迄今在体内发现的第一个气体性信息分子,对今后其他信使的发现有重大启发。

自 Kerr 等^[3]提出细胞凋亡概念以后,凋亡研究不断取得发展,包括在生物化学水平对凋亡特征进行观察,如特征性断裂片段发现^[4];凋亡信号传导,凋亡相关的酶和蛋白质表达,以及凋亡相关基因的发现^[5]等等。通过这些研究,人们认识到凋亡是群体细胞重要的调控机制,在生物体发育,发育后细胞群修饰,以及生物体自稳方面有重要意义,可以在不发炎症的情况下,清除受损的、衰老的和不需要的细胞,它和细胞分裂、分化一起决定细胞群体数量和质量。

NO 由 NO 合酶(NOS)以 L-精氨酸为底物合成,在基因水平 NOS 分为三种形式^[6],即神经型 NOS(nNOS)、内皮型 NOS(eNOS)和诱导型 NOS(iNOS)。由于 NO 半衰期短,合成以后只能以自分泌或旁分泌形式发挥作用,故测定 NOS mRNA 分布能较好地反映 NO 在体内的作用。Albina 等^[7]研究 NO 对巨噬细胞的毒性作用时,发现用 IFN- α 诱导的细胞内源性 NO 或外源性 NO 均可引起体外培养的巨噬细

胞表现出典型的凋亡形态学和生化特征,于是,提出 NO 可诱导细胞凋亡。随后, Fehsel 等^[8]发现 NO 在体内体外均可诱导鼠胸腺细胞凋亡:出生后 30 天的 NMRI 鼠胸腺细胞和 NO 供体共育,3h 后胸腺细胞凋亡即明显增加;用 RT-PCR 技术检测 p53 mRNA 表达,发现细胞与 NO 供体共育 2h 后, p53 mRNA 表达明显增加;用细胞因子活化内皮细胞后,内皮细胞 iNOS mRNA 表达明显增加,而且 NO 代谢产物含量升高,将活化的内皮细胞与胸腺细胞共同培养,导致胸腺细胞凋亡数增加;用内毒素注射小鼠,原位杂交显示胸腺内皮细胞 iNOS mRNA 表达增加,在 iNOS mRNA 表达阳性的内皮细胞周围,出现凋亡的胸腺细胞;这表明无论是外源性 NO,还是由细胞因子、细菌毒素诱导 iNOS 生成后再合成释放的内源性 NO 均能有效诱导胸腺细胞凋亡。不久便在软骨细胞^[9]和 RAW264.7 巨噬细胞^[10]中同样观察到此现象,人们开始关注 NO 与细胞凋亡的关系。

一、NO 诱导细胞凋亡

活性氧如 O_2^- 、 H_2O_2 、脂类过氧化物和 NO 被认为在细胞凋亡过程中广泛存在,因为大量研究证实抗氧化剂可抑制或延迟细胞凋亡的发生^[11]。例如:体外培养的去神经神经生长因子(NGF)后,就会发生凋亡;但如果在去除神经生长因子的几小时内向神经细胞内注入 CuZn-SOD 的蛋白或 cDNA 会延缓细胞凋亡^[12];在白介素依赖性的促 B 淋巴细胞中发现有同样的现象,谷胱甘肽过氧化物酶的过度表达可显著抑制由去除生长因子所诱导的细胞凋亡^[13]。因此,我们从上述实例可看出,细胞死亡的生理信号在连续传递过程中或多或少取决于接受细胞氧化还原状态的变化。如前所述,已

有大量文献报道了 NO 可诱导众多类型的细胞发生凋亡(表 1)^[9,14],但正如其他氧自由基一样,NO 在体内许多生理和病理过程中发挥重要作用^[11],而且 NO 作用的分子靶点及效应分

子的多样性决定了 NO 作用机理的复杂性。因此,目前 NO 影响细胞凋亡的分子机制仍不十分清楚,同时,这也是当前生命科学研究的前沿热点。

表 1 NO 诱导细胞凋亡

靶细胞	抑制剂	促进剂	涉及基因
胸腺细胞	地塞米松		p53
胰岛 β 细胞	放线菌素 D 放线菌酮 NO 合酶抑制剂	TNF- α	p53
巨噬细胞	PKC,cAMP 类似物 NO 合酶抑制剂		p53
肿瘤细胞	NO 合酶抑制剂 地塞米松		
软骨细胞	NO 合酶抑制剂 氧自由基生成剂	二甲亚砷 N-乙酰半胱氨酸	

二、NO 影响细胞凋亡的生化途径

1. 破坏能量代谢

NO 可抑制乌头酸酶活性,干扰线粒体电子传递链反应,从而破坏细胞氧化磷酸化过程,导致细胞死亡^[15],氧化磷酸化反应遭到破坏后,糖酵解途径得到代偿性增强,这已在实验中得到证实^[16]。而且,发现 NO 对电子传递链上的一些起关键作用的含 Fe 蛋白酶具有氧化修饰作用。用 NO 供体 S-亚硝基-乙酰青霉胺(SNAP)分别作用于 NO 敏感性的 RAW264.7 巨噬细胞和 NO 耐性的鼠纤维肉瘤细胞 L-929,都观察到对线粒体氧化磷酸化过程的抑制作用^[15],但只有 RAW264.7 细胞发生明显凋亡,L-929 细胞存活率却没有受到什么影响,这表明 NO 对细胞氧化代谢的抑制作用并不能完全解释 NO 的细胞毒性作用机制。

2. 影响细胞自由基代谢水平

NO 及其衍生物本身具有自由基特性,因此,我们推测 NO 诱导细胞凋亡的作用机制可能与其他活性氧自由基的作用机制存有共性。

而且,已有实验结果显示:NO 与其他氧自由基诱导的细胞凋亡途径之间有对话(cross-talk)效应^[17],例如:先用低剂量 NO 供体预处理鼠肝细胞后,就可抵御过氧化氢(H_2O_2)的损伤作用^[18]。如果细胞内抗氧化水平高就对 NO 不敏感,一旦去除细胞内还原型谷胱甘肽(GSH),导致抗氧化能力降低,就会变得对 NO 极为敏感^[19];再加上 Bcl-2 抗氧化活性的发现^[13],人们更加支持 NO 诱导细胞凋亡的自由基学说。最近发现抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸确能抑制 NO 诱导的细胞凋亡,其作用机理正在研究之中^[15,20],也许通过维持细胞内 GSH 于正常水平,以抵御 NO 造成的损伤。

3. 直接攻击 DNA

NO 也可直接损伤 DNA 而诱发细胞发生凋亡。已有实验结果表明:NO 使 DNA 中嘌呤碱和嘧啶碱脱氨化,导致 DNA 链断裂及突变^[21]。因此,NO 除了可影响氧化代谢途径和细胞自由基代谢水平外,还可损伤 DNA,最终引发细胞凋亡。而 DNA 损伤又可激活一种耗能的 DNA 修复酶-多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)^[22],PARP 激活后引发其底物 NAD^+

的大量消耗,抑制糖酵解途径,从而降低细胞 ATP 的产量^[23-25],引发细胞凋亡。我们研究发现 H₂O₂ 诱导人肝癌细胞凋亡的作用途径之一就是直接攻击 DNA,激活 PARP,破坏细胞正常能量代谢^[24]。最近有人发现 NO 还可通过破坏细胞内 Ca²⁺ 平衡,激活核酸内切酶,诱发细胞凋亡^[26]。

三、NO 作为信号分子诱导凋亡

NO 是一种重要的信使分子,因此它在细胞凋亡过程中的信号传导机制,引起人们的浓厚兴趣。人们首先以 NO 和 H₂O₂ 作用效应的相似性为导向,因为 H₂O₂ 同样可通过直接损伤 DNA,诱导细胞凋亡^[24]。最近,越来越多的研究结果显示:H₂O₂ 可诱发细胞膜发生脂质过氧化、激活膜上酪氨酸激酶、打开膜离子通道、激活 G 蛋白活性,引发信号传递系统,从而激活氧化还原敏感性转录因子如:AP-1 和 NF- κ B 等^[27,28]。有趣的是,随后就有实验证实 NO 同样可诱发膜脂过氧化、改变离子通道、激活 G 蛋白和相关激酶及转录因子 AP-1/NF- κ B^[29-31],而且 NO 还可使蛋白激酶 C(PKC)失活,直接激活 G 蛋白,诱导核转录因子 NF- κ B 发生变位^[32]。大量研究证实 NF- κ B 对氧化胁迫极为敏感,氧化胁迫条件下,NF- κ B 被激活转位,可能进一步在转录水平上激活一些“死亡基因”的表达^[27]。

四、NO 的基因调控机制

目前有关细胞凋亡过程中的基因表达调控机制还知之甚少。最初认为细胞凋亡是一种受基因调控的主动死亡方式的主要证据就是:蛋白合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide)和 RNA 合成抑制剂放线菌素 D(actinomycin D)可阻止某些细胞凋亡的发生。但现在很多实验都发现,放线菌酮或/和放线菌素 D 不但对某些细胞凋亡无抑制作用,而且它们本身在一定浓度条件下还可诱发某些细胞发生凋亡^[15],也

许是它们抑制了那些阻碍凋亡发生的基因表达的缘故。

Messmer 等首先发现 NO 可诱发 p53 基因的表达^[33]。p53 是一种肿瘤抑制基因,其蛋白能与 DNA 结合,具有修复 DNA 损伤和调节转录功能,P53 蛋白羧基端有 DNA 结合位点,氨基端有转录调控位点。DNA 受伤断裂,p53 便与 DNA 结合并催化 DNA 修复;p53 可和 TATA 结合蛋白及另外一些转录因子或调控元件结合,抑制或促进基因转录^[34]。p53 诱导凋亡与其 DNA 结合功能及基因调控功能有关,但其诱导凋亡的下游途径仍不清楚^[35]。现已发现在一种重要的抗凋亡基因 bcl-2 中有 p53 结合元件,p53 与之结合可以使 bcl-2 表达下降^[34],破坏 bcl-2 与 bax 之间的平衡,这可能是 p53 诱导凋亡的机制之一。而且 NO 还可诱导 bax 的表达^[36],破坏 bcl-2/bax 平衡,诱发细胞凋亡。

原癌基因 bcl-2 最初是从 t(14;18)染色体转位断裂点发现的,这种转位和滤泡淋巴瘤密切相关。bcl-2 可阻止多种诱发因素(如:氧化胁迫、去除生长因子、 γ -辐射、热激及各种药物等)诱导的细胞凋亡^[37]。Bcl-2 在线粒体有大量分布,提示其可能与氧化代谢有关,联系到氧化代谢过程中可以产生氧自由基,于是,Bcl-2 与氧自由基的关系受到重视。有研究表明:细胞在接受多种凋亡诱导剂刺激以后,其 bcl-2 表达大量增加,并且能减轻氧自由基造成的结构破坏^[11],即表明 Bcl-2 有抗氧化作用。Bcl-2 对 NO 诱导细胞凋亡的抑制效应已被实验证实^[36,38,39]:通过转基因技术将 bcl-2 转入受体细胞(巨噬细胞),Bcl-2 得到高表达,从形态学和生化特征上均反映出对外源和内源 NO 诱导凋亡的抑制效应,且阻止 NO 激发的 PARP 降解和蛋白酶的激活,但不影响 NOS 活性和 p53 基因过度表达,这表明 Bcl-2 抑制凋亡发生的作用位点在 NO 诱导 p53 过度表达事件的下游。NO 诱导细胞凋亡的机制之一就是促进 bax 的表达,破坏 bax/bcl-2 平衡,Bcl-2 的抑制效

应可能是对这种平衡修复的结果。

五、结 语

综上所述,NO可诱导细胞发生凋亡,但其分子机理有待阐明,根据目前的研究结果,我们将NO诱导细胞凋亡的作用途径用下图简要说明:

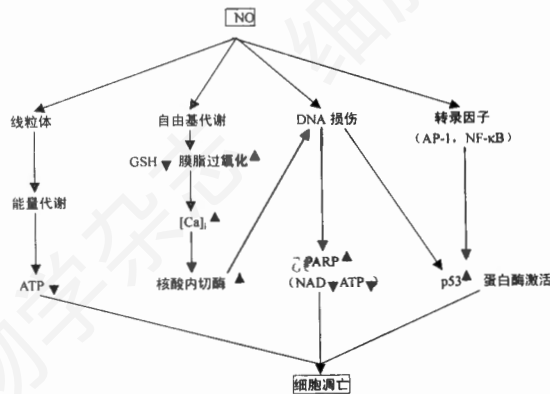


图1 一氧化氮(NO)诱导细胞凋亡

NO与凋亡关系研究是一个新课题,目前主要集中于免疫相关细胞及肿瘤细胞。NO对不同细胞及同一细胞不同分化阶段的作用存在异质性,NO与其他氧自由基凋亡传导途径之间存在对话效应。NO诱导凋亡与p53基因表达有关,p53基因除有阻断细胞于周期检查点的作用外,还有直接诱导凋亡功能。但NO如何影响p53、bcl-2及bax基因表达,以及这些基因表达后影响凋亡的具体途径是目前研究重点。值得指出的是,NO与凋亡研究,可能会对免疫细胞群体修饰、免疫反应调节、神经传导机制、自身免疫反应机制、肿瘤发生及治疗等有重要意义。

摘 要

一氧化氮(NO)参与体内众多的生理病理过程,最近发现NO与细胞凋亡关系密切,可诱发多种细胞发生凋亡,并与其他活性氧自由基

(ROS)的凋亡传导途径之间存在对话效应,NO诱导凋亡促进p53基因表达,其分子作用机理正是目前的研究重点。

参 考 文 献

- [1] Koppenol WH. 1998, *Free Rad. Biol. & Med.*, **25**:385-391.
- [2] Tzeng E, et al., 1998, *Surgery*, **124**:278-283.
- [3] Kerr JF, et al., 1972, *Br. J. Cancer.*, **26**:239-257.
- [4] Wyllie AH. 1980, *Nature*, **284**:555-556.
- [5] Yin Y, et al., 1998, *Nature*, **391**:707-710.
- [6] 高博等, 1999, *生物化学与生物物理进展*, **26**:31-34.
- [7] Albina JE, et al., 1993, *J Immunol.*, **150**:5080-5085.
- [8] Fehsel K, et al., 1995, *J Immunol.*, **155**:2858-2865.
- [9] Blance FJ, et al., 1995, *Am J Pathol.*, **146**:75-85.
- [10] Messmer UK, et al., 1995, *Mol Pharmacol.*, **47**:757-765.
- [11] 李忌、郑荣梁, 1997, *细胞生物学杂志*, **19**:115-119.
- [12] Greenlund LJS, et al., 1995, *Neuron*, **14**:303-314.
- [13] Hockenbery DM, et al., 1993, *Cell*, **75**:241-251.
- [14] Geng YJ, et al., 1996, *Cancer Res.*, **56**:866-874.
- [15] Albina JE and Reichner JS. 1998, *Cancer Metastasis Rev.*, **17**:39-53.
- [16] Albina JE and Mastrofrancesco B. 1993, *Am J Physiol.*, **264**:C1594-C1599.
- [17] Patel RP, et al., 1999, *Biochim Biophys Acta.*, **1411**:385-400.
- [18] Kim YM, et al., 1995, *FEBS Lett.*, **374**:228-232.
- [19] Walker MW, et al., 1995, *Pediatr Res.*, **37**:41-49.
- [20] Brune B, et al., 1998, *Eur J Pharmacol.*, **351**:261-272.
- [21] Nguyen T, et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **89**:3030-3034.
- [22] Zhang J, et al., 1994, *Science*, **263**:687-689.
- [23] Schraufatatter IU, et al., 1986, *J Clin Invest.*, **77**:1312-1320.
- [24] 李忌等, 2000, *Cell Biol Int.*, **24**:(1)9-23.
- [25] Pieper AA, et al., 1999, *Trends Pharmacol*

- Sci.*, **20**:171-181.
- [26] Murphy MP, 1999, *Biochim Biophys Acta.*, **1411**:401-414.
- [27] Schreck R, et al., 1991, *EMBO J.*, **10**: 2247-2258.
- [28] 李忌等, 1997, 自由基生命科学进展, **5**:14-19.
- [29] Tabuchi A, et al., 1994, *FEBS Lett.*, **351**: 123-127.
- [30] Lander HM, et al., 1993, *J Immunol.*, **151**: 7182-7187.
- [31] Brune B, et al., 1998, *Biochemistry*, **63**:817-825.
- [32] Gopalakrishna R, et al., 1993, *J Biol Chem.*, **268**:27180-27185.
- [33] Messmer UK, et al., 1994, *FEBS Lett.*, **355**:23-26.
- [34] Levine AJ. 1997, *Cell*, **88**:323-331.
- [35] Kaelin WJr. 1998, *Science*, **281**:57-58.
- [36] Messmer UK, et al., 1996, *J Biol Chem.*, **271**:20192-20197.
- [37] Hawkins CJ and Vaux DL. 1994, *Immunol Rev.*, **142**:127-139.
- [38] Genaro AM, et al., 1995, *J Clin Invest.*, **95**:1884-1890.
- [39] Xie K, et al., 1996, *Cancer Immunol Immunother.*, **43**:109-115.

Fas/Fas L 凋亡作用机制

郭淑贞 夏宁邵

(厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室 厦门 361005)

机体如何消除识别自身抗原的 T 细胞, 以维持周边免疫耐受? 如何消除免疫反应后过剩的致敏 T 细胞, 实现免疫下调? 这些免疫调节过程都有细胞表面分子 Fas 及其受体 Fas L 介导的程序性细胞死亡 (Programmed Cell Death, PCD) 的参与^[1]。它们还与多种疾病的发生密切相关, 如系统性红斑狼疮^[2]、丙型肝炎^[3]、艾滋病^[4]。某些病毒即通过诱导产生无活性的 Fas 或 Fas L 来达到复制自我, 逃避宿主免疫防御的目的^[5]。在一些抗癌药物的作用过程中也观察到它们对 Fas/Fas L 的依赖性, 如阿霉素、氨甲蝶呤。分属于 TNF/TNF 受体超家族的 Fas L/Fas 已成为程序性细胞死亡, 亦称细胞凋亡研究中的热点之一。本文仅从 Fas/Fas L 的表达调控, 存在形式, 结合蛋白, 相关蛋白酶等方面来讨论它们诱导细胞凋亡的机制。这对弄清它们在生理、病理条件中的作用, 进一步认识细胞凋亡调控网络有重大意义, 并为相关疾病的诊断治疗提供新方法。

一、Fas/Fas L 的表达 及其存在形式

在 Fas 基因启动区序列中没有常见的

TATA、GC 或 CCAAT Boxes, 而于更上游的位置有转录因子 AP-1、Ets 及 NF-IL6 的结合位点。其中 NF-IL6 的结合序列共有六处, 在第一外显子中还另有两处, 由此可以推测 NF-IL6 对 Fas 基因表达有一定调控作用^[6]。已知, 流感病毒感染的 Hela 细胞通过一种双链 RNA 激活的蛋白激酶对 NF-IL6 进行磷酸化修饰, 使其 DNA 结合能力升高, 导致相关基因表达量上升。对 NF-IL6 在其他条件下的作用, 及 AP-1、Ets 的功能还有待认识。Fas 基因启动区还存在两种序列多态性: 一为沉默子中-1377 位 CG-CA, 改变了转录因子 SP-1 的结合位点; 二为增强子中-670 位 GA-GG, 使核转录元件 GAS 的结合位点被破坏^[7]。这无疑也是 Fas 基因表达调控的一部分。

除转录水平外, Fas 还存在 mRNA 剪接水平上的调节。Cascino 等人分离三种 Fas mRNA 变体, 其中 FasTMDel 缺失跨膜区段, FasDel2 和 FasDel3 在胞内区缺失, 缺失区段皆为内含子所在位置, 证明这些 mRNA 变体是由 mRNA 前体经选择性剪接形成, 它们的蛋白产物都是可溶性 Fas (sFas), 有一定凋亡抑制作用^[8]。免疫荧光检测发现 FasDel2 和 FasDel3