

- [20] Inohara N., et al., 1998, *J. Biol. Chem.*, **273**:12296—12300.
- [21] Tian Q. et al., 1995, *J. Exp. Med.*, **182**:865—874.
- [22] Furukawa Y. et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**:28469—28477.
- [23] Atkinson E. A. et al., 1996, *J. Biol. Chem.*, **271**:5968—5971.
- [24] Eischen C. M. et al., 1994, *J. Immunol.*, **153**:1947—1953.
- [25] Kennedy N. J., and Budd R. C., 1998, *J. of Immunol.*, **160**:4881—4888.
- [26] Golstein P. et al., 1995, *Immunol. Rev.*, **146**:45—56.
- [27] Bawer M. K. A. et al., 1997, *FEBS Letters*, **402**(2-3):256—258.
- [28] Bertin J., et al., 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:1172—1176.
- [29] Clement M.-V., Stamenkovic I., 1996, *The EMBO J.*, **15**:216—225.

作用于微管的药物介导的细胞周期及凋亡信号通路

袁金辉 谢弘

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

有机体及其组织完整性的维持有赖于增殖、分化和凋亡之间平衡的精细调节,某一阶段的不完全成熟或分化失常或正常的凋亡功能丧失所造成的生长失控均会导致这种平衡的显著变化。因此,可通过激活某一通路使细胞发生周期阻滞,分化或凋亡来控制癌细胞生长。

微管是细胞骨架的重要组成部分,参与了细胞增殖、分化和凋亡的调控。微管由 α 、 β 管蛋白异二聚体自我装配而成并结合有微管相关蛋白和摩托蛋白(motor proteins)。管蛋白的聚合和解聚对微管的动力学进行着最基本的调控。有许多配体能与管蛋白结合从而影响微管的装配。其中以微管为靶的药物是重要的配体,已发现此类药物是有效的抗肿瘤药物。紫杉醇类能与聚合的管蛋白作用并抑制其解聚,而长春花碱类与单聚体的管蛋白结合抑制其聚合。研究表明,这些抗微管药物可促使癌细胞发生周期阻滞及凋亡^[1-4]。如5—9nmol/L的紫杉醇足以使A549人肺癌细胞的有丝分裂期延迟,且退出有丝分裂后可诱导凋亡^[1]。如果以高于9nmol/L的紫杉醇处理A549细胞即可诱导有丝分裂阻滞并使细胞发生异常有丝分裂^[1]。我们以SMMC-7721人肝癌细胞作为实验材料进行的一系列研究表明^[2,3],无论在体外还是体内,紫杉醇均可以使细胞发生显著的G₂/M期阻滞,继之发生凋亡。本文对此类抗微管药物诱

导细胞周期阻滞及凋亡的信号通路作一简要综述。

一、作用于微管的药物介导的细胞周期信号通路

细胞的有丝分裂需要通过激活 cyclin B1-Cdc2 激酶复合物启动,而在有丝分裂过程中亦有蛋白激酶被激活。Ling 等的研究发现,紫杉醇诱导的有丝分裂阻滞伴有 cyclin B1 的积聚及 p34^{cdc2} 的激活^[5]。也有人持不同的看法,认为紫杉醇诱导有丝分裂阻滞使 p21 的表达增高,从而使 p34^{cdc2}/cyclin2 复合物的活性受到抑制^[6],这种矛盾有可能是由实验材料不同所致。相似地,在 nocodazole 诱导的有丝分裂阻滞中 Raf-1 被激活,而且在多个位点如 322, 43 和 259 位残基被高度磷酸化^[7]。另外, p38 MAPK 在 nocodazole 诱导的有丝分裂阻滞过程中亦可被激活^[8]。c-Mos 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,尽管认为它只在减数分裂时才表达,但已证明 c-Mos 蛋白可在体细胞有丝分裂期积聚而且可磷酸化管蛋白,同时介导 MAPK 通路。当 c-Mos 过表达时可引起中期阻滞,在紫杉醇诱导的有丝分裂阻滞过程中已证实有 c-Mos 的激活和表达^[5,9]。有丝分裂不仅与多种丝氨酸/苏氨酸激酶有关,而且与丝氨酸/苏氨酸蛋白磷

酸酶 2A(PP2A)有关^[10]。PP2A 的抑制剂维甲酸可稳定微管并使细胞阻滞在有丝分裂期。

二、作用于微管的药物介导的凋亡信号通路

抗微管药物对细胞凋亡的影响很复杂,涉及到数条信号通路。

1. c-Raf-1/Ras/Bcl-2 通路

Raf 激酶和 Ras GTP 结合蛋白是细胞增殖、分化、细胞周期进程及凋亡的重要调节因素^[11-15]。Raf-1 是细胞内 v-Raf 蛋白的同源物,是一种普遍存在的丝氨酸/苏氨酸激酶,处于增殖信号由细胞膜至细胞核通路的中心位置^[12-15]。另外,Ras 蛋白是生长因子受体的一个重要的效应子,可激活不同的信号通路^[16]。p23 r-Ras 蛋白与 Bcl-2 活性相关。过表达 p23 r-Ras 不能转化细胞但可诱导细胞凋亡。最近的研究表明,作用于微管的药物诱导凋亡时需要 c-Raf-1/Ras/Bcl-2 通路^[4,17,18]。用紫杉醇处理肿瘤细胞可导致细胞凋亡和 c-Raf-1 激活,同时发生 Bcl-2 的磷酸化^[17]。Raf-1 的激活需要紫杉醇与管蛋白的相互作用,而在紫杉醇耐药的细胞中 Raf-1 明显减少。用紫杉醇的类似物和其他的作用于微管的药物亦观察到管蛋白聚合、Raf-1 激活、Bcl-2 磷酸化和凋亡之间的相关性^[17]。

2. p53/p21^{WAF1/CIP1}通路

作为凋亡的上游基因,p53 和 p21 参与了由作用于微管的药物激发的凋亡^[6,19]。cyclin 依赖的激酶(Cdks)与 cdk 的抑制因素的平衡调节着细胞周期的进程。p21^{WAF1/CIP1}(p21)是 cdk2 和 cdk4 的有效抑制子。用抗微管的药物处理细胞可诱导 p21 和 p53 的表达^[6,19]。在含有野生型 p53 或 p53 缺失的细胞,紫杉醇诱导 p21 的积聚均具有浓度和时间依赖性,但在表达野生型 p53 的细胞中积聚的程度更强一些。同时,紫杉醇改变 c-Raf-1 的电泳迁移率并且激活 MAPK。用 benzpquinone ansamycin GA 处理

已缺失 c-Raf-1 的 3T3 细胞可抑制 p21 和 p53 的表达,而且 MAPK 的激活也受到抑制。这些结果表明,紫杉醇诱导 p21 和 p53 需要 c-Raf-1 的活性,但凋亡却并不完全依赖野生型 p53^[19]。p21 表达的上升也伴随着 p34^{cdc2}活性的抑制^[6]。已经发现,紫杉醇处理后 p21 蛋白水平提高与 p34^{cdc2}/cyclin B 复合物的失活有关^[6]。

3. 蛋白激酶 A(PKA)通路

cAMP 通过激活 PKA 在调节各种细胞功能,包括细胞增殖、分化和基因诱导中的作用已经清楚。在几种癌细胞系中,cAMP 的类似物 8-Cl-cAMP 和 RI-a 反义寡核苷酸诱导的凋亡与 PKA I 的下调程度以及 PKA II 的上调水平平行^[20,21]。已经证明,8-Cl-cAMP 和紫杉醇、顺铂或维甲酸对几种人类癌细胞生长的抑制及凋亡的诱导有协同作用^[22,23]。另外,胞质内显微注射纯化的 PKA 催化亚单位可促进细胞死亡。PKA I 已被发现与哺乳动物的着丝粒有关,而且,在紫杉醇、长春新碱或长春花碱引起微管破坏的基础上,激活的 PKA 引起 Bcl-2 磷酸化,从而导致凋亡。与长春新碱作用类似的药物 nocodazole 阻止微管聚合但不能激活 PKA,不能诱导 Bcl-2 磷酸化程度的提高,因而不能诱导凋亡^[24]。因此,微管聚合的破坏并不是诱导凋亡所必须的,除非下游的元件被激活。这些研究表明,由微管损伤激活 PKA 在 Bcl-2 磷酸化和诱导凋亡中是一个重要的事件。

4. MAPK/p34^{cdc2}-cyclin A and B 激酶/Bcl-2 通路

微管是细胞骨架的重要组成部分,涉及到许多细胞活动。最近的研究表明,在微管装配过程中,微管相关蛋白和微丝的功能受到 MAPK 和 p34^{cdc2}磷酸化的调控。MAPK 家族由 ERK (extracellular signal-regulated protein kinase), JNK/SAPK(c-Jun N-terminal kinases/stress-activated protein kinase)和 p38 组成。新近有研究表明,在紫杉醇诱导人卵巢癌凋亡的过程中 JNK/SAPK 被激活^[25]。Srivastava 等^[26]也报道,紫杉醇处理 MDA-MB-231 细胞后可激

活 JNK。微管相关蛋白是 ERK 的底物,磷酸化后减弱了它们作用于微管的稳定性。已有报道,在诱导凋亡的过程中,作用于微管的药物对 MAPK 的活性有不同的作用。以前的研究表明,在 PC-9 和 PC-14 细胞系,紫杉醇通过抑制 G₂/M 期 MAPK 和 p34^{cdc2} 激酶的活性而诱导凋亡^[27]。这种 MAPK 和 p34^{cdc2} 激酶活性的降低与微管相关蛋白、 α 、 β 管蛋白复合体形成上升平行,同时有微管相关蛋白-2 磷酸化数量的增高^[27]。也有报道表明,凋亡能激活 MAPK^[25,26,28]。对此可能的解释是对 MAPK 不同的影响取决于抗微管药物是促进微管聚合还是促进微管解聚。另外,这种作用有可能是有细胞特异性的。

Wang 等^[29]观察到,在 MCF-7 细胞中,MAPK 可被 vinorelbine 迅速激活而被紫杉醇及 estramustine 抑制。与 Nishio 等^[27]的报道一致的是紫杉醇也可引起 MCF-7 细胞的 MAPK 活性抑制。故抗微管药物对 MAPK 活性不同的作用可能是由于这些药物作用于微管的位点不同,所造成的微管结构损伤不同,从而激活诱导凋亡的不同的信号通路。

MAPK 的激活是否参与 Bcl-2 的磷酸化目前尚不十分清楚。Wang 等^[4]的研究表明当用免疫纯化的 Bcl-2 直接与纯化的 MAPK 反应未发生 Bcl-2 的磷酸化。但是,MAPK 有可能间接参与 Bcl-2 的磷酸化^[30]。2-Mehto 用。用 2-Mehtoxyestradiol 处理红白血病细胞系 K562 可致其微管稳定并伴有 Bcl-2 的磷酸化和失活。2-Mehtoxyestradiol 也可使 Raf-1 磷酸化,但这种作用迟于 Bcl-2 的磷酸化,表明 Raf-1 不参与 Bcl-2 的磷酸化。另一方面,2-Mehtoxyestradiol 处理后可发生 JNK/SAPK 快速的、一过性的激活。这一发现表明,JNK/SAPK 的过表达可能直接导致 Bcl-2 的磷酸化。Srivastavs 等^[26]的研究也表明 JNK 的激活与 Bcl-2 的磷酸化有关。最近的研究还发现,在许多人类细胞中作用于微管的药物通过 Ras 和凋亡信号调控激酶(ASK1)通路激活 JNK/

SAPK。这种激活需要与微管的反应^[29]。

三、结 束 语

研究表明,紫杉醇、长春花碱、秋水仙碱和 nocodazole 能阻滞细胞的有丝分裂。此类药物作用在多个信号通路抑制细胞增殖,可激活 cyclinB-cdc2, Raf-1 以及 p38 MAPK 等激酶。c-Mos 亦参与了紫杉醇诱导的有丝分裂阻滞的信号过程。但尚有不一致的报道,比如紫杉醇作用后对 p34^{cdc2} 激酶的活性的影响。此将有待进一步的研究。作用于微管的药物诱导凋亡是一个非常复杂的过程,涉及许多蛋白激酶信号通路。激活 c-Raf-1,使 Bcl-2 磷酸化,从而诱导凋亡;增强 p21 的表达,抑制 CDK 活性;激活 PKA,磷酸化 Bcl-2;作用于 MAPK,通过 p34^{cdc2}、Bcl-2 等参与凋亡。尚有许多问题有待阐明,如 Bcl-2 磷酸化的作用、凋亡调控中凋亡启动与抑制间蛋白与蛋白的反应等。另外,作用于微管的药物影响的凋亡通路中不同蛋白激酶之间的关系亦有待进一步研究。由于抗微管药物与微管不同的结合位点,以及对微管不同的破坏形式(聚合或解聚)可能激发不同蛋白激酶信号途径,因此,作用于微管的药物介导凋亡过程中不同蛋白激酶信号通路和这些激酶间可能存在的对话(crosstalk),通过对话能把两个或更多信息综合在一起,对组合信息作出反应,形成一细胞内控制系统。这个控制系统的一个重要的靶是细胞骨架。这些都有待于进一步阐明。深入了解这些信号通路将揭示一个有助于癌症预防 and 治疗的崭新领域。

参 考 文 献

- [1] Torres K. et al., 1998, *Cancer Res.*, **58**: 3620-3626.
- [2] Yuan J. H. et al., 2000, *Acta Pharmacol Sin.*, **21**:450-454.
- [3] Yuan J. H. et al., 2000, *World J Gastroentero.*, **6**:210-215.
- [4] Wang L. G. et al., 1999, *Proc Am Assoc Cancer Res.*, **40**:13.
- [5] Ling Y. H. et al., 1998, *Int J Cancer.*, **58**:

- 3633—3640.
- [6] Barboule N. et al., 1997, *Oncogene*, **15**:2867—2875.
- [7] Lovric J. et al., 1996, *Oncogene*, **12**:1109—1116.
- [8] Takenaka K. et al., 1998, *Science*, **280**:599—602.
- [9] Fukasawa K. et al., 1997, *Mol Cell Biol.*, **17**:506—518.
- [10] Tournbize R. et al., 1997, *EMBO J.*, **16**:5537—5549.
- [11] Kerhoff E. et al., 1998, *Oncogene*, **17**:1457—1462.
- [12] Pumiglia K. M. et al., 1997, *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**:448—452.
- [13] Sewing A. et al., 1997, *Mol Cell Biol.*, **17**:5588—5597.
- [14] Weissinger E. M. et al., 1997, *Mol Cell Biol.*, **17**:3229—3241.
- [15] Woods D. et al., 1997, *Mol Cell Biol.*, **17**:5598—5611.
- [16] Symons M. et al., 1996, *Trends Biochem Sci.*, **21**:178—181.
- [17] Blagosklonny M. V. et al., 1996, *Cancer Res.*, **56**:1851—1854.
- [18] Haldar S. et al., 1997, *Cancer Res.*, **57**:229—233.
- [19] Blagosklonny M. V. et al., 1995, *Cancer Res.*, **55**:4623—4626.
- [20] Cho-Chung Y. S. et al., 1997, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **7**:217—223.
- [21] Srivastava R. K. et al., 1998, *Clin Cancer Res.*, **4**:755—761.
- [22] Srinivasula S. M. et al., 1999, *Cancer Res.*, **59**:999—1002.
- [23] Tortora G. et al., 1991, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **88**:2011—2015.
- [24] Srivastava R. K. et al., 1998, *Mol Cell Biol.*, **18**:3509—3517.
- [25] Wang T. H. et al., 1999, *J Biol Chem.*, **274**:8208—8216.
- [26] Srivastava R. K. et al., 1999, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **96**:3775—3780.
- [27] Nishio K. et al., 1995, *Int J Cancer.*, **63**:688—693.
- [28] Stone AA. et al., 2000, *Exp Cell Res.*, **254**:110—119.
- [29] Wang T. H. et al., 1998, *J Biol Chem.*, **273**:4928—4936.
- [30] Attalla H. et al., 1998, *Biochem Biophys Res Commun.*, **247**:616—619.

溶血磷脂酸——一种具有多种生物学功能的磷脂信号分子

何 兰 杰

(宁夏医学院附属医院心内科 银川 750004)

溶血磷脂酸(Lysophosphatidic acid, LPA)是迄今发现的一种最小、结构最简单的磷脂,它是真核细胞磷脂生物合成早期阶段的关键性前体,甘油磷脂代谢的中间产物^[1]。60年代初, Vogt 等人在实验中观察到, LPA 能够引起兔离体肠平滑肌收缩^[2]。这一现象使人们认识到 LPA 不仅仅是生物膜的组成成分可能还具有某些生物学功能。随后越来越多的研究表明: LPA 作为一种细胞间的磷脂信使,可以激活 G 蛋白偶联受体,引起生长激素样作用,从而产生广泛的生物学效应。LPA 对细胞的生长、增殖、分化及细胞内信息传递产生多种影响,在维持机体正常的生理功能,参与各种病理过程的发

生发展均有着重要的作用。这种作用不仅局限在哺乳动物细胞,同时在较低等的细胞:如非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)卵母细胞及网菌属盘状硅藻(*Dictyostelium discoideum*)中也存在^[3]。本文从溶血磷脂酸的基本性质入手,着重介绍溶血磷脂酸的生物学效应。

LPA 是由一个甘油主链和 Sn-1 位上的一个脂肪酰侧链、Sn-2 位上的一个羟基及 Sn-3 位上的磷酸基团所组成(图 1 所示)。因为 LPA 有一个自由羟基和磷酸基团,所以易溶于水,尤其易溶于不含钙镁离子的溶液^[4,5]。

感谢陈曦教授、赵淑清教授对本文的审校。