

神经酰胺在 T 细胞信号转导中的作用

梅传忠¹ 综述, 李柏青² 审校

[关键词] 神经酰胺; T 淋巴细胞; 信号转导; 综述

[中国图书资料分类法分类号] Q 556.2 R 392.12 [文献标识码] A

神经鞘磷脂 (sphingomyelin, SM) 由鞘氨醇 (sphingosine, SPH)、脂肪酸和磷酸胆碱所组成, 其中 SPH 的氨基通过酰胺键与脂肪酸相连, 构成 N 脂酰鞘氨醇, 又称为神经酰胺 (ceramide, Cer)。Cer 作为神经鞘脂类的主要成员之一, 在多种细胞因子、维生素 D₃、Fas 及 CD28 配体 (CD28 ligand, CD28L) 等介导的生物效应中作为重要的第二信使, 参与调节细胞生长、增殖、分化、凋亡及损伤等多种细胞活动^[1,2]。本文就 Cer 的生物合成、作用的靶分子及其在 T 细胞信号转导中的作用作一综述。

1 Cer 的生物合成

1.1 合成途径 丝氨酸与软脂酰 CoA 在磷酸吡哆醛依赖性丝氨酸软脂酰基转移酶作用下, 缩合形成 3 酮鞘氨醇, 进一步还原为双氢鞘氨醇, 在鞘氨醇-N 酰基转移酶, 即神经酰胺合酶 (ceramid synthase) 作用下, 去饱和生成双氢神经酰胺, 最后 C₄~C₅ 间插入双键形成 Cer。此途径可被药物及离子射线所激活, 需要数小时才能产生可检测到的 Cer^[3,4]。利用 Fumonisin B₁ (FB₁) 一种神经酰胺合酶特异性抑制剂, 可阻断 daunorubicin 所诱导的小鼠淋巴瘤细胞 Cer 蓄积及细胞凋亡^[3]。

Cer 可在神经酰胺酶 (ceramidases) 催化下去酰基生成 SPH。D-MAPP [D-erythro-2-(N-methylseryl)-1-phenylethyl-1-propanol] 可抑制神经酰胺酶活性, 导致 Cer 的蓄积, 表现 HL-60 和淋巴瘤细胞促凋亡的生物学活性^[5]。SPH 又可在鞘氨醇激酶的作用下迅速磷酸化变为 1 磷酸鞘氨醇 (sphingosine-1-phosphate, SPP/S1P)。SPP 和 SPH 一样也是重要的信号分子, SPP 既可在细胞外经内皮分化基因家族 G 蛋白偶联受体, 也可在细胞内直接与靶蛋白作用参与体内多种细胞的增殖、分化和凋亡, 且常表现出对抗 Cer 所诱导的生物学效应^[6]。

1.2 SM 循环 SM 在神经鞘磷脂酶 (sphingomyelinase, SMase) 作用下可水解为磷酸胆碱和 Cer, 此过程是可逆的, 因此称为 SM 循环。目前认为此途径是调控 Cer 信使细胞内水平的主要方式之一。SM 循环最初由 Okazaki 等在研究人 HL-60 白血病细胞中发现, 用维生素 D₃ 处理 HL-60 细胞后, 该细胞出现早期的和可逆的 SM 水解, 同时伴有 Cer 升高。

近年来研究发现, 多种刺激因素 (如 TNF- α 、IFN- γ 、IL-5、FasL、地塞米松、化疗药物、电离辐射及热刺激等) 可诱导 U937、HL-60、Jurkat T 细胞、Mol4 等细胞内 SM 水解而产生 Cer, 最终导致细胞周期停滞或凋亡等现象发生^[7]。

SMase 作为 SM 水解反应的关键酶, 是调控 Cer 浓度的关键所在。根据 SMase 的体外活化条件及最适 pH 值的不同, 目前发现至少有四型: (1) 膜型中性 SMase (neutral sphingomyelinase, nSMase), 其活性依赖于 Mg²⁺ 及中性 pH 环境, 最适 pH 值 7.0~7.5; (2) 胞浆型 nSMase, 不依赖于 Mg²⁺, 但具有中性 pH 依赖性, GSH 的降低可能为中性 SMase 活化的重要机制; (3) 酸性 SMase (acidic sphingomyelinase, aSMase), 主要分布于溶酶体及核内体, 激活时需要二酰基甘油 (diacylglycerol, DAG), 最适 pH 值 4.5~5.0; (4) 碱性 SMase, 激活时需要胆盐, 最适 pH 值 9.0。不同外源性刺激均能迅速活化 aSMase 和 nSMase, 在数秒至数分钟后使细胞内 Cer 水平增加^[8]。也有报道 nSMase 需要较长时间才能活化^[9]。

1.3 由脑苷脂类代谢产生 脑苷脂类 (cerebrosides) 在脑苷脂酶作用下可降解生成 Cer, Cer 又可在脑苷脂合酶作用下生成脑苷脂类。

2 参与 Cer 信号传递的效应分子

Cer 作为第二信使, 能转导多种生物学效应, 不仅与受体的多样性有关, 而且需要通过一系列效应分子的级联放大反应, 最终激活核内相关基因来完成。目前发现 Cer 直接作用的靶分子有:

2.1 Cer 活化的蛋白激酶 (ceramide-activated protein kinase, CAK) CAK 是一个分子量为 97 000 的脯氨酸引导的丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 蛋白激酶家族中的成员, 位于细胞膜上, 在进行非细胞体系重建时发现, 与 TNF 和 L-1 的受体紧密偶联。与这个家族的其他激酶不同的是, 它的最小识别基团为 Leu-Thr-Pro, 用 TNF- α 、IL-1 β 、Cer 类似物和细菌 SMase 处理完整的细胞和分离的细胞膜可加强 CAK 的活性。已证实, CAK 能磷酸化和激活 Raf, 后者能将细胞膜表面受体所产生的信号传给细胞外调节的蛋白激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)^[10]。

2.2 Cer 活化的蛋白磷酸酶 (ceramide-activated protein phosphatase, CAPP) CAPP 位于胞浆, 属于异源三聚体蛋白磷酸酶 2A 类的 Ser/Thr 蛋白磷酸酶家族, CAPP 的 B 亚基含有 Cer 结合位点, 且与 Cer 的结合具有严格结构特异性, 即 Cer 可作为 CAPP 的一个很特异的调节因子。它的活性不需要阳离子存在, 但能被低浓度冈田酸 (okadaic acid) 所抑制。TNF- α 和外源性 C₂-Cer 能诱导 HL-60 细胞凋亡和降低其

[收稿日期] 2005-01-10

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 30070721)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 生化与分子生物学教研室, 2. 免疫学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 梅传忠 (1972-), 男, 硕士, 讲师。

cmyc基因的 mRNA水平,而 C₂-二羟神经酰胺无此作用;冈田酸则能抑制上述作用,表明 Cer引起的 cmyc基因下调并进而诱导细胞凋亡是通过激活 CAPP介导的^[12-14]。

2.3 蛋白激酶 C ζ (Protein kinase C ζ , PKC ζ) PKC ζ 是不典型的 PKC同工酶的一种,能被磷脂酰丝氨酸、Cer激活,但不被 Ca²⁺、DAG或佛波酯激活。研究显示,对无 PKC ζ 活性的重组细胞及用丝氨酸蛋白酶抑制剂如二氯丙异香豆素处理过的细胞, TNF- α 及 Cer均不能诱导激活 NF- κ B^[12]。PKC ζ 的主要作用是促使 NF- κ B的生理抑制剂 I κ B的磷酸化,使 NF- κ B得以从胞浆转位到细胞核,从而发挥功能。

2.4 应激活化的蛋白激酶 (stress activated protein kinase, SAPK/JNK) SAPK是丝裂原活化的蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK)超家族的亚族成员,其介导的信号转导通路与细胞生长抑制、凋亡及炎症反应相关。外源性 C₂-Cer或 sMase引起 U937和 BAE细胞凋亡是通过 Cer激活的 SAPK/JNK信号途径介导的。研究表明, Cer可迅速激活 P46 JNK1/B4-JNK2,从而使 JNK的主要底物 C-Jun的表达增强和活性增高,而且发现 JNK的底物 C-Jun的表达和活性的增强对 Cer诱导的细胞凋亡发生是绝对必需的^[13]。

2.5 半胱天冬酶 (cysteine aspartase, Caspases) Caspases属天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶家族,目前根据其种系发生可分为三个亚族: (1) CED3亚族,包括 Caspases 3/CPP32, Caspases 6, Caspases 7, Caspases 8, Caspases 9和 Caspases 10; (2) ICE家族,包括 Caspases 1, Caspases 4, Caspases 5, Caspases 11; (3) Nedd8亚族,以 Caspases 2为代表。DNA修复酶多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 [PolV (ADP-ribose) polymerase, PARP]、DNA蛋白激酶催化亚单位 (DNA protein kinase catalytic subunit, DNA-PKcs)和核结构蛋白 NIMA lamins等是这类酶的底物,这些底物的水解可能与细胞凋亡时核形态和生化上的改变有关。CED3亚族的几个 Caspases可在凋亡早期催化 PARP的分解,其中 Caspases 3/CPP32被认为最有效(其次为 Caspases 7);核 lamins的降解是浓缩染色质进入凋亡小体(凋亡晚期典型的形态结构)所必需的, Caspases 6是目前唯一所知的水解 lamins的酶。Caspases 3在 C₂-Cer诱导的 HL60和 Jurkat T细胞凋亡过程中被激活,而 Caspases 3的特异性抑制剂 Ac-DEVE-CHO可有效地保护 Cer诱导的细胞死亡,提示 Caspases 3在 Cer诱导的凋亡过程中起关键作用^[14]。

2.6 原癌基因产物 Bcl2 Zhang等用抗癌药物 vincristine处理人急性淋巴细胞性白血病 ALL-697细胞系,只转染空载体的 ALL-697细胞和转染 Bcl2基因的 ALL-697细胞,发现 vincristine能引起 3株细胞中 Cer的升高,但只有前两者发生了凋亡,后者则不发生凋亡;用合成 Cer处理 3株细胞也得到同样的结果,说明 Bcl2的过度表达不影响 Cer的产生,但能阻断 Cer介导的细胞凋亡^[15]。Chen等用离子射线、TNF- α 和 C₂-Cer处理 HL60和 U937细胞可引起这些细胞的凋亡,相应伴有 Bcl2 mRNA水平的下降^[16]。

Cer下游靶分子还有许多,如 Cox IL-2和 IL-6基因、Vav Rb c-Fos和其它转录调节因子等,具体的信号转导机制

尚有待于进一步证实。

3 Cer在 T细胞信号转导中的作用

表达 $\alpha\beta$ T细胞受体 (T-cell receptor, TCR)的 T细胞可识别由 MHC I类分子或 MHC II类分子呈递的多肽分子。而表达 $\gamma\delta$ TCR的 T细胞在不受 MHC限制性的条件下可识别 MHC 类分子相关性抗原或非蛋白类的小分子。尽管 $\alpha\beta$ T细胞 TCR与 $\gamma\delta$ T细胞 TCR在信号转导方面的不同现未被深入研究,但最近在研究鞘磷脂在 T细胞生存与死亡调节中的作用中证实这样的观点,即 Cer及其代谢物在多级水平的 T细胞生物学活性调节中起作用。

3.1 Cer与 AICD 静止 T细胞依赖 TCR与抗原结合而被活化,相同抗原再刺激可诱导已活化 T细胞的凋亡,此现象被称为活化诱导的细胞死亡 (activation induced cell death, AICD)。AICD的发生机制主要是通过诱导 T细胞 CD 95配体 (CD 95 ligand, CD 95L)表达的上调,及 CD 95与 CD 95L相互作用来完成。最近的研究表明, Cer在依赖 TCR的 AICD调节中发挥多方面的重要作用。Tonnetti等报道鼠 T细胞杂交瘤细胞的 TCR受刺激后可产生 Cer^[17]。另外 FB1可阻止 TCR受刺激所导致的 CD 95L表达及 AICD产生,说明 Cer是 TCR信号转导机制中的一个必须组成部分。用依赖 IL-2活化的人 T细胞系, Flores等^[18]观察到在凋亡细胞内有大量 Cer产生;另外观察到,新鲜分离的静止 T细胞在 TCR交联刺激时,亦可有 Cer产生^[17],但不会引起 AICD。另有研究报道, Cer的生物学效应不仅依赖于其在细胞内的浓度,而且与细胞的活化或增殖状态有关。Cer作用于细胞的时间长短,亦是决定细胞最终走向的另一个重要参数^[19]。

我们最近在实验研究中发现, C₂-Cer能诱导人 $\gamma\delta$ T细胞和 $\alpha\beta$ T细胞发生凋亡,但诱导 $\gamma\delta$ T细胞发生凋亡所需的 C₂-Cer浓度明显高于诱导 $\alpha\beta$ T细胞所需浓度;这就提示 $\gamma\delta$ T细胞和 $\alpha\beta$ T细胞对 C₂-Cer致凋亡作用的敏感性不同,可能由于神经酰胺在这两种 T细胞中启动凋亡的机制存在不同,亦可能由于 $\gamma\delta$ T细胞中缺少某种信息分子,进而导致神经酰胺诱导其凋亡延迟^[20]。

3.2 Cer与 TCR表达 Menne等发现,新鲜分离的人 T细胞在受到低浓度 Cer刺激时,快速上调 TCR表达,升高达 15%~20%^[21]。最近该小组报道, Cer也可对 TCR表达发挥相反的作用,当 Jurkat细胞被 Cer (> 40 μ mol/L)处理 4 h后 TCR表达下调, TCR表达下调依赖于 Cer诱导的 Caspase活化,并与 Caspase介导的 TCR ζ 链的裂解有关。进一步研究发现, TCR的表达高低,由 Cer作用于 T细胞的时间与浓度参数决定^[21]。由此,我们认为由 Cer介导的某一个新途径可能参予 T细胞功能的最佳协调。

3.3 Cer与共刺激 TCR识别抗原导致 T细胞增殖或是无反应性(失能),依赖于共刺激信号的有无。多项研究显示, Cer参与 CD 28L激发的共刺激信号途径, CD 28L诱导 Jurkat T细胞和鼠静止及活化的原代 T细胞中 sMase活化,结果导致 Cer迅速产生,活化 MAPK信号途径^[21]。在抗-CD 3抗体作用下,加入外源性 sMase和 Cer均可促进 T细胞增殖,此与 NF- κ B活化和编码 IL-2的基因转录活性增强有关。最近

研究表明, CD 28与 Ce^e 的短期丝裂原活性可能与 CD 28与 CD28L交联导致 Ce^e 迅速产生有关, Ce^e 可能促进细胞内脂筏向细胞膜靶向移动, 并促进其积极再分布到 TCR配体接触区域, 增强了胞膜流动性^[24]。

4 小结与展望

Ce^e 信号转导生物学效应的多样性, 不仅与受体的多样性有关, 而且与其作用的不同下游靶分子、细胞微环境 Ce^e 代谢有关酶活性等因素有关。另外 Ce^e 产生的量、部位、所处细胞周期以及信号转导的活化状态等因素均在 Ce^e 的最终效应中发挥一定的作用。亦有报道, 细胞内 Ce^e 与其它鞘磷脂的水平的动力学平衡可以调控相反的信号转导途径。因此, 当我们观察 Ce^e 在 T细胞信号转导中的作用时, 应当考虑到 Ce^e 可被代谢为性质与 Ce^e 不同或甚至相反的鞘磷脂类物质, Ce^e 的部分生物学效应可能是由 Ce^e 的代谢物比如 SPP或 SPP所引起的。另外, 检测细胞内的所有具有生物学活性的鞘磷脂类代谢物水平有助于我们更好的理解 Ce^e 的生物学效应。但是, 因 Ce^e 的发现时间不长, 许多未知问题还有待人们去认识, 尤其是 Ce^e 下游活动中, 还有哪些因素参与 Ce^e 调节活动, 它们的生物学意义及相互作用、 Ce^e 信号转导通路与其它信号通路之间的关系及相互作用等均有待进一步研究。我们相信, 随着 Ce^e 作用的分子机制的深入了解, 可以更好的阐明疾病的发生机制, 为多种疾病如自身免疫性疾病、炎症性组织损伤、肿瘤发生及退行性脑病的防治提供新的线索和治疗干预策略。

[参 考 文 献]

- [1] Kolesnick R, Golde DW. The sphingomyelin pathway in tumor necrosis factor and interleukin-1 signaling. *J. Cell* 1994; 77(3): 325-328
- [2] Hannun YA. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol Chem* 1994; 269(5): 3125-3128
- [3] Bose R, Verheij M, Hajnovitz, Friedman A, et al. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: An alternative mechanism for generating death signals. *J. Cell* 1995; 82(3): 405-414
- [4] Garzotto M, Hajnovitz, Friedman A, Liao WC. Reversal of radiation resistance in INCaP cells by targeting apoptosis through ceramide synthase. *J. Cancer Res* 1999; 59(20): 5194-5201
- [5] Bielawska A, Greenberg MS, Perry D, et al. (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myrystoylamino)-1-phenylethyl-propanol as an inhibitor of ceramidase. *J. Biol Chem* 1996; 271(21): 12646-12654
- [6] Spiegel S, Foster D, Kolesnick R. Signal transduction through lipid second messengers. *J. Curr Opin Cell Biol* 1996; 8(2): 159-167
- [7] Shalini M, Louis A, Richard N. Signal transduction of stress via ceramide. *J. Biochem* 1998; 335(3): 465-480
- [8] Pena LA, Fuks Z, Kolesnick R. Stress-induced apoptosis and the sphingomyelin pathway. *J. Biochem Pharmacol* 1997; 53(5): 615-621
- [9] Hannun YA. Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *J. Science* 1996; 274(5294): 1855-1859
- [10] Yao B, Zhang Y, Delikat S, et al. Phosphorylation of Raf by ceramide-activated protein kinase. *Nature* 1995; 378(6554): 307-310
- [11] Hannun YA, Obeid IM. Ceramide: An intracellular signal for apoptosis. *Trends Biochem Sci* 1995; 20(2): 73-77
- [12] Lozano J, Berra E, Municio MM, et al. Protein kinase C zeta isoform is critical for kappa B-dependent promoter activation by sphingomyelinase. *J. Biol Chem* 1994; 269(30): 19200-19202
- [13] Jarvis WD, Fomari EA, Auer KL, et al. Coordinate regulation of stress and mitogen-activated protein kinases in the apoptotic actions of ceramide and sphingosine. *J. Mol Pharmacol* 1997; 52(6): 935-947
- [14] Kuo ML, Chen CW, Jee SH, et al. Transforming growth factor beta1 attenuates ceramide-induced CPP32/Yama activation and apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *J. Biochem J* 1997; 327(3): 663-667
- [15] Zhang J, Alter N, Reed JC, et al. Bcl2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *J. Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(11): 5325-5328
- [16] Yoshimura S, Banno Y, Nakashima S, et al. Ceramide formation leads to Caspase-3 activation during hypoxic PC12 cell death. *J. Biol Chem* 1998; 273(12): 6921-6927
- [17] Tonnetti L, Veri MC, Bonvini E, et al. A role for neural sphingomyelinase-mediated ceramide production in T cell receptor-induced apoptosis and mitogen-activated protein kinase-mediated signal transduction. *J. J Exp Med* 1999; 189(10): 1581-1589
- [18] Flores J, Jones DR, Merida J. Changes in the balance between mitogenic and antimitogenic lipid second messengers during proliferation, cell arrest and apoptosis in T lymphocytes. *J. FASEB J* 2000; 14(13): 1873-1875
- [19] Flores J, Martinez AC, Hannun YA, et al. Dual role of ceramide in the control of apoptosis following L-2 withdrawal. *J. Immunol* 1998; 160(7): 3528-3533
- [20] 梅传忠, 沈继龙, 陈勇, 等. 神经酰胺对人 $\gamma\delta$ T细胞和 $\alpha\beta$ T细胞的诱导凋亡作用. *蚌埠医学院学报*, 2004, 29(3): 193-196
- [21] Menre C, Lauritsen JH, Dietrich J, et al. Ceramide-induced TCR up-regulation. *J. Immunol* 2000; 165(6): 3065-3072
- [22] Menre C, Lauritsen JH, Dietrich J, et al. T cell receptor down-regulation by ceramide-induced caspase activation and cleavage of the zeta chain. *J. Scand J Immunol* 2001; 53(2): 176-183
- [23] Chan G, Ochi A. Sphingomyelin ceramide turnover in CD28 costimulatory signaling. *J. Eur J Immunol* 1995; 25(7): 1999-2004
- [24] Viola A. The amplification of TCR signaling by dynamic membrane microdomains. *J. Trends Immunol* 2001; 22(6): 322-327