

文章编号: 1001-098X(2005)01-0044-04

酸性神经鞘磷脂酶的生物学特性及其功能

侯丽莉 陈肖华

摘要 神经鞘磷脂酶(SMase)可水解鞘磷脂产生神经酰胺,在人体内发挥重要作用。酸性神经鞘磷脂酶(ASMase)作为 SMase 最重要的一个亚型,在辐射诱导细胞凋亡、调节肿瘤细胞生长、参与 Fas 信号系统传递等方面均可发挥重要作用。

关键词 神经鞘磷脂酶; 酸性神经鞘磷脂酶; 神经酰胺; 凋亡。

中图分类号 Q345+.2 文献标识码 A

Property and function of acid sphingomyelinase

HOU Li-li, CHEN Xiao-hua

(Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Science, Beijing, 100850, China)

Abstract Sphingomyelinase can hydrolyze the sphingomyelin to ceramide. And sphingomyelinase play important roles in diverse physiological. Acid sphingomyelinase is the most important type of sphingomyelinase.

Key words sphingomyelinase; acid sphingomyelinase; ceramide; apoptosis.

神经鞘磷脂酶(sphingomyelinase, SMase)是一种可以作用于鞘磷脂(sphingomyelin, SM)的水解酶。SMase 可以水解质膜表面鞘磷脂的磷酸二酯键,产生神经酰胺(ceramide)和磷酸胆碱。当前,人们对 SMase 的分泌机制尚不清楚,细胞可能是通过自分泌或旁分泌方式将 SMase 释放到细胞表面,并水解细胞表面的 SM,再进一步启动初始信号的转导^[1]。SMase 的水解反应产物神经酰胺作为一种重要的第二信使,可在多种信号转导过程中发挥作用,参与多种细胞功能,如调节细胞生长、增殖、变异,引起细胞凋亡,调节蛋白质分泌,参与免疫过程及炎症反应等作用。SMase 可通过控制神经酰胺的生成过程来间接调节机体的各种生化反应。

通常,SMase 可以分为六种亚型:酸性型、分泌型、依赖 Mg^{2+} 的中性型、不依赖 Mg^{2+} 的中性型、碱性型以及同时具有磷脂酶 C 和 SMase 活性的细菌酶型^[2],这几种酶的亚细胞分布及其特性都各不相同,各自介导的信号转导机制的差异也很大。已知只有酸性和中性 SMase 参与哺乳动物细胞的信号传递。其中,人们对酸性神经鞘磷脂酶(acid sphingomyelinase, ASMase)结构和功能的研究较

多,且 ASMase 的生物学活性占 SMase 总活性的 90%。ASMase 作为 SMase 最重要的一个亚型,在辐射诱导的细胞凋亡、调节肿瘤细胞生长、参与 Fas 信号系统的传递等方面发挥着重要作用。

1 ASMase 的理化特性

最初,科学家在对尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease, NPD, 一种 SMase 缺乏病)患者体内一种溶酶体酶(该酶最适 pH 值为 4.5~5.0)缺陷的研究中首次认识了 ASMase。NPD 患者体内缺乏 SMase,导致 SM 代谢障碍,SM 在全身的单核-巨嗜细胞系及神经组织中大量堆积,形成大量含有 SM 的泡沫细胞,逐步出现肝、脾肿大,中枢神经系统退行性病变等。人和鼠的 ASMase 基因高度同源,在遗传学意义上极为相似。剔除小鼠的 ASMase 基因,可在小鼠体内发生与人类似的 NPD,患鼠寿命大为缩短。由此,引起了生命科学界对 SM,主要是对 ASMase 的重视。

ASMase 是相对分子质量为 64 000 的可溶性糖蛋白,其编码基因位于 11p15.1~15.4,长约 5kb,有 6 个外显子,编码产物由 627 个氨基酸残基构成。ASMase 主要分布于溶酶体,并参与细胞膜的翻转过程^[3]。在 pH 小于 5 的环境中,ASMase 的生

物学活性最高,因此它最适于处在酸性的环境,如溶酶体中。ASMase 在一定的外源刺激下能快速活化,释放到细胞表面,水解细胞膜上的 SM,导致神经酰胺水平在数秒到数分钟内迅速上升。巨噬细胞、纤维母细胞和内皮细胞都能分泌大量的 ASMase,而且 Zn^{2+} 可促进 ASMase 的分泌^[1]。内皮细胞中 ASMase 量非常高,为其他细胞中 ASMase 量的 20 倍左右。

人 ASMase 可在中国仓鼠卵巢细胞中实现克隆表达,也可在大肠杆菌及昆虫 Sf21 细胞中实现表达。选择性破坏小鼠 ASMase 基因的外显子,可制得 ASMase 基因缺陷小鼠模型。目前研究 ASMase 时应用较多的细胞是 ASMase 基因剔除鼠细胞和 NPD 细胞。

2 ASMase 抑制剂和表达诱导剂

无机磷酸盐及 AMP 是 ASMase 的非竞争性抑制剂。3, 4, 5-三磷酸磷脂酰肌醇抑制 ASMase 的能力比酸性溶血磷脂及 4, 5-二磷酸磷脂酰肌醇更强,在培养的细胞中加入三磷酸磷脂酰肌醇可以抑制 50% 的 ASMase 活性,但不会抑制其他的溶酶体水解酶。肿瘤抑制剂 PTEN (phosphatase and tensin homolog protein) 可抑制三磷酸磷脂酰肌醇水解为二磷酸磷脂酰肌醇的过程,利用 PTEN 转染人少突神经胶质瘤细胞,ASMase 活性可以增加 2 倍;此外,磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3-kinase) 抑制剂渥曼青霉素 (wortmannin) 可降低三磷酸磷脂酰肌醇水平,也可影响 ASMase 活性;细胞膜稳定剂可影响小剂量 ASMase 的活性;ASMase 还可能与受体聚集和修饰有关^[4]。氯喹和丙咪嗪是公认的 ASMase 活性抑制剂,它们抑制 ASMase 在细胞表面形成功能簇,从而抑制 ASMase 产成神经酰胺,阻止 ASMase 进一步发挥功能。莫能星 (monensin, 抗生素类药) 可抑制 ASMase, 减少受电离辐射的少突胶质细胞的凋亡反应。全反式维甲酸 (all-trans-retinoic acid, ATRA) 可激活 ASMase 基因的转录,使 ASMase 表达增高 4 倍。应用 ATRA 后 8h, ASMase 水平明显增高,24h 后达到峰值,导致神经酰胺在 NB4 细胞内堆积^[5]。总之,了解 ASMase 的抑制剂和激活剂,有利于研究 ASMase 的功能特点。

3 ASMase 的生物学功能

3.1 ASMase 与电离辐射诱导的细胞凋亡密切相关

细胞受到电离辐射后,被激活的 ASMase 由溶酶体释放到质膜,与辐射诱导凋亡有密切关系。由 A 型 NPD 患者分离的 ASMase 基因缺陷细胞可抵抗辐射诱导的神经酰胺释放,从而抑制细胞凋亡的发生,重新给予 ASMase 后细胞则会恢复辐射造成的效应。ASMase 缺陷鼠的成熟 B 细胞、内皮细胞和间质细胞都对辐射诱导的细胞凋亡有一定的抗性,为辐射诱导的细胞凋亡需要 ASMase 提供了基因学证据。ASMase 缺陷鼠的离体培养胚胎成纤维细胞可抵抗辐射,给予外源性的 ^{16}C -神经酰胺则可以逆转这种情况。有些细胞,如 $p53^{+/+}$ 的 ASMase 缺陷鼠胸腺细胞对辐射仍然敏感,在 $p53^{-/-}$ 背景下则表现为辐射抗性。这些研究表明,辐射引起的效应依赖于不同的细胞类型,由不同的机制介导。

ASMase 在辐射诱导肿瘤细胞凋亡的过程中起着重要作用。用 10Gy 的 γ 射线照射已植入纤维肉瘤的 ASMase^{-/-} 鼠及 ASMase^{+/+} 鼠,ASMase^{+/+} 鼠体内纤维肉瘤生长延迟,且可以控制 10% 肿瘤生长,但 ASMase^{-/-} 鼠体内肿瘤的生长则不受影响;移植到 ASMase^{-/-} 鼠体内的肿瘤能够完全抵抗 15Gy 照射,与未受照射鼠相比,生长速率无明显改变;植入 ASMase^{+/+} 鼠的 B16F1 黑素瘤则对 15Gy 的 γ 射线敏感,受照射后一周,肿瘤体积减少 40% 左右,表明植入 ASMase^{-/-} 鼠体内的肿瘤比 ASMase^{+/+} 鼠体内肿瘤更具抗辐射性;15Gy γ 射线照射肿瘤后 1h,ASMase^{+/+} 鼠体内的 MCA/129 纤维肉瘤内皮细胞凋亡开始显著增加,照射后 4h 可见到典型的组织变化,照射后 6~10h 内,50% 内皮细胞及 0.35% 的肿瘤细胞发生凋亡,相反 ASMase^{-/-} 鼠体内肿瘤内皮细胞则可抵抗辐射诱导凋亡,且凋亡的肿瘤细胞数量没有明显增加^[5]。20Gy γ 射线照射已超过 ASMase^{-/-} 鼠体内肿瘤抗辐射的能力,但 ASMase^{-/-} 鼠肿瘤内皮细胞的凋亡程度没有明显增加^[5]。这些都表明,ASMase 参与辐射诱导的肿瘤细胞凋亡,ASMase 存在时,肿瘤细胞对辐射敏感;缺乏 ASMase 时,肿瘤细胞对辐射具有一定的抵抗能力。

ASMase 在一定程度上可影响肿瘤的内皮细胞凋亡,从而间接地影响肿瘤对辐射的凋亡应答。对肿瘤血管分离纯化的内皮细胞进行照射后,表达 ASMase 的细胞发生凋亡,不表达 ASMase 的细胞则不发生凋亡。将正常的骨髓细胞移植入已灭活骨

髓的 ASMase 剔除鼠体内,可表达 ASMase 的细胞将重新整合入肿瘤血管,进而恢复肿瘤对辐射的敏感性;反之,将 ASMase 缺陷鼠的骨髓移植入已灭活骨髓的正常鼠会使肿瘤抵抗辐射,说明 ASMase 是辐射诱导细胞凋亡的首要目标,而且就某些细胞而言,ASMase 对辐射诱导的凋亡非常必要。辐射诱导内皮细胞凋亡造成的微血管功能异常会导致局部缺血、循环障碍等其他副作用,这将影响肿瘤细胞的生存能力,此外微血管功能异常可能会与肿瘤细胞 DNA 双链断裂共同影响肿瘤的退行性变。今后需要通过进一步研究来确定电离辐射造成肿瘤效应的各机制间存在何种关系^[5]。

电离辐射不仅激活 DNA 损伤的核内信号通路,同时还会激活质膜水平的信号通路^[6]。有些细胞电离辐射后立刻水解细胞膜上的 SM 而产生神经酰胺,并启动凋亡反应^[7]。辐射诱导神经酰胺的产生过程可分为两个阶段:受到电离辐射后数分钟之内出现的暂时性神经酰胺升高是由不依赖 DNA 损伤的 SMase 激活造成的;而电离辐射数小时后出现的第二次神经酰胺聚集则是 DNA 损伤激活合成神经酰胺的神经酰胺酶。第二阶段神经酰胺聚集也与第一次 SMase 激活有关,并在一定程度上限制了电离辐射诱导的细胞凋亡进程^[8]。

3.2 ASMase 可影响肿瘤内皮细胞和肿瘤细胞的生长

将 MCA/129 纤维肉瘤和 B16F1 黑素瘤分别移植到 ASMase^{-/-}和 ASMase^{+/+}同窝仔鼠体内,移植后,ASMase^{+/+}鼠体内 MCA/129 纤维肉瘤生长速率比 ASMase^{-/-}同窝仔鼠体内肿瘤生长速率的一半还小,移植到 ASMase^{-/-}鼠的 B16F1 黑素瘤也出现了类似生长速率不同的情况,ASMase^{-/-}鼠体内肿瘤细胞的生长能力明显高于 ASMase^{+/+}鼠体内的肿瘤;同时,相对于 ASMase^{-/-}鼠的情况,移植到 ASMase^{+/+}鼠的纤维肉瘤内皮细胞凋亡明显增加^[5]。这说明,ASMase 基因的存在与否会影响肿瘤细胞及内皮细胞的生长和凋亡,而肿瘤生长又与内皮细胞的凋亡有关,ASMase 进而又影响了肿瘤的生长。

3.3 ASMase 与 TNF- α 诱导的肝损伤有关

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 在肝细胞损伤中起着重要作用^[9]。在致死性肝炎模型鼠体内, TNF- α 诱导先造成腺苷甲硫氨酸损耗,然后是 caspase-8 和 caspase-3 激活,还会造成大面积肝损伤和鼠死亡^[10]。神经酰胺参与 TNF- α 的

信号调节, ASMase 是调节神经酰胺的重要因子,因而也参与 TNF- α 的信号调节,并在 TNF- α 诱导的肝细胞凋亡和肝损伤中起着重要作用。TNF- α 与结合在质膜上的 TNF- α 受体 1 相结合,可激活两种主要类型的 SMase: 结合在膜上依赖 Mg²⁺、最适 pH 值为 7.5 的中性 SMase; 最适 pH 值为 4.8 的酸性 SMase (即 ASMase)^[11]。

腺苷甲硫氨酸转移酶 (methionine adenosyl-transferase, MAT) 作用下合成的腺苷甲硫氨酸是主要在肝脏中合成和消耗的重要蛋白,它可为 DNA、RNA、蛋白甲基化以及谷胱甘肽的合成提供一个碳原子。此外腺苷甲硫氨酸还在线粒体内的 DNA 及 RNA 甲基化中起着重要作用,同时也是生物合成辅酶 Q 及固醇类甲基化的中间体。哺乳动物的 MAT 有 MAT I、MAT II 及 MAT III 三个类型。MAT I 和(或)MAT III 受损可造成腺苷甲硫氨酸水平的下降^[10]。剔除肝特异性 MAT1A 基因可导致肝细胞形成肿瘤以及对氧化剂损伤敏感。培养 ASMase^{-/-}的大鼠肝细胞给予外源性人胚胎 ASMase 外源性的 hASMase 通过内吞作用进入肝细胞被递送到酸性区室^[12],产生的神经酰胺可降低 MAT1A mRNA 以及 MAT I 和(或)MAT III 蛋白的水平。ASMase^{-/-}肝细胞对 TNF- α 不敏感,但对外源性的 ASMase 诱导的 MAT1A 下调有反应,说明 ASMase 可与 TNF- α 协同降低 SAM,造成肝损伤^[13]。

3.4 ASMase 可能与 Fas 介导的细胞凋亡有关

Fas 受体可通过激活 ASMase 诱导神经酰胺生成,再引起细胞凋亡。ASMase 在 Fas 介导的细胞死亡中所起作用一直是科学界争议的焦点。源自 ASMase^{+/+}和 ASMase^{-/-}鼠的胸腺细胞、刀豆球蛋白 A 激活的 T 细胞和脂多糖激活的 B 细胞对 Fas 介导的细胞死亡(在体外都可被抗 Fas 抗体或 Fas 配体激发)同样敏感。活化诱导的 T 淋巴细胞凋亡不受 ASMase 状态影响,ASMase^{-/-}鼠免疫系统也不会与 Fas 功能缺陷动物免疫系统相同。在 ASMase^{-/-}鼠体内静脉注射抗 Fas Jo2 抗体,不会影响肝细胞凋亡或致死率,而同样处理的野生型同源仔鼠则会出现大量肝细胞凋亡和动物死亡。抗 Fas 抗体水平高($\geq 4\mu\text{g}/25\text{g mouse}$)时, ASMase^{-/-}鼠也会出现肝细胞凋亡的情况^[14]。

ASMase 通过神经酰胺参与 Fas 介导的肝细胞凋亡过程。ASMase^{-/-}肝细胞无 ASMase 活性,但其

SM表达水平正常, 细胞的形态学、生化和生物特性也正常。与 ASMase^{+/+}肝细胞相比, 尽管 ASMase^{-/-}肝细胞有正常水平的 SM, 但 ASMase^{-/-}肝细胞早期阶段完全不能产生神经酰胺。ASMase^{-/-}肝细胞在受到 Fas 激活时, 神经酰胺的水平不能快速升高, 且对 Fas 介导的凋亡有明显的抗性。在应用了 Jo2(抗 Fas 抗体)后, 可出现依赖和非依赖 ASMase 的细胞凋亡。取自 ASMase^{-/-}鼠的原代培养肝细胞与取自 ASMase^{+/+}鼠的原代培养肝细胞相比, 体外抗 Fas 诱导的死亡明显不同: 给予正常剂量的神经酰胺后, ASMase^{-/-}肝细胞抑制凋亡能力减弱; 有正常的神经酰胺时, ASMase^{-/-}肝细胞没有针对 Fas 的抗凋亡作用, 正常水平的神经酰胺可以改变表现型但不改变基因型, 这说明决定凋亡的不是 ASMase, 而是神经酰胺, ASMase 通过神经酰胺调节细胞对外界刺激的反应^[15]。

3.5 ASMase 也参与细胞抗细菌感染的过程

起吞噬作用的溶酶体在抗细胞内病原体感染方面也起着重要作用。ASMase 存在于溶酶体中, 可感染早期产生的细胞因子 TNF- α 以及干扰素- γ 激活 ASMase, 产生第二信使神经酰胺。研究表明, ASMase^{-/-}鼠比野生型鼠感染致死性 *L. monocytogenes* (单核细胞增多性李斯特杆菌)的可能性要高 100 多倍; ASMase^{-/-}鼠的巨嗜细胞和粒细胞能正常产生反应性的氮介质和氧爆发, 但 ASMase^{-/-}鼠巨嗜细胞完全不能限制 *L. monocytogenes* 生长。细胞内控制 *L. monocytogenes* 需要 ASMase 的参与, 但 ASMase 不是通过控制一氧化氮、活性氧中间体或分泌细胞因子起作用的, ASMase 参与溶酶体内抗感染可能是通过产生神经酰胺, 再由神经酰胺激活蛋白酶如组织蛋白酶 D 起作用的^[16]。

综上所述, ASMase 参与和调节多项生物学功能, 主要是通过神经酰胺参与对细胞的生长、辐射诱导凋亡、细菌感染、信号传递等。在对肿瘤患者实施放疗的过程中, 通过调节细胞内 ASMase 的水平可控制受照射细胞的凋亡和生长; 增强肿瘤细胞对辐射的敏感性; 降低正常细胞内的 ASMase 水平则可提高正常细胞对辐射的抵抗能力。

随着国内外对 SMase 研究的进一步深入, 人类将会对它的生物学特性和生物学机制了解得更为透彻, 进而使得 ASMase 及其相关技术在医学领域中的应用更加广阔。

参 考 文 献

- 1 Marathe S, Miranda SR, Tabas I, et al. Creation of a mouse model for non-neurological (type B) Niemann-Pick disease by stable, low level expression of lysosomal sphingomyelinase in the absence of secretory sphingomyelinase: relationship between brain intra-lysosomal enzyme activity and central nervous system function[J]. *Hum Mol Genet*, 2000, 9(13): 1967-1976.
- 2 Goñi FM, Alonso A. Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity[J]. *FEBS Letter*, 2002, 531 (1): 38-46.
- 3 Murate T, Susuki M, Hattori M, et al. Up-regulation of acid sphingomyelinase during retinoic acid-induced myeloid differentiation of NB4, a human acute promyelocytic leukemia cell line[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(12): 9936-9943.
- 4 Testai FD, Landek, Goswami R. Acid sphingomyelinase and inhibition by phosphate ion: role of inhibition by phosphatidyl-myo-inositol 3,4,5-triphosphate in oligodendrocyte cell signaling [J]. *J Neurochem*, 2004, 89(3): 636-644.
- 5 Garcia-Barros M, Paris F, Cordon-Cardo C, et al. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis[J]. *Science*, 2003, 300(5622): 1155-1159.
- 6 Watters D. Molecular mechanism of ionizing radiation induced apoptosis[J]. *Immunol Cell Biol*, 77(3): 263-271.
- 7 Haimovitz-Friedman A, Kan CC, Ehleiter D, et al. Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis[J]. *J Exp Med*, 1994, 180(2): 525-535.
- 8 Vit JP, Rosselli F. Role of the ceramide-signaling pathways in ionizing radiation-induced apoptosis[J]. *Oncogene*, 2003, 22(54): 8645-8652.
- 9 Bird GL, Sheron N, Goka AK, et al. Increased plasma tumor necrosis factor in severe alcoholic hepatitis[J]. *Ann Intern Med*, 1990, 112(12): 917-920.
- 10 Mato JM, Alvarez L, Ortiz P, et al. S-adenosylmethionine synthesis: molecular mechanisms and clinical implications[J]. *Pharmacol Ther*, 1997, 73(3): 265-280.
- 11 Kolesnick RN, Kronke M. Regulation of ceramide production and apoptosis[J]. *Ann Rev Physiol*, 1998, 60: 643-665.
- 12 Garcia-Ruiz C, Mari M, Morales A, et al. Human placenta sphingomyelinase, an exogenous acidic pH-optimum sphingomyelinase, induces oxidative stress, glutathione depletion, and apoptosis in rat hepatocytes[J]. *Hepatology*, 2000, 32(1): 56-65.
- 13 Mari M, Colell A, Morales A, et al. Acidic sphingomyelinase downregulates the liver-specific methionine adenosyltransferase 1A, contributing to tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis[J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(6): 895-904.
- 14 Lin T, Genestier L, Pinkoski MJ, et al. Role of acidic sphingomyelinase in Fas/CD95-mediated cell death[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(12): 8657-8663.
- 15 Paris F, Grassme H, Cremesti A, et al. Natural ceramide reverses fas resistance of acid sphingomyelinase^{-/-} hepatocytes[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(11): 8297-8305.
- 16 Utermohlen O, Karow U, Lohler J, et al. Severe impairment in early host defense against listeria monocytogenes in mice deficient in acid sphingomyelinase[J]. *J Immunol*, 2003, 170(5): 2621-2628.