

神经酰胺的凋亡效应在恶性肿瘤治疗中的作用

孙传玉(综述) 徐 可 夏国伟 丁 强[△](审校)
(复旦大学附属华山医院泌尿外科 上海 200040)

【摘要】 神经鞘脂(sphingolipid)是生物膜脂质类的一个家族,它在调节脂质双分子层的流动性和亚结构域方面发挥着重要作用。神经酰胺(ceramide)作为神经鞘脂代谢的核心分子起着第二信使的作用,可介导细胞凋亡、分化、生长抑制等多种生物效应。细胞内神经酰胺浓度降低和恶性肿瘤抗凋亡机制之间的联系越来越密切,因此增加内源性神经酰胺浓度或外源性类似物(模拟神经酰胺活性)可以逆转肿瘤的耐药性,并为恶性肿瘤治疗提供全新方法。
【关键词】 神经酰胺; 恶性肿瘤; 凋亡; 治疗
【中图分类号】 R 73-36⁺ 2 **【文献标志码】** B

Apoptotic effect of ceramide on the treatment of malignant tumour

SUN Chuan-yu, XU Ke, XIA Guo-wei, DING Qiang[△]
(Department of Urology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Sphingolipids are a family of membrane lipids with important structural roles in the regulation of the fluidity and subdomain structure of the lipid bilayer. As a central molecule in sphingolipid metabolism, ceramide induces many biological effects including cell apoptosis, differentiation and growth inhibition. Attenuation of ceramide levels is increasingly implicated in anti-apoptotic mechanism of malignant tumour, so inducing endogenous ceramide accumulation or mimicking its actions by exogenous ceramide analogue could present a novel therapeutic modality for the treatment of malignant tumour including the reversal of drug resistance.
【Key words】 ceramide; malignant tumour; apoptosis; therapy

神经鞘脂(sphingolipid)是生物膜脂质类的一个家族,它在调节脂质双分子层的流动性和亚结构域方面发挥着重要作用。神经酰胺(ceramide)作为神经鞘脂代谢的核心分子由脂肪酸和鞘氨醇通过酰胺键连接而成,不仅参与生物膜的构成,而且发挥第二信使的作用。神经酰胺主要是通过调节磷酸酶和激酶等特异性靶蛋白构成的多种信号传导通路,例如AKT、磷脂酶D、蛋白激酶C(PKC)和丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs),介导肿瘤细胞生长、分化、衰老和凋亡^[1]。神经酰胺发挥的效应实际上起着肿瘤抑制剂的作用,因此本文主要综述神经酰胺代谢及其凋亡效应在恶性肿瘤治疗中的作用。

神经酰胺的代谢

神经酰胺的生成 神经酰胺作为神经鞘脂代谢的核心分子可以通过多种途径生成,其主要的生成方式是“从头合成途径”及“鞘磷脂循环”^[2]。从头合成途径是指丝氨酸和软脂酰-CoA在丝氨酸软脂酰转移酶作用下形成3-酮基双氢鞘氨醇,然后在还原酶的作用下转变成双氢鞘氨醇,再经神经

酰胺合酶作用与长链脂肪酸酰-CoA生成双氢神经酰胺,最后脱氢而转变为神经酰胺。另一种途径是通过鞘磷脂酶水解鞘磷脂生成神经酰胺,而水解过程中产生的另一种产物磷酸胆碱又可以在神经酰胺胆碱磷酸转移酶作用下与神经酰胺合成鞘磷脂,因此这个过程又被称为“鞘磷脂循环”。该途径中鞘磷脂酶可分为几个亚型,即中性、酸性及碱性鞘磷脂酶。

神经酰胺的分解与转化 神经酰胺一经生成就会转化为其他代谢产物:神经酰胺在神经酰胺激酶作用下磷酸化后生成神经酰胺-1-磷酸;在葡萄糖酰鞘氨醇合成酶的作用下神经酰胺糖基化而转化成葡萄糖酰鞘氨醇,然后经高尔基体中各种酶的修饰,形成复杂的鞘糖脂;通过鞘磷脂合成酶转移磷脂酰胆碱的磷酸胆碱基团到神经酰胺,生成鞘磷脂和二酰甘油;神经酰胺在神经酰胺酶的作用下脱酰基为鞘氨醇,然后经鞘氨醇激酶的作用生成鞘氨醇-1-磷酸。与神经酰胺的作用相反,鞘氨醇-1-磷酸是介导细胞增殖、炎症反应、血管增生和抗凋亡的关键分子^[3]。神经鞘脂代谢的诸多通路交织成网络,这个网络不仅调节单一生物活性分子的浓度,还调节

[△]Corresponding author E-mail: zhugexianglong@163.com

它们之间的相互转化并使之最终达到平衡。而神经酰胺代谢途径的诸多关键酶在调控细胞中神经酰胺的含量和维持神经鞘脂代谢平衡方面起着重要作用。

神经酰胺的凋亡效应 凋亡是指一系列介导细胞程序性死亡的生化反应,许多恶性肿瘤的发病与抗凋亡有关,这包括抗凋亡基因的过度表达(如 Bcl-2)或促凋亡基因的隐性突变(如 P53)。所以,恶性肿瘤的抗凋亡特性可以抵抗严重的 DNA 损伤、不利环境以及细胞毒性药物的作用。很多研究支持神经酰胺在介导肿瘤细胞对细胞凋亡诱导因素的反应中具有重要作用,这些诱导因素包括 Fas/Fas 配体、TNF- α 、生长因子缺乏、缺氧、高温、化疗药物、电离辐射及 DNA 损伤^[4]。这些刺激因素通过前述的代谢关键酶调节神经酰胺生成和分解的一条或多条通路诱导神经酰胺的累积。

从头合成通路 Eto 等^[5]发现,雄激素剥夺促进前列腺癌 LNCaP 细胞中 C16-神经酰胺的从头合成,这一过程可被神经酰胺合酶的抑制剂曲霉毒素 B1 阻断,这种神经酰胺的累积促进细胞进入 G₀/G₁ 静止阶段并最终导致凋亡。Kroesen 等^[6]研究发现,B 细胞受体诱导的淋巴细胞凋亡过程中存在着特异性从头合成途径从而高度选择性地导致 C16-神经酰胺浓度升高的现象,所以抑制神经酰胺的合成可以阻止 B 细胞受体诱导的凋亡,后者是线粒体改变(膜电位丧失、caspase 激活等)诱导细胞凋亡的上游步骤。神经酰胺的从头合成也可出现在柔红霉素、依托泊甙等多种化疗药物诱导肿瘤细胞的凋亡反应中^[7-8]。利用液相色谱仪对神经酰胺特定分子类型的鉴定揭示了从头合成途径中 C16-神经酰胺的选择性生成,提示 C16-神经酰胺是这一途径的潜在标志。更重要的是,这一途径特异性诱导 SR 蛋白去磷酸化,此类蛋白是一个丝氨酸/精氨酸结构域蛋白家族,它们被认为是 mRNA 剪接的调节剂,进一步通过蛋白磷酸酶 1 的激活诱导编码 Bcl-X 和 caspase-9 的基因转录产物剪接,这清楚地证实了神经酰胺从头合成通路的特异性功能^[9]。

鞘磷脂酶通路 神经酰胺的生成机制与鞘磷脂酶的激活也有关系,鞘磷脂酶同样参与调节凋亡反应。酸性鞘磷脂酶与紫外线 A 诱导的人类 JY 淋巴母细胞凋亡有关,而酸性鞘磷脂酶基因缺失的尼曼-皮克病患者的淋巴母细胞则可耐受紫外线 A^[10]。研究表明,通过抑制神经酰胺合酶或中性酸性鞘磷脂酶不能影响到紫杉醇对人类卵巢癌 CABA I 细胞的凋亡作用,凋亡过程中神经酰胺水平的升高是由酸性鞘磷脂酶水解所产生^[11]。TNF- α 诱导 HeLa 细胞系凋亡的过程中,部分性依赖活性酸性鞘磷脂,后者可导致内溶酶体组织蛋白 D 活化,进而引发前凋亡蛋白 Bid 介导的 caspase-9 和 caspase-3 活化,从而将溶酶体的功能与线粒体介导的凋亡途径相连接^[12]。

通过抑制剂或 RNA 干扰技术抑制中性鞘磷脂酶的实验也提示,这种酶也调节着诸如 TNF- α 对乳腺癌细胞、乙醇对 HepG2 肝癌细胞以及阿尔兹海默促凋亡 β -淀粉样肽对神经元等多种刺激因素下的细胞凋亡^[13-15]。Testai 等^[16]指出,中性鞘磷脂酶分解来源的神经酰胺参与了星孢菌素诱导的多种神经元肿瘤细胞系的细胞凋亡过程。

神经酰胺酶 神经酰胺酶调节神经酰胺的浓度并进一步调控细胞凋亡反应,例如一氧化氮诱导中性神经酰胺酶减

少,从而诱导神经酰胺累积,进而引起细胞死亡^[17]。相对于前列腺癌旁组织,酸性神经酰胺酶在 60% 前列腺癌组织中过度表达,而且随着 Gleason 评分的增加,表达也增加。酸性神经酰胺酶表达增加有助于前列腺癌细胞的生长,改变癌细胞增殖和凋亡的平衡,导致前列腺癌进展^[18]。

多条通路并存 即使在同一类型的细胞中,有些刺激因素也可能通过不止一种机制调节神经酰胺的含量,这一点已在 TNF- α 处理 MCF-7 乳腺肿瘤细胞的研究中被证实^[13]。中性鞘磷脂酶途径和从头合成途径在神经酰胺的产生过程中互不依赖,而且拥有各自不同的动力学特点。选择性抑制其中一条途径可调节细胞对 TNF- α 特定的凋亡反应,例如中性鞘磷脂酶途径产生的神经酰胺与细胞色素 C 逸出和 caspase-9 活化有关。与之相似,与 Fas 相关的凋亡反应可激活从头合成、中性鞘磷脂酶及酸性鞘磷脂酶途径,每一条途径可触发一种独特的神经酰胺相关反应,例如酸性鞘磷脂酶的活化与细胞膜特定位点 Fas 受体配体复合物的聚集有关,这对下游信号的进一步传导具有重要意义^[19]。

对恶性肿瘤治疗的作用 由于神经酰胺介导上述的凋亡效应,神经酰胺的生成和累积可能是阻断肿瘤活化和生长的关键机制。所以,通过调节神经酰胺代谢途径的关键酶或者模拟神经酰胺增加神经酰胺浓度可以增强药物作用、克服耐药性、保护细胞毒性药物作用下的正常细胞,为治疗恶性肿瘤提供全新的方法。

神经酰胺代谢酶调节剂或模拟神经酰胺 神经酰胺调控细胞生长以及调节化疗药物诱导细胞死亡的作用提示,增加内源性神经酰胺的浓度和/或模拟其活性可以作为新的治疗方式。例如,酸性神经酰胺酶抑制剂 B13 可通过诱导神经酰胺累积促进前列腺癌动物模型中细胞凋亡,从而起到阻止肿瘤生长的作用^[20]。此外,鞘磷脂合酶抑制剂 D609 可诱导多种人类癌细胞凋亡和/或生长暂停^[21]。葡糖酰鞘氨醇合成酶抑制剂既可以直接诱导细胞凋亡,又可与经典化疗药物协同作用。因此,可以将神经酰胺代谢酶作为靶点,开发新药,提高内源性神经酰胺的浓度,加强肿瘤细胞对细胞毒性药物的反应。

此外,神经酰胺的类似物(如 C2 或 C6 神经酰胺)通常可直接激活神经酰胺的靶点(如神经酰胺相关蛋白磷酸酶),从而诱导多种癌细胞的死亡^[22]。新型神经酰胺结构类似物如 C16-丝氨酸和 4,6-双烯-神经酰胺也可模拟神经酰胺,分别介导神经母细胞瘤细胞和乳腺癌细胞的凋亡^[23]。其他神经酰胺类似物如 5R-OH-3E-C8-神经酰胺、硬脂酸神经酰胺和苯-C4-神经酰胺,相对于正常乳腺上皮细胞对耐药人类乳腺癌细胞系(SKBr3 和 MCF-7/Adr)表现出选择性细胞毒性^[24]。

如何将神经酰胺或其类似物更有效地转移入细胞以提高其特异性和有效性的方法已经引起越来越多的关注。通过阳离子聚乙二醇脂质体转运神经酰胺可以使其更好地通过细胞膜,从而提高胞内神经酰胺的浓度,进而提高杀灭癌细胞的能力。实验中,通过脂质体转运的外源性天然神经酰胺与不使用脂质体转运的神经酰胺相比,其抑制 AKT 磷酸化和激活 caspase-3/7 的效果更强^[25]。这些基础研究让人们看到了开发更有效、更高选择性神经酰胺类似物的可行性。

神经酰胺与肿瘤耐药性 肿瘤细胞对化疗药物的耐药性是临床治疗失败的重要原因,有文献指出这与神经酰胺累积量不足有关。增加葡萄糖酰鞘氨醇合成酶的活性可降低神经酰胺的浓度,从而促进白血病、乳腺癌、黑色素瘤和神经母细胞瘤等多种人类癌细胞产生对多种化疗药物的耐药性^[26]。Liu等^[27]研究发现,葡萄糖酰鞘氨醇合成酶的过度表达可诱导乳腺癌 MCF-7 细胞对阿霉素的耐药性。相反,使用反义寡脱氧核糖核苷酸或葡萄糖酰鞘氨醇合成酶抑制剂处理耐药多乳癌 MCF-7/Adr 细胞可加强神经酰胺的作用,从而恢复这些细胞系对阿霉素、紫杉醇和依托泊甙的敏感性^[27-28]。

研究进一步发现了葡萄糖酰鞘氨醇合成酶与 P-糖蛋白之间联系的机制,后者是一种与耐药有关的 ABC 转运蛋白,很多能够逆转耐药性的药物如三苯氧胺、维拉帕米、环孢菌素 A 等可阻断或竞争 P-糖蛋白药物泵作用从而改变葡萄糖酰鞘氨醇的浓度^[27-28]。P-糖蛋白阻断剂可能是通过抑制葡萄糖酰鞘氨醇合成酶或抑制 P-糖蛋白减少葡萄糖神经酰胺的转移而发挥作用的。ABC 转运蛋白的一些成员与磷脂和神经鞘脂的跨膜转运有关,而 P-糖蛋白被认为是特异性的葡萄糖神经酰胺转运体,后者是葡萄糖酰鞘氨醇合成酶的催化产物。P-糖蛋白将这些分子转运至高尔基体膜,使之参与合成中性鞘糖脂。研究已经发现,乳腺癌、卵巢癌和皮肤癌等 P-糖蛋白过度表达的多种癌细胞中存在鞘糖脂的过度堆积,从而证实了上述假说^[29]。所以,P-糖蛋白和葡萄糖酰鞘氨醇合成酶可能均作用于神经酰胺/葡萄糖酰鞘氨醇代谢的途径。

这些结果提示,葡萄糖酰鞘氨醇合成酶抑制剂可能成为化疗药物或者药物增敏剂。葡萄糖酰鞘氨醇合成酶抑制剂 OGT2378 可抑制同系原位鼠类模型中黑色素瘤的生长,而不产生明显的毒性反应^[30]。另外,联合使用多种葡萄糖酰鞘氨醇合成酶抑制剂,如 PPMP 与沙芬戈或 4-HPR 等药物合用,可通过增加神经酰胺累积量发挥协同作用,抑制多种人类肿瘤细胞系的生长,如神经母细胞瘤、黑色素瘤、前列腺癌、肺癌、结肠癌、乳腺癌和胰腺癌细胞^[31]。因此,葡萄糖酰鞘氨醇合成酶是新型逆转耐药性药物的一个前景广阔的研究靶点。

结 语 生物活性神经鞘脂调控多种重要生命活动的作用已受到越来越多的关注,这些神经鞘脂与大多数恶性肿瘤的发病机制与治疗紧密地联系起来。神经酰胺作为神经鞘脂代谢的核心分子起着第二信使的作用,可介导恶性肿瘤细胞的凋亡,具有肿瘤抑制功能。研究已表明,多种恶性肿瘤存在神经酰胺浓度调节机制及其代谢酶类的表达异常,因此小分子神经酰胺类似物和神经酰胺代谢酶抑制剂的研发已成为恶性肿瘤的治疗提供了新的靶点和治疗方略。随着对神经酰胺及其下游信号传导通路研究的深入,将有助于恶性肿瘤发病机制、进展、转移、治疗和预防的进一步研究。

参 考 文 献

[1] 金道忠,朱兴族.神经酰胺代谢及凋亡信号调节[J].生命科学,2006,18(5):481-486.
[2] Sultan I, Senkal CE, Ponnusamy S, et al. Regulation of the sphingosine recycling pathway for ceramide generation by oxidative stress, and its role in controlling c2Myc/Max

function[J]. *Biochem J*, 2006, 393(2):513-521.

- [3] Tani M, Ito M, Igarashi Y. Ceramide/sphingosine/sphingosine-1-phosphate metabolism on the cell surface and in the extracellular space[J]. *Cell Signal*, 2007, 19(2):229-237.
[4] Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585(2-3):114-125.
[5] Eto M, Bennouna J, Hunter OC, et al. Importance of C16 ceramide accumulation during apoptosis in prostate cancer cells[J]. *Int J Urol*, 2006, 13(2):148-156.
[6] Kroesen BJ, Pettus B, Luberto C, et al. Induction of apoptosis through B-cell receptor cross-linking occurs via de novo generated C16-ceramide and involves mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(17):13 606-13 614.
[7] Bose R, Verheij M, Haimovitz-Friedman A, et al. Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals[J]. *Cell*, 1995, 82(3):405-414.
[8] Perry DK, Carton J, Shah AK, et al. Serine palmitoyltransferase regulates de novo ceramide generation during etoposide-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(12):9 078-9 084.
[9] Chalfant CE, Ogretmen B, Galadari S, et al. Fas activation induces dephosphorylation of SR proteins; dependence on the de novo generation of ceramide and activation of protein phosphatase 1[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(48):44 848-44 855.
[10] Zhang Y, Mattjus P, Schmid PC, et al. Involvement of the acid sphingomyelinase pathway in uva-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(15):11 775-11 782.
[11] Prinetti A, Millimaggi D, D'Ascenzo S, et al. Lack of ceramide generation and altered sphingolipid composition are associated with drug resistance in human ovarian carcinoma cells[J]. *Biochem J*, 2006, 395(2):311-318.
[12] Heinrich M, Neumeyer J, Jakob M, et al. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(5):550-563.
[13] Luberto C, Hassler DF, Signorelli P, et al. Inhibition of tumor-necrosis factor-induced cell death in MCF-7 by a novel inhibitor of neutral sphingomyelinase[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(43):41 128-41 139.
[14] Lee JT, Xu J, Lee JM, et al. Amyloid- β -peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway[J]. *J Cell Biol*, 2004, 164(1):123-131.
[15] Liu JJ, Wang JY, Hertervig E, et al. Activation of neutral sphingomyelinase participates in ethanol-induced apoptosis in HepG2 cells[J]. *Alcohol Alcohol*, 2000, 35(6):569-573.
[16] Testai RD, Landek MA, Dawson G. Regulation of sphingomyelinases in cells of the oligodendrocyte lineage[J]. *J Neurosci Res*, 2004, 75(1):66-74.
[17] Franzen R, Fabbro D, Aschrafi A, et al. Nitric oxide induces degradation of the neutral ceramidase in rat renal mesangial cells and is counterregulated by protein kinase C[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(48):46 184-46 190.
[18] Saad AF, Meacham WD, Bai A, et al. The functional effects of acid ceramidase overexpression in Prostate Cancer Progression and Resistance to Chemotherapy[J]. *Canc Biol Ther*, 2007, 6(9):1 455-1 460.

- [19] Cremesti A, Paris F, Grassme H, *et al.* Ceramide enables Fas to cap and kill[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(26): 23 954 – 23 961.
- [20] Samsel L, Zaidel G, Drumgoole HM, *et al.* The ceramide analog, B13, induces apoptosis in prostate cancer cell lines and inhibits tumor growth in prostate cancer xenografts[J]. *Prostate*, 2004, 58(4): 382 – 393.
- [21] Meng A, Luberto C, Meier P, *et al.* Sphingomyelin synthase as a potential target for D609-induced apoptosis in U937 human monocytic leukemia cells[J]. *Exp Cell Res*, 2004, 292(2): 385 – 392.
- [22] Radin NS. Killing tumours by ceramide-induced apoptosis: a critique of available drugs[J]. *Biochem J*, 2003, 371(2): 243 – 256.
- [23] Bieberich E, Hu B, Silva J, *et al.* Synthesis and characterization of novel ceramide analogs for induction of apoptosis in human cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2002, 181(1): 55 – 64.
- [24] Crawford KW, Bittman R, Chun J, *et al.* Novel ceramide analogs display selective cytotoxicity in drug-resistant breast tumor cell lines compared to normal breast epithelial cells[J]. *Cell Mol Biol*, 2003, 49(7): 1 017 – 1 023.
- [25] Stover T, Kester M. Liposomal delivery enhances short-chain ceramide-induced apoptosis of breast cancer cells [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(2): 468 – 475.
- [26] Bleicher RJ, Cabot MC. Glucosylceramide synthase and apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1 585(2): 172 – 178.
- [27] Liu YY, Han TY, Giuliano AE, *et al.* Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance[J]. *FASEB J*, 2001, 15(3): 719 – 730.
- [28] Liu YY, Han TY, Yu JY, *et al.* Oligonucleotides blocking glucosylceramide synthase expression selectively reverse drug resistance in cancer cells[J]. *J Lipid Res*, 2004, 45(5): 933 – 940.
- [29] Lavie Y, Cao H, Bursten SL, *et al.* Accumulation of glucosylceramides in multidrug-resistant cancer cells [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(32): 19 530 – 19 536.
- [30] Weiss M, Hettmer S, Smith P, *et al.* Inhibition of melanoma tumor growth by a novel inhibitor of glucosylceramide synthase[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(13): 3 654 – 3 658.
- [31] Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4(8): 604 – 616.

(收稿日期: 2009-12-22; 编辑: 段佳)