

## 中性鞘磷脂酶-2 的调控机制与功能研究进展

张 澜, 郭 军

南京医科大学基础医学实验教学中心, 南京 210029

通信作者: 郭 军 电话: 025-86862882, 电子邮件: Guoj69@yahoo.com.cn

**摘要:** 中性鞘磷脂酶-2 主要分布于哺乳动物细胞质膜, 能水解神经鞘磷脂生成神经酰胺, 参与细胞凋亡、生长抑制、炎症反应等多种生理病理活动调节, 并与阿尔茨海默病的发展、骨骼生长有关。在生理 pH 值和钙、镁、锰阳离子环境下, 氧化应激能诱导中性鞘磷脂酶-2 磷酸化调节其活性, 鞘磷脂等阴离子脂质以及受体活化的蛋白激酶 C1/胚胎外胚层发展蛋白等信号分子的诱导结合也是其活性的重要调节途径。本文主要综述中性鞘磷脂酶-2 的结构、功能及其分子机制, 揭示其当前研究进展。

**关键词:** 中性鞘磷脂酶-2; 功能; 调控机制

中图分类号: Q556 文献标志码: A 文章编号: 1000-503X(2013)05-0581-05

DOI: 10.3881/j.issn.1000-503X.2013.05.018

## Advance in Research on Regulatory Mechanism and Functions of Neutral Sphingomyelinase 2

ZHANG Lan, GUO Jun

Laboratory Center for Basic Medical Sciences, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Corresponding author: GUO Jun Tel: 025-86862882, E-mail: Guoj69@yahoo.com.cn

**ABSTRACT:** Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2), which located mainly on the plasma membrane, hydrolyzes sphingomyelin into ceramide and plays an important role in the physiological and pathological regulation of cell apoptosis, cell growth arrest, and inflammation. nSMase2 is also involved in the development of Alzheimer's disease and the bone growth. Under neutral pH and the presence of  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ , and  $Mn^{+}$ , the activity of nSMase2 is induced by oxidative stress through phosphorylation. Furthermore, the induced interaction of anionic phospholipids and the signaling molecules like receptor for activated C-kinase 1/embryonic ectodermal development with nSMase2 are also crucial mechanisms of protein activation. In the review, recent research advances in the structure and function of nSMase2 and its underlying mechanisms are summarized.

**Key words:** neutral sphingomyelinase 2; function; mechanism

*Acta Acad Med Sin*, 2013,35(5):581-585

中性鞘磷脂酶是神经鞘磷脂水解酶家族的重要成员, 区别于酸性和碱性鞘磷脂酶, 生理条件 (pH7.4) 是其激活的最适环境<sup>[1]</sup>。已识别中性鞘磷脂酶家族有 3 个成员分布于哺乳动物体内, 中性鞘磷脂酶-1 主要定位于核基质、内质网等细胞器; 中性鞘磷脂酶-3 主要分布于心肌、条纹肌细胞内质网和高尔基复合体中<sup>[2]</sup>, 而中性鞘磷脂酶-2 广泛存在于细胞质膜的胞浆

面<sup>[3]</sup>, 通过水解神经鞘磷脂调控胞内第二信使神经酰胺水平, 参与细胞的应激、生长、分化和凋亡过程的调控<sup>[2]</sup>。

### 中性鞘磷脂酶-2 的结构与定位

中性鞘磷脂酶-2 由 655 个氨基酸组成, 相对分子

质量约 71 000, 它包括 1 个 C 端催化区、2 个 N 端疏水区、1 个由 200 氨基酸残基组成的胶原样结构域和  $Mg^{2+}$  结合位点。目前对其胶原样结构域的功能尚不清楚<sup>[4]</sup>。此外, C 端和 N 端均有磷酸化位点, 其磷酸化水平与中性鞘磷脂酶-2 的生物学活性密切相关。

催化区包含 1 个 P-环 (P-loop-like domain, PLL 区域) 和 1 个与蛋白质相互作用的结构域<sup>[2]</sup>。前者又称沃克环路 A 循环结构域, 包含 GxxGxGK [T/S] (G: 甘氨酸; K: 赖氨酸; T: 苏氨酸; S: 丝氨酸残基; X: 任意氨基酸) 序列。在中性鞘磷脂酶-2 中, PLL 区常位于两个高度保守残基天冬氨酸-428 和赖氨酸-433 附近, 可在赖氨酸协同下使中性鞘磷脂酶-2 与核苷酸结合。点突变研究显示, PLL 的突变体对  $Mg^{2+}$  具有更强的亲和力, 揭示 PLL 区在催化过程中需要 2 价阳离子的协调作用<sup>[1]</sup>。中性鞘磷脂酶晶体结构分析表明, PLL 为结构高度多变的区域, 因此, PLL 具有“瓶盖”作用, 开启后, 有助于底物与催化部位的结合。PLL 在与底物识别的过程中, 具有较高的选择性, 能诱导鞘磷脂或少数其他底物 (如酵母中的肌醇磷酸甘油酯) 进入活性区域。此外, PLL 也能通过转导阴离子鞘磷脂 (anionic phospholipids, APL) 结合到催化区来调控催化活性<sup>[1]</sup>。

最初研究认为 N 端疏水区是跨膜区域, 而酶拓扑学研究揭示其疏水区仅插入细胞膜。同时, 突变研究揭示两个疏水端 N 端能发生棕榈酰化 (棕榈酰化只发生在质膜胞浆面), 证实其 N 端疏水区并非跨膜结构<sup>[2]</sup>。中性鞘磷脂酶-2 的棕榈酰化对其稳定及质膜定位均有重要作用。在特定的刺激下 [如肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)  $-\alpha$ 、 $H_2O_2$ ], 中性鞘磷脂酶-2 膜转位增加, 提示其高尔基体输出对膜功能调节有重要作用<sup>[2]</sup>。

## 中性鞘磷脂酶-2 水解神经鞘磷脂的 分子调控机制

中性鞘磷脂酶家族酶活性依赖于中性 pH 和阳离子环境<sup>[5]</sup>。中性鞘磷脂酶-2 作为一种磷蛋白<sup>[6]</sup>, 其活性受磷酸化、脂质结合及信号蛋白结合等多种途径调控。已证实  $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$  等阳离子在调节中性鞘磷脂酶-2 活性发挥重要作用。同时, 研究显示  $Ca^{2+}$  通过使磷脂酶 A2 和神经酰胺激酶在细胞间积聚的增多, 诱导中性鞘磷脂酶-2 水解生成更多的神经酰胺。且当钙离子浓度在 0.1 ~ 1.0  $\mu\text{mol/L}$  时诱导中性鞘磷脂酶-2

的过度表达, 并呈现出两个钙离子依赖性的表达高峰 ( $10^{-7}$  ~  $10^{-6}$  mol/L 和  $10^{-3}$  mol/L)<sup>[7]</sup>, 其精确调控机制尚不清楚。

过氧化氢、烟草烟雾等氧化应激能通过激活上游调控介质 p38 丝裂原活化蛋白激酶和蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 诱导中性鞘磷脂酶-2 磷酸化继而上调其活性<sup>[6]</sup>。中性鞘磷脂酶-2 存在 5 个特定的磷酸化位点, 其中, 丝氨酸-173、丝氨酸-208 位于 CaN 结合位点附近, 而丝氨酸-289、丝氨酸-292 和丝氨酸-299 则聚集在催化区域之前。丝氨酸-173、丝氨酸-289、丝氨酸-292 和丝氨酸-299 被证实与中性鞘磷脂酶-2 的激活有关, 而丝氨酸-208 则与稳定性相关。5 个磷酸化位点间存在相互正性或负性调控的现象<sup>[8]</sup>。钙调磷蛋白磷酸酶作为一种  $Ca^{2+}$ /钙调素依赖性的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶, 被证实与中性鞘磷脂酶-2 的去磷酸化密切相关。首先, 激活的钙调磷蛋白磷酸酶能通过其 PXLXIT 序列与中性鞘磷脂酶-2 的 PQIKIY 序列相结合, 直接诱导中性鞘磷脂酶-2 去磷酸化而抑制其活性。其次,  $H_2O_2$  通过氧化的二硫键修饰丝氨酸-173/208 残基从而抑制钙调磷蛋白磷酸酶与中性鞘磷脂酶-2 的相互作用, 继而上调中性鞘磷脂酶-2 磷酸化水平及其活性<sup>[6]</sup>。

磷酸化作用不仅参与中性鞘磷脂酶-2 的活性调控, 还被认为与中性鞘磷脂酶-2 的表达增强有关。在人类乳腺癌细胞中, 全反式维甲酸能激活 PKC $\delta$ , 引起启动子 Sp1 区域的磷酸化, 通过重建染色质构象而加速其转录, 上调中性鞘磷脂酶-2 的 mRNA 水平, 继而引起中性鞘磷脂酶-2 及其下游产物神经酰胺含量的升高。而全反式维甲酸抑制剂卡马拉素能拮抗其诱导的中性鞘磷脂酶-2 的 mRNA 水平升高, 进一步验证上述结论<sup>[9]</sup>。此外, PKC 家族的 PKC $\delta$  和 PKC $\zeta$  也被识别参与了中性鞘磷脂酶-2 活性和神经酰胺水平的调控<sup>[10]</sup>。

脂质结合是调控中性鞘磷脂酶-2 细胞定位的另一重要机制。在体外, 中性鞘磷脂酶-2 能被多种 APL 以剂量依赖的形式激活, 尤其是磷脂酰丝氨酸<sup>[1]</sup>。脂质-蛋白覆盖分析显示: 在体内中性鞘磷脂酶-2 能被磷脂酰丝氨酸和磷脂酸等代表性 APL 直接激活。突变研究表明中性鞘磷脂酶-2 N 端存在两个相互独立的 APL 结合位点: 氨基末端初始疏水区和精氨酸-33/45/48、氨基末端第二疏水区和精氨酸-92/93, 其中任何 1 个或 2 个结合位点的突变都会引起 APL 结合抑制, 继而引起 APL 依赖的中性鞘磷脂酶-2 催化活性下调。特别是

两个结合位点的共突变甚至会引起中性鞘磷脂酶-2 质膜定位减少。疏水端苯丙氨酸和亮氨酸残基与其后续的多碱性氨基酸序列在中性鞘磷脂酶家族中高度保守,并在中性鞘磷脂酶-2 与 APL 相互作用中发挥重要调控作用。同时, C 端阳离子氨基酸在磷脂酰丝氨酸和磷脂酸诱导的中性鞘磷脂酶-2 激活过程中发挥协同作用<sup>[11]</sup>。

蛋白与蛋白的相互结合是中性鞘磷脂酶-2 活性调控的重要机制<sup>[11]</sup>。中性鞘磷脂酶-2 具有潜在的蛋白结合结构域,其重复色氨酸-天冬氨酸结合结构域在中性鞘磷脂酶-2 活性调节中发挥关键作用。在 TNF 诱导中性鞘磷脂酶-2 激活过程中,中性鞘磷脂酶激活相关因子,能通过其色氨酸-天冬氨酸串联序列特异性结合 TNF 受体中性鞘磷脂酶激活结构域和受体活化的蛋白激酶 C (receptor activated protein kinase C, RACK) 1 的色氨酸-天冬氨酸结构域,将中性鞘磷脂酶激活相关因子-RACK1 复合体募集到细胞膜。同时 TNF $\alpha$  能刺激蛋白质胚胎外胚层发展蛋白 (embryonic ectodermal development, EED) (多梳蛋白家族中核内色氨酸-天冬氨酸重复蛋白) 由胞核输出,并向细胞膜转位,与 RACK1 和中性鞘磷脂酶-2 催化区 C 端相结合,从而形成中性鞘磷脂酶激活结构域/中性鞘磷脂酶激活相关因子/RACK1/EED/中性鞘磷脂酶-2 膜内复合体,诱导中性鞘磷脂酶-2 激活和神经酰胺的胞膜积累,其结合机制可能与整合蛋白信号通路有关<sup>[12]</sup>。其中,对 EED 的抑制能直接阻止 TNF 活化中性鞘磷脂酶-2 的过程,表明 EED 作为中性鞘磷脂酶-2 和 RACK1 的衔接蛋白调控其活性<sup>[11]</sup>。

### 中性鞘磷脂酶-2 的功能

**中性鞘磷脂酶-2 与细胞凋亡** 细胞凋亡是机体维护内环境稳定而由基因调控的程序性死亡。在细胞因子、血清饥饿和热刺激等不良因素作用下,中性鞘磷脂酶-2 能被显著激活,触发细胞程序性死亡<sup>[10]</sup>。在人乳腺癌细胞-7 细胞中,中性鞘磷脂酶-2 的激活可引起胞内线粒体结构改变、细胞色素 C 释放以及半胱天冬酶-9 的激活。通过对鼠肝脏细胞的研究发现:中性鞘磷脂酶-2 是凋亡通路中溶酶体透化作用的上游调节物质,能使组织蛋白酶 B 释放到胞质溶胶<sup>[13]</sup>。中性鞘磷脂酶-2 也能与其他信号分子协同完成对细胞凋亡的程序性调控<sup>[10]</sup>。

**中性鞘磷脂酶-2 与细胞生长抑制** 在生长抑制的

人乳腺癌细胞-7 中可检测到中性鞘磷脂酶-2 mRNA 水平的上调,提示中性鞘磷脂酶-2 与细胞生长抑制有关<sup>[10]</sup>。进一步研究表明,下调中性鞘磷脂酶-2 水平能同时抑制 Rb 蛋白磷酸化与 p21<sup>WAF1</sup> 的激活过程,使细胞周期阻滞于 G0/G1 期。同时,中性鞘磷脂酶-2 可与多个细胞周期调控因子密切联系,抑制细胞生长<sup>[2]</sup>。脂质调节蛋白磷酸酶磷蛋白磷酸酶 1 被证实能作为中性鞘磷脂酶-2 的下游调节物质,调节细胞融合过程的细胞运动<sup>[14]</sup>。全反式维甲酸作为引起细胞周期停滞在 G0/G1 期的重要物质已被证实通过上调中性鞘磷脂酶-2 的 mRNA 水平,引起中性鞘磷脂酶-2 及其下游产物神经酰胺含量的升高。中性鞘磷脂酶-2 还与端粒酶的抑制反应和柔红霉素诱导的细胞周期停滞有关<sup>[2,9]</sup>。此外,抗氧化剂辅酶 Q 能抑制血清剥夺刺激中性鞘磷脂酶-2 的活化和神经酰胺的积聚,在中性鞘磷脂酶-2 抑制细胞生长中发挥拮抗作用<sup>[2]</sup>。在癌变细胞中,可检测出中性鞘磷脂酶-2 鞘磷脂磷酸二酯酶 3 基因的一系列突变,提示中性鞘磷脂酶-2 在癌症的发生发展过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。

**中性鞘磷脂酶-2 与炎症反应** 中性鞘磷脂酶-2 可被多种致炎因子激活,其中 TNF- $\alpha$  是最常见的中性鞘磷脂酶-2 激活剂。长期 TNF- $\alpha$  刺激能引起人乳腺癌细胞-7 细胞中性鞘磷脂酶-2 的过度表达,而急性刺激会诱导肺癌细胞 (A549)、脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 和平滑肌细胞中性鞘磷脂酶-2 活性上调<sup>[2]</sup>,中性鞘磷脂酶-2 的炎症激活与 TNF 受体 1 中性鞘磷脂酶激活相关因子 RACK1 复合体形成、EED 调节、PKC 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶诱导的磷酸化密切相关<sup>[2,12]</sup>。中性鞘磷脂酶-2 还被作为重要介质,参与 TNF- $\alpha$  对胞膜 N-甲基-D-天(门)冬氨酸受体突触可塑性的调节。在与年龄相关的炎症反应中,衰老小鼠体内检测到高水平的中性鞘磷脂酶-2,研究显示衰老刺激的白细胞介素 (interleukin, IL) -1 $\beta$  水平上调而不是 IL-1 $\beta$  受体 I、C-JUN 氨基末端激酶、IL-1 $\beta$  受体相关激酶-1 和转化生长因子  $\beta$  激活性激酶-1 的功能异常激活,是中性鞘磷脂酶-2 表达增加的重要诱因。此外,过度表达的中性鞘磷脂酶-2 也具有正反馈调节作用,能通过诱导 C-JUN 氨基末端激酶磷酸化激活和 IL-1 $\beta$  受体相关激酶的遍在蛋白化作用提高 IL-1 $\beta$  水平<sup>[2]</sup>。

**中性鞘磷脂酶-2 与阿尔茨海默病** 阿尔茨海默病人脑内检测发现中性鞘磷脂酶-2 的高表达提示中性鞘磷脂酶-2 参与阿尔茨海默病发病调控<sup>[2]</sup>。研究表明  $\beta$  淀粉样蛋白 (amyloid-b peptide, A $\beta$ ) 能激活中性鞘

磷脂酶-2, 引起神经酰胺积聚<sup>[15-16]</sup>, 同时高水平的中性鞘磷脂酶-2 可以加速 A $\beta$  在脑组织内的沉积, 引起疾病的进一步恶化。中性鞘磷脂酶抑制剂 GW4869 能有效抑制 A $\beta$  对神经元损伤效应更进一步验证了中性鞘磷脂酶-2 在阿尔茨海默病发病过程中发挥的作用。此外, A $\beta$  在激活中性鞘磷脂酶同时, 也伴随酸性磷酸酯酶活性上调<sup>[2]</sup>, 以及神经酰胺积累成为 A $\beta$  诱发阿尔茨海默病重要机制。

**中性鞘磷脂酶-2 与骨骼生长发育** 采用基因敲除小鼠研究显示: 中性鞘磷脂酶-2 基因敲除小鼠与野生型小鼠相比, 精神身体发育明显迟缓, 并伴随长骨变短和关节畸形的畸变表型, 提示中性鞘磷脂酶-2 在生物体骨骼生成与发育中发挥重要作用; 深入分析表明: 敲除中性鞘磷脂酶-2 的小鼠与野生型相比, 生长激素水平明显下降, 血清中类胰岛素生长因子水平也显著降低, 推测上述变化可能与细胞周期的延长和发育不良有关<sup>[2,17]</sup>。在骨形成和牙本质形成不全小鼠模型 (fro/fro 小鼠) 的独立研究中, 小鼠均呈现出生时身形小、长骨和软骨处多处骨折并伴有严重的骨质破坏但软骨生长正常的表型, 其原因可能与中性鞘磷脂酶-2 上鞘磷脂磷酸二酯酶 3 基因的突变有关<sup>[2]</sup>。

综上, 基因敲除技术为中性鞘磷脂酶-2 的研究带来诸多突破, 使其功能不仅仅局限于水解鞘磷脂生成第二信使神经酰胺的酶类, 更被证实参与细胞凋亡、生长抑制、炎症反应等多种生理病理过程, 并与阿尔茨海默病及骨骼的生长畸变密切相关。同时, 研究显示中性鞘磷脂酶-2 通过激活外染色体中 miRNA 的分泌, 参与肿瘤细胞的转移<sup>[18]</sup>, 并被证实与肺癌的形成密切相关<sup>[19]</sup>。然而, 对中性鞘磷脂酶-2 晶体结构认识的不足, 如胶原样区域、PLL 区域在中性鞘磷脂酶-2 功能上发挥的作用, Mg<sup>2+</sup> 结合位点的位置确定等, 为其结构功能的阐明提出了许多亟待解决的新问题。同时, 对中性鞘磷脂酶-2 调控机制的研究尚不够深入, 如 Ca<sup>2+</sup> 离子调控中性鞘磷脂酶-2 水平的精确机制至今不明等。这些都使中性鞘磷脂酶-2 研究多停留在理论层面, 其临床应用相对有限。因而, 精确识别其作用靶点, 深入揭示其调控机制, 才能为癌症、阿尔茨海默病等多种高发疾病的治疗提供新的途径和方法。

### 参 考 文 献

- [1] Clarke CJ, Wu BX, Hannun YA. The neutral sphingomyelinase family: Identifying biochemical connections [J]. *Adv Enzyme Regul*, 2011, 51(1):51-58.
- [2] Wu BX, Clarke CJ, Hannun YA. Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses [J]. *Neuromol Med*, 2010, 12(4):320-330.
- [3] Tani M, Hannun YA. Analysis of membrane topology of neutral sphingomyelinase 2 [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(7):1323-1328.
- [4] Hofmann K, Tomiuk S, Wolff G, et al. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg<sup>2+</sup>-dependent neutral sphingomyelinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(11):5895-5900.
- [5] Marchesini N, Luberto C, Hannun YA. Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase 2 and its role in sphingolipid metabolism [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(16):13775-13783.
- [6] Filosto S, Fry W, Knowlton AA, et al. Neutral sphingomyelinase 2 (N-SMase2) is a phosphoprotein regulated by calcineurin (PP2B) [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(14):10213-10222.
- [7] Kim SK, Ahn KH, Jeon HJ, et al. Purification of neutral sphingomyelinase 2 from bovine brain and its calcium-dependent activation [J]. *J Neurochem*, 2010, 112(4):1088-1097.
- [8] Filosto S, Ashfaq M, Chung S, et al. Neutral sphingomyelinase 2 activity and protein stability are modulated by phosphorylation of five conserved serines [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(1):514-522.
- [9] Ito H, Tanaka K, Haqiwaru K, et al. Transcriptional regulation of neutral sphingomyelinase 2 in all-trans retinoic acid-treated human breast cancer cell line, MCF-7 [J]. *J Biol Chem*, 2012, 151(6):599-610.
- [10] Clarke CJ, Hannun YA. Neutral sphingomyelinases and N-SMase 2: bridging the gaps [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1758(12):1893-1901.
- [11] Wu BX, Clarke CJ, Matmati N, et al. Identification of novel anionic phospholipid binding domains in neutral sphingomyelinase 2 with selective binding preference [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(25):22362-22371.
- [12] Philipp S, Puchert M, Adam-Klaues S, et al. The Polycomb group protein EED couples TNF receptor 1 to neutral sphingomyelinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(3):1112-1117.
- [13] Werneburg N, Guicciardi ME, Yin XM, et al. TNF- $\alpha$ -mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 287(2):G436-G443.
- [14] Norma M, Jeffrey AJ, Yusuf AH. Confluence induced threonine41/serine45 phospho- $\beta$ -catenin dephosphorylation via ce-

- ramide-mediated activation of PP1 $\gamma$  [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771(12):1418-1428.
- [15] Jana A, Pahan K. Fibrillar amyloid-beta peptides kill human primary neurons via NADPH oxidase-mediated activation of neutral sphingomyelinase. Implications for Alzheimer's disease[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(49):51451-51459.
- [16] Jana A, Pahan K. Oxidative stress kills human primary oligodendrocytes via neutral sphingomyelinase: implications for multiple sclerosis [J]. *J Neuroimmune Pharm*, 2007, 2(2):184-193.
- [17] Stoffel W, Jenke B, Block B, et al. Neutral sphingomyelinase 2 (smpd3) in the control of postnatal growth and development [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(12):4554-4559.
- [18] Nobuyoshi K, Haruhisa L, Keitaro H, et al. Neutral sphingomyelinase 2 (nsmase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis [J]. *J Biol Chem*, 2013, 299(15):10849-10859.
- [19] Goldkorn T, Chung S, Filosto S. Lung cancer and lung injury: the dual role of ceramide [M]. *Spei in Dis: Springer Vienna*, 2013:93-113.

(收稿日期: 2012-11-23)