

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00837

氧应激与细胞信号转导

刘鹏,殷正丰*,杨甲梅

第二军医大学东方肝胆外科研究所分子肿瘤实验室,上海 200438

[摘要] 氧应激是脂肪肝、动脉粥样硬化、癌症、器官缺血再灌注损伤等病理生理过程中导致器官组织损伤的主要因素之一。近年对氧应激与细胞信号转导的路径的研究逐步深入,为药物和基因治疗奠定了良好的研究基础。本文就氧应激与细胞信号转导的有关通路包括核转录因子、生长因子信号通路、蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinases,PTK)和蛋白酪氨酸磷酸酶(protein tyrosine phosphatases,PTP)系统及其丝氨酸/苏氨酸激酶信号系统作一综述。

[关键词] 氧化性应激;信号转导;活性氧

[中图分类号] R 363.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0837-04

Oxidative stress and cell signal transduction

LIU Peng, YIN Zheng-feng*, YANG Jia-mei

Department of Molecular Oncology, Eastern Hepatobiliary Surgery Institute, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] Oxidative stress is a major cause of fatty liver, atherosclerosis, cancer, organ damage following ischemia/reperfusion, etc. In recent years, significant improvements have been achieved in studies on signaling pathways involved in oxidative stress, which provide a basis for the drug and gene therapy. This article reviews the major redox-related signaling molecules and pathways, including transcription factors, growth factor signaling, tyrosine kinases and serine/threonine kinases.

[KEY WORDS] oxidative stress; signal transduction; reactive oxygen species

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 837-840]

氧应激是糖尿病、动脉粥样硬化、脂肪肝、器官缺血再灌注损伤、癌症等常见病理过程造成组织损伤的主要机制之一。造成氧应激的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的主要来源主要包括线粒体、巨噬和非巨噬细胞尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, NADP)氧化酶系统、中性粒细胞以及黄嘌呤氧化酶/次黄嘌呤氧化酶系统等^[1]。主要的活性氧簇(ROS)分子之一过氧化氢(hydrogen peroxide, H₂O₂)可以作为第二信使影响多条信号转导通路。其中研究较为广泛的是转录因子NF- κ B、激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1);生长因子信号通路、蛋白酪氨酸激酶和磷酸酶系统以及丝氨酸/苏氨酸激酶信号转导途径。

1 转录因子

1.1 NF- κ B NF- κ B /Rel 家族是重要的氧化还原敏感因子。NF- κ B 的非活化形式由 P65、P50 和 I κ B 组成。NF- κ B 激活的关键一步是 I κ B 亚单位 N 末端 32 和 36 位丝氨酸的磷酸化,而所有导致 I κ B 降解和 NF- κ B 核转位的信号通路的

共同点是需要活性氧参与的,活性氧是 NF- κ B 激活的介导剂。当 I κ B 亚单位的两个丝氨酸残基被特定的激酶磷酸化后可被进一步泛素化,进而被 26S 蛋白酶体水解,被释放的 P65/P50 进入细胞核之后则发生核转位,激活下游信号分子。Takada 等发现新的 NF- κ B 激活路径,即 H₂O₂ 通过 SyK 介导的 I κ B α 酪氨酸磷酸化和 P65 亚基的丝氨酸磷酸化激活 NF- κ B^[2]。非依赖 I κ B 亚单位的 NF- κ B 激活途径则与 DNA 结合蛋白亚单位的调节磷酸化有关。ROS 抑制 NF- κ B 激活的分子基础是 P50DNA 结合蛋白域半胱氨酸残基的氧化,其中该亚基的 62 位半胱氨酸残基被认为是氧化还原敏感调节节点,另一氧化还原敏感调节节点位于 Rel 亚基。有研究同时显示高水平的谷胱甘肽抑制泛素化酶,从而影响多种氧化还原酶的活性。由于 NF- κ B 构成了氧应激所致组织损伤及细胞癌变的重要信号途径之一,因而通过慢病毒和干扰 RNA 的方法阻断 NF- κ B 信号转导,可以实现减轻氧应激组织损伤和抑制肿瘤细胞增殖^[3-4]。

1.2 AP-1 AP-1 是由 Fos-Jun 或 Jun-Jun 二聚体构成的具有氧化还原敏感性的转录复合体。在每一蛋白亚基上的

[收稿日期] 2007-12-31 **[接受日期]** 2008-03-15

[作者简介] 刘鹏, 博士生. E-mail: liupengmail100@sina.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25070859, E-mail: yinzfk@yahoo.com.cn

DNA 结合蛋白域中的丝氨酸残基是调节 AP-1 活性的关键位点,该位点的氧化可降低蛋白结合 DNA 的能力,而氧化作用减弱则增强 DNA 与蛋白的结合能力。有关 ROS 调节 AP-1 活性的机制研究较少,研究证实与两个亚基保守半胱氨酸残基的巯基化,以及硫氧还蛋白和核蛋白 Ref1 对半胱氨酸的作用有关。硫氧还蛋白和 Ref1 不但对氧化还原反应具有调节作用,而且也是 ROS 直接作用的靶点。AP-1 对于内源性和外源性 ROS 引发的氧化应激均有调节作用。有学者发现,由黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶系统所产生的 ROS 可诱导小鼠上皮细胞 JB6 和 Balb/3T3 表达大量的 *c-fos* mRNA。另一项研究也发现,在远端肾小管上皮细胞 ROS 同样可以诱导生成大量的 *c-fos* mRNA。在大鼠平滑肌细胞氧应激模型中发现 H_2O_2 是 *c-fos* 表达的诱导物,而在氧化应激过程中 *c-fos* 和 *c-jun* 的表达与磷脂酶-A、花生四烯酸、脂质氧化酶和蛋白激酶 C(PKC)均起了重要作用。氧化应激条件下 AP-1 的活性可能受 *c-fos* 和 *junD* 的磷酸化调节^[5],比如丝裂原激活蛋白激酶等,它们的活性同时也受到抗氧化剂的调节。在其他器官氧应激研究中发现,与氧化应激有关的核转录因子还有 SP-1、*c-Myb*、P53、*c-myc* 以及早期生长反应因子 (early growth response factor-1, EGR-1)、铁反应转录因子、糖皮质激素受体、环磷酸腺苷应答结合蛋白等。这些转录因子的活化均与 DNA 结合域半胱氨酸残基有关。基于 AP-1 是氧应激过程中重要的转录因子,其活性的高低与氧应激成正比关系,有动物实验报道检测 AP-1 可预测胚胎畸形的概率^[6]。

2 生长因子信号通路

H_2O_2 的产生与生长因子信号通路具有相互依赖的特点。一方面, H_2O_2 可以通过诱导磷酸化从而激活某些生长因子的受体,例如血小板衍生生活化因子 (platelet derived growth factor, PDGF) 受体、表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 受体以及胰岛素受体等^[7]。激活 EGF 受体的机制可能在于铁蛋白的激活和随后肝素结合样 EGF 的产生。 H_2O_2 同时可以通过诱导 SHc-Grb2-Sos 复合体与 EGF 受体结合激活下游信号系统。另一方面一些生长因子可诱导 H_2O_2 的产生,例如 PDGF、EGF、内皮素-1、血管紧张素-Ⅱ (angiotensin-Ⅱ, Ang-Ⅱ) 以及细胞因子,如转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 等。Campese 等^[8] 研究发现,Ang-Ⅱ 与其受体结合后导致 PKC 激活 NADP 氧化酶,随后生成的 H_2O_2 激活 Src,导致 EGF 受体信号通路活化,激活 PI3K 和 Rac-1,最终导致 NADP 氧化酶大量产生,从而形成内部信号放大系统。5-羟色胺亦可以快速升高超氧阴离子的浓度,刺激细胞外信号调节激酶的蛋白磷酸化,加速肺动脉平滑肌细胞以及成纤维细胞的增殖。由此可见氧应激过程中产生 H_2O_2 并非只产生负面的调控效应,它所引起的某些生长信号通路的激活对

于组织损伤和修复有着重要的意义,有望成为促进细胞分化增殖的药物作用潜在靶点。

3 PTK 和 PTP 系统

3.1 PTK 系统 氧应激过程中 ROS 不但对受体型 PTK 有激活作用,同时对非受体型 PTK 也有激活作用。最近有关 H_2O_2 所致巨噬细胞释放炎症因子的研究中证实可能存在蛋白酪氨酸激酶和蛋白酪氨酸磷酸酶两条通路^[9]。在成纤维细胞、平滑肌细胞、T 和 B 淋巴细胞及髓细胞的研究中发现, H_2O_2 和超氧阴离子可以激活多种酪氨酸激酶,例如非受体型酪氨酸激酶-2、富脯氨酸蛋白酪氨酸激酶/细胞黏附激酶 β 等^[10-11]。值得注意的是,依赖 ROS 的 JAK₂ 激活对于平滑肌细胞 Ang-Ⅱ 诱导细胞因子的产生,以及血栓对于诱导热休克蛋白的产生是极其重要的。有研究发现,抗氧化剂可以在 Y418 和 Y215 位点阻止 Ang-Ⅱ 对 *c-Src* 的激活作用,从而反证了 H_2O_2 对于 *c-Src* 的激动作用。 H_2O_2 刺激 *c-Ab1* 和 PKC- δ 的结合前提条件是 JAK2 的激活。

3.2 PTP 系统 尽管大量证据表明 PTP 系统在氧应激中起重要作用。早先的研究发现, H_2O_2 可以阻断 PTP,从而阻止 PTP 的去磷酸化作用,并且证实了超氧阴离子可使磷酸化和去磷酸化失衡并导致 PDGF 受体的激活。在所有 PTP 中都有重要的半胱氨酸残基活性位点,这些位点在氧应激时可产生非活性的亚硫酸。 H_2O_2 通过使邻近的半胱氨酸残基形成二硫键而使得 PTP 失活。 H_2O_2 除了可以直接阻断 PTP 以外,还可通过对细胞内结合型谷胱甘肽的数量而间接调控 PTP 系统,但机制尚不明了^[12]。另外在其他研究中发现,除了 H_2O_2 与谷胱甘肽外蛋白质及多肽的氧化产物尤其是半胱氨酸残基氧化产物对于 PTP 系统的调控也有较高的生物学活性效率^[13]。综上所述,蛋白酪氨酸磷酸酶系统在氧应激所介导的细胞信号转导过程中有着重要的作用。

4 丝氨酸/苏氨酸激酶系统

ROS 也可激活丝氨酸/苏氨酸激酶系统。小鼠成纤维细胞系 NIH3T3、人类胚胎肾细胞系、神经细胞、肌肉细胞、上皮细胞和心肌细胞的实验中发现,ROS 可以通过调节蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB) 而起作用^[14]。Ang-Ⅱ 诱导 PKB 以及 H_2O_2 激活 PKB 均是依赖于 PI3K 与 P21ras 的聚合^[15]。在丝氨酸/苏氨酸激酶系统中,PKC 信号的调节是较为复杂的过程,PKC 在锌指蛋白调节区及氧化还原调节区均含有几个富含半胱氨酸残基的区域,因而氨基端的选择性氧化或者破坏锌指蛋白的结构可以降低调节区域的自我抑制作用,并产生非依赖共刺激分子的催化效果。相反,如果在羧基端催化区域发生氧化修饰可因还原巯基的丢失导致激酶的失活。PKC 的调节亚基和催化亚基对于氧化应激所引起的修饰均很敏感,最终导致 PKC 的激活^[16]。在肾小球系膜细胞的缺氧研究中发现, H_2O_2 可以导致细胞膜上 PKC- δ 和 β 的富集,表明 ROS 可以刺激对二酰基甘油敏感的 PKC 同工酶的激

活^[17]。可能的机制是酪氨酸磷酸化或转化为非依赖钙/磷脂的活性形式。较早的研究发现, H₂O₂ 诱导的 PKC- δ 的激活可不依赖酪氨酸磷酸化, 此外氧化反应诱导的 PKC 还可引起其他转录因子如 MAPK 和原癌基因的激活。对中性粒细胞的研究中发现, PKC 系统可以通过磷酸化作用参与调节 NADPH 氧化酶, 并参与调节 p47^{phox}, 但同样的结果在非巨嗜细胞系统中 PKC 对 NADPH 氧化酶的作用尚未阐明^[18]。Lee 及其同事在研究中发现缺氧和高糖状态均可导致动脉平滑肌细胞和内皮细胞 PKC 的激活^[19]。

PKC 系统中 MAPK 家族也受 ROS 的调节。MAPK 家族包含了胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulated kinase, ERKs)、JNKs、P38MAPK 和大的 MAPK-1 等。Li-ang 等^[20] 在大鼠肝移植缺血再灌注氧应激的研究中发现它们与细胞的增生、分化和凋亡有关。研究发现在不同细胞系中外源性 H₂O₂ 的干预对细胞氧化还原的调节是通过 MAPK 而起作用的^[21]。有关内源性 H₂O₂ 的干预模型中 MAPK 的调节作用未见报道。但是小牛冠状动脉氧化应激的实验中却发现, NADPH 氧化酶被动产生的 H₂O₂ 可以通过 EGFR/src 激活 ERK^[22]。其他研究亦证实 ERK 和 JNK 可被巨噬细胞的 ROS 所激活^[23]。此外, Ang- II 可通过 H₂O₂ 和超氧阴离子的产生以及 EGF 受体的活化、c-Src、JNK、MAPK 的激活诱导平滑肌细胞的肥大增生反应。

在目前有关 H₂O₂ 诱导 MAPK 上调的文献大多支持氧应激激活的信号通路具有细胞特异性和刺激源特异性^[24]。缺氧应激产生的内源性 H₂O₂ 可诱导 ERK 的活化, 而不是 P38 激酶的活化, 外源性 H₂O₂ 却与之恰好相反。在豚鼠成纤维细胞的研究中发现, 由甲氨蝶呤诱发的内源 H₂O₂ 可活化 JNK 和 P38, 而不是 ERK; 然而在 A549 肺上皮细胞, 内源性 H₂O₂ 则可激活 JNK 和 ERK, 而不是 P38。在人类多型核白细胞的研究中发现, 内源 H₂O₂ 也是通过激活 P38 而发挥生理作用。有关 ROS 激活 MAPK 的详细分子机制尚不明了, 可能与磷酸化酶有关。MAPK 磷酸化酶是双磷酸化酶, 其特异性的靶点位于 ERK1 和 ERK2。该家族中的某些成员已被鉴定, 例如 PTP, 主要特点是催化位点的半胱氨酸残基。Kwon 等^[25] 发现, 在 Jurkat T 细胞中, H₂O₂ 可以通过激活 MAPK 家族中不同的成员抑制不同 PTP 的活性。其他的研究证明 ROS 介导 MAPK 的激活可能是生长因子受体、Src 激酶以及 P21ras 水平升高的先导事件, 乙酰半胱氨酸、反义 P22^{phox}、过氧化氢酶等抗氧化剂可以阻断由 Ang- II 激活的 P38MAPK 和 JNK 的信号转导^[26]。H₂O₂ 可以激活 c-Src, 进而激活 ERK5 和 JNK。另外的研究发现, H₂O₂ 通过激活 JNK 和 Ras 可以进一步激活酪氨酸激酶分子 Fyn。Ras 蛋白是 MAPK 氧化敏感位点激活上调因子, 它扮演着双重角色, 一方面可介导激活 NADH/NADPH 氧化酶产生 ROS, 另一方面可以被 ROS 激活。

氧应激导致的活性氧产生是细胞损伤、凋亡、坏死的主要原因, 同时也是损伤修复的启动因子。在此病理过程中,

各种氧化物和氧化底物的相互作用, 各种细胞器包括细胞质膜、线粒体、内质网以及细胞核转录因子的参与构成了复杂的网络系统。在这一网络中起重要信息传递作用的转导分子的激活、失活以及信息链的形成, 对于细胞在氧应激后的结局起了关键作用。如果能从氧应激的角度进一步研究各环节信号转导分子的调节因素及其相互之间的作用机制, 鉴定出关键的转导分子, 对于减轻各种病理状态下氧应激药物靶点的研究和设计无疑具有重要的理论指导意义。

[参考文献]

- [1] Galaris D, Barbouti A, Korantzopoulos P. Oxidative stress in hepatic ischemia-reperfusion injury: the role of antioxidants and iron chelating compounds[J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12: 2875-2890.
- [2] Takada Y, Mukhopadhyay A, Kundu G C, Mahabeleshwar G H, Singh S, Aggarwal B B. Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 2433-2441.
- [3] Oida Y, Gopalan B, Miyahara R, Branch C D, Chiao P, Chada S, et al. Inhibition of nuclear factor-kappaB augments antitumor activity of adenovirus-mediated melanoma differentiation-associated gene-7 against lung cancer cells *via* mitogen-activated protein kinase kinase 1 activation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6: 1440-1449.
- [4] Meunier A, Latremoliere A, Dominguez E, Mauborgne A, Philippe S, Hamon M, et al. Lentiviral-mediated targeted NF-kappaB blockade in dorsal spinal cord glia attenuates sciatic nerve injury-induced neuropathic pain in the rat [J]. *Mol Ther*, 2007, 15: 687-697.
- [5] Gerald D, Berra E, Frapart Y M, Chan D A, Giaccia A J, Mansuy D, et al. JunD reduces tumor angiogenesis by protecting cells from oxidative stress [J]. *Cell*, 2004, 118: 781-794.
- [6] Sahambi S K, Hales B F. Exposure to 5-bromo-2'-deoxyuridine induces oxidative stress and activator protein-1 DNA binding activity in the embryo [J]. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 2006, 76: 580-591.
- [7] Frank G D, Eguchi S, Motley E D. The role of reactive oxygen species in insulin signaling in the vasculature [J]. *Antioxid-Redox-Signal*, 2005, 7: 1053-1061.
- [8] Campese V M, Shaohua Y, Huiquin Z. Oxidative stress mediates angiotensin II-dependent stimulation of sympathetic nerve activity [J]. *Hypertension*, 2005, 46: 533-539.
- [9] De Oliveira-Marques V, Cyrne L, Marinho HS, Antunes F. A quantitative study of NF-kappaB activation by H₂O₂: relevance in inflammation and synergy with TNF-alpha [J]. *J Immunol*, 2007, 178: 3893-3902.
- [10] Azar Z M, Mehdi M Z, Srivastava A K. Activation of insulin-like growth factor type-1 receptor is required for H₂O₂-induced PKB phosphorylation in vascular smooth muscle cells [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006, 84: 777-786.

- [11] Kang J L, Lee H W, Kim H J, Lee H S, Castranova V, Lim CM, et al. Inhibition of SRC tyrosine kinases suppresses activation of nuclear factor-kappaB, and serine and tyrosine phosphorylation of I kappaB-alpha in lipopolysaccharide-stimulated raw 264.7 macrophages[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2005, 68: 1643-1662.
- [12] Wu X, Zhu L, Zilbering A, Mahadev K, Motoshima H, Yao J, Goldstein B J, et al. Hyperglycemia potentiates H₂O₂ production in adipocytes and enhances insulin signal transduction; potential role for oxidative inhibition of thiol-sensitive protein-tyrosine phosphatases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7: 526-537.
- [13] Gracanic M, Davies M J. Inhibition of protein tyrosine phosphatases by amino acid, peptide, and protein hydroperoxides; potential modulation of cell signaling by protein oxidation products[J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42: 1543-1551.
- [14] Engelbrecht A M, Esterhuysen J, du Toit E F, Lochner A, van Rooyen J. p38-MAPK and PKB/Akt, possible role players in red palm oil-induced protection of the isolated perfused rat heart[J]? *J Nutr Biochem*, 2006, 17: 265-271.
- [15] Oudit G Y, Kassiri Z, Patel M P, Chappell M, Butany J, Backx P H, et al. Angiotensin II-mediated oxidative stress and inflammation mediate the age-dependent cardiomyopathy in ACE2 null mice[J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 75: 29-39.
- [16] Niwa K, Sakai J, Karino T, Aonuma H, Watanabe T, Ohyama T, et al. Reactive oxygen species mediate shear stress-induced fluid-phase endocytosis in vascular endothelial cells[J]. *Free Radic Res*, 2006, 40: 167-174.
- [17] Xia L, Wang H, Goldberg H J, Munk S, Fantus I G, Whiteside C I. Mesangial cell NADPH oxidase upregulation in high glucose is protein kinase C dependent and required for collagen IV expression[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2006, 290: 345-356.
- [18] Morigi M, Macconi D, Zoja C, Donadelli R, Buelli S, Zanchi C, et al. Protein overload-induced NF-kappaB activation in proximal tubular cells requires H₂O₂ through a PKC-dependent pathway [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 1179-1189.
- [19] Lee H B, Yu M R, Song J S, Ha H. Reactive oxygen species amplify protein kinase C signaling in high glucose-induced fibronectin expression by human peritoneal mesothelial cells[J]. *Kidney Int*, 2004, 65: 1170-1179.
- [20] Liang T, Xu S, Yu J, Shen K, Li D, Zheng S. Activation pattern of mitogen-activated protein kinases in early phase of different size liver isografts in rats[J]. *Liver Transpl*, 2005, 11: 1527-1532.
- [21] Esposito G, De Filippis D, Cirillo C, Sarnelli G, Cuomo R, Iuvone T. The astroglial-derived S100beta protein stimulates the expression of nitric oxide synthase in rodent macrophages through p38 MAP kinase activation [J]. *Life Sci*, 2006, 78: 2707-1715.
- [22] Oeckler R A, Arcuino E, Ahmad M, Olson SC, Wolin M S. Cytosolic NADH redox and thiol oxidation regulate pulmonary arterial force through ERK MAP kinase [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288: L1017-L1025.
- [23] Das S, Engelman R M, Maulik N, Das D K. Angiotensin preconditioning of the heart: evidence for redox signaling [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2006, 44: 1003-1010.
- [24] Zeng S, Feirt N, Goldstein M, Guarrera J, Ippagunta N, Ekong U, et al. Blockade of receptor for advanced glycation end product (RAGE) attenuates ischemia and reperfusion injury to the liver in mice[J]. *Hepatology*, 2004, 39: 422-432.
- [25] Kwon J, Devadas S, Williams M S. T cell receptor-stimulated generation of hydrogen peroxide inhibits MEK-ERK activation and Ick serine phosphorylation [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 35: 406-417.
- [26] Yogi A, Callera G E, Montezano A C, Aranha AB, Tostes RC, Schiffrin EL, et al. Endothelin-1, but not Ang II, activates MAP kinases through c-Src independent Ras-Raf dependent pathways in vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27: 1960-1967.

[本文编辑] 尹 茶

欢 迎 订 阅

《 第二军医大学学报 》

ISSN 0258-879X
CN 31-1001/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725