

· 综 述 ·

细胞内保护机制和老年多器官疾病的预防

林仲翔

最近美国 Baranano 等^[1]证明的胆红素生理保护作用令人瞩目,为哺乳类细胞内保护机制的探索和其在临床可能的应用前景提出了新的思路。细胞运用多种体系来保护自己免受内、外来源的毒害,这些都属细胞保护机制。例如,细胞内存在各种抵抗活性氧物质(reactive oxygen species, ROS)的机制:①通过细胞内的铁蛋白及转铁蛋白一类螯合分子来螯合重金属离子,严密控制其在细胞内的活动,保护细胞,因为游离状态的重金属离子有促进产生自由基的作用;②细胞内有对抗氧化剂的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶,它们的协同作用可将有害的超氧化物转变为无害的水;③细胞内另一些小分子像抗坏血酸盐(维生素 C),和 α -生育酚(维生素 E)是直接的抗氧化剂,能淬灭自由基的扩散;④一般认为的主要内源性细胞保护剂还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH),为小分子抗氧化剂,以毫摩尔浓度存在于多种组织内。此外,细胞核含有抑癌基因 *p53*, *Rb* 等,通过级联性反应调控途径能对抗外环境辐射线等致基因突变作用^[2]。细胞间隙连接通讯,可在相邻细胞间直接交流扩散小分子保护剂 GSH 及营养分子等,保护机体重要组分如心肌和神经元细胞对抗应激性刺激损伤^[3]。然而在生理状态下细胞的保护机制如何能够高效、快速地发挥作用应对急性或慢性毒害始终是疾病预防的要害问题,也是老年多器官疾病预防的基础性问题。人们都知道胆红素是引起黄疸的一种色素,一直不清楚其生理作用。胆红素的来源是血红素。最近,Baranano 等^[1]证明胆红素为强有力的抗氧化剂,它可在过氧化氢(H_2O_2)过量 10 000 倍条件下保护细胞不受损害。他们证明胆红素是主要的天然生理性抗氧化的细胞保护剂。这不仅有重要基础理论意

义,更可能与临床实际有关,因为氧化性应激在血管疾病的发生上起关键作用。血清胆红素水平的高低与冠心病、癌症的关系均已报道^[4,5]。

1 胆红素问题的提出

胆红素是亲脂性四吡咯线形分子,为血红素的终末代谢产物,在血浆中含量丰富,但只存在于哺乳类动物。一般认为胆红素具有强细胞毒性,为脂溶性废物,必需排出。过量升高的胆红素导致脑实质胆红素沉着发生脑核性黄疸引起严重脑损害的事实早在 19 世纪末就被医学前辈关注。哺乳类血红素在代谢过程经过血红素氧化酶裂解形成胆绿素,再经过胆绿素还原酶作用产生胆红素。胆绿素是水溶性并容易排除的分子。既然如此,为什么哺乳类进化过程中却发展了还原胆绿素产生胆红素这种既浪费能量、产物又有害而且显然不需要的功能呢?人们推测必然是出于哺乳类进化的需要,胆红素的积极作用在哪里,成为激发科学家探索揭露的谜。

2 对抗自由基的强抗氧化剂胆红素

胆红素能强有力地对抗自由基的作用,决定了其抗氧化剂的特性。Stocker 等^[6]并证明胆红素在生理性氧张力条件下具有最强的对抗脂质超氧化的作用,成为比 α -生育酚更为优越的超强抗氧化保护剂。血清内的胆红素水平具有相当浓度,足以以为血清的总体抗氧化能力提供一个实体成分。值得忧虑的是组织内含有的胆红素浓度相当低,为 20~50 μmol ,比已知的抗氧化剂,如 GSH,在组织内含量的 0.1% 还低。这就对在生理条件下的胆红素是否能对抗细胞内氧化应激的问题提出质疑。然而 Baranano 等证明胆红素是一个生理性抗氧化的神经组织保护剂,令人振奋。10 μmol 胆红素能对抗比它浓度高 10 000 倍的 H_2O_2 ,成为有保护神经元作用的抗氧化剂^[7,8]。

3 胆红素抗氧化作用机制

胆红素的抗氧化保护作用机制有两种可能:①

基金项目:国家重点基础研究 973 项目课题资助(G2000057002)。

作者单位:100034 北京,北京大学医学部临床肿瘤学院暨北京市肿瘤研究所

作者简介:林仲翔,女,医学本科,教授

通讯作者:林仲翔, E-mail: zhongxianglin@yahoo.com

针对 H_2O_2 的简单的化学计量学抗氧化剂作用,微量胆红素能对抗浓度悬殊 H_2O_2 的毒性作用表明不可能是化学计量学反应;②通过一种催化方式来作用,即当胆红素被 ROS 氧化成胆绿素后,已经被氧化形成的胆绿素立即又被还原成胆红素,这个过程只需要有胆绿素还原酶 A (biliverdin reductase A, BVRA) 的存在,氧化还原往复循环使胆红素得到再利用,能够保证胆红素成万倍的扩增,具有经济、高效和快速的特点,适应了细胞在受毒素攻击时的急需。Barañano 等的最新成果确立了细胞内存在的胆红素 $\rightleftharpoons$ 胆绿素氧化还原周期体系(图 1)及运转环节。他们的实验结果证明在哺乳类细胞如人宫颈癌 HeLa 细胞培养条件下,10 nmol 胆红素 IX α (哺乳类成体专一表达的胆红素亚型)能够完全抵制 >10 000 倍浓度(100 μ mol)的 H_2O_2 的毒性作用,挽救细胞免于死亡。当培养的 HeLa 细胞用 100 μ mol H_2O_2 处理 8 h 后,MMT 方法检查细胞生存率只有约 40%,表明 H_2O_2 对 HeLa 细胞有明显的毒性。另一组细胞同时加有 100 μ mol H_2O_2 和 10 nmol 胆红素,8 h 后,细胞生存率保持在约 80%。此外,通过试管内实验结果直接证明,自由基激发剂 2,2'-偶氮-双[2-脒基丙烷盐酸盐,2,2'-azo-bis(2-amidinopropane) hydrochloride, AAPH] 可以使胆红素水平下降,与此同时,胆绿素水平上升,此时如果有 BVRA 的存在则使胆红素的消耗大为减少,也证明是由于胆绿素还原酶作用下,催化胆红素 $\rightleftharpoons$ 胆绿素氧化还原周期,使胆红素不断得到再利用的结果。

4 胆绿素还原酶 A 是关键

特别值得关注的是,事实上决定细胞或组织能否发挥其内在的胆红素再利用体系作用进行自身保护并起着关键作用的是 BVRA,因为它在细胞内合成,受到细胞遗传程序调控,推测是细胞应对紧急氧化应激的机制。Barañano 等用 RNA 干扰法,将靶向人类 BVRA 转录子的小片段干扰性 RNA 双股分子(RNAi)转染 HeLa 细胞,发现细胞的 BVRA 蛋白水平下降 85%~90%,同时 BVRA 酶活性下降,这时检查细胞内 ROS 的水平,细胞内 ROS 的水平可以用 H_2DCF 检测; H_2DCF 是一种可渗入细胞的酯类,可被细胞内 ROS 瞬时氧化为荧光产物,可用荧光光度计或荧光显微镜影像软件进行量化测定。结果表明转染 RNAi 的细胞内其 ROS 水平比对照高 3 倍,表明由于 BVRA 酶的抑制削弱了细胞对 ROS 的抵抗力。大脑皮质神经元原代培养细胞转染 RNAi

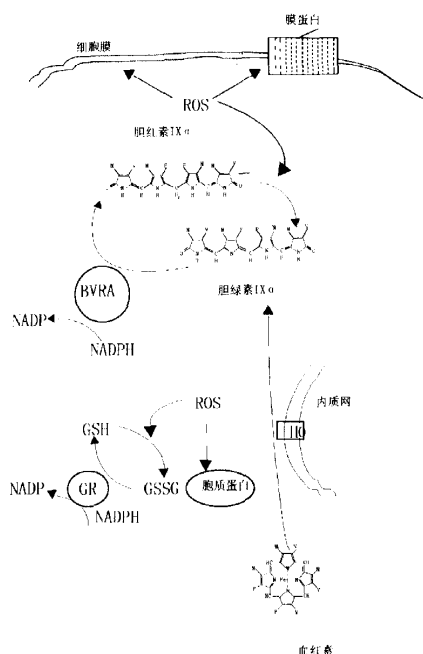


图 1 胆红素 $\rightleftharpoons$ 胆绿素氧化还原周期示意图

BVRA:胆绿素还原酶 A,ROS:活性氧物质,GSH:还原型谷胱甘肽,GR:还原酶谷胱甘肽,GSSG:氧化型谷胱甘肽,HO:血红素氧化酶

也得到类似结果,表明 BVRA 酶的抗氧化作用对多类型细胞具有普遍意义。胆红素/胆绿素氧化还原体系在细胞抗氧化保护机制中可能占有相当比重,因为与过去公认的细胞内主要的可溶性抗氧化剂 GSH 比较,用同样方法检查 HeLa 细胞内 ROS 的水平,发现当用 GSH 合成抑制剂丁基半胱氨酸磺化脒(buthionine sulfoxime, BSO)处理后细胞的 GSH 水平减少了 >95%,而细胞内 ROS 水平仅上升 50%,非常明显地低于 BVRA 缺失造成的 ROS 上升效应^[1]。由此看来, BVRA 是在生理条件下能与 GSH 相媲美甚至是更有效的细胞保护剂。

5 胆红素与 GSH 抗氧化保护作用的协同与分别

从图 1 所示可以看出,GSH 也是通过氧化还原周期再利用机制起抗氧化保护作用的,与胆红素的氧化还原周期相比,显然类似之处在于:两个体系都涉及一种能以氧化型和还原型存在的简单化学分子,它们当细胞处于健康条件下时,都以还原型分子占主导地位。这两个体系又都属于细胞内协同性应激反应的一个部分。细胞内的协同性应激反应还包括热休克蛋白类,专门应对细胞遭受的广谱毒素侵犯情况。当各种保护体系都破坏后,氧化刺激增强,细

胞死亡。胆红素的氧化还原周期与 GSH 氧化还原周期两个体系间又存在显著的差别: ①细胞内含量的差别悬殊; GSH 浓度为毫摩尔级, 而胆红素仅有 ≤ 100 nmol 的水平。值得注意的是, 所有的组织内都含有丰富的 BVRA, 说明胆红素氧化还原周期具有相当高的运转效率, 可以保证应激需要^[1]; ②酶促反应调节的形式不同, GSH 的再利用周期中包括一种过氧化物酶和一个抗氧化物; 反之, 胆红素通过胆绿素的直接还原而产生, 不特别需要过氧化物酶, 虽然过氧化物酶存在的好处也不能完全排除。由此提示两个体系各自为细胞内特定类型的分子提供抗氧化保护活动, 有不同的分工; 胆红素具有高度亲脂性, 与细胞膜相连紧密, 从而能保护所在处脂质抵抗抗氧化并且保护膜蛋白。另一方面, 具有高度水溶性的 GSH 可能在保护胞质成分上发挥作用。

6 结 语

Barañano 等关于胆红素生理保护作用的系列最新报道, 激起了相关研究领域关注和连锁反应。特别是其与临床的关系提示可喜的应用前景。在血管疾病的发生中, 氧化应激起着关键性作用, 最近 Djousse 等^[4]报道, 总胆红素水平与男性心血管病反相关。有 Gilbert 综合征的中年病例其缺血性心脏病为普通人口发生率的 1/5 因为前者有游离性超胆红素血相。普通人口的血浆胆红素生理范围的高水平为冠心病发生的低危因素^[1]。比利时人口 10 年

回顾调查发现胆红素水平与癌症死亡率反相关^[5]。

参 考 文 献

- 1 Barañano DE, Rao M, Ferris CD, et al. Biliverdin reductase: a major physiologic cytoprotectant. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(25): 16093-16098.
- 2 Lakin ND, Jackson SP. Regulation of p53 in response to DNA damage. *Oncogene*, 1999, 18: 7644-7655.
- 3 林仲翔, 张志谦, 赵威. 脏器保护与细胞间隙连接. *中华老年多器官疾病杂志*, 2002, 1(1): 70-73; 1(2): 137-141.
- 4 Djousse L, Levy D, Cupples LA, et al. Total serum bilirubin and risk of cardiovascular disease in the Framingham offspring study. *Am J Cardiol*, 2001, 87: 1196-1200; A4, 7.
- 5 Temme E H, Zhang J, Schouten EG, et al. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population. *Cancer Causes Control*, 2001, 12(10): 887-894.
- 6 Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 1987, 235 (4792): 1043-1046.
- 7 Dore S, Takahashi M, Ferris CD, et al. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (5): 2445-2450.
- 8 Barañano DE, Synder SH. Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (20): 10996-11002.

(收稿日期: 2003-04-16)

(本文编辑 缪其宏)

· 消 息 ·

《中华老年多器官疾病杂志》征稿征订启事

《中华老年多器官疾病杂志》是经国家新闻出版署正式批准的新创医学学术期刊, 由解放军总医院主管、该院老年心血管病研究所主办, 王士雯院士任总编辑、国内多学科知名专家组成编委会。本刊于 2002 年 6 月创刊发行。

本刊是针对老年群体特点而创办的, 老年多器官疾病是指老年人同时患有两种或两种以上疾病, 或两个及两个以上器官患病。本刊设有以下栏目: 专题笔谈、述评、论著、论著摘要、经验交流、临床病例(理)讨论、新药与临床、综述、讲座、技术与方法、病例报告、学术动态等。读者对象为从事医学特别是老年医学的临床医师、科研、教学工作、保健人员, 以及有关学科工作者。欢迎医务工作者踊跃投稿。欢迎广大读者订阅。

本刊为季刊, 大 16 开本, 80 页, 每册定价 12 元, 全年 48 元。中国标准刊号为 ISSN 1671-5403 CN 11-4786/R。邮发代号: 82-408。欲订购者可去当地邮局订阅或直接汇款至本刊编辑部。地址: 北京市复兴路 28 号《中华老年多器官疾病杂志》编辑部, 邮编: 100853。联系人: 方爱军。电话/传真: 010-88270497。E-mail: zhldnqg@yahoo.com.cn

《中华老年多器官疾病杂志》编辑部