

· 基础论著 ·

短期使用齐多夫定抑制 p53R2 表达及诱导小鼠神经元凋亡的研究

宋凤丽 张玉林 丁渭 乔录新 徐树莹 张彤 吴昊 陈德喜

【摘要】目的 探讨齐多夫定(AZT)的中枢神经毒性及其相关机制。**方法** 原代培养小鼠大脑皮层神经元,分别用0 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L的AZT作用于细胞,TUNEL法检测细胞凋亡,免疫荧光观察细胞形态,实时定量PCR(qPCR)检测依赖p53的p53R2、抑癌基因p21、胸苷激酶(TK2)mRNA表达及线粒体DNA含量,蛋白印迹检测p53R2与p21蛋白的表达。**结果** AZT 0 mmol/L组(对照组)、50 mmol/L组和100 mmol/L组细胞凋亡率分别为(11.9 ± 3.37)%、(24.3 ± 8.94)%和(54.7 ± 17.9)%,差异具有统计学意义($\chi^2 = 5.19, 19.33, P$ 均<0.01);突起长度分别为(869.21 ± 177.75)mm、(495.76 ± 175.20)mm和(120.38 ± 47.12)mm,且差异均具有统计学意义($F = 19.558, P = 0.002$);real-time qPCR检测结果显示AZT 50 mmol/L和100 mmol/L组p53R2、TK2 mRNA拷贝数分别是对照组的0.42和0.04倍、0.52和0.29倍,组间差异均具有统计学意义($Z = -4.54, -6.65, -4.33$ 和 $-5.24, P$ 均<0.01);AZT 50 mmol/L和100 mmol/L组p21 mRNA拷贝数分别是对照组的0.98和0.86倍,差异无统计学意义($P > 0.05$)。线粒体含量用环氧化酶2(COX-2)拷贝数评估,AZT 50 mmol/L组和100 mmol/L组分别是对照组的0.92和0.87倍,差异无统计学意义($P > 0.05$)。蛋白印迹显示对照组、AZT 50 mmol/L组和100 mmol/L组p53R2蛋白含量依次降低,而p21蛋白含量无差异。**结论** AZT可诱导神经元凋亡,抑制突起形成,推测其机制与p53R2表达降低有关。短期接触AZT可抑制TK2的表达,但对线粒体DNA含量无影响。

【关键词】 齐多夫定;核苷类反转录酶抑制剂;神经毒性;获得性免疫缺陷综合征

Short-term exposure to zidovudine results in low expression of p53R2 and neuronal apoptosis in mouse cortical neuronal cultures SONG Fengli, ZHANG Yulin, DING Wei, QIAO Luxin, XU Shuying, ZHANG Tong, WU Hao, CHEN Dexi. Beijing Liver Diseases Institute; Department of Infectious Diseases, Beijing Youan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100069, China

Corresponding author: CHEN Dexi, Email: dexi09@yahoo.com

【Abstract】 Objective To investigate the central neurotoxicity and the related mechanism of nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors—zidovudine (AZT). **Methods** Mouse primary cortical neurons were cultured and treated with different concentrations of AZT. Neuron apoptosis was analyzed by TUNEL assay and neurite lengths change was confirmed by anti-MAP2 immunofluorescence. Mitochondrial DNA copies which were usually evaluated through COX-2 and the mRNA expression of thymidine kinase 2 (TK2), p53R2 and p21 were tested by real-time polymerase chain reaction (qPCR). The protein expression of p53R2 and p21 was tested with Western blot. **Results** The rate of neuronal apoptosis increased as AZT concentration, with (11.9 ± 3.37)% (control) vs (24.3 ± 8.94)% (50 mmol/L) vs (54.7 ± 17.9)% (100 mmol/L) ($\chi^2 = 5.19, 19.33; P < 0.01$). The average neurite lengths were (869.21 ± 177.75) mm in control and (495.76 ± 175.20) mm in 50 mmol/L AZT treatment group and (120.38 ± 47.12) mm in 100 mmol/L AZT treatment group. There were significant differences between the two groups ($F = 19.558, P = 0.002$). Compared with control group, the relative fold change of p53R2 mRNA copies were 0.42 in 50 mmol/L AZT treatment group and 0.04 in 100 mmol/L AZT treatment group via real-time qPCR. The difference were significant between each two groups ($Z = -4.54$ and $-6.65, P < 0.01$), but the difference of p21 mRNA change was not significant (0.98 vs 0.86; $Z = 1.11$ vs 1.21, $P > 0.05$). Simultaneously, p53R2 protein expression rather

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.01.001

基金项目: 国家自然科学基金重大国际专项(No. 30910103915); 国家科技部“十二五”重大专项(No. 2012ZX10001007, 2012ZX10001004); 国家科技部“十二五”专项(No. 2012ZX10001-003-003)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学附属北京佑安医院

通讯作者: 陈德喜, Email: dexi09@yahoo.com

than p21 significantly decreased according to AZT concentration by Western blot. The relative fold changes of COX-2 were 0.92 in 50 mmol/L AZT treatment group and 0.87 in 100 mmol/L AZT treatment group. The differences were not significant ($Z = 0.63$ and 0.71 , $P > 0.05$). But TK2 mRNA expression significantly decreased according to AZT concentration and the fold changes of it were 0.52 in 50 mmol/L AZT treatment group and 0.29 in 100 mmol/L AZT treatment group ($Z = -4.33$ and -5.24 , $P < 0.01$). **Conclusions** Short-term exposure to AZT may result in neuron apoptosis and neurite shrink by low expression of p53R2. Simultaneously, the expression of TK2 mRNA is low, but mitochondrial DNA maintain stable.

【Key words】 Zidovudine; Nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors (NRTIS); Neurotoxicity; Acquired immune deficiency syndrome (AIDS)

随着高活性抗反转录病毒治疗 (high active antiretroviral treatment, HAART) 水平的不断提高, 人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染者生存期明显延长, HIV 相关神经认知损害 (HIV associated neurocognitive impairment, NCI) 已成为影响 HIV 感染者生存质量及寿命最为重要的慢性并发症之一^[1]。该病的发病机制目前尚不清楚, 多数观点认为是感染的 HIV 病毒通过单核/巨噬细胞进入中枢神经系统而引起炎症反应, 进而导致神经元凋亡所致^[2]。一项临床队列研究显示 HAART 使得艾滋病患者神经认知损害病情稳定, 而另有研究却发现即使进行有效 HAART 治疗, 艾滋病神经损害仍然逐步加重^[3]。最新研究发现长期抗病毒治疗使 HIV 患者的脑血管病发病率成倍增加^[4]。因此, NCI 决不是单纯的病毒损伤, 长期使用抗反转录病毒药物的神经毒性不容小觑。

齐多夫定 (zidovudine, AZT) 属于核苷类反转录酶抑制剂 (nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTIs), 具有很高的血脑屏障 (blood brain barrier, BBB) 通透性, 是治疗晚期 HIV 感染的一线药物, 也是目前 HAART 中最基本的组合成份^[5]。大量资料表明, 长期服用包括 AZT 在内的核苷 (酸) 类似物会产生线粒体毒性反应, 主要表现为乳酸中毒、胰腺炎、脂肪肝及外周神经病变等。然而, 该药的中枢神经毒性目前尚不清楚, 本文拟通过小鼠大脑皮层原代神经元培养探讨 AZT 所导致的中枢神经毒性, 报道如下。

材料与方 法

一、实验材料

AZT 由东北制药厂提供。小鼠抗微管相关蛋白 (MAP-2) 单克隆抗体、Cy3 标记兔抗小鼠 IgG、兔抗 p21 多克隆抗体、右旋多聚赖氨酸、D-葡萄糖 (D-Glucose) 购自美国 Sigma 公司; 小鼠抗

p53R2 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司; 辣根过氧化物酶标记抗小鼠和抗兔二抗购自美国 Jackson 实验室; 锥虫蓝、神经培养基、B27、100 倍浓度 Glutamax、1 倍浓度 Hanks 平衡盐溶液和青链霉素购自美国 Gibco 公司; TUNEL 试剂盒、牛血清白蛋白 (BSA) 和羟乙基哌嗪乙磺酸 (Hepes) 购自美国 Roche 公司。

二、原代神经元培养及 AZT 毒性实验

动物实验严格按照有关实验动物保护规定执行。取孕 16 d 后胎鼠脑组织, 在显微镜下解剖分离液 (1 倍浓度 Hanks 平衡盐溶液 + 2.5 mmol/L Hepes + 30 mmol/L D-葡萄糖 + 2 mmol/L CaCl_2 + 0.5 mmol/L MgSO_4 + 2 mmol/L NaHCO_3 + 0.03% BSA + 1% 青链霉素) 中剥除硬脑膜, 分离出大脑皮层。解剖分离液清洗 2 遍后轻柔吹打, 200 目筛网过滤后, 1500 r/min (离心半径 $r = 10$ cm), 离心 3 min, 弃上清液, 加入神经元培养液 (神经培养基 + 1 倍浓度 Glutamax + 2%B27 + 1% 青链霉素), 接种入右旋多聚赖氨酸包被的细胞培养板。对于预加盖玻片的培养板, 依次将盖玻片在 100% 丙酮中洗涤 40 min, 无水乙醇中洗涤 20 min, 0.1 mol/L 盐酸中洗涤 40 min, 蒸馏水中洗涤 10 min, 高压灭菌 25 min。盖玻片预先放入培养板孔中经由右旋多聚赖氨酸包被。每孔分别加培养液 0.5 ml (24 孔板)、1 ml (12 孔板) 和 2 ml (6 孔板)。细胞接种浓度分别为每孔 2.5×10^5 (24 孔板)、 5.0×10^5 (12 孔板) 和 12×10^5 (6 孔板), 置于 37 °C、体积分数为 5% 的 CO_2 恒湿培养箱温育, 每 3 d 更换 1 次培养液。同时从第 1 天起分别向培养基中加入 0、50 和 100 mmol/L AZT, 每次更换培养基时维持 AZT 浓度不变。细胞培养第 8 天开始以下实验, 并设立 3 次重复实验。

三、细胞凋亡检测

采用 TUNEL 法检测细胞凋亡。细胞培养第 8 天去细胞培养液 (载盖玻片), 40 g/L 多聚甲醛固定 15 min, 1% Trion 穿孔 5 min, 按照 TUNEL 试

剂盒说明书操作。4', 6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染细胞核。荧光显微镜下观察计数存活和凋亡神经元。40倍物镜下每个点取3个视野的平均数。依据公式 TUNEL/DAPI × 100% 计算凋亡细胞比例。

四、免疫荧光抗体的检测

去细胞培养液(载盖玻片)后细胞如下处理: 40 g/L 多聚甲醛固定 5 min; 1% Triton 穿孔 5 min; 3% BSA + 1% 羊血清 37 °C 封闭 1 h; MAP-2 小鼠抗体(1 : 500 稀释) 37 °C 温育 1 h; Cy3 标记抗小鼠二抗(1 : 500 稀释) 37 °C 温育 1 h; DAPI 封片后于德国 Leica-dm500b 型荧光显微镜下阅片; 40 倍物镜下每个点取 3 个视野的平均数。

五、核酸提取和实时定量 PCR 检测

分别应用北京博迈德生物技术公司生产的组织细胞基因组 DNA 提取试剂盒和组织细胞 RNA 提取试剂盒提取培养的神经元基因组 DNA 和总 RNA, 具体方法依照试剂盒说明书操作。应用美国 Invitrogen 公司 Superscript™ III 逆转录聚合酶链反应首链合成系统(first-strand synthesis system for RT-PCR) 试剂盒, 将提取的 RNA 逆转录为 cDNA, 具体操作按照说明书进行。

采用 TaqMan 探针法进行实时定量 PCR (qPCR) 检测神经元基因组 DNA 中 COX-2 含量以及神经元提取 RNA 逆转录的 cDNA 中 TK2 mRNA、p53R2 mRNA 与 p21 mRNA 的含量。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 基因作为内参, 线粒体 DNA 特定序列 COX-2 为评定线粒体 DNA 含量的靶序列, 每个试验点取 3 个检测点的平均值, 同时设立阴性对照。通过胸苷激酶 TK2 mRNA 检测评价 AZT 对线粒体 DNA 损伤及修复功能的影响。通过 p53R2 mRNA 及 p21 mRNA 检测探讨 AZT 诱导神经元调

表 1 COX-2、GAPDH、p53R2 与 p21 引物及探针信息表

名称	序列
GAPDH	
正向引物	5'-CGTGGGGCTGCCAGAATC-3'
反向引物	5'-GGATGCCTTGGCCACAGCCT-3'
探针	5'-FAM-CCCTGCATCCACTGGTGCTGCC-TAMRA-3'
COX-2	
正向引物	5'-CGACCTAAAACCTGGTGAAC-3'
反向引物	5'-TTGGAAGTTCTATTGGCAGAAC-3'
探针	5'-FAM-ACTGCTAGAAAGTTGATAACCGAGTC-TAMRA-3'
TK2	
正向引物	5'-CGTCAGGAACATTGATGTCTC-3'
反向引物	5'-CTCTGGTAGCAGATTTCGGGA-3'
探针	5'-FAM-TTGATCTGATAGTTTATCTGCGAAC-TAMRA-3'
p53R2	
正向引物	5'-AGGCACAGGCTTCTCTGGACAGCA-3'
反向引物	5'-CATCTGCTTTAAGCTTGTCCAGTG-3'
探针	5'-FAMAGAGGTCGACTTATCAAAGGATCTCCC-TAMRA-3'
p21	
正向引物	5'-TGGGGAATAATTCGACAGAG-3'
反向引物	5'-TGCAGCTGGTTGACATCGAG-3'
探针	5'-FAM-GGCACCAAGCAGCCACTGCTGG-TAMR-3'

亡的机制。以上引物和探针由上海 Invitrogen 公司合成, 其序列见表 1。反应体系中使用含有 Taq 酶的 TaqMan 通用 PCR 主要混合物, 引物和探针浓度分别为 300 nmol/L 和 250 nmol/L。反应条件为 95 °C 3 min, 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 共 40 个循环。依照相对于对照组基因拷贝增减的倍数等于 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 的相对定量法计算实验组基因变化。使用仪器为美国 TaqMan 7900HT qPCR 检测系统。

六、蛋白免疫印迹

去细胞培养液后细胞如下处理: 2 倍浓度 loading buffer 裂解, 8% 聚丙烯酰胺凝胶上样, 100 V 电压电泳, 30 V 电压转膜过夜, 6% 脱脂牛奶封闭, 一抗(抗小鼠 p53R2 单克隆抗体与抗兔 p21 多克隆抗体)(1 : 1000 稀释) 37 °C 温育 1 h, 二抗(与上对应的辣根过氧化物酶标记抗小鼠二抗和抗兔二抗)(1 : 1000 稀释) 室温 1 h, 暗室发光。

七、图像数据处理及统计分析

细胞计数、神经元突起长度分析使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 方法采用卡方检验、方差分析和 Wilcoxon 非参数检验。设定双侧 95% 可信区间, 使用 PASW Statistics 18 统计软件统计分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、AZT 对神经元凋亡的诱导作用

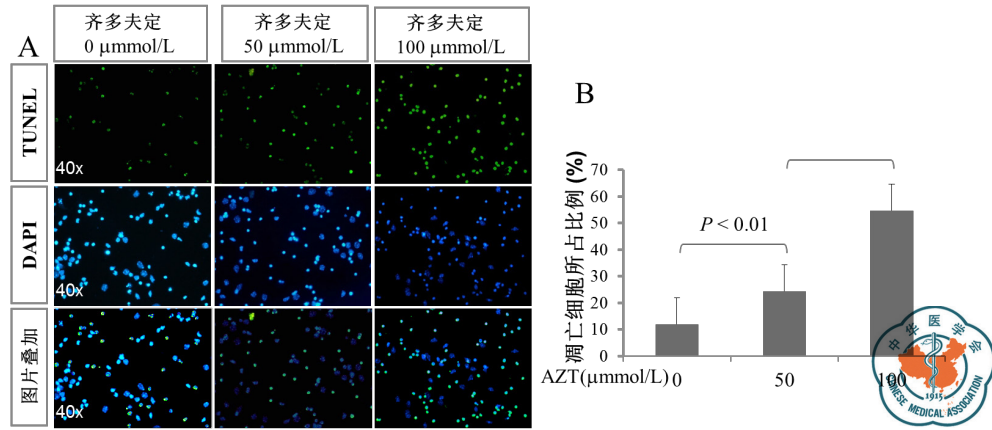
成活神经元细胞 DAPI 染色和死亡/凋亡细胞 TUNEL 染色见(图 1A)。AZT 0 mmol/L (对照组)、AZT 50 mmol/L 组和 AZT 100 mmol/L 组凋亡细胞所占比例分别为(11.9 ± 3.37)%、(24.3 ± 8.94)% 和(54.7 ± 17.9)%, 其中 AZT 50 mmol/L 组细胞凋亡率显著高于对照组, AZT 100 mmol/L 组显著高于 AZT 50 mmol/L 组, 差异均具有统计学意义($\chi^2 = 5.19$ 和 19.33, $P < 0.01$) (图 1B)。提示 AZT 可诱导中枢神经元凋亡, 且该作用与药物浓度有关。

二、AZT 对神经元突起形成的抑制作用

对照组、AZT 50 mmol/L 组和 AZT 100 mmol/L 组神经突起长度分别为(869.21 ± 177.75) mm、(495.76 ± 175.20) mm 和(120.38 ± 47.12) mm, 差异具有统计学意义($F = 19.558$, $P = 0.002$), 其中任两组间差异具有统计学意义($P < 0.01$), 见图 2。

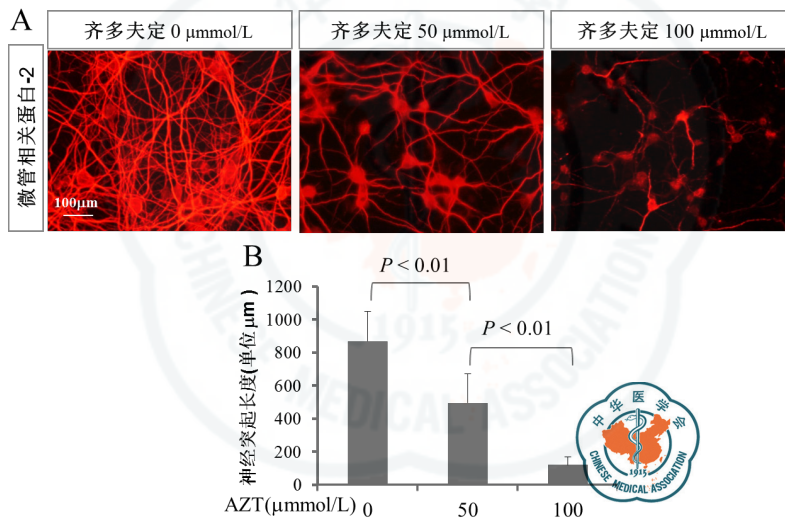
三、短期接触 AZT 对神经元 TK2 mRNA 及线粒体 DNA 含量的影响

AZT 50 mmol/L 组和 AZT 100 mmol/L 组线粒体 DNA 拷贝数分别是对照组的 0.92 和 0.87 倍, 组



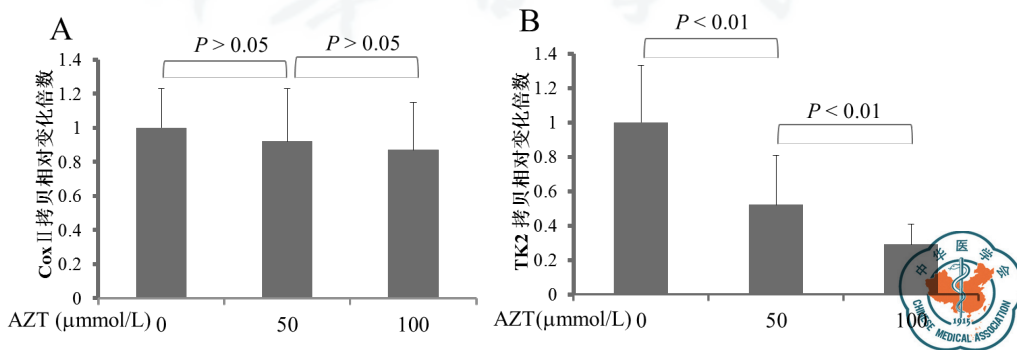
注: 图 1A: 荧光显微镜下 TUNEL/DAPI 染色细胞凋亡形态学 (40 ×); 图 1B: 基于 TUNEL/DAPI 染色的细胞凋亡数据分析结果

图 1 AZT 可诱导神经元凋亡



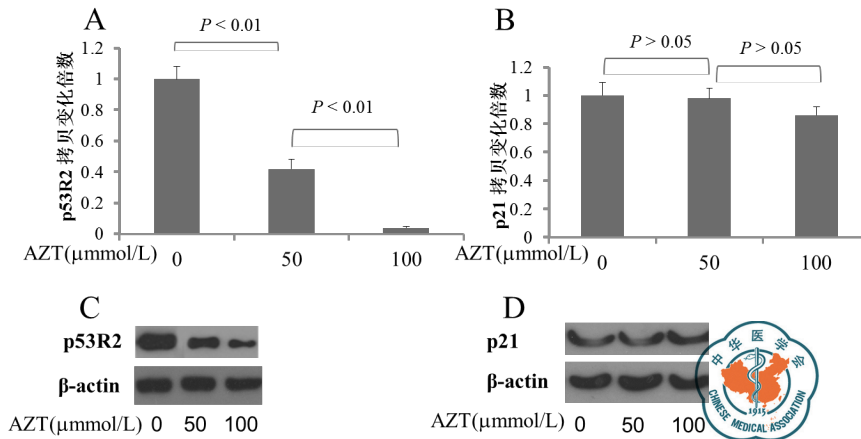
注: 图 2A: 荧光显微镜下神经突起形态学变化 (抗微管相关蛋白 2 单克隆抗体 Cy3 标记的免疫荧光染色, 40 ×); 图 2B: 神经突起长度变化统计图

图 2 AZT 可抑制神经元突起形成



注: 图 3A: 线粒体 DNA 相对含量的变化 (对照组与 AZT 50 mmol/L 组间比较: $Z = 0.63, P = 0.076$; AZT 50 mmol/L 组与 AZT 100 mmol/L 组间比较: $Z = 0.71, P = 0.094$); 图 3B: TK2 mRNA 拷贝数相对含量的变化 (对照组与 AZT 50 mmol/L 组间比较: $Z = -4.33, P = 0.004$; AZT 50 mmol/L 组与 AZT 100 mmol/L 组间比较: $Z = -5.24, P = 0.000$)

图 3 短期接触 AZT 不影响神经元线粒体 DNA 含量但可抑制 TK2 表达



注: 图4A: p53R2 mRNA相对拷贝数变化(对照组与AZT 50 mmol/L组间比较: $Z = -4.54$, $P = 0.000$; AZT 50 mmol/L组与AZT 100 mmol/L组间比较: $Z = -6.65$, $P = 0.001$); 图4B: p21 mRNA相对拷贝数变化(对照组与AZT 50 mmol/L组间比较: $Z = 1.11$, $P = 0.078$; AZT 50 mmol/L组与AZT 100 mmol/L组间比较: $Z = 1.21$, $P = 0.055$); 图4C: p53R2蛋白表达变化; 图4D: p21蛋白表达变化

图4 短期接触AZT不影响神经元p21的表达但可抑制p53R2 mRNA及蛋白水平的表达

间差异无统计学意义($Z = 0.63$ 和 0.71 , $P > 0.05$)(图3A)。AZT 50 mmol/L组和AZT 100 mmol/L组的TK2 mRNA拷贝数分别是对照组的0.52和0.29倍,组间差异具有统计学意义($Z = -4.33$ 和 -5.24 , $P < 0.01$)(图3B),提示AZT抑制TK2活性,且此作用随着AZT浓度的增高而增强。

四、AZT通过降低p53R2表达机制诱导神经元凋亡

核苷酸还原酶p53R2在p53调控细胞周期,继而启动线粒体和核DNA修复中发挥重要作用^[6]。p21是周期调节蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent protein kinases, CDKs)抑制剂,可结合并抑制CDK1或CDK2,作为细胞进入G1期的调控子,介导p53依赖性细胞周期G1期抑制^[7-8]。通过管家基因GAPDH作为内参,AZT 50 mmol/L组和AZT 100 mmol/L组p53R2 mRNA拷贝数分别是对照组的0.42和0.04倍,组间差异具有统计学意义($Z = -4.54$ 和 -6.65 , $P < 0.01$)(图4A);免疫蛋白印迹显示一致结果(图4C),提示AZT抑制了p53R2活性。AZT 50 mmol/L组和AZT 100 mmol/L组p21 mRNA拷贝数分别是对照组的0.98和0.86倍,组间差异无统计学意义($Z = 1.11$ 和 1.21 , $P > 0.05$)(图4B),免疫蛋白印迹结果一致(图4D),提示AZT对p21活性并无影响。

讨 论

中枢神经系统(central nervous system, CNS)

是HIV主要储藏库之一。随着单核/巨噬细胞进入CNS的HIV一方面可以利用BBB躲避抗病毒药物的杀灭,从而有效复制;另一方面可释放gp120和tat等包膜蛋白或利用感染的单核/巨噬细胞和神经胶质细胞释放的炎性介质对中枢神经元发动攻击,产生神经毒性。因此,BBB的通透性是决定抗反转录病毒药物是否具有HIV神经病变治疗作用的重要因素之一。核苷类药物AZT具有较高的BBB通透性,可有效杀灭CNS中的HIV,因此,广泛用于中枢神经相关的抗HIV治疗中。由于目前尚无有效办法将感染者体内的HIV完全清除,因此大多数患者需要长期接受包括NRTIs在内的HAART治疗,将导致长期HAART治疗的药物毒副作用产生。

研究发现,长期使用NRTIs可产生周围感觉神经病变^[9]。但相关机制尚未明确,多数研究认为,NRTIs仅加重了HIV所致的周围感觉神经损伤^[10]。然而,关于核苷类药物的中枢神经毒性鲜有报道。因此,观察和研究NRTIs的中枢神经损伤显得尤为重要和紧迫。本文应用培养的神经元体外研究发现,AZT可诱导神经元的凋亡,同时还可抑制神经突起的形成,并且这种损伤呈浓度依赖性。提示AZT对中枢神经元的早期直接作用可诱导细胞凋亡和亚凋亡,从而产生神经损伤。

长期使用核苷类药物可产生线粒体毒性。包括AZT在内的核苷类药物需要通过宿主内源性TK(胞质主要是TK1,线粒体主要是TK2)磷酸化为三磷酸活性形式,继而成为DNA聚合酶和病毒反转录酶底物,竞争性整合入病毒DNA,通过脱氧核糖

3-OH 基化学修饰形成 DNA 分子的 3'-5' 磷酸键, 阻止下游核苷酸加入, 从而使病毒复制过程终止。其中, TK2 是哺乳动物细胞线粒体内重要的激酶, 可将由胞质进入线粒体内的单核苷酸磷酸化为三磷酸活性形式, 从而在线粒体 DNA 合成与修复中发挥重要作用^[11-12]。因此, 该酶的检测对于评估核苷类药物药理作用和毒副作用都具有重要的意义。核苷(酸)类药物的磷酸化是其有效发挥抗病毒作用的前提, 同时也是该类药物竞争内源性核苷酸磷酸化, 从而产生线粒体毒性的关键步骤, TK2 表达量减少先于线粒体 DNA 含量改变, 说明其对 AZT 毒性损伤较为敏感, 可能作为判断 NRTIs 线粒体毒性的一个早期指标, 虽然其确切机制有待进一步研究。由于线粒体 DNA 位于线粒体内膜, 该部位同时也是线粒体氧化磷酸化部位, 因此, 氧化应激和修复缺陷在 NRTIs 所致线粒体损伤中具有重要作用^[11]。随着药物剂量的增加和用药时间的延长, NRTIs 的毒副作用将会愈加显著。只有当 NRTIs 所致的线粒体损害在时间和量上积累到一定程度, 超出线粒体自身修复能力, 才会出现临床症状^[14]。由于原代神经元寿命短(12 d 左右), 且不能像肿瘤细胞株一样进行传代培养, 故本研究中神经元线粒体含量未受 AZT 影响, 可能与细胞接触药物时间较短有关。而在长期给药的动物模型中, 该毒性可能会变得更为显著。

TK 酶的激活作用受到胞浆内核苷酸还原酶 p53R2 的调节。哺乳动物有两种核苷还原酶活性形式。两种形式都含有具有催化活性的 R1 蛋白, 而 R1 蛋白与 R2 或 p53R2 蛋白结合就形成了完整的核苷还原酶。增殖期(S 期)细胞胞浆内为 R1/R2 RNA 形式, 利于线粒体和核 DNA 复制, 而非增殖期(G0/G1)细胞胞浆内为 R1/p53R2 RNA 形式, 利于线粒体和核 DNA 修复^[15]。长期使用核苷(酸)类药物可抑制 DNA 聚合酶 γ 活性, 产生线粒体毒性。短期使用核苷类药物 AZT 作用于神经元细胞, 虽不影响线粒体 DNA 含量, 但抑制 TK2 活性; 结合 p53R2 活性减低, 而 p21 表达无改变, 考虑 AZT 诱导细胞凋亡可能与抑制 p53 介导的线粒体 DNA 损伤修复有关, 而非通过 p21 介导的 p53 依赖性细胞周期抑制。

参考文献

- 1 Levine AJ, Miller JA, Shapshak P, et al. Systems analysis of human brain gene expression: mechanisms for HIV-associated neurocognitive impairment and common pathways with Alzheimer's disease[J]. BMC Med Genomics, 2013, 6:4-24
- 2 张玉林, 张彤, 吴昊, 等. 人免疫缺陷病毒相关痴呆症诊断策略[J]. 中华内科杂志, 2011, 30(1):4-9
- 3 Kandaneeratchi A, Williams B, Everall IP. Assessing the efficacy of highly active antiretroviral therapy in the brain[J]. Brain Pathol, 2003, 13(1):104-110.
- 4 Lanoy E, Guiguet M, Bentata M, et al. Survival after neuro AIDS: association with antiretroviral CNS Penetration-effectiveness score[J]. Neurology, 2011, 76(7):644-651.
- 5 Santos JV, Pina ME, Marques MP, et al. New sustained release of zidovudine matrix tablets-cytotoxicity toward Caco-2 cells [J]. Drug Dev Ind Pharm, 2013, 39(8):1154-1166.
- 6 Guittet O, Håkansson P, Voevodskaya N, et al. Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase in vitro with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells[J]. J Biol Chem, 2001, 276(44):40647-40651.
- 7 Hoeflerlin LA, Oleinik NV, Krupenko NI, et al. Activation of p21-dependent G1/G2 arrest in the absence of DNA damage as an antiapoptotic response to metabolic stress[J]. Genes Cancer, 2011, 2(9):889-899.
- 8 Wallace MR, Moss RB, Beecham HJ 3rd, et al. Early clinical markers and CD4 percentage in subjects with human immunodeficiency virus infection[J]. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996, 12(4):358-362.
- 9 Gray LR, Tachedjian G, Ellett AM P, et al. The NRTIs lamivudine, stavudine and zidovudine have reduced HIV-1 inhibitory activity in astrocytes[J]. PLoS One, 2013, 8(4):1-7.
- 10 Cherry CL, McArthur JC, Hoy JF, et al. Nucleoside analogues and neuropathy in the era of HAART[J]. J Clin Virol, 2003, 26(2):195-207.
- 11 Chen G, He C, Li L, et al. Nuclear TK1 expression is an independent prognostic factor for survival in pre-malignant and malignant lesions of the cervix[J]. BMC Cancer, 2013, 13:249-257.
- 12 Paradas C, Gutierrez Rios P, Rivas E, et al. TK2 mutation presenting as indolent myopathy[J]. Neurology, 2013, 8(50):504-506.
- 13 Lund KC, Wallace KB. Direct effects of nucleoside reverse transcriptase inhibitors on rat cardiac mitochondrial bioenergetics[J]. Mitochondrion, 2004, 4(2-3):193-202.
- 14 Martin AM, Hammond E, Nolan D, et al. Accumulation of mitochondrial DNA mutations in human immunodeficiency virus-infected patients treated with nucleoside-analogue reverse-transcriptase inhibitors[J]. Am J Hum Genet, 2003, 72(3):549-560.
- 15 Pontarin G, Ferraro P, Håkansson P, et al. p53R2-dependent ribonucleotide reduction provides deoxyribonucleotides in quiescent human fibroblasts in the absence of induced DNA damage[J]. J Biol Chem, 2007, 282(23):16820-16828.

(收稿日期: 2013-06-03)

(本文编辑: 孙荣华)