

未折叠蛋白应答通路调控机制的研究进展及其临床应用前景

郭筱华,赵忠新*

(第二军医大学长征医院神经内科,上海 200003)

[摘要] 未折叠蛋白应答(unfolded protein response,UPR)是应激条件下细胞中内质网的一种保护性反应。在哺乳动物中,其主要通过内质网跨膜蛋白(IRE1、PERK及ATF6)转导的3条信号通路发挥效应,并依赖相关蛋白、因子进行正负反馈调控,以维持细胞功能正常。如果应激持续存在,UPR调控失衡,诱导细胞凋亡或死亡,引发相关疾病。不少研究选取UPR通路中的关键因子作为疾病治疗靶点,取得一些进展,提供了新的临床思路,具有广阔的应用前景。

[关键词] 内质网;蛋白质折叠;基因表达调控;细胞凋亡

[中图分类号] R 341 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)03-0325-04

Regulation mechanism of unfolded protein response: progress and clinical prospect

GUO Xiao-hua, ZHAO Zhong-xin* (Department of Neurology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] Unfolded protein response(UPR) is a protective response in cell endoplasmic reticulum (ER) under stress condition. Three ER transmembrane proteins, IRE1, PERK, and ATF6, coordinately regulate the UPR function in mammalian cells through their signaling pathways. In addition, some proteins and transcription factors during the UPR can provide negative and positive feedback loops to maintain the normal function of ER. UPR can trigger cell death or apoptosis and eventually cause related diseases if the ER stress persists. Several key mediators of UPR are candidates for therapeutic targets in many studies. Up to now progress has been made in the area, which provides new ideas for clinical practice and holds a great potential for future application.

[KEY WORDS] endoplasmic reticulum; protein folding; gene expression regulation; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28(3):325-328]

内质网功能紊乱时出现蛋白错误折叠、未折叠蛋白在腔内聚集以及Ca²⁺平衡紊乱的状态,称为内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)。其中由蛋白质堆积所引起的一系列后续反应称为未折叠蛋白应答(unfolded protein response,UPR)。过去十多年的研究使我们对UPR信号转导机制有了总体的了解。目前在UPR信号调控机制方面的研究更加深入,UPR的3条通路如何有序活化和整合?在应激持续存在时,UPR如何调控使细胞最终接受凋亡或死亡的命运而不是努力生存?本文综述这些领域的研究进展和临床研究前景。

1 UPR通路和调控

1.1 UPR的3条通路 见图1。目前证实有3种UPR信号转导蛋白:激酶IRE1(inositol-requiring kinase 1)和PERK(PKR-like ER kinase),转录因子ATF6(activating transcription factor 6)。3种信号转导蛋白的活化均依赖于与调控蛋白BIP(immunoglobulin binding protein)的解离。生理条件下,BIP与PERK、IRE1、ATF6结合停留在内质网腔内。当未折叠蛋白质积累时,它们与BIP解离。BIP与转导蛋白的结合区也是它的肽结合区。因此,UPR活化的可能模式是,当BIP浓度很高时(BIP是内质网内最丰富的蛋白),IRE1、PERK、ATF6的内质网区能更迅速地与BIP结合,而不是相

互间结合;BIP也可能优先与未折叠蛋白结合^[1]。这样,未折叠蛋白的堆积促使结合型的BIP与转导蛋白分离。转导蛋白活化的共同结果是相关基因表达上调。PERK的活化导致翻译起始因子eIF2(eukaryotic initiation factor 2)的 α 亚基磷酸化,使蛋白合成受抑;IRE1通过活化的Irelp的核酸内切酶切割XBP1 mRNA(X-box binding protein 1,XBP1)前体,形成有活性的XBP1 mRNA调节蛋白转录;ATF6的胞质区移位入核上调下游转录蛋白^[2]。研究发现B细胞分化致IRE1通路活化,并不引起ATF6和PERK通路的下游信号CHOP(C/EBP-homologous protein)上调^[3-4]。因此推测,UPR的3条通路可以选择性活化。

UPR通过一系列适应性反应提高内质网处理未折叠或错折叠蛋白的能力。首先活化的是PERK介导的蛋白翻译抑制。由于eIF2 α 是PERK的直接底物,eIF2 α 的磷酸化不需核移位、转录或翻译,因此内质网应激后迅速发生蛋白翻译抑制。Novoa等^[5]报道eIF2 α 磷酸化和翻译抑制30 min即完成。翻译抑制的作用是阻止更多的初生蛋白进入已经饱和的内质网。同样,应激后也立即出现ATF6剪切,其下

[作者简介] 郭筱华,硕士生,主治医师。

E-mail: xhguo21@yahoo.com.cn

* Corresponding author. E-mail: zhaozx@medmail.com.cn

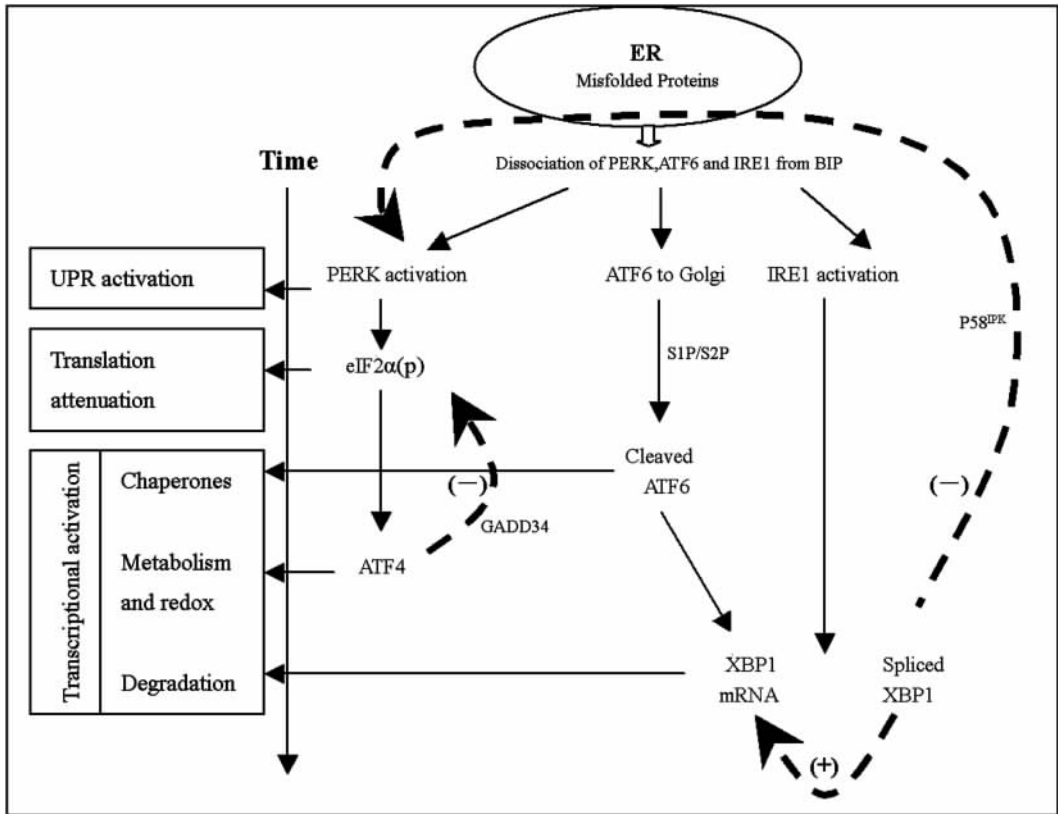


图 1 内质网跨膜蛋白 PERK,ATF6 和 IRE1 转导未折叠蛋白应答 3 条通路及各通路有序活化大致进程和正负反馈回路
 Fig 1 The 3 pathways of PERK,ATF6 and IRE1 mediated unfolded protein response and the positive and negative feedback loops
 The broken arrows represent feedback loops, both positive [(+)] and negative[(-)]

游基因表达有赖于核转运、转录和翻译。因此,UPR 早期蛋白翻译暂时性抑制,给细胞一个喘息的机会;随后 ATF6 诱导基因表达,像内质网伴侣分子 BIP, PDI (protein disulfide isomerase) 和 GRP94 (glucose regulated protein 94) 等,提高内质网应激细胞处理未折叠蛋白的能力^[6]。此外,ATF4 也转录诱导基因表达。ATF4 是转录因子 CREB (cAMP response-element-binding) 家族成员之一,它的 mRNA 序列 5' 端存在特殊的上游开放阅读框 (upstream open reading frames, uORFs), eIF2 α 的磷酸化使 ATF4 ORF 翻译合成 ATF4 蛋白^[7]。不仅在内质网应激时 PERK 使 eIF2 α 磷酸化,而且在其他应激时非 PERK eIF2 α 激酶,包括 GCN2 (general control non-derepressible-2), PKR (double strand RNA-dependent protein kinase) 和 HRI (heme reticulocytes inhibitor) 等,也能使 eIF2 α 磷酸化。因此,ATF4 对各种应激的恢复很重要,而 ATF6 是特异性的缓解内质网应激。

IRE1 通路要在后期才完全活化,这是由于 IRE1 的底物 XBP1 mRNA 在非应激细胞内表达水平非常低。在内质网应激时,XBP1 mRNA 通过 ATF6 诱导表达,这样可能仅在上游的起始转录诱导后,XBP1 mRNA 表达量才增加,以保证依赖 XBP1 的 IRE1 通路在 PERK 和 ATF6 通路后活化。尽管对 XBP1 剪接反应的基因还不确定,但这些基因包括内

质网甘露糖苷酶-I 样蛋白 (α -mannosidase I-like protein, EDEM), 其与错折叠糖蛋白的降解有关^[8]。因此,UPR 有序活化的 3 个阶段可能是早期蛋白合成暂停,随后内质网分子伴侣表达上调,后期诱导内质网相关性降解。

1.2 UPR 正负反馈调控 见图 1。UPR 通过反馈机制来保证反应既不过强也不过早结束。两条抑制 PERK 通路的负反馈回路是由 GADD34 (growth arrest and DNA damage 34) 和 PKR 抑制蛋白 P58^{IPK} 调控。GADD34 是 DNA 损伤和生长抑制基因家族成员之一。GADD34 结合蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1), 而 PP1 使磷酸化的 eIF2 α 脱磷酸,蛋白合成中断得以恢复^[5,9]。p58^{IPK} 是一种复合分子伴侣,能抑制 PERK 磷酸化和 PERK 激酶的活性,从而减弱内质网应激和蛋白合成抑制作用。与 GADD34 在内质网应激后仅几小时就表达不一样,p58^{IPK} 蛋白的水平要更晚才会增加(应激诱导后约 12 h)。因此推测 p58^{IPK} 的作用是当细胞克服应激后终止 UPR。p58^{IPK} 存在于 IRE1 活化的下游区,表明 UPR 的调控从 PERK 和 ATF6 的早期活化转移到后阶段 IRE1 活化^[10]。

负反馈通路可以缓解内质网应激,而正反馈调节确保当应激持续存在时,某些反应效应被强化。因此,尽管 ATF6 能与转录因子 NF-Y (nuclear factor-Y) 一起诱导 XBP1 表

达,但 XBP1 转录因子也能直接调节 XBP1 基因的自身转录,而不依赖于 NF-Y,这表明可能允许一种自动调节的正反馈回路,维持 IRE1 通路甚至后来的 PERK 和 ATF6 通路信号下调^[1]。因此,在慢性应激期间,许多 UPR 反应基因的调控从 ATF6 转变为 XBP1。

2 UPR 与细胞凋亡

除了诱导基因表达使细胞在内质网应激反应过程中继续生存外,UPR 也启动了细胞促凋亡通路。通常把凋亡的启动分成内源性通路和外源性通路。外源性通路通过细胞膜上的“死亡受体”,如肿瘤坏死因子受体 1 及 CD95/Fas/Apo1 受体等,活化 caspase8/10 引起凋亡;内源性通路通过 bcl-2 家族蛋白,启动线粒体介导的凋亡通路。内源性和外源性凋亡通路相互关联。内质网单独或协同参与凋亡过程,并且有赖于这两条通路。

Caspase-12 位于内质网胞质面,以前体形式存在。内质网应激时,IRE1 和 TRAF2 (tumor necrosis factor receptor associated factor-2) 形成复合物,导致 TRAF2 从其与 caspase-12 前体形成的复合物上解离,激活 caspase-12,引起细胞凋亡。可见 caspase-12 的活化与 UPR 通路中 IRE1 的信号转导有关。此外,应激条件下,活化的 IRE1 招募 C-JUN 氨基末端激酶 (the c-jun N-terminal kinase, JNK) 和 TRAF2, TRAF2 激活细胞凋亡信号激酶 1 (apoptosis signal-regulating kinase, ASK1),活化的 ASK1 进一步激活 JNK 和线粒体介导的细胞凋亡^[11]。

内质网、线粒体和胞质中钙离子参与凋亡。研究发现, caspase-12 的活化需要钙的调控,钙蛋白酶切割内质网膜上的 caspase-12,产生 caspase-12 活性片段。蛋白 Bax、Bad 和 Bak 被证实参与 UPR 期间参与内质网钙离子的释放。发生内质网应激时,Bax 和 Bak 在内质网膜上经历构象改变和/或寡聚化作用,而且位于内质网上的 Bak 导致内质网钙释放和 caspase-12 活化^[12]。由于线粒体膜电势梯度迅速地摄取从内质网释放的钙离子,线粒体钙超载导致线粒体内膜的崩解,释放细胞色素 C 引起凋亡。阻断线粒体内膜崩解能抑制但不是完全解除内质网应激诱导的凋亡^[13]。最近发现 c-Abl、Bbc3-PUMA、BAP31 也涉及内质网诱导的凋亡^[1],这些蛋白在钙平衡中所起的作用还不清楚。

促凋亡转录因子 CHOP 是 UPR 中 PERK 和 ATF6 通路中的下游信号,由 ATF4 和 ATF6 诱导表达,抑制 bcl-2,促进凋亡。CHOP^{-/-} 细胞能适当地抗内质网应激诱导的凋亡^[14]。内质网膜上的 BAP31 蛋白也可被 caspase-8 特异剪切,使线粒体破裂而释放细胞色素 C,引发凋亡^[15]。

UPR 启动的促凋亡通路是复杂而多层次的,与线粒体通路和死亡受体通路相互联系。UPR 中促凋亡信号与促细胞生存信号如何相互权衡使细胞接受死亡的命运,还值得深入探讨。不同的应激形式诱导不同的凋亡通路,这表明应激源本身的特点在诱导细胞凋亡的时间和方式上起作用。

3 UPR 和疾病靶点治疗的研究进展

以往的研究表明 UPR 与多种疾病相关,包括蛋白错折叠引起的疾病,如:纤维囊泡症、 α 1-抗胰蛋白酶病、高胆固醇血症和各种神经系统变性疾病 (Alzheimer 病、帕金森病等);内质网固有蛋白功能障碍引起的疾病:如糖尿病和双相性精神障碍;UPR 也与肿瘤的发生和发展密切相关^[16]。因此把 UPR 通路中的关键因子选做治疗的靶点成为研究的热点。

ASK1 在内质网应激中通过 IRE1-TRAF2-ASK1-JNK 途径引发凋亡。还原型的硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 与 ASK1 结合抑制 ASK1 活化。因此最近 TRX 相关分子在内质网应激中的保护作用引起关注。研究发现, TMX (transmembrane TRX-related protein) 是位于内质网内的 TRX 相关蛋白家族新成员,能抗内质网应激诱导的凋亡^[17]。缺乏 CHOP 基因的鼠对内质网应激诱导的细胞死亡的易感性下降,但理论上很难找到 CHOP 抑制剂。由于 p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) 增强 CHOP 活性,目前发现,在炎症性疾病中该激酶的小分子拮抗剂可起保护作用^[18]。最近证实了磷酸化 eIF2 α 脱磷酸抑制剂小分子 salubrinal,能特异性地抑制 PPI-GADD34 磷酸酶的活性,使得 eIF2 α 持续磷酸化,从而应对内质网应激引起的细胞死亡。Salubrinal 将可能作为一种新的保护剂用于 2 型糖尿病患者减轻胰腺 B 细胞死亡发生以及成为疱疹病毒感染的辅助治疗手段^[19]。

此外,c-Abl 传递从内质网到线粒体的死亡信号,因此 c-Abl 抑制剂 imatinib mesylate (Gleevec) 发现在缺血和变性疾病中有益^[20]。去除各种 caspase 的鼠,能在 ERS 参与的卒中损伤中对抗内质网应激诱导的凋亡^[21]。Caspase 抑制剂 zVAD-fmk (benzoyl-valinyl-alanyl-asparty-fluoromechylketone),在内质网应激相关的凋亡通路中抑制 caspase-12 的活性^[22]。缺乏 iNOS 的鼠显示对脑缺血敏感性下降,并且减少 CHOP 的表达^[23]。促凋亡 Bcl-2/Bax 家族蛋白的抑制剂可能改善由于 ERS 导致的组织损伤^[24]。

由于多条平行通路启动细胞凋亡信号,因此仅仅阻止其中的一条通路仍不能维持细胞生存。将来可通过更多的对凋亡通路中基因和基因产物的研究找到有效的治疗手段。

4 展望

内质网应激时激活的 UPR 通路是维持细胞生存的基本手段。IRE1、PERK 及 ATF6 转导的 3 条通路有序活化和整合,使得 UPR 既不过强也不过早终止。当细胞功能不能恢复时,UPR 启动促凋亡通路,细胞接受凋亡或死亡,机体清除受损细胞。这些 UPR 调控机制的研究仍在不断深入,尤其是 UPR 和细胞内其他信号通路是如何相互影响和统一等问题正引起学者的关注。尽管我们知道内质网内未折叠和错折叠蛋白的积聚是多种疾病的病因,但缺乏有效的治疗手段。随着对 UPR 更进一步的理解,将来可能针对其多个环

节设计药物激活或抑制 UPR 通路,达到治疗的目的。

[参考文献]

- [1] Rutkowski D T, Kaufman R J. A trip to the ER: coping with stress[J]. *Trends Cell Biol*, 2004, 14:20-28.
- [2] Lee K, Tirasophon W, Shen X, et al. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response[J]. *Genes Dev*, 2002, 16: 452-466.
- [3] Gass J N, Gifford N M, Brewer J W. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells[J]. *J Biol Chem*, 2002,277:49047-49054.
- [4] Ma Y, Brewer J W, Diehl J A, et al. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response[J]. *J Mol Biol*, 2002, 318:1351-1365.
- [5] Novoa I, Zhang Y, Zeng H, et al. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression[J]. *EMBO J*, 2003, 22:1180-1187.
- [6] Okada T, Yoshida H, Akazawa R, et al. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response[J]. *Biochem J*,2002,366:585-594.
- [7] Harding H P, Novoa I, Zhang Y, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells[J]. *Mol Cell*, 2000,6:1099-1108.
- [8] Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, et al. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response[J]. *Dev Cell*, 2003,4:265-271.
- [9] Ma Y, Hendershot L M. Delineation of a negative feedback regulatory loop that controls protein translation during endoplasmic reticulum stress[J]. *J Biol Chem*,2003, 278: 34864-34873.
- [10] van Huizen R, Martindale J L, Gorospe M, et al. P58^{IPK}, a novel endoplasmic reticulum stress-inducible protein and potential negative regulator of eIF2 alpha signaling[J]. *J Biol Chem*, 2003,278:15558-15564.
- [11] Kaufman R J. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease[J]. *J Clin Invest*,2002,110:1389-1398.
- [12] Zong W X, Li C, Hatzivassiliou G, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis[J]. *J Cell Biol*, 2003,162:59-69.
- [13] Filippin L, Magalhaes P J, Di-Benedetto G, et al. Stable interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum allow rapid accumulation of calcium in a subpopulation of mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 2003,278:39224-39234.
- [14] McCullough K D, Martindale J L, Klotz L O, et al. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state[J]. *Mol Cell Biol*, 2001,21:1249-1259.
- [15] Breckenridge D G, Stojanovic M, Marcellus R C, et al. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol[J]. *J Cell Biol*, 2003, 160: 1115-1127.
- [16] Cullinan S B, Diehl J A. Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006,38: 317-332.
- [17] Masutani H, Ueda S, Yodoi J. The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis[J]. *Cell Death Different*,2005,12: 991-998.
- [18] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed J C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115:2656-2664.
- [19] Wiseman R L, Balch W E. A new pharmacology: drugging stressed folding pathways[J]. *Trends Mol Med*, 2005, 11:347-350.
- [20] Ito Y, Pandey P, Mishra N, et al. Targeting of the c-Abl tyrosine kinase to mitochondria in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. *Mol Cell Biol*, 2001,21:6233-6242.
- [21] Yuan J, Yankner B A. Apoptosis in the nervous system[J]. *Nature*, 2000,407:802-809.
- [22] Smith W W, Jiang H, Pei Z H, et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity [J]. *Hum Mol Genet*, 2005,14:3801-3811.
- [23] Iadecola C, Zhang F, Casey R, et al. Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene[J]. *J Neurosci*, 1997,17: 9157-9164.
- [24] Chae H J, Kim H R, Xu C, et al. BI-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress[J]. *Mol Cell*, 2004,15:355-366.

[收稿日期] 2006-07-19

[修回日期] 2007-02-05

[本文编辑] 贾泽军