

热休克蛋白 HSP70 和 gp96 在抗病毒感染中的作用

杨柳萌¹ 刘红亮^{1,2} 郑永唐^{1*}

(¹中国科学院昆明动物研究所, 昆明 650223; ²中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 热休克蛋白(HSP)是一组在进化上高度保守、具有重要生理功能的蛋白质家族,是生物在应激条件下产生的一种非特异性防御产物,在调节免疫应答和抗病毒反应中起重要作用。现简要介绍 HSP70、gp96(HSP96, GRP94)这两种 HSP 与病毒感染的关系及在抗病毒感染中的作用。

关键词 HSP70; gp96; 病毒感染; HIV

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一组生物体内普遍存在、进化上高度保守、具有重要生理功能的蛋白质家族,是生物在应激条件下产生的一种非特异性、能增强机体对高低温、创伤、细菌和病毒感染等适应能力的防御性产物。各种应激因素,如环境(高/低温)、病理(细菌/病毒感染)、生理(缺氧/缺血)等均可诱导细胞产生 HSP,故又被称为应激蛋白。HSP 的主要生理功能是促进与维持新生多肽链的正确折叠,并且调节细胞的生长、分裂、分化、死亡。由于 HSP 参与蛋白质的转运、折叠和装配,所以 HSP 又被称为“分子伴侣”。根据分子量的大小和同源程度将 HSP 分为 HSP110、HSP90、HSP70、HSP60、小分子 HSP 等几个家族^[1,2]。近年来 HSP 在抗病毒感染中作用及机制的研究受到高度重视,本文简要介绍 HSP70、gp96 (HSP96, GRP94)两种 HSP 在抗病毒感染中的作用。

1 HSP70 和 gp96 的结构

HSP70 家族广泛存在于各个亚细胞结构中。HSP70 家族的结构分为 3 部分: N 端(44 kDa)由 4 个 α 螺旋形成一个裂缝,比 C 端具有更高的保守性,它具有 ATP 酶活性,类似肌动蛋白 ATP 酶结构域; 18 kDa 部分,由 4 个反向平行的 β 折叠和一个 α 螺旋构成,是多肽的结合部位; C 端(10 kDa)主要由 α 螺旋构成,是多肽和蛋白质结合的部位,不同 HSP70 分子该部分的同源性较低,空间结构类似于主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex, MHC)结合肽的结构域。另外, C 端还具有 EEVD 四个氨基酸序列,这在 HSP70 家族和 HSP90 家族中都是高度保守的^[2]。

gp96(GRP94)主要存在于内质网(ER)腔。gp96 的 N 端具有跨膜序列,所以能在细胞膜上表达,靠近 N 末端有 2 个 Walker 盒,可能是 ATP 结合位点,二聚化位点是第 692~709 位氨基酸残基,靠近肽结合位点和 C 末端;其 C 端具有 ER 腔定位序列 KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu),后者是从高尔基体到 ER 的一个反馈信号。gp96 是 ER 腔中肽分子的结合受体,促使 MHC-I 类分子与肽分子的结合^[2]。

2 HSP 在抗病毒感染中的作用

2.1 病毒感染诱导细胞产生 HSP

体外实验证明,病毒可以诱导宿主细胞产生 HSP,而病毒本身不表达 HSP。许多 DNA 和 RNA 病毒(如 HIV、HSV、VSV、HBV、SV40、新城疫病毒、脊髓灰质炎病毒、牛痘病毒、腺病毒、流感病毒、巨细胞病毒等)感染不同类型细胞后都可诱导细胞产生 HSP,同一种病毒感染不同类型的细胞所产生的 HSP 家族以及 HSP 的表达水平也不尽相同,这可能与病毒早期的复制是否在宿主细胞的细胞核或细胞浆中进行等诸多因素有关^[3-6]。例如牛痘病毒(VV)感染 HeLa 细胞不产生 HSP70^[7],而用 VV 感染 U937、HSV-1 和腺病毒 Ad5 感染 HeLa 细胞则能高水平地表达 HSP70^[3,7]。病毒感染与 HSP 产生之间的关系具有多样性和复杂性,与病毒的结构、遗

收稿日期: 2004-02-09 接受日期: 2004-04-01

国家高技术研究发展计划资助项目(863 计划)(No. 2003AA219142)、中国科学院知识创新工程重要方向(No.KSCX2-SW-216)和云南省自然科学基金(No.2002C0066M, No.2003C0022R)资助项目

* 通讯作者。Tel: 0871-5195684, Fax: 0871-5195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn

传特征、感染特性和条件、病毒的生活周期及感染的宿主细胞类型等多种方面因素相关。

2.2 细胞坏死导致 HSP 的释放

实验证实 HSP96-肽复合物能诱导肽特异性的细胞毒性 T 细胞(CTL)反应^[8], 提示了一种颇有发展前景的治疗途径。但 HSP 是否能在生理环境下调节细胞免疫反应呢?

凋亡细胞和坏死细胞与 HSP 释放关系的体外实验表明: 坏死细胞释放大量的 gp96、HSP90 和 HSP70, 而凋亡细胞则不能^[9,10]。生理学上与诱导免疫反应密切相关的是细胞死亡(广义上包括细胞的坏死和凋亡), 两种不同形式死亡的主要区别在于凋亡是生长过程中一种重要的生理机制, 而坏死则是一种病理的终结点。重要的是细胞坏死将导致炎症的发生并刺激宿主的免疫系统。这种炎症反应可以调节细胞内免疫反应。这是宿主免疫系统对生理环境中危险信号的一种反应, 即细胞免疫反应要求抗原和炎症产生共刺激因子来刺激抗原呈递细胞(APC)的成熟和抗原的提呈。细胞被病毒感染发生坏死, 溶解后释放 HSP, 且 HSP 结构保持不变。HSP 通过受体识别 APC, 如巨噬细胞(MΦ)和树突状细胞(DC), 作为生理性坏死依赖的免疫反应的一个中介, 参与抗原肽再提呈进而激活 T 细胞发生免疫反应^[10]。HSP 与这些 APC 通过高度保守的 NF-κB 途径而起相互作用。这一作用的产生源于 HSP-肽复合物有效的免疫原性^[9]。

但在体内, 病理性细胞死亡是否也能诱导 HSP96 释放进而引起相应的细胞免疫反应尚有待研究。此外, 机械性损伤如反复冻融细胞也能诱导 HSP 的释放, 产生细胞免疫反应。HSP 具有 ATPase 活性及蛋白酶活性, 可以对其结合的抗原肽进行分子修剪或由 ER 腔外肽酶进行修剪, 使抗原肽最适合与 MHC-I 分子结合^[2,11]。

2.3 HSP 刺激产生抗病毒免疫的作用机制

HSP 是一类高度保守的蛋白质, 存在于所有真核和原核生物细胞内。在正常条件下, HSP 在细胞总蛋白质中的浓度为 5%~10%, 当细胞受病毒感染、环境温度升高等刺激时, 其浓度可升高 2~3 倍^[12]。

坏死细胞释放的 HSP-抗原肽或体外制备的 HSP-抗原蛋白复合物可以通过 APC 表面的 CD91^[13]、CD40^[14]或可能存在的其他受体高效转运至 APC 内, APC 内的 HSP70 家族协助蛋白酶体对抗原蛋白进行加工, 使其成为较容易呈递的小肽并由 TAP 转运至

ER, ER 内的 gp96 对抗原肽进一步修饰, 并将其转运到 MHC-I 分子上, 而 Bip 和细胞质内的 HSP 分子 Calnexin 则能促进 MHC-I 和 MHC-II 的正确折叠和组装。在表面共刺激分子协助下, 呈递抗原肽的 APC 可以有效刺激 T 细胞特异扩增, 而激活的 T 细胞则能特异识别表达有病毒抗原的靶细胞, 并通过多种机制杀伤靶细胞。

HSP 是将病毒抗原呈递到 MHC-I 的载体, 它们可以有效地将抗原小肽呈递到 MHC-I 上进而诱导产生病毒特异的 CTL。单独的病毒抗原小肽不能通过 MHC-I 途径产生有效的 CTL。但抗原肽一旦与 HSP (如 HSP70、gp96) 结合即可刺激产生病毒特异的 CTL。这是因为 APC 可以通过细胞表面的 HSP 受体高效的摄取与 HSP 结合的肽。需要指出的是 HSP 并不是免疫原, 引起 CTL 反应的是病毒抗原而不是 HSPs。有人认为 HSP-病毒小肽复合物增强了体液免疫、CTL 和记忆细胞反应。另外, 做为佐剂的 HSP 能增强所带的病毒抗原小肽的免疫反应。而应激蛋白如 HSP70 和 gp96 在质膜上的再分配, 能特异的识别病毒感染的细胞(如 NK 细胞, T 细胞)^[15,16]。

2.4 HSP 与 HIV

2.4.1 HSP 在 HIV 复制早期的作用

HIV 诱导 HSP 在细胞内大量表达。在许多感染体系中, HSP 产生于病毒感染细胞的早期^[17]。不同的病毒感染诱导 HSP70 的选择性表达暗示了病毒依赖性的 HSP70 基因转录的激活^[18]。用 Northern 印迹和 Western 印迹方法检测在 HIV-1 感染 CD4⁺ 细胞的单个周期内 HSP mRNA 和蛋白质的表达水平, 发现在病毒进入细胞(3~8 h)但尚未合成病毒 mRNA 前, HSP70 mRNA 和蛋白质的表达水平增加, 且 HSP70 的表达是病毒剂量依赖性的^[17]。

最初, HSP70 的增加在 HIV 合成阶段发生了下调。在转染研究中发现 HSP70 和 HIV p24 抗原的反向关系。但比较 HSP70、HSP mRNA 和蛋白质的表达水平, 发现在整个 HIV 感染的过程中没有发生变化^[17]。

2.4.2 HSP 在病毒复制晚期的作用

HSP70 在 HIV 感染后期亦会产生, 可能与阻止 HIV 感染细胞凋亡相关, 这种凋亡抑制作用是通过阻断 SAPK/JNK 信号转导途径而起作用的^[19]。HIV 感染过程中, 细胞内的 HSP 表达并没有增强, 仅仅是 HIV 感染后期 HSP70 在 CD4⁺ 细胞表面重新分配^[20]。HIV 细胞表面 HSP 的高表达导致 HIV 感染的细胞容易对 NK 细胞、淋

巴因子激活的杀伤细胞(LAK)和抗体依赖性细胞(ADCC)介导的细胞毒作用对其更容易识别和杀伤^[20, 21]。

3 HSP 与 CTL 反应

体内外实验表明, 无论取自肿瘤细胞还是病毒感染的细胞, HSP 提取物都能够产生特异的抗肿瘤或抗病毒的 CTL 反应, 而从正常组织中分离到的 HSP 则不能产生这种特异的免疫反应。从正常组织和抗原性不同的肿瘤/病毒感染细胞中获得的 HSP, 通过 cDNA 序列比较, 两者并无差异。野生型 HSP (gp96, HSP90) 和肿瘤的 HSP(gp96, HSP90) 序列相同而且 HSP 也不表现遗传多态性。以上事实提示 HSP 本身并不具有免疫原性, 可能是作为抗原肽的载体, 真正具有免疫活性的是 HSP 所携带的抗原肽。Udono 等^[22]用纯化来源于 Meth A 肉瘤的 HSP70 提取物免疫 BABL/cJ 小鼠, 然后接种肿瘤细胞, 观察其抗肿瘤免疫的效果, 结果发现: (1) 洗脱下一个 HSP70 结合肽的宽范围肽峰(1000~5000 Da)后的 HSP70 提取物的免疫原性随之消失。(2) 用 ATP 处理过的 HSP70 提取物无免疫原性。该实验证实了 HSP-肽复合物中的肽是 HSP 诱导产生特异性免疫的真正原因所在, 而且 HSP70 结合的抗原肽对 ATP 敏感。

Suto 等^[23]也证实了是抗原肽而不是 HSP 具有免疫原性。有数据表明, gp96 在氨基酸高度保守区域的 624~630 位点是与肽结合的一个凹槽^[24]。HSP70 倾向于结合 1.6~3.2 kDa 长的抗原肽段, HSP90 和 gp96 则结合较短的肽段。随后又得到了一系列重大的发现: (1) 纯化的 HSP 可在体外与人工合成多肽结合形成复合物, 根据装配反应的具体情况, 1%~10% 的 gp96 与多肽分子结合, 且体外装配成的 HSP70-肽或 HSP96-肽复合物同样具有免疫活性, 能够诱导产生特异的细胞毒性 T 细胞 CTL 反应。(2) HSP-肽复合物相当稳定, 即使用从 SDS-PAGE 变性凝胶中萃取分离得到的 gp96-肽复合物来免疫实验鼠也可以成功的抑制肿瘤生长; (3) 注射外源性 HSP-肽复合物即能诱导产生 CD8⁺T 细胞反应。一般来说, 外源性抗原是通过 MHC-II 途径诱导 CD4⁺T 细胞反应, 而内源性抗原是通过 MHC-I 途径诱导 CD8⁺T 细胞反应。外源性 HSP-肽复合物却可通过 MHC-I 途径诱导 CTL 反应, 表明 HSPs 是产生 CTL 反应的高效佐剂; (4) 产生有效免疫反应所需要多肽的量极少, 皮克到纳克级的肽一旦与 HSP 结合就能诱导产生有效的免疫反应^[8, 15]。

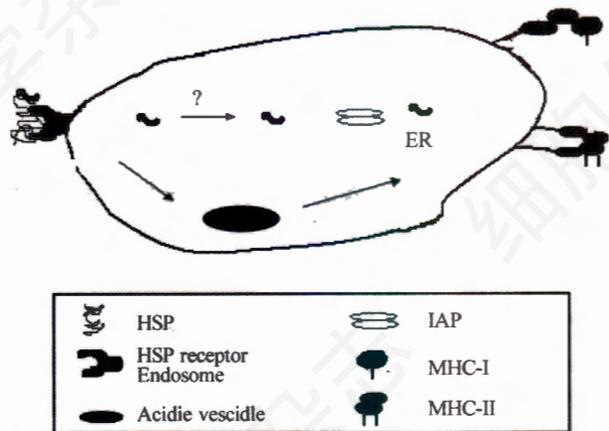


图1 通过 CD91 分子吸附 HSP-抗原肽复合物再递呈抗原肽的两个途径(MHC-I 和 MHC-II)^[15]

一般认为 HSP-肽复合物通过以下方式诱导产生 CTL。HSP 与内源性抗原肽结合后, 通过在 MΦ 或 DC 上的 HSP 受体 CD91 递呈给这些 APC。CD91 不仅是 gp96 的受体, 也是 HSP70、HSP90 和 calreticulin 的受体。与受体结合后的 HSP-肽复合物进入 APC 胞内的非酸性内含体(Endosome), 内含体中的蛋白酶体对多肽分子进行降解加工, 加工后的 HSP-肽复合物以依赖 ATP 方式借助多肽转运酶(TAP)转运至 ER 腔内, 然后再与 APC 的 MHC-I 分子形成稳定的抗原肽-MHC-I 复合物, 转运至细胞表面再递呈给 CD8⁺T 细胞的 TCR 识别, 从而激活免疫细胞, 产生特异的 CTL(图 1)^[1, 15]。

4 HSP: 新型抗病毒的载体

在动物实验中, 从肿瘤中获得的 HSP(HSP70, gp96) 可以作为抗肿瘤疫苗的佐剂, 在体液免疫中可激发强烈的 T 细胞依赖性抗体效应。同样, 研究发现 HSP70, gp96-病毒肽复合物也能激发 CTL 和 NK 免疫而产生各种抗病毒作用。用 HSP70 和 HIV-1 p24 共价交联的融合蛋白免疫小鼠产生了高滴度的抗 HIV-1 p24 的抗体, 而用非共价交联混合物免疫效果则很差。这可能与 HSP70 的再次免疫应答有关^[16]。HSP70 在疫苗的构建中起支架作用, 与抗原肽结合后, 一旦进入免疫系统就能够成为有效抗原, 实际上 HSP70 是抗原肽的高效传递载体。

Meng 等^[25]的研究结果表明, 从乙型肝炎病毒(HBV)导致的肝癌组织中分离的 HSP96 伴随有 HBV 核心蛋白特异小肽(YVNTNMG), 该复合体可诱导产生肝癌特异的 CTL 反应, 所以用 HSP96 作为新型抗病毒的

疫苗的载体可能是极有前景的防治方法。

5 小结

HSP 的广泛存在及其功能和结构的高度保守性在生物界较为罕见。表达 HSP 作为细胞自我保护的一种基本机制, 对所有生物都具有重要意义。HSP 不仅参与了天然免疫, 也参与了获得性免疫反应的调节, 尤其 HSP- 肽复合物能诱导 CTL 的产生。HSP 作为肿瘤疫苗的可行性在实验动物中已得到证实, 从肿瘤/癌症组织中制备的 HSP- 小肽复合物可以诱导产生相应的肿瘤的特异免疫反应, 其疫苗防治作用已成功地在肝癌、纤维肉瘤、肺癌、结肠癌、黑色素瘤等的小鼠/大鼠模型中得到验证^[26]。CTL 的产生是清除体内病毒和病毒感染细胞的关键, 也是至今各国研制的 HIV 疫苗不成功的原因所在, HSP- 抗原肽复合物在抗肿瘤动物模型的成功应用可能将为探索 HIV 免疫治疗提供很好的理论与应用基础。通过对 HSP 在病毒免疫学中作用的深入研究, 很可能为 AIDS 等重大病毒性疾病的预防和治疗提供新的思路和方法。

参考文献 (References)

- [1] 谢卫国. *中国免疫学杂志*, 2002, **18**: 66
- [2] 范云霞. *国外医学免疫学杂志*, 2001, **24**: 62
- [3] Jindal S *et al. J Virol*, 1992, **66**: 5357
- [4] Collins PL *et al. J Virol*, 1982, **44**: 703
- [5] La Thangue NB *et al. Exp Cell Res*, 1988, **178**: 169
- [6] 刘开扬等. *中华肿瘤临床*, 2003, **30**: 483
- [7] Phillips B *et al. J Virol*, 1991, **65**: 5680
- [8] Blachere NE *et al. J Exp Med*, 1997, **186**: 1315
- [9] Basu S *et al. Int Immunol*, 2000, **12**: 1539
- [10] Berwin B *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 21083
- [11] Srivastava PK *et al. Immunogenetics*, 1994, **39**: 93
- [12] Pockley AG. *Lancet*, 2003, **362**: 469
- [13] Binder RJ *et al. Nat Immunol*, 2000, **1**: 151
- [14] Becker T *et al. J Cell Biol*, 2002, **158**: 1277
- [15] Srivastava P *et al. Ann Rev Immunol*, 2002, **20**: 395
- [16] Brenner BG *et al. Exp Opin Biol Ther*, 2001, **1**: 67
- [17] Wainberg Z *et al. Virology*, 1997, **233**: 364
- [18] Santoro MG. *Experientia*, 1994, **50**: 1039
- [19] Mosser DD *et al. Mol Cell Biol*, 1997, **17**: 5317
- [20] Di Cesare S *et al. Immunology*, 1992, **76**: 341
- [21] Brenner BG *et al. Clin Exp Immunol*, 1993, **93**: 142
- [22] Udono H *et al. J Exp Med*, 1993, **178**: 1391
- [23] Suto R *et al. Science*, 1995, **269**: 1585
- [24] Linderth NA *et al. J Biol Chem*, 2000, **275**: 5472
- [25] Meng SD *et al. Lancet*, 2001, **357**: 528
- [26] Tamura Y *et al. Science*, 1997, **278**: 117

The Roles of HSP70 and gp96 in Viral Infection

Liu-Meng Yang¹, Hong-Liang Liu^{1,2}, Yong-Tang Zheng^{1*}

(¹Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;

²Graduate School of Chinese Academy of Science, Beijing 100039, China)

Abstract Heat shock proteins (HSP), a large protein family, are part of extraordinarily conserved during evolution and play diverse roles in cellular functions. HSPs are expressed in cells in response to a range of stimuli, including heat, mitogen and microbial/viral infection. HSP binding to viral antigen complex can enhance the antiviral immune. The review briefly introduces the roles of HSP70 and gp96 in the viral infection.

Key words HSP70; gp96; viral infection; HIV

Received: February 9, 2004 Accepted: April 1, 2004

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program)(No. 2003AA219142), the Knowledge Innovation Program of Chinese Academy of Sciences (No.KSCX2-SW-216) and the Natural Science Foundation of Yunnan Province (No.2002C0066M, No.2003C0022R)

*Corresponding author. Tel: 86-871-5195684, Fax: 86-871-5195684, E-mail: zhengyt@mail.kiz.ac.cn