

热休克蛋白对细胞凋亡的调控作用

于晓姝*

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京 100850)

摘要 热休克蛋白属于细胞内分子伴侣蛋白, 除涉及细胞内一些蛋白质分子构象和稳定性的调节之外, 热休克蛋白对细胞应激、代谢、增殖以及凋亡等生理过程均具有重要的调控作用。研究表明热休克蛋白对细胞凋亡的调控机制是复杂的, 可直接作用于与凋亡相关的蛋白质, 也可以通过影响细胞信号传递而间接影响凋亡的发生。由于热休克蛋白对细胞凋亡的调控机制大多依赖于其分子伴侣功能, 阻断热休克蛋白的伴侣功能已经成为研究药物诱导肿瘤细胞凋亡的重要靶点。

关键词 热休克蛋白; 分子伴侣; 细胞凋亡

热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是细胞内最重要的分子伴侣分子, 除参与细胞内一些重要蛋白质分子的构象、稳定性及激酶活性调节之外, HSP 另一重要生理功能是对应激状态下的细胞提供保护。通常认为 HSP 可以通过阻断细胞重要蛋白质的变性及聚合而达到保护细胞的作用, 但近年来的研究证实 HSP 蛋白家族的重要成员如 HSP90、HSP70 及 HSP27 等可以直接作用于细胞的抗凋亡机制, 而 HSP90 由于其功能的特殊性, 更是在细胞的抗凋亡反应中起着举足轻重的调控作用。由于细胞抗凋亡能力与肿瘤细胞存活及药物耐受等特性密切相关, 阻断 HSP 介导的细胞抗凋亡功能已成为肿瘤治疗的一项新策略, 目前拮抗 HSP90 功能的抗肿瘤药物 17-AAG 已经在美国进入二期临床实验, 现就 HSP, 特别是 HSP90 对细胞凋亡的调控机制进行综述。

1 HSP90 的分子伴侣功能

细胞内含有多种分子伴侣蛋白, 由这些伴侣分子协助完成新生蛋白多肽的正确折叠及受损蛋白质构象的恢复。HSP90 在哺乳动物细胞内含量丰富, 可以占到细胞胞浆总蛋白的 1%~2%, 而在肿瘤细胞中其含量更是较正常细胞高出 2~10 倍, 这一特性提示 HSP90 对肿瘤细胞的增殖和存活起着重要的作用, 但其相关机制长期以来并不清楚。人体细胞内 HSP90 分为 α 型和 β 型, 两者间同源性为 84%, 它们分别由不同的基因编码。HSP90 在进化上高度保守, 其共同结构特征为 N 端含有 ATP 酶结合位点, C 端则含有形成 HSP90 同源二聚体所必需的由 190 个

氨基酸残基组成的结合亚单位^[1]。HSP70 的底物蛋白通常是新生肽分子, 而 HSP90 的底物(clients)多为涉及信号传递的蛋白质, HSP90 对其稳定性和活性具有重要的调节作用。研究表明 HSP90 的分子伴侣功能需要 ATP 的结合和水解, 同时依赖于和不同的辅助伴侣分子构成伴侣蛋白复合体。依结合 ATP/ADP 状态的不同以及辅助伴侣分子的不同, HSP90 对底物蛋白发挥着截然相反的调节作用。当 ATP 与 HSP90 结合时, HSP90 与 p23 和 p50Cdc37 形成伴侣复合体, 该复合体有助于 HSP90 底物蛋白的稳定及活性; 而当 HSP90 与 ADP 结合时, HSP90 与 HSP70 以及 p60Hop 形成的伴侣复合体却促进底物蛋白的泛素化并经蛋白酶体通路降解^[2]。Whitesell 等^[3]首次发现苯醌安莎霉素类药物 Geldanamycin(GA)可以与 HSP90 的 ATP 酶位点特异性结合, 且其结合活性较 ATP 高出 25 倍。高效而特异的结合特性使得 GA 在纳摩尔作用浓度下即可竞争性阻断 ATP 与 HSP90 的结合, 而 GA 与 HSP90 的结合更易于形成不利于底物蛋白稳定的伴侣复合体, 最终导致 HSP90 的底物蛋白经泛素-蛋白酶体通路降解。借助于 GA 的帮助, 有关 HSP90 底物蛋白分子的研究取得了长足的进展, 迄今为止已经有近百种蛋白质被发现可能是 HSP90 的底物蛋白, 而得到确切证实的 HSP90 的底物蛋白分子有几十种之多, 其中包括

收稿日期: 2004-05-24 接受日期: 2004-08-31

国家自然科学基金重点项目(No.30330620)和军事医学科学院创新基金资助项目

* 通讯作者。Tel: 010-66931318, Fax: 010-68213039, E-mail: yuxd@nic.bmi.ac.cn

了众多的激酶蛋白、膜受体和核内受体及转录因子等^[4]。由于 HSP90 的分子伴侣功能对这些底物蛋白的活性及稳定性调节是必须的,通过阻断 HSP90 的分子伴侣功能的研究,人们发现在 HSP90 的底物分子中有相当数量的蛋白质介入了细胞的抗凋亡调节,从而揭示出 HSP90 保护细胞免于凋亡更深层的作用机制。

2 HSP 对线粒体通路介导细胞凋亡的调控作用

细胞凋亡又称程序性细胞死亡,依据细胞凋亡发生的信号转导途径,将细胞凋亡分为线粒体通路介导的凋亡及死亡受体通路介导的凋亡,而 HSP 不同程度地对这两条通路的活化具有调节作用。在细胞凋亡的过程中,经线粒体通路介导的凋亡信号其重要的特征是凋亡体的形成。研究表明 HSP 家族成员可以对凋亡体形成的不同阶段发挥阻断作用,如 HSP70 可以通过阻断细胞色素 *c* 的释放、阻断 Apaf-1 寡聚化及阻断 caspase-9 的活化等多重环节阻断凋亡体的形成^[5,6]。而 HSP90 及 HSP27 则分别通过阻断 Apaf-1 寡聚化及直接阻断细胞色素 *c* 与 Apaf-1 的结合,最终阻断凋亡体的形成^[7,8]。此外有证据表明 HSP70 还可以通过抑制凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)的功能而保护细胞免于凋亡^[9]。AIF 是位于线粒体内膜的黄素蛋白,可以通过 caspase 非依赖的方式直接诱导细胞凋亡。值得注意的是 HSP 对凋亡体的调节是通过其分子伴侣功能来实现的^[10],提示对 HSP 功能的调节将直接影响其对凋亡体的调控作用。

3 HSP 对死亡受体通路介导细胞凋亡的调控作用

死亡受体家族成员包括 TNFR1、TNFR2、Fas/CD95、TRAIL-Rs 等,该受体家族为跨膜蛋白,其结构特征包括富含半胱氨酸的胞外区和胞内与其他蛋白质结合的死亡域。当死亡受体与其相应的配基如 FasL 结合时,受体聚合形成三聚体,并介导形成由死亡受体胞内区、Fas 相关死亡域蛋白(FADD)及非活化型 caspase-8 组成的诱导死亡信号复合体(death-inducing signaling complex, DISC),DISC 形成后可以启动 caspase-8 及其下游 caspase-3 的活化,进而引发细胞凋亡。近来的研究发现当细胞 Fas 通路活化时,除 FADD 蛋白分子外,另一种新型细胞

接头蛋白 Daxx 可以通过与凋亡信号调节激酶 1(Ask1)形成复合体而介导 JNK 信号通路活化,并诱导细胞凋亡。而磷酸化 HSP27 可以通过形成二聚体而特异性地与 Daxx 结合,阻断其由细胞核转运至胞浆并与 Ask1 结合,从而阻断了 Fas 介导的细胞凋亡^[11]。TNF 与其受体结合时,可以启动 3 种不同的信号转导通路,即 NF- κ B 通路和 JNK 通路的活化及诱导细胞凋亡,而这 3 条通路间的选择在于 TNFR 招募不同的细胞接头蛋白组成不同的复合体。在 TNF 诱导的 NF- κ B 通路活化的过程中,需要形成由胞内重要的受体交互作用蛋白 RIP 和 TNFR1 参与组成的复合体,而 HSP90 可以通过维持 RIP 的稳定性,提高 NF- κ B 的活性,介入阻断 TNF 诱导的细胞凋亡^[12],此外 HSP90 还可以通过调节 AKT 激酶而间接影响 NF- κ B 的活性^[13]。死亡受体介导的凋亡信号还可以通过由促凋亡蛋白 Bid 介导线粒体凋亡通路的活化,当 Bid 蛋白被剪切活化后可以由胞浆转移到线粒体,启动线粒体凋亡通路。新近的实验揭示 Bid 蛋白也属于 HSP90 的底物蛋白,过表达 HSP90 可以保护 Bid 免于被切割和活化,从而阻断 TNF 诱导的细胞凋亡。当采用 HSP90 功能抑制剂阻断 HSP90 的分子伴侣功能后,由 HSP90 提供的对 Bid 蛋白的保护随之消失^[14]。

4 HSP 对细胞内抗凋亡及促凋亡信号转导通路的调控作用

在生理状态下,细胞内存在促凋亡与抗凋亡两种信号转导通路,这两种信号间的动态平衡构成对细胞增殖和凋亡的相关调节。主要涉及细胞增殖与分化的信号转导通路包括 MAPK 通路的 ERK 支路和三磷酸肌醇激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)及其下游丝氨酸-苏氨酸 AKT 激酶通路;而通常情况下应激活化蛋白激酶(stress-activated protein kinases, SAPK)/c-JUN N 端激酶(JNK)以及 p38 MAPK 通路活化与促进细胞凋亡有关。HSP 对上述多种信号转导通路具有激活或抑制作用,在一定程度上通过介导抗凋亡通路活化和抑制促凋亡通路而参与细胞凋亡的调节。

4.1 HSP 对促凋亡 JNK 信号通路的调节

在多种应激的情况下,细胞常伴有 JNK 激酶的活化,活化的 JNK 既可以通过磷酸化 p53 和 Myc 蛋白,也可以通过磷酸化抗凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-XL,促进细胞色素 *c* 自线粒体释放,从而诱导细胞

凋亡^[15~17]。而 HSP70 的表达在细胞应激的情况下同样获得增强, 这些过表达的 HSP70 蛋白可以对 JNK 激酶产生明确的抑制作用, 从而阻断 JNK 介导的细胞凋亡^[18]。HSP70 对 JNK 的抑制作用似乎是直接的, 因为过表达 JNK 的上游激酶 MEKK1 并不能拮抗 HSP70 对 JNK 的抑制作用, 且 HSP70 对 JNK 的活性抑制并不依赖于分子伴侣功能^[19,20]。此外有证据表明在热休克等应激情况下, JNK 激酶的自身去磷酸化过程受到抑制, 使得 JNK 的活性获得增强, 而过表达 HSP70 可以去除这种抑制, 从而降低 JNK 的活性^[21]。新近的研究表明 HSP90 和辅助伴侣分子 p50cdc37 还参与了对 JNK 及 p38 上游激酶 MLK3 (mixed lineage kinase 3) 稳定性和活性的调节, 当 HSP90 功能受到抑制时, MLK3 激酶水平明显降低, TNF α 诱导的 MLK3 及 JNK 的活化随之被阻断^[22], 这一结果提示可能一些促进凋亡的蛋白质同样受到 HSP90 伴侣功能调控。

4.2 HSP 对 PI3K/AKT 抗凋亡信号通路的调节

细胞凋亡的过程不仅涉及了诱导凋亡信号通路的活化, 还受到细胞存活信号通路的负调控。各种生长因子等均可以通过活化细胞存活信号而程度不同地发挥抗凋亡作用, 其作用的主要环节是活化 PI3K/AKT 激酶通路。AKT 激酶在细胞的抗凋亡作用中扮演着非常重要的角色, AKT 可以直接作用于多种抗凋亡信号分子, 阻断其诱导凋亡的作用。诸如 AKT 可以介导前凋亡蛋白 Bad 磷酸化, 使其丧失与抗凋亡蛋白 Bcl-XL 结合的能力而不能发挥促使线粒体释放细胞色素 c 诱导凋亡的作用; AKT 还可以直接作用于 caspase-9, 诱导其磷酸化及灭活; 此外 AKT 可以通过调节转录因子 Forkhead (FKHRL1) 及 NF- κ B 的活性阻断凋亡^[23]。转录因子 FKHRL1 的活化可以增强死亡受体配基 FasL 及促凋亡蛋白 Bim 的表达, 而 AKT 通过磷酸化 FKHRL1 使其灭活^[24,25]。I κ B 通过与 NF- κ B 结合而阻遏 NF- κ B 转入细胞核, 当 I κ B 磷酸化时会与 NF- κ B 解离, NF- κ B 得以活化并入核发挥转录因子活性, I κ B 则通过蛋白酶体通路快速降解。AKT 可以通过促进 I κ B 降解而诱导 NF- κ B 的激活^[26]。免疫沉淀实验证实 AKT 激酶及其上游 PDK1 激酶同属于 HSP90 底物蛋白^[27,28], 实验表明 AKT 的活化需要 AKT 与 HSP90 及辅助伴侣分子 Cdc37 组成复合体, HSP90 的伴侣功能对于维持该复合体的存在是至关重要的, HSP90 可以通过与 AKT 结合, 阻断磷脂酶 2A 介导的 AKT 去磷酸化,

从而维持 AKT 的活化状态。当采用 HSP90 抑制剂阻断 HSP90 的伴侣功能时, PDK1 激酶和 AKT 激酶的蛋白质水平降低, 活性受到抑制, 导致细胞对凋亡的刺激信号更为敏感^[29,30]。

4.3 HSP 对 Ras-Raf-MEK-ERK 抗凋亡通路的调节

细胞存活及抗凋亡调节的另一重要信号传递通路是 MAPK 通路的 Ras-Raf-MEK-ERK 支路, 该信号通路参与调节细胞的增殖、分化、抗凋亡和应激存活等过程, 而通路中重要的 Raf-1 和 MEK 激酶相继被发现系 HSP90 的底物蛋白。实验表明 HSP90 对 Raf-1 蛋白活性、细胞内定位及稳定性均具有重要的调控作用, 采用 HSP90 功能抑制剂阻断 HSP90 与 Raf-1 之间的结合, 可以导致胞内 Raf-1 蛋白的水平迅速降低, 同时阻断下游 MAPK 通路活化并诱导细胞凋亡^[31]。此外一些辅助伴侣蛋白分子同样介入了 HSP90 对 Raf-1 的调节, Grammatikakis 等^[32]的工作表明, HSP90 和 p50cdc37 的活性对于维持 Raf-1 的功能是至关重要的, p50cdc37 可以介导 HSP90 与 Raf-1 激酶的结合, 过度表达 p50Cdc37 可以增强 Raf-1 的活性, 而表达突变型 p50Cdc37, 则可阻断由生长因子及其他激酶刺激引起的 Raf-1 活性增加。另一个重要的辅助伴侣分子 Bag-1 同样显示出对 Raf 激酶活性的调节作用, 在细胞热应激的条件下 Bag-1

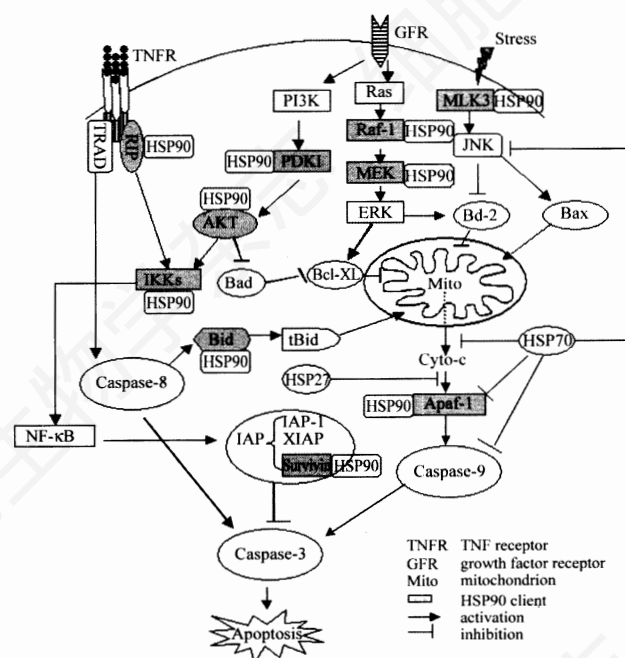


Fig.1 Regulation of multiple apoptotic signaling pathways by heat shock proteins

失去与 Raf-1 的结合, 改为与 HSP70 形成复合体, 其结果是导致 Raf 激酶活性抑制和 ERK 通路的阻断^[33]。

综上所述, HSP 以直接或间接的方式参与了保护细胞免于凋亡的调节, 其作用靶点涉及不同凋亡信号通路的主要激酶或关键性调控蛋白(图 1)。除对凋亡相关信号转导通路的蛋白质直接调节作用之外, HSP90 还涉及了一些细胞膜生长因子受体, 如 EGFR、ErbB2、FLT3 及细胞内雌、雄激素受体等蛋白质稳定性和活性的调节, 而这些受体蛋白可以直接或间接活化细胞增殖及抗凋亡的信号如 ERK 及 PI3K/AKT 的传递过程, 因而 HSP90 也可以通过调节这些蛋白质的结构、稳定性和功能而间接发挥促细胞增殖及抗凋亡的作用^[34]。

参考文献 (References)

- [1] Young JC *et al.* *J Cell Biol*, 2001, **154**: 267
- [2] Neckers L. *Curr Med Chem*, 2003, **10**: 733
- [3] Whitesell L *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91**: 8324
- [4] Pratt WB *et al.* *Exp Biol Med (Maywood)*, 2003, **228**: 111
- [5] Saleh A *et al.* *Nat Cell Biol*, 2000, **2**: 476
- [6] Beere HM *et al.* *Nat Cell Biol*, 2000, **2**: 469
- [7] Pandey P *et al.* *EMBO J*, 2000, **19**: 4310
- [8] Concannon CG *et al.* *Gene Expr*, 2001, **9**: 195
- [9] Ravagnan L *et al.* *Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 839
- [10] Mosser DD *et al.* *Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 7146
- [11] Charette SJ *et al.* *Mol Cell Biol*, 2000, **20**: 7602
- [12] Lewis J *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 10519
- [13] Ozes ON *et al.* *Nature*, 1999, **401**: 82
- [14] Zhao C *et al.* *Cell Signal*, 2004, **16**: 313
- [15] Schuler M *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 7337
- [16] Juin P *et al.* *Mol Cell Biol*, 2002, **22**: 6158
- [17] Fan M *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 29980
- [18] Kumar Y *et al.* *Proteomics*, 2003, **3**: 513
- [19] Park HS *et al.* *EMBO J*, 2001, **20**: 446
- [20] Yaglom JA *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 20223
- [21] Meriin AB *et al.* *Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 2547
- [22] Zhang H *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 19457
- [23] Khwaja A. *Nature*, 1999, **401**: 33
- [24] Brunet A *et al.* *Cell*, 1999, **96**: 857
- [25] Dijkers PF *et al.* *Curr Biol*, 2000, **10**: 1201
- [26] Kane LP *et al.* *Curr Biol*, 1999, **9**: 601
- [27] Sato S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 10832
- [28] Fujita N *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 10346
- [29] Basso AD *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 39858
- [30] Solit DB *et al.* *Cancer Res*, 2003, **63**: 2139
- [31] Yu X *et al.* *J Natl Cancer Inst*, 2002, **94**: 504
- [32] Grammatikakis N *et al.* *Mol Cell Biol*, 1999, **19**: 1661
- [33] Song J *et al.* *Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 276
- [34] Neckers L. *Trends Mol Med*, 2002, **8**: S55

Regulation of Cell Apoptosis by Heat Shock Proteins

Xiao-Dan Yu*

(Beijing Institute of Basic Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract Heat shock proteins (HSPs) were ubiquitous molecular chaperone proteins that were involved in the regulation of various physiological processes such as stress response, metabolism, proliferation and apoptosis. The mechanism of how HSP protect the cells from apoptosis was complicated, as HSP could either regulate the structure and function of several key apoptotic mediators or affect multiple apoptotic signaling pathways. Because the modulation of HSP on apoptosis depends on their capacity as chaperon proteins, blockage the chaperoning function of HSP90 has become a potential target for inducing apoptosis by anticancer drugs.

Key words heat shock protein; molecule chaperone; apoptosis

Received: May 24, 2004 Accepted: August 31, 2004

This work was supported by the Key Program from the National Natural Science Foundation of China (No. 30330260) and the Seed Grant from the Beijing Institute of Basic Medical Sciences

*Corresponding author. Tel: 86-10-66931318, Fax: 86-10-68213039, E-mail: yuxd@nic.bmi.ac.cn