

热休克蛋白在阿尔茨海默病中的研究

谭震球^{1,2} 李 锋^{1,3} 刘润中^{1,3} 洪水根¹ 王建枝^{2*} 许华曦^{1,2,3*}

¹ 厦门大学生命科学学院分子细胞神经科学实验室, 厦门 361005;

² 华中科技大学同济医学院病理生理系, 武汉 430030;

³ Degenerative Disease Research, the Burnham Institute New York, New York 10021, USA)

摘要 热休克蛋白(heat shock protein, HSP)是一种重要的分子伴侣, 它们参与辅助蛋白质合成、折叠、转运以及定位等过程, 并且在协调蛋白质水解、阻止蛋白质错误折叠和聚积方面发挥重要作用。阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是最常见的神经退行性疾病, 以神经细胞内过度磷酸化的 tau 蛋白异常聚积形成神经原纤维缠结以及细胞外 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)异常折叠形成淀粉样斑为主要病理特征。研究表明 HSP 不但对 tau 蛋白的聚积/降解发挥重要作用, 并且可抑制 A β 相关的毒性作用。这些研究结果提示了分子伴侣有可能成为 AD 治疗的新靶点, 现对该方面的研究进展进行综述。

关键词 热休克蛋白; 阿尔茨海默病; tau 蛋白; β 淀粉样蛋白

1 热休克蛋白

1.1 热休克蛋白的分类

热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)(也称应激蛋白)是一类重要的分子伴侣, 在进化上由几个高度保守的相关蛋白质家族组成, 根据分子量可将 HSP 分为以下几类: HSP100、HSP90、HSP70、HSP60 和小分子热休克蛋白(small heat shock proteins, sHSPs)^[1,2]。sHSPs 分子量为 12~43 kDa, 包括 α 晶状体球蛋白(α -crystallin)家族^[2~4]。此外, 还有葡萄糖调节蛋白(glucose-regulated proteins, Grps)^[5~7], 例如 Grp78 和 Grp94, 它们是内质网(endoplasmic reticulum, ER)应激诱导的蛋白质, 可作为 ER 应激反应的分子标记。

1.2 HSP 的主要功能

HSP 在蛋白质合成、折叠、转运以及细胞定位过程中起广泛作用, 其主要功能可归纳为: (1) 辅助特定蛋白质构象的形成和维持蛋白质正常的构象^[2,8,9]。当机体受到应激(如热、金属离子以及稳态失调)因素的作用时, 蛋白质构象的异常变化可导致蛋白质错误折叠并聚积; 此时, 应激反应导致 HSP 表达上调, 选择地识别和结合异常蛋白质, 辅助其重新折叠, 并且保护正常蛋白质不与变性蛋白质相互作用, 从而阻止蛋白质的异常聚积。(2) 保持蛋白质的正常水平。HSP 与蛋白质水解体系共同协调体

内蛋白质的降解, 从而使特定蛋白质保持在正常水平, 它们的功能失调会导致细胞发生退行性变性乃至死亡^[2,8,9]。(3) 广泛参与细胞的代谢和调控。受有丝分裂原信号和生长因子的控制, HSP 参与细胞周期调控, 在有机体的发育和分化方面起重要的作用^[2,8,9]。

1.3 HSP 的激活机制

HSP 的表达受热休克转录因子(heat shock transcription factor, HSF)^[8,10]的调控。在哺乳动物细胞中已鉴定了 3 种主要的 HSFs: HSF1、HSF2 和 HSF4, 其中 HSF1 是脊椎动物中热休克反应等环境应激的调节因子。在非应激条件下, HSF1 以单聚体形式存在, 没有 DNA 结合活性; 在应激条件下, HSF1 通过多聚化和磷酸化而具有 DNA 结合活性, 活化的 HSF1 入核, 通过与热休克基因启动子区域高保守的热休克元件(heat shock element, HSE)^[8,11]结合而启动热休克基因的表达。

2 HSP 与 AD

早期研究表明 HSP 可抑制神经退行性疾病中的异常蛋白质聚积。HSP70 在帕金森病(Parkin-son's

收稿日期: 2005-01-14 接受日期: 2005-04-11

* 通讯作者。王建枝: Tel: 027-83693883, Fax: 027-83693883,

E-mail: wangjz@mails.tjmu.edu.cn; 许华曦: Tel: 0592-2188568, Fax: 0592-2188528, E-mail: xuh@burnham.org

disease, PD)中能防止 α 共核蛋白(α -synuclein)等异常蛋白质聚积并具有神经保护作用^[12-14],在亨廷顿病(Huntington's disease, HD)中亦能减少可形成胞内包涵体的变异(poly-glutamine)huntingtin蛋白的聚积^[15]。

最近的研究表明HSP参与了阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的形成。AD的重要病理特征之一是神经细胞外形成大量淀粉样斑(amyloid plaques),这种斑块主要是由 β 淀粉样蛋白前体(amyloid precursor protein, APP)代谢产生的 β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)组成;另一个重要病理特征是神经细胞内形成神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFT),主要由过度磷酸化的tau蛋白形成。AD脑中HSP与NFT共定位^[3,16-19],并且HSP与NFT水平呈负相关,进一步的体外研究发现HSP与A β ^[5,7,19-23]以及tau蛋白^[16-18,24-26]密切相关;例如,在胞内HSP与A β 共定位,内质网中HSP家族蛋白与APP作用可减少分泌性A β 的产生;此外,HSP与胞内tau蛋白共定位,且较高的HSP水平可以减少异常tau蛋白的产生和聚积。最近的研究还表明HSP对tau蛋白的聚积/降解发挥着重要的作用,并且可以抑制A β 相关的毒性作用。因此,HSP在AD发病中的作用受到广泛关注。表1摘要介绍了目前发现的与AD相关的HSP的细胞特异性和功能。

2.1 HSP90

HSP90是一种普遍存在的胞质蛋白,具有分子伴侣活性,能与HSP70作用,协调异常折叠的蛋白质重新折叠^[9]。此外,HSP90还可特异性结合细胞骨架成分,如肌动蛋白和蛋白激酶,协调基本的细胞过程,例如激素信号过程和细胞周期控制。

HSP90/HSP70在AD相关tau蛋白的病理发生过程中发挥了重要的作用,研究表明它们参与维持tau蛋白的正常生理状态、抑制tau蛋白的异常磷酸化和聚积,而且较高的HSP90/HSP70水平还能够促

进tau蛋白与微管(microtubule, MT)的组装。许华曦领导的研究小组从不同研究角度检测了HSP90/HSP70的保护作用:在转tau(V337M)基因鼠和死后AD病人海马神经元中,发现HSP90和聚积的tau蛋白水平呈负相关,在没有出现tau蛋白聚积的海马神经元中,HSP90水平显著高于那些有tau蛋白聚积的海马神经元;将tau转染到COS-1、N2a和大鼠原代皮质神经元中,以研究HSP90/HSP70与tau蛋白可溶性的关系,发现在不改变总tau水平的情况下,HSP90/HSP70的上调能提高可溶性tau蛋白的水平,从而降低tau蛋白的聚积^[18]。此外,该研究小组利用siRNA抑制COS-1细胞中HSP90/HSP70的表达,检测微管结合tau蛋白、膜结合tau蛋白和不溶性tau蛋白的水平,发现微管结合tau蛋白水平降低、聚积的不溶性tau蛋白增加,并通过无细胞体系进一步证实了这个结果^[18]。他们的研究结果表明,HSP90/HSP70在维持tau蛋白正常的生理功能中起重要作用,其异常可能参与AD患者tau蛋白的异常聚积。

2.2 HSP70

HSP70主要包括诱导型HSP70(分子量为72 kDa)和结构型HSC70(分子量为73 kDa)。应激诱导后,HSP70既可出现在胞质中,也可出现在胞核内。HSP70可以识别并且结合新生的多肽以及部分折叠的中分子肽,阻止蛋白质错误折叠;与ATP结合而引发蛋白质构象变化,导致结合的底物蛋白释放^[2]。另外,有研究表明胶质细胞可以释放HSP70,并且外源HSP70的刺激能够增强神经元应激承受能力^[19]。结构型HSP70辅助新生肽的折叠和装配,维持蛋白质伸展状态,并且协助蛋白质的跨膜定位。此外,HSC70还参与了蛋白质的转运过程;在体外,HSC70与倾向聚积的底物蛋白质的结合受到共分子伴侣(co-chaperones)参与的(如HSP40)ATP水解过程的调节^[2]。HSP70家族还包括

表1 目前发现的与AD相关的HSP的细胞特异性和功能

HSP	细胞表达特异性	主要功能
HSP90	所有脑细胞	分子伴侣、与细胞骨架相连、参与HSP70的作用、细胞周期控制、激素信号途径
HSC70/HSP70	所有脑细胞	分子伴侣、神经保护、突触可塑性等
HSP60	所有脑细胞	分子伴侣、线粒体转运蛋白的折叠和装配、参与凋亡信号途径等
HSP32/HO-1	主要在胶质细胞,神经元中较少	具有酶活性、调节氧化应激、铁离子的沉积等
HSP25/HSP27	主要在胶质细胞	分子伴侣、应激条件下磷酸化
α B晶状体球蛋白	星型胶质细胞,胶质细胞	与细胞骨架和中心体相连、稳定微丝
泛素	所有脑细胞	靶定蛋白质通过蛋白酶体降解、信号转导、细胞损伤的分子标记等

Grp78 或 Bip (结合蛋白), 这两种蛋白质主要定位在 ER 的内腔中。Grp78 是 ER 应激蛋白, 对许多膜结合蛋白和分泌性蛋白的糖基化、折叠和装配至关重要; 并且在维持细胞动态平衡和阻止凋亡方面也具有重要的作用。

正如前所述, Dou 等^[18]的研究显示, 用基因转染或抗菌素 Geldanamycin 诱导 HSP70 水平的增加可阻止 tau 蛋白的聚积、促进 tau 蛋白与微管的结合, 从而维持 tau 蛋白的正常生理功能, 最近深入的研究发现, HSP70 的共分子伴侣 (carboxyl terminus of Hsc70-interacting protein, CHIP) 也能与 tau 蛋白相互作用, 并且协同 HSP70 共同参与 tau 蛋白的代谢和聚积过程, HSP70 可抑制 tau 蛋白的聚积, CHIP 可以诱导 tau 蛋白的泛素化, 进而通过泛素蛋白酶体系 (ubiquitin-proteasome system, UPS) 降解, 它们共同协调维持胞内 tau 蛋白呈正常状态。Dai 等^[27]报道: CHIP 可通过诱导 HSF1 的多聚化和转录活性, 调节 HSP70 的表达; Hatakeyama 等^[28]发现过度表达 CHIP 能够促进 tau 蛋白的降解, 降低不可溶 tau 蛋白水平。Petrucci 等^[24]研究认为 tau 蛋白可以作为 CHIP 的底物, 并且 CHIP 能促进 tau 蛋白的聚积, 而 HSP70 可以抑制这种聚积; HSP70 可以重新折叠异常的 tau 蛋白, 抑制 tau 蛋白的非正常聚积, 而未能重新折叠的 tau 蛋白在 E2 泛素结合酶 UbcH5 的参与下, 发生由 CHIP 介导的泛素化, 从而通过蛋白酶体降解; Shimura 等^[25]研究发现 CHIP 能够介导异常磷酸化 tau 蛋白的泛素化, 并且, tau 蛋白的异常磷酸化是其泛素化的先行事件; 在体内、体外试验中, HSC70 和 CHIP 可以选择性地识别并降解磷酸化的 tau 蛋白。从目前的研究来看, HSP70/CHIP 在抑制异常 tau 蛋白聚积的方面发挥着重要的保护性作用, 两者的平衡动态地协调体内蛋白质保持正常的水平, 但具体的机制仍有待深入研究。

HSP70/HSC70 除了可抑制与 tau 相关的病理变化外, 同时对 A β 的神经毒性也具有抑制作用。Kakimura 等^[19]在正常鼠和 Toll-Like 受体 (TLR4) 突变鼠脑中分离的小胶质细胞中, 发现外源的 HSP70 等 HSP 可以显著地促进小胶质细胞的激活, 从而介导对 A β 42 的吞噬作用。Fonte 等^[20]利用 *C.elegans* 线虫模型, 通过质谱分析发现 HSP70 能特异性地与 A β 共沉淀, 同时应用反转录 PCR 的研究发现, A β 可诱导 sHSPs 的表达; 此外, 他们还通过 siRNA 技术, 内源性调节 HSP70 的表达, 发现 HSP70 可以

抑制 A β 的毒性作用。Magrane 等^[22]利用腺病毒载体体系研究发现, 在神经元中过度表达 A β 42 诱导了应激反应, 促进 HSP70 的表达, 进而抑制胞内聚积的 A β 所产生的神经毒性作用, 说明 HSP70 参与的应激反应可以作为神经元内 A β 毒性作用的重要调节方式。尽管没有证据证明 A β 42 和 HSP70 存在直接联系, 但是 A β 42 如果能被转运到胞质, 则可与 HSP70 相互作用^[20], 从而受到 HSP70 的应激调节。

从目前的研究来看, HSP70 不仅可以调节 tau 蛋白代谢和聚积, 而且在协调 A β 胞内代谢和缓解 A β 毒性方面发挥着重要的作用。

2.3 HSP32

HSP32 又称为血红素加氧酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1), 属于血红素加氧酶家族, 是一类具有酶活性的小分子应激蛋白。血红素加氧酶可以催化血红素降解为胆绿素, 随后胆绿素转化为胆红素以及等摩尔的一氧化碳和铁离子, 血红素和铁可增加活性氧中间物的形成, 因此表现出胞内氧化应激活性^[17]。在神经瘤细胞中, 过度表达 HO-1 会抑制 tau 蛋白的表达; 此外, 氧化应激引发胞质骨架发生变化时, HO-1 免疫活性与 tau 蛋白磷酸化状态变化是一致的; 在缺乏 HO-1 免疫活性的神经元中发现过度磷酸化的 tau 蛋白^[16]。因此, HO-1 与 tau 蛋白的相互作用可能是神经细胞对抗氧化应激的保护性反应。

2.4 sHSPs

sHSPs 含有高保留的 C 端 α 晶状体球蛋白区, 这类 HSP 和胞质骨架相互作用, 尤其是微丝 (microfilament, MF) 和中间纤维 (intermediate filament, IF)。哺乳动物表达的 sHSPs 分子量为 27~28 kDa (人类) 和 25~26 kDa (啮齿动物)。HSP27 的磷酸化受到丝氨酸蛋白激酶的调节, 非磷酸化的 HSP27 可稳定肌动蛋白纤维, 还可协调胶质细胞纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 的装配。Shimura 等^[26]通过免疫共沉淀, 发现 HSP27 可与过度磷酸化的 tau 蛋白以及 PHF-tau 蛋白结合, 而且 HSP27 可通过降解病理状的 tau 蛋白, 或通过促进去磷酸化来维持 tau 蛋白的正常生理状态。

α 晶状体球蛋白是脊椎动物晶状体最主要的结构蛋白, 是 sHSPs 家族成员之一, 主要由两个相关的亚基组成: 酸性 α A (173 个氨基酸) 和碱性 α B (175 个氨基酸)。这两个亚基的序列同源性大约为 57%。 α A 具有晶状体特异性; α B 分子量为 20

kDa, 存在于许多非晶状体组织, 包括心脏组织、外周神经系统(peripheral nervous system, PNS)和中枢神经系统(central nervous system, CNS)。 α B晶状体球蛋白是胶质细胞纤维内含物的主要成分, 主要在少突胶质细胞中表达^[1]。胞质骨架主要由微管、中间丝和微丝组成, 它们的空间装配对维持细胞形态和蛋白质分选具有重要作用。sHSPs, 包括 α B晶状体球蛋白和HSP25, 可以与这3种胞质骨架成分相互作用, 辅助其正常的空间装配。热应激等导致微管相关蛋白(如tau蛋白)的磷酸化, 影响胞质骨架的装配。在AD患者脑中的纤维状内含物以过度磷酸化的tau蛋白为主, 同时还表现出 α B晶状体球蛋白的免疫活性^[2-4]。此外, Fonte等^[20]发现 α B晶状体球蛋白同源物HSP16与胞内A β 共定位; 在体外, α B晶状体球蛋白能够与A β 相互作用并且抑制纤维状A β 的形成。

2.5 泛素

泛素是一种分子量最小、进化高度保守的HSP(8.5 kDa), 泛素以共价键与目标蛋白相连, 介导目标蛋白通过26S蛋白酶体降解。泛素在所有脑细胞均能表达, 而且应激时表达量升高。在胞内, HSP可以辅助异常蛋白质参与泛素蛋白酶降解途径^[29-31]; 在AD患者脑中, 异常tau蛋白的代谢受到分子伴侣和泛素蛋白酶体系的监控; 而且以过度磷酸化tau蛋白为主的病理损伤与泛素免疫活性正相关^[24,28,30,32]。

3 展望

Tau蛋白和A β 异常聚积是AD患者的典型病理特征, 上调HSP不但可抑制tau蛋白的病理发生, 而且还可抑制A β 相关的毒性作用。因此, HSP很可能成为AD以及其他与蛋白质异常聚积有关的神经退行性疾病治疗的有效靶点。但是, 目前亟待解决的问题是阐明HSP抑制异常蛋白质聚积和解除A β 毒

性、以及HSP与泛素蛋白酶体系协调异常蛋白质降解的机制。此外, 由于当前有关HSP的研究多是在离体的细胞培养系统中进行的, 因此, 在整体动物模型、乃至人体(例如用副作用较小的药物或者小分子复合物来诱导HSP)验证HSP确能改善神经退行性疾病的症状(如行为异常和记忆衰退等)也应是今后研究的重要方向。

参考文献 (References)

- [1] Goldbaum O *et al.* *J Neurochem*, 2001, **78**: 1233
- [2] Fink AL. *Physiol Rev*, 1999, **79**: 425
- [3] Mao JJ *et al.* *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2001, **27**: 180
- [4] Gangalum RK *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 43374
- [5] Yang Y *et al.* *J Biol Chem*, 1998, **273**: 25552
- [6] Yoo BC *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **280**: 249
- [7] Kakimura J *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **281**: 6
- [8] Pirkkala L *et al.* *FASEB J*, 2001, **15**: 1118
- [9] McClellan AJ *et al.* *Nat Cell Biol*, 2001, **3**: E51
- [10] Morimoto RI. *Genes Dev*, 1998, **12**: 3788
- [11] Morano KA *et al.* *Gene Expr*, 1999, **7**: 271
- [12] Adachi H *et al.* *J Neurosci*, 2003, **23**: 2203
- [13] Auluck PK *et al.* *Science*, 2002, **295**: 865
- [14] Chung KK *et al.* *Neuron*, 2004, **44**: 899
- [15] Zeng XC *et al.* *J Cell Sci*, 2004, **117**: 4991
- [16] Takeda A *et al.* *J Neurochem*, 2000, **75**: 1234
- [17] Schipper HM. *Exp Gerontol*, 2000, **35**: 821
- [18] Dou F *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**: 721
- [19] Kakimura J *et al.* *FASEB J*, 2002, **16**: 601
- [20] Fonte V *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 9439
- [21] Kakimura J *et al.* *Ann N Y Acad Sci*, 2002, **977**: 327
- [22] Magrane J *et al.* *J Neurosci*, 2004, **24**: 1700
- [23] Gestwicki JE *et al.* *Science*, 2004, **306**: 865
- [24] Petrucelli L *et al.* *Hum Mol Genet*, 2004, **13**: 703
- [25] Shimura H *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 4869
- [26] Shimura H *et al.* *J Biol Chem*, 2004, **279**: 17957
- [27] Dai Q *et al.* *EMBO J*, 2003, **22**: 5446
- [28] Hatakeyama S *et al.* *J Neurochem*, 2004, **91**: 299
- [29] Hirsch C *et al.* *Trends Cell Biol*, 2000, **10**: 268
- [30] Hershko A *et al.* *Nat Med*, 2000, **6**: 1073
- [31] Hope AD *et al.* *J Neurochem*, 2003, **86**: 394
- [32] Goldbaum O *et al.* *J Neurosci*, 2004, **24**: 5748

The Studies of Heat Shock Proteins in Alzheimer Disease

Zhen-Qiu Tan^{1,2}, Feng Li^{1,3}, Run-Zhong Liu^{1,3}, Shui-Gen Hong¹, Jian-Zhi Wang^{2*}, Hua-Xi Xu^{1,2,3*}

¹The laboratory of Molecular Cellular Neuroscience, School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

²Department of Pathophysiology, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China;

³Degenerative Disease Research, the Burnham Institute New York, New York 10021, USA)

Abstract Heat shock proteins (HSPs), or so-called stress proteins, comprise of several highly conserved families of related proteins. They not only participate in the synthesis, folding, translocation and transport of proteins, but also modulate proteolytic machinery and prevent misfolding and aggregation of proteins in neurodegenerative diseases, e.g. alpha-synuclein and parkin in Parkinson's disease and huntingtin in Huntington's disease. Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by two major pathological lesions: neurofibrillary tangles which comprise largely of insoluble hyperphosphorylated tau, and senile or amyloid plaques which mainly composed of β -amyloid peptides ($A\beta$). The accumulating evidence begins to demonstrate a key role for HSPs in the accumulation/solubility of tau, and inhibition of $A\beta$ -induced neurotoxicity. Although the detailed mechanisms underlying the functions of HSPs in AD pathogenesis remain elusive, the protective roles of HSPs in both normal physiological and pathological processes suggest that HSPs maybe a therapeutic target of AD treatment. Thus, this article intends to review recent findings on HSPs' roles in AD pathogenesis.

Key words heat shock protein; Alzheimer's disease; tau; β -amyloid

Received: January 14, 2005 Accepted: April 11, 2005

*Corresponding author. Jian-Zhi Wang: Tel: 86-27-83693883, Fax: 86-27-83693883, E-mail: wangjz@mails.tjmu.edu.cn

Hua-Xi Xu: Tel: 86-592-2188568, Fax: 86-592-2188528, E-mail: xuh@burnham.org