

内质网应激与阿尔茨海默病

程 敏 朱粹青*

(复旦大学医学神经生物学国家重点实验室, 上海 200032)

摘要 内质网是蛋白质合成、修饰以及折叠的重要场所。内质网内未折叠蛋白堆积, 钙离子失稳等可触发内质网应激, 通过非折叠蛋白应答纠正这些异常变化。过度的内质网应激或内质网应激机制失常将导致细胞损害和死亡。近年来的研究发现阿尔茨海默病的神经系统损害与内质网应激异常有关。深入研究内质网应激将为进一步探索阿尔茨海默病发病机制和防治基础提供新的方向。

关键词 内质网应激; 非折叠蛋白反应; 凋亡; 阿尔茨海默病; 早老蛋白

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种常见的以进行性记忆、认知功能丧失为临床特征的神经退行性疾病。典型的脑病理特征是大量老年斑、神经元纤维缠结形成以及神经元丢失。目前就其发病机制有多种假说, 包括胆碱能假说, 基因假说, 金属离子假说, β 淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)级联假说、tau 蛋白过度磷酸化假说和突触功能障碍假说等。近年来的研究表明 AD 神经元死亡还与内质网(endoplasmic reticulum, ER)功能的异常有关。ER 参与蛋白质合成, 翻译后加工修饰以及蛋白质的正确折叠。ER 内驻留有大量的分子伴侣蛋白和折叠酶, 它们组建成了一个调控蛋白质折叠的“质控系统”。在病理情况下如蛋白质糖基化的抑制, 钙离子稳态的改变, 二硫键减少等可引发 ER 内非折叠或错折叠蛋白的聚集。当非折叠或错折叠蛋白在 ER 内堆积超过生理条件下 ER 的处理能力时, 称为 ER 应激; 但也可把非折叠或错折叠蛋白在 ER 堆积及其激发的细胞内反应的整个过程称为 ER 应激。ER 应激可激发细胞的非折叠蛋白应答(unfolded protein response, UPR), 促进蛋白质的正常折叠或降解异常折叠的蛋白质^[1]。而 ER 应激过度或反应机制的失调可导致异常折叠蛋白在细胞内过度堆积干扰细胞正常功能, 或通过 ER 应激相关的凋亡途径引起细胞凋亡, 导致疾病的发生。这些异常反应可能在 AD 病理机制中起着重要的作用^[2]。本文将就 ER 应激的机制, 及其与 AD 关系的研究进展作一简要的综述。

ER 应激可激发 UPR 发挥细胞自我保护作用。UPR 包括: (1)分子伴侣蛋白免疫球蛋白结合蛋白(immunoglobulin binding protein, BiP)也称为葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulating protein78, GRP78)、GRP94 和蛋白二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI)等表达增加以助错折叠或非折叠的蛋白质正常折叠; (2)通过 PERK(PKR like ER kinase, PERK)介导的途径减少蛋白质翻译; (3)激活 ER 相关蛋白降解(ER associated degradation, ERAD)系统将无法修复的蛋白质由 ER 运输至胞浆, 通过泛素-蛋白酶体系统降解^[3]。如果 ER 应激过强, 通过 UPR 机制不能修复蛋白质的异常改变, 将导致细胞的损害或凋亡。

在 ER 应激反应中, 有几种跨膜蛋白可感知 ER 应激并向细胞质和细胞核转导 ER 应激信号, 启动 UPR。在哺乳动物细胞的 ER 膜上有: IRE1 (inositol requiring 1, IRE1)、PERK 和激活转录因子 6 (activating transcription factor-6, ATF6)^[4]。

1.1 IRE1

在 IRE1、PERK 和 ATF6 感知 ER 应激的机制中 BiP 起着重要的介导作用。在正常生理情况下, BiP 与 IRE1、PERK 等结合; ER 应激时大量的非折叠蛋白与 IRE1、PERK 竞争 BiP 的结合, 导致 IRE1、PERK 二聚化并激活相应的信号通路^[5]。在哺乳动物细胞中有两种 IRE1 亚型, IRE1 α 和 IRE1 β 为 I 型跨膜蛋白, 其位于内质网内腔的氨基末端有识别非折

1 ER 应激信号转导

收稿日期: 2005-08-05 接受日期: 2006-04-10

*通讯作者。Tel: 021-54237224, Fax: 021-64174579, E-mail: cqzhu@shmu.edu.cn

叠蛋白信号的结构, 位于胞质或胞核中的羧基末端有丝氨酸/酪氨酸特异的蛋白激酶和 RnaseL 结构域。IRE1 的二聚化位点与 BiP 结合域有部分重叠, 当 BiP 从 IRE1 上释放后, 二聚化位点游离, 导致 IRE1 二聚化和磷酸化。自身激活的 IRE1 进一步通过 γ -分泌酶(γ -secretase)样的方式被切割, 其羧基端片段被运输到细胞核内, 参与 XBP-1 mRNA 的剪辑。XBP-1 是亮氨酸拉链家族的转录因子, 经 IRE1 介导产生的 XBP-1 剪接子可通过与 DNA 上非折叠蛋白应答元件(UPR-element, UPRE)和内质网应激反应元件(ER stress response element, ERSE)结合调节 UPR, 使 ER 分子伴侣蛋白(如 BiP)表达增加^[6,7], 从而诱导蛋白质的正确折叠。IRE1 的激活还可诱导参与 ER 相关蛋白降解的 SEL1L、HRD1 表达增加^[8]。由 SEL1L、HRD1 介导错折叠蛋白去 ER 定位, 并把它们拖入胞浆由泛素-蛋白酶体系统降解, 由于 HRD1 具有泛素连接酶 E3 的活性, 因此它还直接参与错折叠蛋白的泛素化^[9]。

1.2 PERK

PERK 也属于 I 型跨膜蛋白, 胞浆侧羧基末端的蛋白激酶活性域既可以使真核生物转录起始因子 2 α (eukaryotic translation initiation factor, eIF2 α)的 51 位丝氨酸磷酸化, 也可使自身磷酸化; 而位于 ER 内的氨基末端主要是感受 ER 应激信息。非 ER 应激状态时 PERK 的氨基末端与 BiP 结合, ER 应激时 PERK 暴露, 进而发生 PERK 寡聚化和磷酸化, 导致 PERK 自身激活。激活的 PERK 催化底物 eIF2 α 发生磷酸化, 使蛋白质合成过程暂停, 进而使得细胞内蛋白质折叠系统负荷减轻。其次, PERK 也可以诱导分子伴侣蛋白表达增加(图 1)。

1.3 ATF6

ATF6 是位于内质网膜上的 II 型跨膜蛋白, 其激活过程也受 BiP 调控。但不同的是 BiP 并不是调控 ATF6 的寡聚化, 而是与 ATF6 转移到高尔基体有关。BiP 结合在 ATF6 的羧基末端的高尔基定位序列位点, 内质网应激时 BiP 释放, 高尔基定位序列位点游离后 ATF6 转移到高尔基体膜上^[10]。分布在高尔基体膜上的 ATF6 在其跨膜序列上或近膜的区域被 S1P (site-1 protease)和 S2P 两种蛋白酶水解, 并向胞浆释放分子量为 50 kDa 的 N 末端片段(p50ATF6), 该片段含亮氨酸拉链结构域^[11]。随后 p50ATF6 被转运入细胞核, 与 DNA 上 ER 应激反应元件 I 和 II 结合^[12,13]。诱导 ER 分子伴侣蛋白和参与 ER 相关蛋白

降解的 SEL1L、HRD1 表达增加^[14]。

ER 应激后细胞通过上述三条途径(图 1)的 UPR 使得非折叠或错折叠蛋白得以重新正确折叠或防止蛋白质错误折叠, 从而保障细胞内环境平衡和功能正常, 这就是 ER 应激所激发的保护机制。

2 ER 应激与细胞凋亡

ER 应激所激发的 UPR 反应是一把“双利剑”, 长时间或过强的 ER 应激可引起一系列的反应, 通过信号级联放大机制和相关的基因表达改变, 最终导致细胞凋亡(图 1)。ER 应激反应性凋亡途径的凋亡信号起始于 ER, 其有一套自身的信号转导通路^[15]。用 ER-高尔基体蛋白转运抑制剂(brefeldinA)、氨基端糖基化抑制剂(tunicamycin)、ER 膜上的钙泵抑制剂(thapsigargin)处理细胞诱导 ER 应激反应, 均可导致细胞凋亡。经免疫印迹检测发现不仅有多聚核糖聚合酶(PARP)活化, 还有 caspase-12 活化以及 BiP 的增加^[16]。

在 ER 应激下, 激活的 IRE1 可募集肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (tumor necrosis factor receptor associated factor2, TRAF2)至 ER 膜上, 继而可能会引起两种效应: (1)TRAF2 激活凋亡信号调控激酶 1 (apoptosis-signaling kinase 1, ASK1), 后者再激活 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)和线粒体依赖的 caspase 凋亡途径。(2)激活的 TRAF2 从与 caspase-12 前体形成的复合物上解离, 导致 caspase-12 活化, 引起细胞凋亡^[17]。Caspase-12 活化是在 ER 内积聚错折叠蛋白后较晚发生的事件, 其详细激活途径尚不完全清楚, 可能通过钙蛋白酶(calpain)对 caspase-12 前体的酶切、TRAF2 诱导其寡聚化和裂解等途径活化^[18]。Caspase-12 的下游信号途径可能有 caspase-9、caspase-3 等参与^[19]。尽管目前认为 caspase-12 在 ER 应激诱导的细胞凋亡中起到重要的作用^[16], 但 caspase-12 只在有些哺乳动物中存在, 如大鼠、小鼠。人基因中的 caspase-4 序列与鼠的 caspase-12 有 68% 的同源性, caspase-4 也定位于 ER 外膜, 并在 ER 应激下形成活性片段, 它被认为极有可能是人的 caspase-12^[20]。此外, ER 应激激活的 IRE、PERK、ATF6 还可导致前凋亡基因的转录上调, 如 CHOP 基因(CCAAT/enhancer-binding-protein homologous protein-10), 诱导细胞凋亡^[21](图 1)。

3 ER 应激与 AD

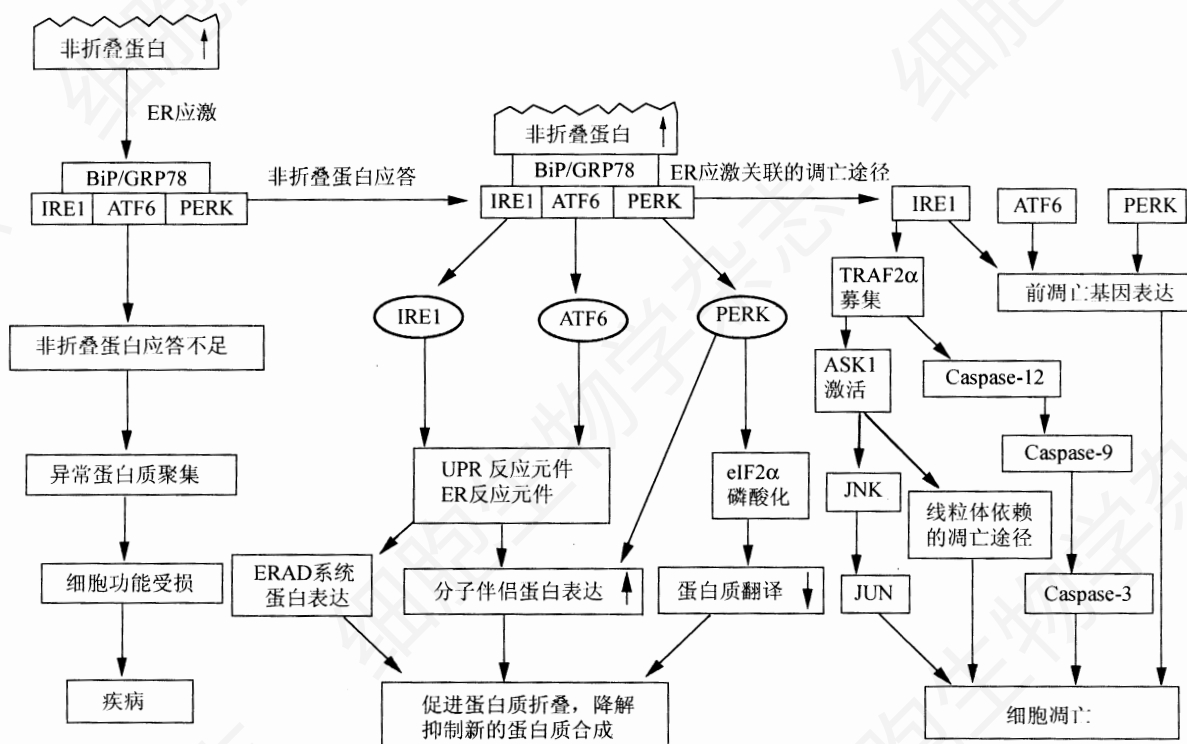


图1 内质网应激非折叠蛋白应答及相关凋亡途径(部分摘录于文献[17])

ERAD: 内质网相关蛋白降解; UPR: 非折叠蛋白应答; ER: 内质网; eIF2 α : 真核生物转录起始因子2 α ; TRAF2 α : 肿瘤坏死因子受体相关因子2 α ; ASK1: 凋亡信号调控激酶1; JNK: c-Jun 氨基末端激酶; BiP/GRP78: 免疫球蛋白结合蛋白/葡萄糖调节蛋白78; PERK(PKR like ER kinase); IRE1(inositol requiring 1); ATF6 (activating transcription factor-6)。

3.1 早老蛋白1基因突变与ER应激

早老蛋白1(presenilin1, PS1)是 γ -分泌酶复合体的一部分,参与 β -淀粉样蛋白前体(β -amyloid precursor protein, APP)的切割过程,PS1突变可影响APP的a位酶切,促进更多的A β_{1-42} 的分泌^[22]。一些研究发现PS1突变不仅可导致细胞对Ca²⁺浓度的紊乱、氧化应激、缺氧等凋亡刺激的易感性增加,并且对ER应激的易感性也增加。表达家族型AD关联的突变型PS1的人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞,伴侣蛋白BiP/GRP78的mRNA转录受到抑制,同样在PS1突变的家族型AD大脑中也发现GRP78表达明显降低^[23],这提示PS1病理突变将导致UPR的抑制,使得神经细胞在ER应激时更易发生损害。尽管有作者认为突变型PS1可能并不直接影响IRE1,ATF6,PERK等的激活^[24,25],但有研究显示突变的PS1可抑制ER应激引起的ER膜上的IRE1 α 、PERK自身磷酸化和eIF2 α 的磷酸化;使50 kDa ATF6片段转运到细胞核时程明显延长,减弱ATF6信号通路^[26]。因此,家族型AD关联的PS1基因突变对UPR机制的影响可能是多方面的。

3.2 ER应激与PS2V

在散发型AD脑内会发生早老蛋白2(presenilin2, PS2)mRNA的异常剪辑。Sato等^[27]研究发现在散发型AD大脑中有PS2的异常剪辑产物PS2V存在。PS2V mRNA缺少外显子5碱基序列,使翻译时产生框移突变,并在外显子6产生终止密码子导致蛋白质翻译过早停止。正常PS2是多次跨膜蛋白,而PS2V则是一次跨膜蛋白,并在羧基末端含5个特征性的氨基酸残基(SSMAG)。用对5个氨基酸残基特异的单克隆抗体检测发现PS2V主要在散发型AD病人大脑海马CA1区锥体细胞和大脑皮层表达。进一步研究发现表达PS2V的细胞对ER应激的易感性增加。PS2V在ER膜上通过与ER应激转导子IRE1结合,并抑制它的磷酸化,进而影响BiP/GRP78等伴侣分子表达。另外,表达PS2V的细胞中A β_{1-40} 和A β_{1-42} 生成增加,这可能与APP从ER运输到高尔基体这一过程受到抑制有关,过多的APP在细胞内聚集导致A β 生成增多^[28]。PS2V的形成机制还不完全清楚,但已发现缺氧可诱导人神经母细胞瘤细胞产生PS2V,同时在这种表达PS2V细胞的细胞核中

提取出一种 18 kDa 的称为高迁移率组 A1 α 蛋白(high mobility group A1 α protein, HMGA1 α)。HMGA1 α 蛋白有多种功能, 可作为转录因子与 DNA 结合; 而在此细胞中 HMGA1 α 结合在 PS2 前 mRNA 的外显子 5' 末端的特定序列, 导致 PS2 mRNA 的异常剪接, 产生 PS2V。通过对散发型 AD 大脑的研究, 也已发现了 HMGA1 α 蛋白显著升高^[29]。因此, 散发型 AD 脑内易发生 mRNA 的异常剪辑, 其引起 ER 应激应答机制损害是神经系统退变的一个重要原因。

3.3 ER 应激与 A β 产生

A β 的神经毒性作用被认为在 AD 的病理改变中起着重要的作用。A β 是从其前体蛋白 APP 上酶切下来的小肽, 这一过程可在 ER 中进行。APP 也属 I 型跨膜蛋白, 在正常细胞中, 分子伴侣蛋白 BiP 可与 APP 结合, 抑制 A β 的产生。而 ER 应激的应答异常时, 可能由于分子伴侣表达受到抑制, BiP 减少, 进而促进 A β 产生增加^[30]。正常的 APP 在 ER 内氨基端糖基化后再运输到高尔基体中进行羧基端的糖基化修饰。Katayama 等^[31]发现表达缺失活性位点 IRE1(Δ IRE1)的细胞中, APP 由 ER 运输到高尔基体这一过程受到抑制, APP 在 ER 内不能正常折叠, 异常水解导致 A β 分泌增加。

3.4 ER 应激介导的细胞凋亡与 AD

A β 的神经毒性作用涉及的机制较为复杂。研究发现 A β 可通过 ER 途径介导细胞的凋亡和变性。用 A β 温育神经细胞, 可产生 ER 应激, 并可能通过激活钙蛋白酶进而激活神经细胞中的 caspase-12; caspase-12 基因剔除的神经元细胞对 A β 诱导的细胞凋亡有部分抑制作用^[16]。A β 的一个显著毒性作用是使细胞内钙离子系统紊乱。A β 可激发 ER 内 Ca²⁺ 向胞浆释放, ER 内的 Ca²⁺ 耗竭可诱发 ER 应激, 而进入胞浆的 Ca²⁺ 可激活钙蛋白酶, 钙蛋白酶再激活 caspase-12 引起细胞凋亡^[32]。另外, 许多分子伴侣蛋白如 GPR78 等都是 Ca²⁺ 结合蛋白, ER 内的 Ca²⁺ 耗竭可以影响这些蛋白质的功能进而影响蛋白质的折叠过程, 加重 ER 应激, 导致细胞损害。因此, 细胞内 Ca²⁺ 系统的失稳可能是 A β 引起的 ER 应激的重要环节之一。

3.5 泛素-蛋白酶体系统损害与 AD

ER 应激后, 经 UPR 作用不能重新正确折叠的蛋白质被运输到 ER 外引起泛素-蛋白酶体系统降解, 因此泛素-蛋白酶体在 ER 应激中也起着重要的作用。有研究发现 AD 病人有泛素 B 基因的框移突

变, 这种突变形成具有异常氨基端的泛素 B(Ub⁺¹), 而 Ub⁺¹ 仍可作为泛素化作用的底物, 由 Ub⁺¹ 修饰的蛋白质可抑制蛋白酶体^[33], 从而抑制了蛋白酶体在 ER 应激中降解非折叠或错折叠蛋白的作用。因此蛋白酶体功能的抑制可促进 AD 的病理进展。在过量表达野生型 PS1/2 细胞中蛋白酶体活性抑制剂的应用可以促进 A β ₄₀ 的形成, 而在过量表达病理突变的 PS1/2 细胞中, 则加剧 A β ₄₂ 的形成。因此, 合理地应用蛋白酶体激动剂有可能有利于促进细胞内 A β 降解, 减少其分泌, 有可能成为治疗 AD 的一个潜在途径^[34]。

4 小结

ER 应激后的 UPR 机制的激活是对细胞的保护反应; 过度的 ER 应激或 ER 应激机制的异常与 AD 神经系统损害有关, 其实 ER 应激还与其他一些神经元退行性疾病有关, 如帕金森氏病等。虽然近年来 ER 应激信号转导及其与 AD 关系的研究很多, 但很多具体机制仍还需进一步详细阐述, 如 IRE1 既参与 UPR, 也参与 ER 应激引起细胞凋亡的途径, IRE1 在这两种截然相反的途径中怎样起到协调作用的; PS1/2 基因突变均可导致 A β 聚集, 其中 ER 应激机制是否起到主导作用; PS1/2 突变体通过 ER 应激如何加速 AD 的发生等。另外, 如何有效调控具有保护作用的 UPR 机制也是需要深入研究的一个重要方面^[35]。通过对这些方面的认识, 可能为研究探索 AD 发病机制和治疗方案开辟了新的思路。

参考文献 (References)

- [1] Kudo T et al. *Ann N Y Acad Sci*, 2002, **977**: 349
- [2] Paschen W et al. *Cell Calcium*, 2005, **38**: 409
- [3] Schroder M et al. *Mutation Res*, 2005, **569**: 29
- [4] Ma Y et al. *Cell*, 2001, **107**: 827
- [5] Kimata Y et al. *J Cell Biol*, 2004, **167**: 445
- [6] Cox JS et al. *Cell*, 1996, **87**: 391
- [7] Back SH et al. *Methods*, 2005, **35**: 395
- [8] Kaneko M et al. *Life Sci*, 2003, **74**: 199
- [9] Saltini G et al. *Neuroscience Lett*, 2006, **398**: 53
- [10] Chen X et al. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 13045
- [11] Ye J et al. *Mol Cell*, 2000, **6**: 1355
- [12] Yoshida H et al. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 33741
- [13] Kokame K et al. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 9199
- [14] Boyce M et al. *Science*, 2005, **307**: 935
- [15] Takuma K et al. *J Pharmacol Sci*, 2005, **97**: 312
- [16] Nakagawa T et al. *Nature*, 2000, **403**: 98
- [17] Forman MS et al. *Trends Neurosci*, 2003, **26**: 407

- [18] Breckenridge DG *et al.* *Oncogene*, 2003, **22**: 8608
[19] Morishima K *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 34287
[20] Van de Craen M *et al.* *FEBS Lett*, 1997, **403**: 61
[21] Ubeda M *et al.* *Mol Cell Biol*, 1996, **16**: 1479
[22] Lleo A *et al.* *Am J Geriatr Psychiatry*, 2004, **12**: 146
[23] Imaizumi K *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2001, **1536**: 85
[24] Sato N *et al.* *Nat Cell Biol*, 2000, **2**: 863
[25] Siman R *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 44736
[26] Katayama T *et al.* *Nat Cell Biol*, 1999, **1**: 479
[27] Sato N *et al.* *J Neurochem*, 1999, **72**: 2498
[28] Sato N *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 2108
[29] Manabe T *et al.* *Cell Death Differ*, 2003, **10**: 698
[30] Yang Y *et al.* *J Bio Chem*, 1998, **273**: 25552
[31] Katayama T *et al.* *J Chem Neuroanat*, 2004, **28**: 67
[32] Suen KC *et al.* *J Neurochem*, 2003, **87**: 1413
[33] Paschen W *et al.* *J Neurochem*, 2001, **79**: 719
[34] Checler F *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1502**: 133
[35] Boyce M *et al.* *Science*, 2005, **307**: 935

The Endoplasmic Reticulum Stress and Alzheimer's Disease

Min Cheng, Cui-Qing Zhu*

(State Key Laboratory of Medical Neurobiology, Fudan University, Shanghai, 200032, China)

Abstract The endoplasmic reticulum (ER) is an important subcellular organelle for the synthesis, post-translational modification, and proper folding of protein. In some conditions, such as accumulation of unfolded protein or disruption of calcium in ER, ER stress is provoked. Normal cells respond to ER stress by activation of the unfolded protein response, to prevent protein misfolding, degrade misfolded protein and facilitate protein proper folding in ER. However, excessive or aberrant ER stress results in cell injury or death. Recent evidence indicates that neurodegenerative disorders in Alzheimer's disease are associated to aberrant ER stress. Further resolution of the molecular relationship between ER stress and neurodegeneration will provide novel insights into the mechanisms of AD pathology, and lead to new therapeutic targets for AD.

Key words endoplasmic reticulum stress; unfolded protein response; apoptosis; Alzheimer's disease; presenilin

Received: August 5, 2005 Accepted: April 10, 2006

*Corresponding author. Tel: 86-21-54237224, Fax: 86-21-64174579, E-mail: cqzhu@shmu.edu.cn