

# 热休克蛋白 70 的结构和功能

王宇萍 蒋建东\*

(中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

**摘要** 热休克蛋白 70 (HSP70)是进化上高度保守的一种的蛋白质, 具有多种生物学功能, 包括分子伴侣功能, 具有细胞保护及抗细胞凋亡功能, 参与免疫调节, 以及在病毒感染与疾病研究中也具有重要作用。本文着重对 HSP70 的结构和功能研究的进展作一综述。

**关键词** 热休克蛋白 70; 分子伴侣; 生物学功能

各种生物有机体受到外界不利或有害因素刺激时, 会发生一种生理性的快速、短暂细胞代谢调节, 此期间细胞内一些正常基因的表达受到抑制, 而一组特殊基因则被激活并表达增强, 这一现象被称为热休克反应(heat shock response, HSR), 这组特殊基因就是热休克基因, 所产生的蛋白质称为热休克蛋白(heat shock protein, HSP)。这类具有重要生理功能且具有高度保守性, 普遍存在于整个生物界, 在应激状态下可被诱导表达<sup>[1]</sup>。

## 1 Hsp70 的概况

1962 年, Ritossa<sup>[2]</sup>在果蝇的研究中首次发现, 短暂的热休克可以诱导唾液腺染色体出现 3 个膨突, 提示这一区带转录加强, 他将这一现象称为“热休克反应(HSR)”。1974 年, Tissières 等<sup>[3]</sup>采用 SDS-PAGE 及放射性自显影技术, 从热休克果蝇唾液腺细胞中分离出一组特殊蛋白质, 并确定这种蛋白质的合成与染色体“膨松”有关, 证实高温引起果蝇幼虫染色体蓬松是由于热休克激发基因转录以合成的特异蛋白引起。由于这种蛋白质是在热刺激下所产生, 故称其为热休克蛋白(HSP)。后来, 人们发现除高温外的其他刺激如缺血、缺氧、重金属、病毒感染、组织损伤等均可诱导 HSP 的合成, 并关闭正常蛋白质的合成, 故也有人称其为应激蛋白(stress protein, SP)或热应激蛋白(heat stress protein, HSP)<sup>[1]</sup>。10 年后, Nover<sup>[4]</sup>与 Soger 等<sup>[5]</sup>先后阐明了编码 HSP 的序列、基因结构及其位点, 并确定是由于高热影响到该基因中保守的上游调节序列即热休克元件(heat shock element, HSE), 由此引起热休克应答, 转录合成 HSP。

## 2 Hsp70 的分类

根据其分子量及等电点不同将 HSPs 分成五大

类(或家族), 如表 1, 分别为: 低分子量 HSPs 家族、中等分子量 HSPs 家族、Hsp70 家族、Hsp90 家族和 Hsp110 家族<sup>[6]</sup>。其中 Hsp70 是 HSP 家族中最保守、最主要、含量最丰富的一种, 具有多种功能, 是一种非特异性细胞保护蛋白, 也是近年来的研究备受关注的一类。人体细胞含有多个 Hsp70 家族成员, 包括应激诱导的 Hsp70 (又称为 Hsp72 或 Hsp70I)、结构型热休克蛋白 Hsc70 (Hsp73)、线粒体 Hsp75 (mtHsp75)和位于内质网的 Grp78 (BiP), 其中分布于细胞质中 Hsp70 成员及其定位见表 2。

目前, 对 Hsp70 家族的结构、功能以及表达调控机制的研究较为深入。正常情况下 Hsp70 位于细胞浆内, 当细胞受到热休克刺激时, 细胞核 Hsp70 迅速增加, 细胞浆内只有少量存在, 细胞处于恢复阶段时, 细胞核内的 Hsp70 消失, 细胞浆内仍有低水平 Hsp70 表达<sup>[7]</sup>。Hsp70 家族成员在细胞内的分布定位虽然不同, 但均具有与核苷酸结合的特性, 特别是与 ADP 或 ATP 结合。Hsp70 家族至少包括四类蛋白质: 第一类为 Hsp73, 是哺乳类动物细胞内的结构蛋白, 属结构型 Hsp70, 又称为 Hsp70 同源蛋白(Hsc70), 热刺激后只有少量增加; 第二类为 Hsp72, 在正常细胞内也有少量表达, 细胞发生应激后, 表达迅速增加, 属诱导型 Hsp70。Hsp72 和 Hsp73 具有高度的序列同源性(95%)和相似的生物化学特性; 第三类为 GRP78, 位于细胞内质网腔中; 第四类为 GRP75, 位于线粒体内。Hsp70 家族成员结构上的共性赋予其一些共同的生物学特性: (1)所有的 Hsp70 都具有较高的 ATP 亲和性及氨基端具有弱的 ATPase 活性, 与肌肉的肌动

收稿日期: 2009-06-11 接受日期: 2010-03-01

\* 通讯作者。Tel: 010-63170236, Fax: 010-63010984, E-mail:

wyping0317@163.com

**Table 1 The main classification and function of HSP**

Major HSP family members	Molecular weight (kDa)	The intracellular location	Biological function
Hsp110 subfamily	≈ 110		
Hsp110		Nucleolus, cytoplasmic	Heat tolerance, cross-tolerance
Hsp105		Cytoplasmic	Protein folding
Hsp90 Subfamily $\alpha$ (Hsp86)	≈ 90	Cytoplasmic	With steroid receptors, heat tolerance
Hsp90 $\beta$ (Hsp84)		Cytoplasmic	With steroid receptors, heat tolerance
Hsp70 subfamily	≈ 70		
Hsc70 (constitutive)		Cytoplasmic	Protein folding and translocation
Hsp70 (induced)		Cytoplasmic, nuclear	Protein folding, cytoprotection
Hsp60 subfamily	≈ 60		
Hsp60		Mitochondria	Protein folding
TriC		Cytoplasmic	Protein folding
Small Hsp Subfamily	20~30		
Hsp32		Cytoplasmic	Antioxidant
Hsp27		Cytoplasmic, nuclear	Actin dynamics
$\alpha$ $\beta$ Crystal-like protein		Cytoplasmic	Cytoskeletal stability
Hsp10	≈ 10	Mitochondria	Auxiliary factor of Hsp60
Ubiquitin	≈ 8	Cytoplasmic, nuclear	Non-lysosomal degradation of proteins

**Table 2 The Hsp70 family members distributed in the cytoplasm**

Loci	Chromosome location	Hsp70 aa sequence homology*	Protein name	Alias
HSPA1A	6p21.3	100%	Hsp70	Hsp72, Hsp70-1a
HSPA1B	6p21.3	99%	Hsp70	Hsp72, Hsp70-1b
HSPA1L	6p21.3	91%	Hsp70t	Hsp70-Hom
HSPA8	11q23.3-q25	86%	Hsc70	Hsp73, Hsp70-8
HSPA2	14q24.1	84%	Hsp70-2	HspA2, Hsp70-3
HSPA6	1cen-eqter	84%	Hsp70-6	Hsp70-B'

\* Hsp70 amino acids homology percentage refers to Hsp70 coded by HSPA1A.

蛋白结构很相似; (2)当ATPase被激活时,可与伸展的多态结合; (3)保护各种酶免受热损伤,使聚合的蛋白质解聚; (4)可与各种未折叠或新合成的多肽链结合,帮助其正确折叠,协助它们的跨膜转运; (5)发挥作用要靠其他HSP或细胞因子的辅助; (6)具有高度保守钙调素结合结构域。

### 3 Hsp70基因与蛋白质结构特点

Hsp70基因家族组成差异较大。如Hsc70基因含有8个内含子,它的cDNA序列已在人、大鼠、小鼠、中国仓鼠和牛等的细胞中被发现,据推测其所编码的蛋白质约含有646个氨基酸。Hsp70基因组成与Hsc70基因有很大不同,Hsp70及其部分相关基因在人类定位于6、14、21号等位染色体上。人类Hsp70基因由2440个核苷酸组成,其中5'端、3'端分别含有非编码的212与242个核苷酸序列,5'端上游是TATA盒,30个核苷酸处是热休克元件(HSE)。

Hsp70基因没有内含子,转录一旦启动就可产生出成熟的mRNA来快速表达Hsp70,防止应激原对Hsp70 mRNA前体的影响,从而保证了机体对Hsp70的需要。Flynn等<sup>[8]</sup>的研究表明:Hsp70氨基酸的一级结构可分为两个功能域,近N端为45 kDa大小ATP结合的结构域,结构上具有高度保守的氨基酸序列,具有ATPase活性区,比羧基端部分具有更高的保守性,与不同生物体的Hsp70所共有的生化特性有关;近C端为25 kDa大小的底物结合结构域;近C端结构域可再分为15 kDa大小的 $\beta$ 2夹层( $\beta$ -sandwich)结构亚区和近C端10 kDa大小的 $\alpha$ -螺旋( $\alpha$ -helix)结构亚区,其结构尚不清楚,可能与特定的一组蛋白质底物相互作用有关<sup>[8]</sup>。Hsp70基因编码序列在进化上具有高度保守性,大鼠Hsp70氨基酸序列与人类Hsp70氨基酸序列的同源性约为95%,与小鼠Hsp70氨基酸序列的同源性约为98%,人类Hsp70氨基酸序列与果蝇Hsp70氨基酸序列的同源性为73%,与大肠杆菌诱导型

Hsp70 (即 DnaK)氨基酸序列的同源性则为 47%<sup>[9]</sup>。

当细胞受到热刺激或其他生理应激诱导后, 在胞质中的多肽-热休克转录因子(heat shock transcription factor, HSF)单体聚合形成有活性的三聚体, 转运到核内, 结合到热应激基因上游的启动子元件-热应激元件(HSE), HSF 与 HSE 结合后, 立即激活热应激基因转录; 在非应激条件下, Hsp70 与 HSF 相结合, 从而抑制 HSF 的活性, HSF 与 HSE 仅有低水平结合。简单地讲, HSP 基因的转录调节过程包括 HSF 的激活(HSF 单体聚合成活性的三聚体)、HSF 寡聚体与 HSE 的结合及启动 HSP 基因的转录三个步骤(图 1)<sup>[10]</sup>。

目前, 一般认为激活 HSF 有以下两种方式。

(1) 1985 年, Munro 等<sup>[11]</sup>发现 HSF 的作用与泛素非依赖性溶酶体蛋白降解系统密切相关。正常情况下, HSF 以无活性的单体形式呈泛素化状态, 在应激状态下, 细胞内产生大量变性蛋白, 泛素介导的蛋白质降解系统随之启动, 使游离的泛素水平下降, 它与 HSF 的结合迅速减少, 而游离态单体 HSF 增多, 三个单体 HSF 结合成一个有活性的三聚体, 与 HSE 的亲性和性明显加强, 并结合 HSE 上, 继而在 RNA 聚合酶作用下促进 HSP 基因转录及表达。伴随着变性蛋白大量被水解酶降解, 加之细胞不断合成新的泛素, HSF 则因重新泛素化而失活, 从而终止基因转录。

(2) 热休克后人类 HSP 会发生广泛磷酸化, 磷酸化后会形成具有转录活性的复合物, 与 HSE 结合, 启动 HSP 基因转录。

Hsp70 大约由 650 个氨基酸组成, 是一组进化上高度保守的应激蛋白, 其所有成员都具有一个共同的结构, 这个共同结构包括两个区域: 一个高度保守的 N 端, 分子量约为 44 kDa 的 ATPase 功能域(ATP binding domain)和一个 C 端分子量约为 25 kDa 的底物结合功能域。图 2C 显示各功能域氨基酸在全蛋白的大约位置。比较 Hsp70 家族各种蛋白质的氨基酸序列发现 N 末端的氨基酸(大约 400 个氨基酸)保守性高于 C 端, 一些 Hsp70 N 端或 C 端存在一段信号肽或延伸序列有助于细胞内定位、驻留<sup>[12]</sup>。X 光衍射晶体结构分析发现 N 端 ATPase 功能域的结构类似于肌动蛋白和己糖磷酸激酶, 主要由 2 个大的球形亚功能域 I 和 II 所组成, 中间被一个深的中央裂缝所分开, 并通过 2 个交叉的  $\alpha$  螺旋相连接, 亚功能域和连接的  $\alpha$  螺旋在裂缝的底部形成一个核苷酸及所需金属离子的结合袋, 核苷酸和金属离子通过弱的相互作用结合在裂缝底部, 如图 2A<sup>[13]</sup>。C 端区域又可分成一个保

守的分子量为 15 kDa 的多肽结合功能域和一个不保守的靠近 C 端的分子量为 10 kDa 不确定功能域。Zhu 等<sup>[14]</sup>研究表明 DnaK(Hsp70 同源体)底物结合功能域和部分可变区域的结构主要由两部分组成, 如图 2B: 第一部分(N 端)多个  $\beta$  折叠形成一个紧密的  $\beta$  夹层结构; 第二部分(C 端)由 5 个  $\alpha$  螺旋组成, 形成一个松弛的  $\alpha$  螺旋束结构。N 端部分的  $\beta$  夹层结构由底部和上部 2 个片层结构组成, 每个片层结构都含有 4 条反向平行的  $\beta$  折叠( $\beta$ -sheet)链组成,  $\beta 3$ 、 $\beta 6$ 、 $\beta 7$  和  $\beta 8$  等 4 条链组成夹层结构中相对规则的底部片层,  $\beta 5$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 1$  和  $\beta 2$  等 4 条链组成上部不规则的片层结构,  $\beta$  折叠之间形成一些特殊的环状结构(loop, L)相连, 不规则的上部片层结构与夹层结构伸出的特殊的环联合形成底物结合位点, L1、2 ( $\beta 1$  和  $\beta 2$  之间形成的)和 L3、4 ( $\beta 3$  和  $\beta 4$ )形成一个大小为 0.5 nm×0.7 nm 的底物疏水结合通道。松弛构象的多肽结合在由  $\beta$  夹层结构形成的底物结合通道中, 而  $\alpha$  螺旋部分位于多肽结合单位之上, 像一个盖子覆盖在结合通道上面, 而且不与底物直接接触, 能阻止结合底物的逃逸。Hsp70 的 10 kDa 片段序列不保守, 其结构变化较多, 如上述 DnaK 的 5 个  $\alpha$  螺旋结构, 真核生物大鼠 Hsc70 10 kDa 片段的螺旋-环-螺旋结构, 线虫 Hsp70 C 末端 10 kDa 功能域的螺旋束结构等。

## 4 Hsp70 的生物学功能

### 4.1 分子伴侣作用

研究发现, 蛋白质在折叠过程中需要一些辅助元件的参与, 这些元件被称为分子伴侣, 分子伴侣本身不参与蛋白质折叠的形成, 而是通过结合和稳定蛋白质的不稳定构象, 并通过有控制的结合和释放, 促进新生多肽链的折叠、多聚体的装配或降解及细胞器蛋白的跨膜运输等。在应激状态下, HSPs 可防止其他蛋白质发生变性或解聚, 使之恢复活性, 所以一般将 HSPs 称为分子伴侣。目前认为, Hsp70 是最重要的分子伴侣之一, 其在细胞内的分布最广、含量最丰富, 主要参与细胞内蛋白质的从头合成和运输、蛋白质的折叠和蛋白质的降解及调节过程, 以维持细胞蛋白的稳定性, 提高细胞对应激原的耐受性, 增强抗氧化作用, 使细胞维持正常的生理功能。在多种应激情况下, 受损蛋白质暴露疏水区, 易被 Hsp70 底物识别区识别, 利于清除受损蛋白, 因而增加了受损细胞的存活能力。

Hsp70 N 端和 C 端两个结构功能域对 Hsp70 的

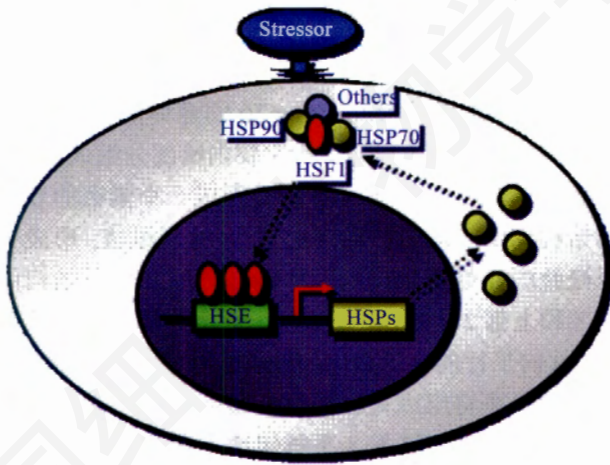


Fig.1 Hsp70 gene regulation process

分子伴侣功能是至关重要的。N端ATPase功能域具有水解ATP的活性，C端底物结合功能域能够与未折叠的多肽底物暴露在外的疏水区域特异性相结合。如图3<sup>[15,16]</sup>以简单的图示描述Hsp70在细胞内伴侣功能：(1)它参与蛋白质的折叠直至多肽的合成完成，使蛋白质可以沿着折叠的通路进行，并以ATP依赖的方式结合未折叠多肽链的疏水区以稳定蛋白质的未折叠状态，再通过有控制的释放帮助其折叠；(2)可以促进错误折叠蛋白质的解聚或降解，以减少发生不溶性蛋白质聚集的危险；(3)Hsp70还具有帮助蛋白质完成细胞内跨膜转移的功能：Hsp70能够和一些细胞中的蛋白质前体相结合，维持蛋白质的伸展状态，帮助这些蛋白质穿过内质网腔或线粒体膜使其在不区

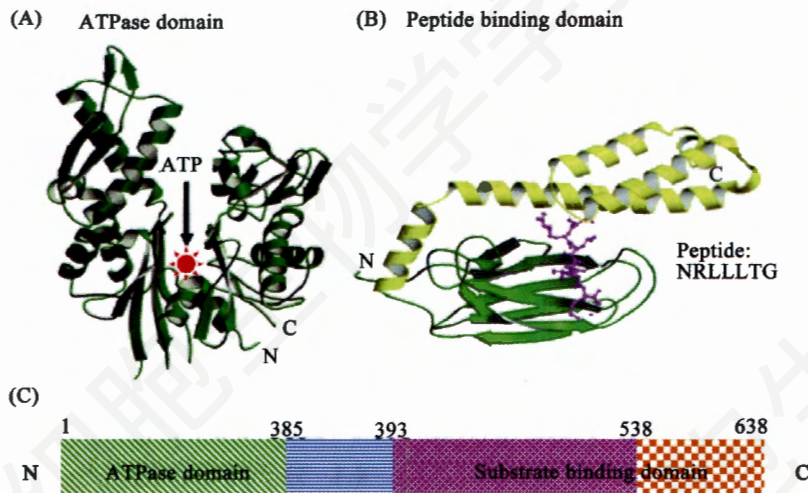


Fig.2 Structures of the ATPase domain (A) and the peptide-binding domain (B), distribution map of the structure of Hsp70 (C)

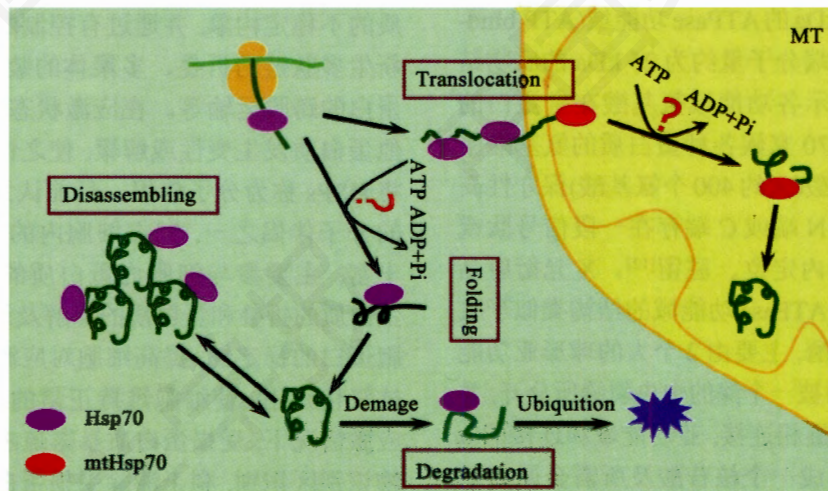


Fig.3 Illustration of the proposed roles of Hsp70 in cell  
mtHsp70: mitochondria Hsp70.

域发挥作用。此外,细胞内有很多蛋白质合成后即和 Hsp70 暂时性结合,以保证其适宜的结构状态<sup>[17]</sup>。

#### 4.2 细胞保护作用

Hsp70 的细胞保护作用是指机体细胞在受到各种应激如高热、氧化、机械损伤等刺激时,产生的 Hsp70 可以增强细胞对损害的抵抗能力以及加速异常蛋白质的降解,进而增强细胞内结构的稳定性,并维持其正常的生物学活性,提高细胞的生存率,从而起到细胞保护作用。

在应激原的作用下,细胞内产生变性或异常的蛋白质,这种应激状态下同时产生的 Hsp70 可以使蛋白质肽链重新折叠,恢复蛋白质原来的构象,并将蛋白质移位至线粒体、内质网或叶绿体内发挥作用,使细胞蛋白恢复原有的功能。

另外,Hsp70 在中枢神经系统及其他组织器官损伤中也具有一定的保护作用,研究发现缺血、创伤、氧化应激等均导致中枢神经系统内 Hsp70 的大量表达,Hsp70 被认为是损伤后脑组织产生的一种重要的内源性保护因子<sup>[18]</sup>。

研究表明,Hsp70 的细胞保护作用与结合细胞内甾体激素受体、激活蛋白激酶 C 及蛋白酶活性、ATP 水解及修复等方面有关系<sup>[19]</sup>。此外,在应激状态下,Hsp70 的表达及细胞保护作用还与细胞的生理状态有关,随着机体衰老和细胞老化,Hsp70 mRNA 和 Hsp70 的功能和表达均有所降低。试验证明,将培养细胞置于中等温度下诱导 Hsp70 表达,能避免高温应激时的细胞畸变,进一步试验证明不同类型的细胞和物种,经热诱导合成 HSPs 后能提高在高温应激下的生存率,而且,细胞或器官对热耐受力的强弱是与 Hsp70 水平高低呈正相关。

#### 4.3 Hsp70 抗细胞凋亡作用

细胞凋亡或称为程序性细胞死亡是受基因调控的一种主动性细胞自杀过程,它不仅是一种重要的生理现象,也是一种重要的病理现象,与多种疾病相关。经研究表明,Hsp70 可以对细胞凋亡信号通路的多个水平调控,起到抑制细胞凋亡的作用<sup>[20]</sup>。

HSP 的表达对热休克、氧化应激、电离射线、TNF- $\alpha$  等多种刺激因素引起的细胞凋亡有抑制作用。Buzzard 等<sup>[21]</sup>研究发现,使小鼠胚胎成纤维细胞产生的热耐受,或外源性表达的 Hsp72,能抑制热应激、TNF- $\alpha$  和酰基鞘氨醇诱导产生的细胞凋亡。Snoeckx 等<sup>[22]</sup>在研究 TNF- $\alpha$  对肝细胞的毒性时发现,NO 预处理对 TNF- $\alpha$  诱导的肝细胞凋亡有明显抑制

作用,而该作用与 NO 诱导表达 Hsp70 的水平直接有关,抑制 Hsp70 的表达将取消 NO 的作用<sup>[22]</sup>。Gordon 等<sup>[23]</sup>采用 Balb/C 小鼠的胸腺细胞和 T 淋巴细胞株实验发现,热休克预处理能诱导 Hsp70 的表达,预处理组  $\gamma$ -射线辐射(5-15GY)诱导的细胞凋亡较未预处理组明显减轻。

Hsp70 抗细胞凋亡的机制可能有以下几种:(1)保护线粒体的功能。在外界各种应激刺激下,线粒体膜的通透性发生改变,使细胞色素 c 释放入细胞质,诱导凋亡活化因子自身多聚化,形成多聚物后与 caspase-9 前体形成 apoptosome 复合物,致 caspase-9 活化,活化的 caspase-9 或 caspase-8 可进一步激活 caspase-3,形成级联放大反应,通过蛋白水解酶作用诱导细胞凋亡。HSP 能抑制线粒体释放细胞色素 c,从而抑制 caspase 途经的活化。(2)抑制应激活化蛋白激酶。最近研究表明,外部应激的信号传递伴随着两大家族激酶的激活:应激活化蛋白激酶 (SAPKs) 即 JNK 和 p38 激酶。在应激条件下,可以激活应激激酶 SAPK/JNKs,然后启动特定程序,引发细胞凋亡。HSPs 对 SAPK/JNKs 激活的抑制作用是其抗凋亡的重要机制之一。Mosser 等<sup>[24]</sup>研究发现,增加细胞 HSP72 水平能防止诱导的 SAPK/JNKs 激活,从而抑制细胞凋亡,同时也阻断 p38 激酶的激活。在粗制的细胞溶解物中加入纯的重组 HSP72 能减少 p38 激酶的激活,而加入 Hsp70 单克隆抗体以阻断 Hsp70 的作用则增加其激活。Buzzard 等<sup>[21]</sup>发现,产生热耐受的细胞能明显抑制热休克引起的 SAPK/JNKs 激活, Mosser 等<sup>[24]</sup>的研究也证实了这一点。(3)抑制凋亡激活基因 p53、Bax 的表达。一些研究表明,Hsp70 可能通过抑制 p53 而防止 p53 介导的 Bax 基因的转录激活。Gordon 等<sup>[23]</sup>发现上调 Hsp70 表达能抑制 p53 和 p53 介导的细胞凋亡,并明显减少 Bax 的表达。(4)抑制氧自由基的生成。Wong 等<sup>[25]</sup>发现,热预处理或药物(亚硝酸钠)诱导表达的 Hsp70 能明显抑制 LPS 所致的肺动脉内皮细胞凋亡,Hsp70 基因转染方法也证实了该结果。同时也发现,Hsp70 的表达能明显减少 LPS 刺激细胞产生的氧自由基,该作用可能与其抗凋亡作用有关。(5)抑制半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶。有研究表明,细胞表达的 HSP72 能防止热休克和 TNF- $\alpha$  引起的 DNA 修复关键酶 PARP 的裂解。

#### 4.4 Hsp70 免疫功能

HSP 是一种强有力的分子佐剂(亦称蛋白佐剂或免疫佐剂),在机体免疫反应中起着十分重要的作用。

研究表明<sup>[26]</sup>, Hsp70 参与免疫反应和抑制炎症反应, Hsp70 在受损细胞表面的表达可帮助免疫系统识别清除这些毒性细胞; Hsp70 亦可协助抗原提呈细胞将抗原提呈给 T 细胞而参与细胞免疫; Hsp70 又可抑制 IL-1、肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )等炎症介质的表达; 它能与肿瘤特异性多肽结合, 形成热休克蛋白-肽复合物(heat shock protein-peptide complexes, HSP-PC), 通过与抗原递呈细胞(antigen-presenting cell, APC)的表面受体结合, 可多方面活化机体特异和非特异免疫反应。

**4.4.1 具有肿瘤免疫原性 HSP** 具有肿瘤免疫原性, 是 Srivastava<sup>[27]</sup>在小鼠肿瘤移植试验中偶然发现的。他在试验中获得一系列排斥肿瘤的抗原, 分析发现这些抗原属于 HSP, 分别是 Hsp90、Hsp70 和 Hsp60, 但从正常组织中提取的 HSP 不具有免疫活性。后来证实, 所获得的抗原并非单一的 HSP, 而是 HSP 和多肽的复合物。进一步证实 HSP-多肽复合物的抗原性来自于多肽, 而非 HSP 本身, HSP 是通过参与抗原提呈而起作用的。Hsp70 可以和细胞内肿瘤抗原结合, 具有调节细胞转化的作用。p53 是一种细胞内蛋白, 是转化作用的激动剂, 大量存在于肿瘤细胞中, 感染 p53 基因和活化 ras 基因的细胞出现多形性生长。p53 在这类细胞胞浆中含量高且相对稳定, 并与 Hsp70 和一组类似于 Hsp90 的 90 kDa 蛋白结合成异低聚体, 其解离需 ATP 参与。这种 HSP-p53 复合物的形成保护 p53 不被水解, 还可能参与活化的 p53 向细胞核内的转移<sup>[28]</sup>。Hsp70 在肿瘤免疫中充当了多重角色。一方面作为“分子伴侣”参与肿瘤细胞的功能代谢, 保护肿瘤细胞免受有害因素的损害; 另一方面肿瘤细胞与机体正常细胞生长、代谢、分化的异质性, 使 HSP 成为与其相结合的肿瘤抗原多肽的靶载体, 在参与肿瘤抗原的免疫反应中充当了举足轻重的角色。

**4.4.2 HSP 可以作为肿瘤的标志物** 有许多报道证实, 肿瘤细胞中的 HSP 明显多于正常细胞, 并且不同部位的肿瘤组织中, HSP 表达的改变并不一致, 可以作为肿瘤进展的标志物。1995 年, HSP 在胃肠道肿瘤组织中的高表达被 Ehrenfried 等<sup>[29]</sup>证实, 他们发现 Hsp90、Hsp70、Hsp27 的 mRNA 表达水平与蛋白质表达水平密切相关, 并在肿瘤组织中呈高表达。2002 年, Beer 等<sup>[30]</sup>显示 Hsp70 在早期肺腺癌中过表达是一个不良预后的分子标志物。2003 年, Kanazawa 等<sup>[31]</sup>认为, 大肠癌组织对 Hsp70 和 Hsp40 表现出特殊的免疫反应性, 分别为 84% 和 14%, 与正常组织相比

较, Hsp70 和 Hsp40 在癌组织标本中过表达。Zhong 等<sup>[32]</sup>在研究非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)血清中 Hsp70 和 Hsp90 的抗体时发现, Hsp70 抗体较正常显著增高( $P=0.0002$ ), 而 Hsp90 抗体较正常没有显著差异( $P=0.11$ ), 表明 Hsp70 抗体是 NSCLC 适度的(灵敏度 0.74, 特异性 0.73)标志物。

**4.4.3 参与抗感染和自身免疫反应** 人体在正常状态下少量表达 HSPs, 其含量仅占总蛋白的 5%~10%, 而且受自身免疫调节网络的作用, 不会引起免疫应答反应。而当病原体感染机体时, 病原体相对抗体及其机体针对病原体均可合成 HSPs, 二者 HSPs 同源性高于 50%, 由此构成 HSP 在不同个体中介导抗感染免疫或自身免疫反应的基础。

Hsp70 参与抗感染免疫, 一方面, 机体通过抗原呈递细胞识别病原体抗原, 诱导 T 细胞免疫。同样, 病原体产生的 Hsp70 作为免疫原性蛋白, 与病原体连接形成免疫显性抗原, 刺激机体产生相应抗体或细胞毒性 T 淋巴细胞, 产生特异性抗感染免疫。另一方面, 病原体感染引起机体内巨噬细胞吞噬和淋巴细胞释放细胞因子 IL、TNF、IFN 等。激活 Hsp70 表达, Hsp70 增高又反馈性抑制炎症细胞因子转录, 故 Hsp70 在调控内毒素耐受、细胞因子产生及敏感性的细胞免疫上又发挥非特异性免疫效应。另外, Hsp70 对感染的发生还具有直接保护作用。

另外, Hsp70 还参与自身免疫, 机体产生的致敏 T 淋巴细胞及其抗体既识别外来抗原, 也识别自身成分, 或者病原体产生 Hsp70 与病原体形成免疫显性抗原, 均可通过“交叉反应性”共同抗原决定簇而攻击自身细胞, 导致自身免疫性疾病。如在类风湿性关节炎、系统性红斑性狼疮、胰岛素依赖性糖尿病、多发性硬化及颈动脉粥样硬化等疾病都可在患者血清中检测出高水平的 Hsp70 自身抗体。Wallin 等<sup>[33]</sup>认为自身免疫疾病产生还可能是由于病原体和机体分别产生的 HSP 作为复合抗原共同作用于抗原呈递细胞, 在产生抗感染疾病同时又诱导自身免疫疾病发生。

**4.4.4 免疫调节作用** Suzue 等<sup>[34]</sup>将鸡卵清白蛋白大片段(aa161276)融合到肺炎分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*) Hsp70 的 N 端, 纯化后免疫小鼠, 可诱导特异性 CTL 应答。研究显示 Hsp70 能激活 NK 细胞, 并促进 DC 的成熟<sup>[35]</sup>。Chen 等<sup>[36]</sup>以人乳头瘤病毒 16 (HPV16) E7 蛋白为模型抗原, 将肺炎分枝杆菌 Hsp70 基因连接到 E7 基因下游, 构建融合蛋白质粒, 基因枪接种后, 诱导产生的 CTL 应答提高了至少 30 倍。

该质粒引起的免疫应答能 100% 保护肿瘤细胞对小鼠的攻击, 并对实验室建立的小鼠肿瘤模型有较好的疗效。Hauser 等<sup>[37]</sup>将人 Hsp70 基因连接到 HPV16 E7 蛋白基因的下游, 构建成表达分泌性融合蛋白的核酸疫苗, 免疫小鼠后, 与只表达抗原基因的核酸疫苗相比, 其特异性抗体滴度及 CTL 应答水平均显著提高。

#### 4.5 Hsp70 与病毒感染和复制的关系

在病毒 DNA 的复制过程中, 除需要自身所编码蛋白质的参与外, 还要自身编码或依赖宿主细胞中如 Hsp70 (Hsc70、DnaK)、Hsp40 (DnaJ)、Hsp60 (GroEL)、Hsp90 (HtpG、Grp)、Hsp100 (C1P) 等分子伴侣的参与。Hu 等<sup>[38]</sup>证实乙型肝炎病毒 RNP 的合成需要宿主细胞的一些成分参与包括 Hsp90、p23 及 ATP 水解功能; Hu 等<sup>[39]</sup>研究表明 HBV Pol 与宿主因子如 Hsp90 复合物相互作用, 这对病毒基因组的复制及病毒粒子的装配是关键的一步。Park 等<sup>[40]</sup>报道 Hsp60 能与 HBV Pol 相互作用, 对于 HBV Pol 的成熟及活化有着重要意义。最新研究发现, Hsc70 可以介导丙型肝炎病毒(HCV)颗粒的感染和释放<sup>[41]</sup>。HSP 在病毒复制中的作用, 为抗病毒药物研究提供了一条新的思路。

Hsp70 在多数病毒感染细胞内均呈现高表达, 表明其与病毒的复制与感染有相互联系。许多 DNA 和 RNA 病毒(如 HIV、HSV、VSV、HBV、SV40、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, 例如用牛痘病毒(vaccinia virus, 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。HSP 可以刺激产生抗病毒免疫, Meng 等<sup>[42]</sup>证实由 HBV 诱导的肝细胞癌患者的肝组织中有一种病毒特异性的多肽能与 HSP 相结合, 诱导产生抗原特异性细胞毒性 T 淋巴细胞。这种病毒特异性多肽在抗肿瘤基因疫苗的研究中具有良好的应用前景。

研究发现, 一些化合物的抗病毒作用均与 Hsp70 相关, 即通过诱导宿主细胞 Hsp70 的表达产生抑制病毒复制的作用。以病毒蛋白为靶点的抗病毒药物的耐药性问题已经成为世界性难题, 这种具有新型作用机制抗病毒药物的研究开发为解决耐药性问题带来希望。目前, 虽然还没有与 Hsp70 相关的抗病毒药物上市, 但随着对 Hsp70 抑制病毒复制的分子生物学研究的不断深入, 必将有力推进相关机制抗病毒药物的研究与开发进程。

#### 4.6 Hsp70 在疾病研究上的应用

Hsp70 生物学作用和功能十分广泛, 在疾病中的作用与意义非常重大, 其中以 HSP 与肿瘤以及病毒感染的关系研究最多。随着对 HSP 研究的不断深入, HSP 在医学上的应用价值也将不断的被开发出来。近来研究表明, HSP 与获得性免疫缺陷综合征、传染性海绵状脑病、传染性疾病、心血管疾病、人类应激性疾病等有关。

在细胞内, 大多数天然蛋白质能自发形成比较稳定的天然结构, 或被配体和代谢因子稳定。蛋白质的错误折叠、聚集、沉淀影响蛋白质的正常功能, 导致一些疾病的发生。如神经退行性疾病就源于细胞内或细胞外错误折叠蛋白形成的聚集体所引起的脑损伤, 包括老年痴呆症(Alzheimer disease, AD)、帕金森氏病(Parkinson disease, PD)等。目前认为错误折叠的  $\alpha$ -synuclein 的聚集和细胞毒性在神经退行性疾病(如: 帕金森氏病和带有 Lewy 小体的痴呆 DLB)的发病过程中起到十分关键的作用<sup>[43]</sup>。Hsp70 可以在体内和体外减少错误折叠和聚集的  $\alpha$ -synuclein 的种类, 并使机体免受  $\alpha$ -synuclein 依赖性毒性作用的损害。另外, 在脑缺血和心肌缺血再灌注中, 虽然大部分蛋白质的合成受到抑制, 但是诱导性 Hsp70 水平却大量提高, Hsp70 在脑缺血早期对神经细胞有保护作用, 缺血后期对细胞的修复起到重要作用。

Hsp70-肽疫苗在传染性疾病中的研究越来越受到重视, 主要集中在病毒性疾病方面, 如乙型肝炎、艾滋病、流感等。乙型肝炎病毒特异性的 CTL 对于控制病毒感染、治疗乙肝及乙肝继发性肝癌具有决定性作用, 而 Hsp70-肽疫苗能有效激活 CTL, 这为乙肝的防治开辟了新思路。Hsp70-肽疫苗, 激发的主要是以 CTL 为主的细胞免疫, 可以作为治疗性疫苗, 这是与普通疫苗的最大区别。Hsp70-肽疫苗作为一类新型的治疗性疫苗, 为这些疾病的防治提供了新的思路, 带来新的希望。

另外, Hsp70 也可以用于核酸疫苗。核酸疫苗作为第 3 代疫苗, 受到研究人员越来越多的重视。但核酸疫苗的主要缺陷是免疫效率有限, 为了增强核酸疫苗的功效, 已经出现了很多的免疫策略, 如将抗原与细胞因子或免疫增强因子进行重组等。Hsp70 具有抗原载体作用和免疫佐剂作用, 能增强与之结合的抗原的抗原性, 成为重组核酸疫苗理想的免疫增强因子。

## 5 小结

Hsp70 是广泛存在于生物界的进化上高度保守

的一组蛋白质,其编码基因也具有高度保守性,它的表达既参与细胞的正常生理过程,又是细胞对外环境变化或刺激所作出的应答或防御反应。Hsp70在疾病的辅助诊断、肿瘤、病毒性感染、自身免疫病及心脏病的诊治等方面的作用,为临床多种疾病的治疗带来了新的思路和方法。

自从Hsp70被发现以来,人们已对其结构、功能和基因转录调控等方面有了比较深入的认识,由于其独特的生物学特性及功能,在生物体内广泛地参与了多种复杂的功能活动,已成为分子生物学的一大热点,并逐渐变为临床多种疾病治疗的新途径。可以预见,随着生物技术的不断发展,人们必将对Hsp70家族成员有更深入的认识,将为认识、诊断和治疗多种疾病带来新的思路,并能开发出以它们为作用靶的全新药物。Hsp70及其相关药物必将得到广泛的应用,为人类征服多种疾病做出贡献。

#### 参考文献(References)

- Lindquist S, Craig EA. The heat shock protein. *Annu Rev Genet* 1988; 22: 631-77.
- Ritossa F. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 1962; 18: 571-3.
- Tissières A, Mitchell HK, Tracy UM. Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. *J Mol Biol* 1974; 84(3): 389-98.
- Nover L. *Heat Shock Response of Eukaryotic Cells*. Berlin: Springer Verlag, 1984, 82: 2723-6.
- Sorger PK, Lewis MJ. Heat shock factor is regulated differently in yeast and HeLa cells. *Nature* 1987; 329(6134): 81-4.
- Buckiova D, Jelínek R. Heat shock proteins and teratogenesis. *Reprod Toxicol* 1995; 9(6): 501-11.
- Velazquez JM, Lindquist S. Hsp70: nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* 1984; 36(3): 655-62.
- Flynn GC, Chappell TG, Rothman JE. Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 1989; 245(4916): 385-90.
- Mestriil R, Chi SH, Sayen MR, Dillmann WH. Isolation of a novel inducible rat heat-shock protein (HSP70) gene and its expression during ischaemia/hypoxia and heat shock. *Biochem J* 1994; 298(Pt 3): 561-9.
- Morimoto RI. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science* 1993; 259(5100): 1409-10.
- Munro S, Pelham H. What turns on heat shock genes? *Nature* 1985; 317(6037): 477-8.
- Munro S, Phelham HR. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78kd glucose-regulated protein and immunoglobulin heavy chain binding protein. *Cell* 1986; 46(2): 291-300.
- Flaherty KM, DeLuca-Flaherty C, McKay DB. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature* 1990; 346(6285): 623-8.
- Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, *et al*. Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone Dank. *Science* 1996; 272(5268): 1606-14.
- Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA, Pfanner N. Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 1990; 348(6297): 137-43.
- Nelson RJ, Ziegelhoffer T, Nicolet C, Werner-Washburne M, Craig EA. The translation machinery and 70 kd heat shock protein cooperate in protein synthesis. *Cell* 1992; 71(1): 97-105.
- Beckmann RP, Mizzen LE, Welch WJ. Interaction of Hsp70 with newly synthesized proteins: implications for protein folding and assembly. *Science* 1990; 248(4957): 850-4.
- Franklin TB, Krueger-Naug AM, Clarke DB, Arrigo AP, Currie RW. The role of heat shock proteins HSP 70 and Hsp27 in cellular protection of the central nervous system. *Int J Hyperthermia* 2005; 21(5): 379-92.
- Binder RJ, Blachere NE, Srivastava PK. Heat shock protein-chaperoned peptides but not free peptides introduced into the cytosol are presented efficiently by major histocompatibility complex I molecules. *J Biol Chem* 2001; 276 (20): 17163-71.
- Parcellier A, Gurbuxani S, Schmitt E, Solary E, Garrido C. Heat shock proteins, cellular chaperones that modulate mitochondrial cell death pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304(3): 505-12.
- Buzzard KA, Giaccia AJ, Killender M, Anderson RL. Heat shock protein 72 modulates pathways of stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1998; 273 (27): 17147-53.
- Snoeckx LH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, Van Der Vusse GJ. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 2001; 81(4): 1461-97.
- Gordon SA, Hoffman RA, Simmons RL, Ford HR. Induction of heat shock protein 70 protects thymocytes against radiation-induced apoptosis. *Arch Surg* 1997; 132(12): 1277-82.
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol* 1997; 17(9): 5317-27.
- Wong HR, Mannix RJ, Rusnak JM, Boota A, Zar H, Watkins SC, *et al*. The heat-shock response attenuates lipopolysaccharide-mediated apoptosis in cultured sheep pulmonary artery endothelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996; 15(6): 745-51.
- Moseley PL. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 856: 206-13.
- Srivastava PK. Immunotherapy of human cancer: lessons from mice. *Nat Immunol* 2000; 1(5): 363-6.
- Selkirk JK, He C, Patterson RM, Merrick BA. Tumor suppressor p53 gene forms multiple isoforms: evidence for single locus origin and cytoplasmic complex formation with heat shock proteins. *Electrophoresis* 1996; 17(11): 1764-71.
- Ehrenfried JA, Herron BE, Townsend CM Jr, Evers BM. Heat shock proteins are differentially expressed in human gastrointestinal cancers. *Surg Oncol* 1995; 4(4): 197-203.
- Beer DG, Kardia SL, Huang CC, Giordano TJ, Levin AM, Misek DE, *et al*. Gene-expression profiles predict survival of patients



- with lung adenocarcinoma. *Nat Med* 2002; 8(8): 816-24.
- 31 Kanazawa Y, Isomoto H, Oka M, Yano Y, Soda H, Shikuwa S, *et al.* Expression of heat shock protein (Hsp) 70 and Hsp 40 in colorectal cancer. *Med Oncol* 2003; 20(2): 157-64.
- 32 Zhong L, Peng X, Hidalgo GE, Doherty DE, Stromberg AJ. Antibodies to Hsp70 and Hsp90 in serum in non- small cell lung cancer patients. *Cancer Detect Prev* 2003; 27(4): 285-90.
- 33 Wallin RP, Lundqvist A, Moré SH, von Bonin A, Kiessling R, Ljunggren HG. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 2002; 23(3): 130-5.
- 34 Suzue K, Zhou XZ, Eisen HN, Young RA. Heat shock fusion proteins as vehicles for antigen delivery into the major histocompatibility complex I presentation way. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94(24): 13146-51.
- 35 Banchereau J, Steinmann RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673): 245-52.
- 36 Chen CH, Wang TL, Hung CF, Yang Y, Young RA, Pardoll DM, *et al.* Enhancement of DNA vaccine potency by linkage of antigen gene to an Hsp70 gene. *Cancer Res* 2000; 60(4): 1035-42.
- 37 Hauser H, Chen SY. Augmentation of DNA vaccine potency through secretory heat shock protein-mediated antigen targeting. *Methods* 2003; 31(3): 225-31.
- 38 Hu J, Anselmo D. *In vitro* reconstitution of a functional duck hepatitis B virus reverse transcriptase: posttranslational activation by Hsp90. *J Virol* 2000; 74(24): 11447-55.
- 39 Hu J, Toft DO, Seeger C. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J* 1997; 16(1): 69-78.
- 40 Park SG, Jung G. Human hepatitis B virus polymerase interacts with the molecular haperonin Hsp60. *J Virol* 2001; 75(15): 6962- 68.
- 41 Parent R, Qu X, Petit MA, Beretta L. The heat shock cognate protein 70 is associated with hepatitis C virus particles and modulates virus infectivity. *Hepatology* 2009; 49(6): 1798-809.
- 42 Meng SD, Gao T, Gao GF, Tien P. HBV-specific peptide associated with heat shock protein gp96. *Lancet* 2001; 357(9255): 528-9.
- 43 Goedert M. Alpha-synuclein and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2001; 2(7): 492-501.

## The Structure and Function of Heat Shock Protein 70

Yu-Ping Wang, Jian-Dong Jiang\*

(Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**Abstract** Heat shock protein 70 (HSP70) is an evolutionarily highly conserved protein, with a variety of biological functions, including the molecular chaperone function, cell protection and anti-apoptosis function, involved in immune-regulation, and playing an important role in the study of viral infections and diseases. This article is reviewed focused on the structure and function of HSP70 progress.

**Key words** heat shock protein 70; molecular chaperone; biological function

Received: June 11, 2009 Accepted: March 1, 2010

\*Corresponding author. Tel: 86-10-63170236, Fax: 86-10-63010984, E-mail: wyping0317@163.com