

内质网应激诱导细胞凋亡机制的研究进展

杨方万 穆茂媛 肖娟娟 林世德

摘要 内质网应激在多种疾病的发病机制中起到关键作用,持续或强烈的内质网应激反应可诱导细胞凋亡,然而对内质网应激诱导细胞凋亡的机制尚不清楚。近几年的研究发现未折叠蛋白反应(unfolded protein response,UPR)通路既可促进细胞生存又可诱导细胞凋亡,与UPR的多条通路对蛋白翻译、过氧化物质产生、Bcl-2蛋白表达、钙离子浓度、microRNA表达及JNK通路等的精确调节有关。

关键词 内质网应激 细胞凋亡 需肌醇酶1 蛋白激酶R样内质网激酶 活化转录因子-6

[中图分类号] R4 R5 [文献标识码] A

内质网(endoplasmic reticulum,ER)是哺乳动物细胞内相对比较敏感的膜性细胞器,是细胞内蛋白质、脂类及糖类合成及修饰的重要场所。内质网还通过对钙的贮存与释放参与细胞内钙离子浓度的调节^[1]。当各种生理病理因素造成内质网稳态失衡,使内质网腔内未折叠蛋白、错误折叠蛋白增加或钙离子浓度改变时,可诱导内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ER stress)^[2]。内质网应激激活内质网应激反应或未折叠蛋白反应(unfolded protein response,UPR)。UPR最终通过减少新生蛋白的合成、促进未折叠蛋白折叠及增加未折叠蛋白的降解减轻内质网压力,恢复内质网稳态^[3]。当内质网应激过于强烈或持续时间过长,内质网稳态不能恢复时,UPR可激活细胞内凋亡信号诱导细胞凋亡。目前为止,细胞凋亡通路主要有死亡受体活化(外源性途径)途径、线粒体损伤途径(内源性途径)和内质网应激诱导的凋亡途径。近几年的研究结果发现,通过内质网应激途径诱导细胞凋亡在多种疾病的发病机制中占有重要地位,对内质网应激诱导细胞凋亡的机制进行了广泛、深入的研究,取得了一些进展,现综述如下^[4]。

一、内质网应激反应信号通路

存在于哺乳动物细胞内质网上感受并传递UPR信号的3个跨膜感应蛋白分别是肌醇酶1(inositol requiring enzyme-1,IRE-1)、活化转录因子-6(activating transcription factor-6,ATF-6)和蛋白激酶R

样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase,PERK)^[2]。当内质网保持稳态时,ATF-6、PERK的N端与葡萄糖调节蛋白78(glucose regulating protein 78,GRP78)结合而处于无活性状态,当内质网处于应激状态时,大量未折叠或错误折叠蛋白堆积于内质网腔中,GRP78与ATF-6及PERK感应蛋白解离,转而与未折叠蛋白质结合^[5]。IRE-1的激活方式尚不清楚,有研究表明未折叠蛋白可以直接激活IRE-1。激活后的IRE-1、PERK、ATF-6分别激活下游信号的传递及相关基因的表达,统称UPR^[6]。

二、内质网应激介导细胞凋亡的特征

迄今的研究表明在多数细胞株内质网应激主要是通过内源性凋亡途径(线粒体途径)诱导细胞凋亡。内源性凋亡途径是由钙离子进入线粒体后导致线粒体膜电位改变、细胞色素C外漏、激活人凋亡蛋白酶活化因子1(apoptosis protease-activating factor 1,Apaf-1),最后激活caspases而实现的。然而敲除Apaf-1的小鼠对内质网应激诱导的细胞凋亡仍然敏感,提示内质网应激介导细胞凋亡还可能在线粒体外的途径。

在线粒体途径诱导的细胞凋亡中,起始caspase的激活起到至关重要的作用,但迄今尚未明确在内质网应激介导的细胞凋亡过程中起主导作用的起始caspase。观察到不同内质网应激反应诱导细胞凋亡的模型中有多种caspases被激活,包括caspase-12, caspase-2, caspase-3, caspase-4, caspase-6, caspase-7, caspase-8及caspase-9。因caspase-12位于内质网腔内,曾被认为是内质网应激介导细胞凋亡的起始caspase,在后来的研究中发现caspase-12虽然表达于多数哺乳动物细胞中,但在人类除

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160067/H0318)

作者单位:563000 贵州,遵义医学院研究生院(杨方万、穆茂媛、肖娟娟);563000 贵州,遵义医学院附属医院(林世德)

通讯作者:林世德,电子信箱:Linshide6@hotmail.com

少数非洲人种外, caspase - 12 由于进化过程中发生的变异而处于无活性状态^[7,8]。虽然有研究发现敲除 caspase - 12 基因的小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblasts, MEFs) 对内质网应激诱导的细胞凋亡具有明显的抵抗性,但在随后的研究中这一现象没有得到证实^[9]。另外, caspase - 12 如何激活其下游通路尚不清楚,所以尚不能肯定 caspase - 12 是内质网应激介导细胞凋亡的起始 caspase。

Caspase - 4 被认为是人类具有 caspase - 12 的功能的起始 caspase,但随后的研究发现敲除 caspase 4 基因的细胞对内质网应激诱导的细胞凋亡同样敏感^[10]。还有研究发现 caspase - 2 是内质网应激诱导细胞凋亡的关键 caspase,通过进一步水解 Bid、经线粒体途径诱导细胞凋亡,但结果尚有待进一步证实^[11]。

三、内质网应激介导细胞凋亡通路

1. 通过 PERK 信号通路诱导细胞凋亡: 见图 1。PERK 是内质网上的跨膜感受蛋白,内质网发生应激时,PERK 磷酸化并催化底物真核起始因子 2 α (eukaryotic initiation factor 2 α , eIF2 α) 的 51 位丝氨酸发生磷酸化。eIF2 α 磷酸化后一方面可抑制蛋白质的翻译和合成,减轻内质网压力;另一方面可选择性的

促进活化转录因子 - 4 (activating transcription factor - 4, ATF - 4) 的翻译,增加伴侣分子的合成,上调与氨基酸代谢、氧化应激及蛋白分泌相关的基因表达而促进细胞生存^[12]。ATF - 4 还可激活 CHOP (C/EBP homology protein) 及 GADD34 (growth arrest and DNA damage inducible 34) 的表达, GADD34 可促进 eIF2 α 脱磷酸化,恢复内质网蛋白合成^[13]。PERK 通路既是细胞一条重要的自我保护通路,又是诱导细胞凋亡的重要途径,在持续内质网应激时可诱导细胞凋亡。这种由自我保护向凋亡转换的机制尚不清楚,多数研究表明 PERK 通路激活 ATF - 4、CHOP 及 GADD34 在细胞凋亡中起到重要作用。通过 PERK 通路抑制蛋白合成有利于减轻内质网压力,恢复内质网稳态,敲除 PERK 的小鼠纤维母细胞在内质网应激时细胞凋亡明显增加。放线菌酮 (cycloheximide) 抑制蛋白合成后细胞凋亡明显减少^[13]。还发现 GADD34 通过促进蛋白合成增加氧自由基产生促进细胞凋亡, GADD34 抑制剂可以降低蛋白合成并阻止细胞凋亡^[14],证实了抑制细胞新生蛋白的合成对细胞生存的重要性。

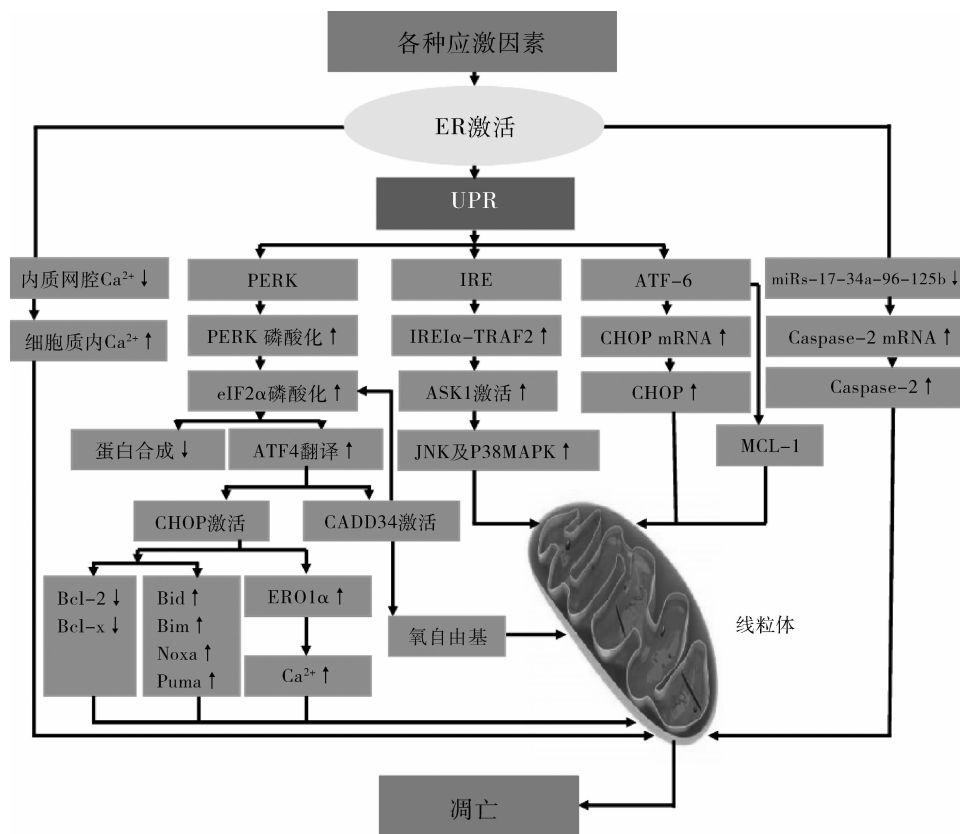


图 1 内质网应激反应诱导细胞凋亡信号通路

目前认为 PERK 通路诱导细胞凋亡的途径之一是通过增加 CHOP 的表达。在非内质网应激状态下, CHOP 通常表达水平较低, 发生内质网应激后, UPR 的 3 条信号通路均可诱导 CHOP 的表达, 但 PERK 及 ATF-4 是诱导 CHOP 表达的主要通路。

CHOP 如何诱导细胞凋亡的机制尚不清楚, 迄今的研究多集中在其对 Bcl-2 蛋白家族的调节上, 发现内质网应激一方面减少抗凋亡蛋白 (Bcl-2、Bcl-xl) 的表达, 另一方面增加促凋亡蛋白 (Bid、Bim、Noxa、Puma) 的表达, 最终激活细胞线粒体凋亡途径^[15]。研究还发现内质网应激通路可通过不同的方式增加促凋亡蛋白的表达, 如通过蛋白水解的方式增加 Bid 表达, 通过增加基因转录的方式增加 Bim 表达^[16]。敲除以上 4 种促凋亡蛋白基因的细胞对内质网应激诱导的凋亡只具有一定的抵抗作用, 但是敲除他们共同的下游基因 Bax 或 Bak 后对内质网应激诱导的细胞凋亡的抵抗性明显增加, 提示 Bax 或 Bak 是内质网应激诱导凋亡途径的关键分子^[17]。另外, 同时敲除 Bim 和 Puma 比单独敲除 Bim 或 Puma 对内质网应激诱导的细胞凋亡更具抵抗性, 提示内质网应激诱导的细胞凋亡需要几种 Bcl-2 蛋白的共同参与^[18]。

目前对内质网应激通路调节 Bcl-2 蛋白表达的机制尚缺乏详细的了解。另外, 也不知道是否不同诱导的内质网应激诱导不同的 Bcl-2 蛋白表达, 今后对以上问题的深入研究将有助于阐明内质网应激介导细胞凋亡的机制。CHOP 诱导细胞凋亡的另一个机制是通过对内质网氧化还原状态的调节。研究发现 CHOP 过度表达可以耗竭谷胱甘肽并通过诱导内质网氧化酶 1 α (ERO1 α) 增加过氧化物的产生^[19]。另外还发现 CHOP 诱导的内质网氧化物蛋白 ERO1 α 可激活 1,4,5-三磷酸肌醇受体 (Ino-sitol1,4,5-trisphosphate receptor, IP3R), 导致钙离子从内质网排出, 细胞质内钙离子浓度增加线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, PTP) 而诱导细胞凋亡^[20]。虽然有大量的证据表明 PERK 及 CHOP 在内质网应激诱导的细胞凋亡过程中起到重要作用, 但敲除 PERK 及 CHOP 的细胞并不能阻止细胞凋亡, 提示 PERK 及 CHOP 信号并不是内质网应激诱导细胞凋亡的唯一通路。

2. 通过 IRE 信号通路调节细胞凋亡: IRE1 α 是一种跨膜蛋白, 由 1 个位于内质网腔内 N-端感受域一个跨膜域及 1 个位于细胞质内的 C-端效应域组成。

其中 C-端效应域具有内切核糖核酸酶及蛋白激酶活性。未折叠蛋白在内质网腔内积聚刺激 IRE1 α 跨膜域寡聚化及位于细胞质的 C-端效应域自身磷酸化。活化的 IRE1 α 在哺乳动物中剪切 X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP-1) mRNA, 另外, IRE1 α 通过降解自身 RNA 对其自身表达也有调节作用。生理状态下, XBP-1 蛋白与 UPR 及 ERAD (ER-assisted degradation) 基因的促进子结合促进内质网稳态, 具有保护细胞、避免凋亡的作用。

近几年的研究发现, 活化的 IRE1 α 可与肿瘤坏死因子受体相关因子-2 (TNF-receptor associated factor 2, TRAF2) 相互作用形成 IRE1 α -TRAF2 复合物, IRE1 α -TRAF2 复合物可激活 TNF- α 依赖性的细胞凋亡信号 1 (TNF-dependent apoptosis-signaling kinase1, ASK1), ASK1 进一步激活 JNK 及 p38 丝裂素活化蛋白激酶 (p38-mitogen activated protein kinase, P38MAPK) 诱导细胞凋亡。p38MAPK 磷酸化后可激活转录因子 CHOP, 通过增加 Bim 及死亡受体 5 (DR5) 基因表达、降低 Bcl-2 基因表达促进细胞凋亡。另外, IRE1 α 还可以通过 microRNAs 来调控 caspases 的表达。

除通过剪切 XBP-1 发挥作用外, IRE1 α 具有内切核糖核酸酶的作用, 可通过 RIDD (regulated IRE1 α -dependent decay) 通路降解一系列 mRNA。既往一直认为 RIDD 是 UPR 的一个重要组成部分, 具有保护细胞的作用。近年来发现 RIDD 也有促进细胞凋亡的作用, 其机制是通过 RIDD 引起内质网伴侣分子 (Bip/GRP78) mRNA 的降解、减少伴侣分子的表达。最近有研究发现通过抑制 RIDD 可部分阻止内质网应激诱导细胞凋亡。在另外的研究中发现抑制 IRE1 α 的内切核糖核酸酶并不能阻止细胞凋亡^[21]。提示内质网应激时 IRE1 α 的内切核糖核酸酶具有两种相反的作用, 通过剪切 XBP-1 可促进细胞生存, 而持续内质网应激诱导的 RIDD 促进细胞凋亡, 这种转换可能与应激强度及应激持续时间有关。提示 IRE1 α 不同的酶活性的选择性激活可激活不同的下游信号, 对细胞凋亡具有重要的调节作用。

3. 通过 ATF-6 信号通路介导细胞凋亡: ATF-6 在真核细胞内质网膜上的跨膜蛋白。ATF-6 有两个等位基因: ATF-6 α 和 ATF-6 β 。ATF-6 α 和 ATF-6 β 均为 II 型跨膜蛋白。一般生理情况下, ATF-6 位于内质网膜, 内质网应激时 ATF-6 可进入高尔基体, 结合 UPR 靶基因启动子区的内质网应激反应元

件而诱导内质网应激蛋白,包括 GRP78,GRP94 及 Ca^{2+} -ATP 酶等。这些内质网应激蛋白有助于内质网应激的恢复,通过修复内质网钙离子转运,清除活性氧等功能促进细胞生存。通常认为 ATF-6 在内质网应激时仅仅传递生存信号,但近年来发现 ATF-6 的过度表达也可诱导 CHOP mRNA 表达,ATF-6 突变可阻断内质网应激诱导的 CHOP 表达。最近还发现 ATF-6 通过下调抗凋亡分子蛋白 MCL-1 而增加细胞凋亡。

4. 通过 microRNAs 介导细胞凋亡:近年来发现 microRNAs(miRNAs)在内质网应激诱导的细胞凋亡中起到重要作用。miRNAs 是一类由内源基因编码的长度约为 22 个核苷酸的非编码单链 RNA 分子,它们在动植物中参与转录后基因表达调控。有研究表明内质网应激信号通过诱导 CHOP 表达调控 miRNA-708 表达,而 miRNA-708 可作用于视紫红质 mRNA 抑制其蛋白合成。PERK 诱导 miRNA-30c-2*,对内质网应激 XBP-1 通路具有直接抑制作用。另外,还发现肝癌细胞 miRNA-214、miRNA-199a-3p 及 miRNA-199a-5p 减少对细胞凋亡有直接影响。近来的研究还提示 miRNA-199a-5p 直接抑制 IRE1 α 、ATF-6 及 GRP78 的表达,阻止肝细胞凋亡。最近的研究提示内质网应激通过 IRE1 α 通路激活内质网跨膜核酸内切酶激酶(RNase),持续的 RNase 激活将迅速降解 miRNAs-17-34a-96-125b,解除对 caspase-2 mRNA 转录的抑制,增加 caspase-2 表达而诱导细胞凋亡。还有研究证明 miRNA-106b-25 可通过促凋亡 Bcl-2 蛋白调节内质网应激诱导的细胞凋亡。内质网应激时 miRNA-106b-25 族的表达受到 ATF-4 的抑制,结果导致 Bim 增加,增加细胞凋亡。另外的研究还发现 miRNA-23a~27a~24-2 族可通过增加 CHOP 的表达促进细胞凋亡,PERK 通过 ATF-4 诱导 miRNA-211 表达,miRNA-211 抑制内质网应激诱导的 CHOP 表达。以上研究表明 miRNAs 在内质网应激诱导的细胞凋亡途径中起到重要的调节作用。

5. 通过钙离子信号介导细胞凋亡:内质网腔内高浓度的钙离子及氧化环境是保证蛋白正确折叠的重要因素。内质网内的伴侣分子对钙离子具有强大的结合能力,但对其亲和力较低,因而可起到钙离子缓冲剂的作用。内质网钙离子浓度降低可以降低伴侣分子的活性而诱导内质网应激反应。内质网钙离子浓度与应激状态下细胞多种生理、病理反应及信号传

递过程有关,如内质网钙离子大量排出可以诱导多种细胞凋亡信号,最终通过线粒体途径诱导细胞凋亡。相反,阻止内质网及线粒体钙离子排出可以促进氧化磷酸化,维持细胞内 ATP 水平,促进细胞生存。促凋亡蛋白 Bax 及 Bak 主要是通过调控内质网及线粒体钙离子浓度来调节细胞凋亡的,Bax 及 Bak 表达增加可促进内质网钙离子释放,增加线粒体钙离子浓度,促进细胞色素 C 释放,诱导细胞凋亡;敲除 Bax 及 Bak 的细胞可以明显减少钙离子释放而阻止细胞凋亡。另外,钙网织蛋白(calreticulin)既是结合钙离子的伴侣分子也是新生蛋白结合的关键成分,内质网内钙离子浓度的波动会严重损伤内质网内蛋白的折叠能力,诱导细胞凋亡。敲除钙网织蛋白的纤维母细胞维持内质网钙离子浓度的能力下降,细胞会发生凋亡。以上研究表明钙离子信号在内质网应激介导的细胞凋亡过程中起到重要的作用(图 1)。

综上所述,UPR 通路既可促进细胞生存又可诱导细胞凋亡,从促生存向促凋亡转换的机制目前尚不清楚。PERK 下游通路通过调节蛋白翻译、自由氧产生、Bcl-2 蛋白表达及钙离子浓度等作用可能是内质网应激诱导细胞凋亡的重要途径。IRE1 α 通路通过对 XBP-1 mRNA 剪切、RIDD 通路、miRNA 的表达、激活 JNK 等通路同样具有促凋亡及抗凋亡作用。任何一条通路的敲除都不能完全阻断内质网应激诱导的细胞凋亡,提示内质网应激诱导的细胞凋亡存在复杂的相互作用。今后通过深入研究内质网应激诱导细胞凋亡的机制有助于阐明相关疾病的发病机制、探索新的治疗方法。

参考文献

- 1 Braakman I, Bulleid NJ. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum [J]. Annual Review of Biochemistry, 2011, 80(1): 71-99
- 2 Kapoor A, Sanyal AJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response [J]. Clinics in Liver Disease, 2009, 13(4): 581-590
- 3 Kawaguchi S, Ng DTW. Sensing ER stress [J]. Science, 2011, 333(6051): 1830-1831
- 4 Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease [J]. J Cell Biol, 2012, 197(7): 857-867
- 5 Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation [J]. Science, 2011, 334(6059): 1081-1086
- 6 Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, et al. The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α [J]. Physiol Rev, 2011, 91(4): 1219-1243
- 7 Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endo-

- plasmic – reticulum – specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid – beta[J]. *Nature*, 2000,403(6765):98 – 103
- 8 Fischer H, Koenig U, Eckhart L, *et al.* Human caspase 12 has acquired deleterious mutations [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002,293(2):722 – 726
- 9 Saleh M, Mathison JC, Wolinski MK, *et al.* Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase – 12 – deficient mice [J]. *Nature*, 2006,440(7087):1064 – 1068
- 10 Obeng EA, Boise LH. Caspase – 12 and caspase – 4 are not required for caspase – dependent endoplasmic reticulum stress – induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 2005,280(33):29578 – 29587
- 11 Cheung HH, Lynn Kelly N, Liston P, *et al.* Involvement of caspase – 2 and caspase – 9 in endoplasmic reticulum stress – induced apoptosis: a role for the IAPs[J]. *Exp Cell Res*, 2006,312(12):2347 – 2357
- 12 Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012,13(2):89 – 102
- 13 Harding HP, Novoa I, Zhang Y, *et al.* Regulated translation initiation controls stress – induced gene expression in mammalian cells[J]. *Mol Cell*, 2000,6(5):1099 – 1108
- 14 Han J, Back SH, Hur J, *et al.* ER – stress – induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death [J]. *Nat Cell Biol*, 2013,15(5):481 – 90
- 15 Szegezdi E, MacDonald DC, Nl' CTo, *et al.* Bcl – 2 family on guard at the ER[J]. *American Journal of Physiology – Cell Physiology*, 2009, 296(5):C941 – C953
- 16 Rodriguez DA, Zamorano S, Lisbona F, *et al.* BH3 – only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signalling of the unfolded protein response sensor IRE1alpha [J]. *EMBO J*, 2012,31(10):2322 – 2335
- 17 Wei MC, Zong WX, Cheng EH, *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death[J]. *Science*, 2001,292(5517):727 – 730
- 18 Kim H, Tu HC, Ren D, *et al.* Stepwise activation of BAX and BAK by tBID, BIM, and PUMA initiates mitochondrial apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2009,36(3):487 – 499
- 19 McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, *et al.* Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down – regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state[J]. *Mol Cell Biol*, 2001,21(4):1249 – 1259
- 20 Li G, Mongillo M, Chin KT, *et al.* Role of ERO1 – alpha – mediated stimulation of inositol 1,4,5 – triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress – induced apoptosis[J]. *J Cell Biol*, 2009, 186(6):783 – 792
- 21 Cross BC, Bond PJ, Sadowski PG, *et al.* The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1 – binding small molecule[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012,109(15):E869 – 878

(收稿日期:2014 – 04 – 22)

(修回日期:2014 – 04 – 30)

microRNA: 缺氧诱导的血管重塑中的重要调控因子

许 多 易 斌 鲁开智

[中图分类号] R3 [文献标识码] A

缺氧诱导的血管重塑(hypoxia – induced vascular remodeling)是多种心血管疾病发生与发展的病理基础。microRNA 是一类长度约 21 ~ 23 个核苷酸的单链非编码 RNA,其通过与特定 mRNA 靶点 3'非编码区相互作用来调控基因表达。microRNA 在细胞增殖、凋亡、分化、血管生成等多个生物学方面都发挥重要作用。近来研究表明,microRNA 参与调控缺氧诱导的血管重塑,本文就 microRNA 在缺氧诱导的血管重塑中的研究进展做一综述。

一、microRNA 的生物起源及其作用机制

自从 1993 年 Lee 等^[1]在秀丽新小杆线虫(*caenorhabditis elegans*)中发现了第 1 个 miRNA(lin – 4)以来,大量 miRNA 相继被发现。miRNA 是细胞核内某些前体 mRNA 的酶切产物,而并非其相应基因直接转录的产物;其通过与特定 mRNA 靶点的 3'非编码区相互作用来调控基因表达^[2,3]。研究表明 miRNA 的功能失调在多种血管性疾病的发生和发展中发挥极其重要的作用,并阐述了参与触发 miRNA 表达失调的因素如缺氧诱导因子(HIF)、内皮素 – 1(ET – 1)、血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)等。

二、microRNA 在血管发育中的作用

胚胎发育过程中敲除 Dicer 的大鼠出现了严重的血管发育缺陷,深入研究发现异常表达的 miRNA 通过影响血管内皮细胞(ECs)、平滑肌细胞(VSMC)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81170053,81170414)

作者单位:430038 重庆,第三军医大学第一附属医院手术麻醉科

通讯作者:鲁开智,主任医师,电子信箱:lukaizhi2010@163.com