

[文章编号] 1000-4718(2008)01-0201-05

内质网应激介导神经变性疾病错折叠蛋白的神经毒性*

高俊鹏^{1,2}, 蔡定芳^{1,2△}(复旦大学¹附属中山医院,²中西医结合研究所神经病学研究室,上海 200032)

Endoplasmic reticulum stress mediates the neurotoxic effect of misfolded proteins in neurodegenerative diseases

GAO Jun-peng^{1,2}, CAI Ding-fang^{1,2△}

(¹Zhongshan Hospital, ²Unit for Neurology, Department of Integrative Medicine, Fudan University, Shanghai 200032, China. E-mail: dingfangcai@163.com)

【A Review】 Endoplasmic reticulum (ER) stress can be caused by disturbances in the function of the ER with the accumulation of misfolded proteins. The ER response is characterized by unfolded protein response (UPR) causing translational attenuation, induction of ER chaperones and degradation of misfolded proteins. In case of prolonged or aggravated ER stress, cellular signals leading to apoptosis are activated. ER stress has been suggested to be involved in human neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and amyotrophic lateral sclerosis, as well as other disorders. Here we will discuss the neurotoxic effect of ER stress in these three major neurodegenerative diseases, and highlight current knowledge in this field that may reveal novel insight into disease mechanisms and help to design better therapies for these disorders.

【关键词】 内质网; 蛋白质折叠; 神经变性疾病

【KEY WORDS】 Endoplasmic reticulum; Protein folding; Neurodegenerative diseases

【中图分类号】 R363

【文献标识码】 A

神经变性疾病 (neurodegenerative diseases, NDD) 的共同病变基础是细胞内的蛋白处理机制失效而出现错折叠蛋白的集聚并产生神经毒性^[1]。环境毒素作用、氧化损伤、线粒体功能失常、胞内 Ca²⁺ 失衡等因素均可能与 NDD 的发病有关^[2]。但面对错折叠蛋白, 细胞必然通过内质网启动未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR), 这就提示我们内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ER stress) 可能在 NDD 发病过程中起关键作用。近期研究表明, 内质网应激广泛存在于各种 NDD 中, 并介导错折叠蛋白产生神经毒性及细胞凋亡作用。这里我们主要对内质网应激在发病率最高的 3 种 NDD 中所起的作用加以阐述, 以期对未来 NDD 的研究及治疗提供切实可行的思路。

1 内质网应激

内质网 (ER) 是帮助细胞内蛋白进行翻译后加工修饰, 正确折叠, 及转运新生蛋白的重要细胞器。ER 还与其它细胞器配合, 共同完成蛋白转运, 并维持细胞内的平衡状态。一旦细胞内的平衡被破坏, 便发生错折叠蛋白在 ER 的积聚, Ca²⁺ 从 ER 内异常外流, 蛋白的糖基化作用被抑制, 以及 ER 与高尔基体之间的蛋白转运被阻断, 这些情况称为内质网应激^[3], 主要表现为 UPR 的启动和内质网相关降解 (ER associated degradation, ERAD) 途径的激活。其中 UPR 途径主要由 IRE1、PERK、ATF6 3 种感受元件介导, 它们均为 ER 的跨膜蛋白, 当有错折叠蛋白在内质网中增多时, 内质网中校正错折叠蛋白的主要分子伴侣免疫球蛋白结合蛋白 (immunoglobulin bind-

[收稿日期] 2006-04-12

[修回日期] 2006-07-25

* [基金项目] 上海市医学领军人才资助项目、上海市卫生系统“百人计划”资助项目 (No. 97BR016)

△通讯作者 E-mail: dingfangcai@163.com

ing protein, BiP) 又称葡萄糖调节蛋白 (glucose - regulated protein 78, GRP78) 从 3 种感受元件上解离下来, 以帮助蛋白的正常折叠, BiP 在解离同时也激活了以下 3 条 UPR 通路。(1) IRE1 通路。IRE1 有 RNA 内切酶活性, 经二聚体形成和自磷酸化作用激活, 随后可剪切 XBP1 mRNA, Xbp1 是内质网应激反应元件 (ER stress response element, ERSE) 转录激活因子, 其转移至核内后, 激活 ERSE, ERSE 可上调 BiP/GRP78、GRP94 等分子伴侣的转录水平。(2) ATF6 通路。ATF6 在高尔基体内被 S1P、S2P 蛋白酶水解后被激活, 形成 p50ATF6, 进入核内后, 可增加 XBP1 的转录, 并激活 ERSE。至此, ATF6 and IRE1 的激活分别使 XBP1 的转录和剪切增加, 并同时激活了 ERSE。(3) PERK 通路。PERK 的活化机制与 IRE1 相似, PERK 激活后可使真核翻译起始因子 2 的 α 亚单位 (eIF2 α) 磷酸化, 磷酸化后的 eIF2 α 阻止 80S 核糖体起始复合物的装配, 从而抑制蛋白翻译。此外, PERK 的激活使转录因子 ATF4 等 UPR 可诱导基因的转录水平提高, 使细胞在整体蛋白合成抑制的情况下保证了 UPR 可诱导基因的表达量^[4]。可见, UPR 的最终结果是通过增加 BiP 转录促进错折叠蛋白的降解, 并使蛋白翻译减少以降低 ER 对新生蛋白的处理负荷。所有这些反应均对 UPR 产生负反

馈作用, 下调 UPR 水平, 以便使细胞重新恢复稳态。而当有过多异常积聚的蛋白将难以降解时, 细胞则把这些蛋白转移至胞质中, 通过泛素 - 蛋白酶体途径降解, 这就是 ERAD 系统^[1]。

UPR 是细胞在进化过程中形成的自我保护通路。过度的 UPR 或 UPR 无法上升到一定水平, 均可导致细胞凋亡^[5]。当出现严重持续的 UPR 时, IRE1 可使肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (TRAF2) 向内质网聚集, 其结果是活化凋亡信号激酶 1 (ASK1), 增加 c - Jun 氨基末端激酶 (c - Jun N - terminal kinase, JNK) 活性, 激活 JNK 凋亡通路。此外, IRE1、PERK 和 ATF6 的激活均可导致 CHOP 等原凋亡基因的转录, 启动细胞凋亡过程, caspase 凋亡通路也可在内质网应激发生时被激活^[4] (图 1)。

那么细胞如何在正常的 UPR 途径与凋亡通路之间进行选择呢? 对 IRE1 的研究给我们提供了一定线索, 在没有应激情况下, Jun 活性域结合蛋白 1 (jun activation domain - binding protein - 1, JAB1) 与 IRE1 相结合, 并抑制 IRE1 活性, JAB1 - IRE1 的结合强度与 UPR 强度相关, 当 UPR 强度增大时, JAB1 与 IRE1 迅速解离。因 JAB1 参与 JNK 凋亡通路, 因此, JAB1 就可能在介导正常 UPR 和凋亡通路之间起到开关作用^[6], 有望成为药物干预的新靶点。

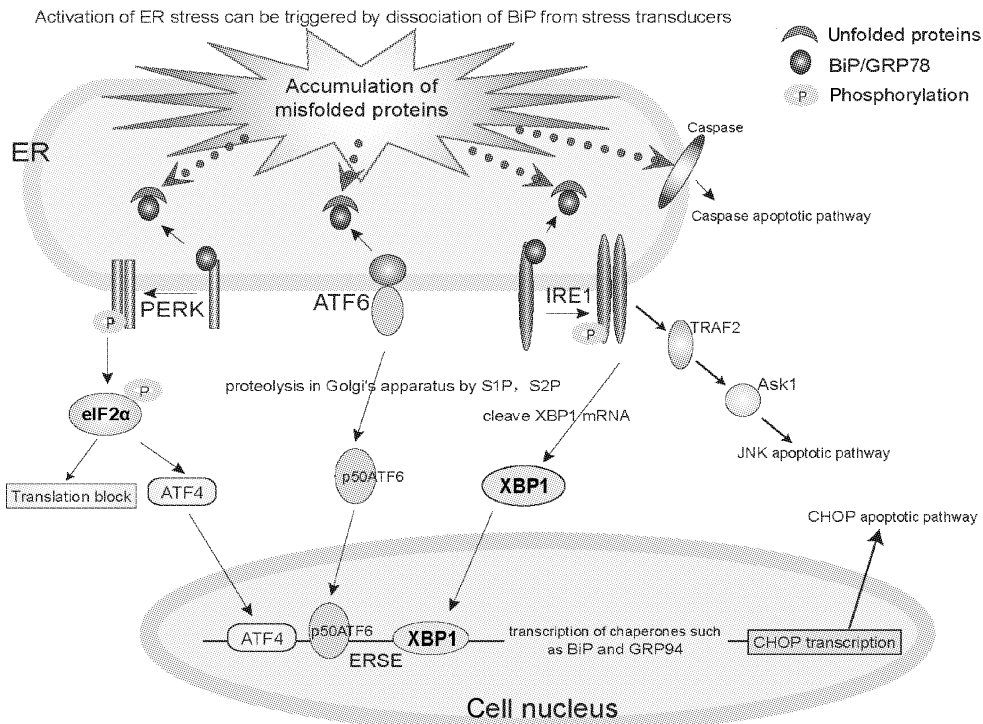


Fig 1 Endoplasmic reticulum stress^[7].

图 1 内质网应激

2 内质网应激与阿尔茨海默病

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是以进行性记忆及认知功能缺失为特征的NDD^[8]。AD的组织病理学表现是老年斑块(senile plaques)和神经原纤维缠结(NFT)的形成,其发病进程中,首先形成以 β -淀粉状蛋白($A\beta$)为主要成分的老年斑,而后由高度磷酸化的微管相关蛋白(tau protein)形成NFT^[1]。病变累积皮质、部分皮层下及海马区域^[8]。

Hoozemans等^[10]对临床确诊为AD的18例病人进行了死后尸检,与15例非痴呆症患者采用免疫组织化学方法对脑组织进行对照观察。结果显示,AD患者颞叶及海马神经元中,BiP的表达量明显高于对照组,并与淀粉 $A\beta$ 沉积程度成正比,且磷酸化PERK仅在AD患者脑组织中出现,均提示UPR途径在AD中被激活。在未出现凋亡迹象的神经元中,BiP和磷酸化PERK表达量同样增加,提示UPR在AD神经变性的早期就已出现。当AD患者错折叠 $A\beta$ 异常集聚时,可引起 Ca^{2+} 向ER外释放,激活UPR途径,通过升高BiP表达量,增强ER对错折叠 $A\beta$ 的处理能力。但当 $A\beta$ 的量超过UPR的处理能力时,便会启动ASK1-JNK凋亡通路,在 $A\beta$ 所致的细胞毒性神经元中,进行ASK1基因敲除或加入JNK抑制剂均可对抗其凋亡过程^[11]。

家族性AD(FAD)占AD总发病人数的5%,早老素(presenilin, PS)相关基因的突变被发现与FAD相关^[1]。PS1是ER内驻留蛋白,FAD相关PS1突变体可直接在ER膜上与IRE1和PERK结合,抑制其自磷酸化作用,降低UPR水平^[12]。PS1突变还延缓ATF6剪切和p50ATF6的形成,阻止其进入核内。表明FAD相关PS1突变体可通过3条途径,共同抑制UPR,下调BiP表达水平^[3],还可同时增加CHOP的表达,加速细胞凋亡^[13]。在人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞系中,在相同内质网应激强度下,含有FAD相关PS1突变体的细胞较含野生型PS1的细胞有更高的凋亡率和更低的BiP mRNA表达水平,说明FAD相关PS1突变可抑制UPR途径并使细胞更倾向于走向凋亡通路^[8]。当在PS1突变细胞中转染BiP后,可降低细胞死亡率,这就为PS1突变型AD的治疗提供了一种新的思路^[14]。

PS2也是AD相关基因之一,其突变体PS2V是PS2缺少外显子5的异常剪切形式,广泛存在散发性AD(SAD)患者脑中。PS2V可通过增加 $A\beta$ 蓄积产生细胞毒性,同时还可抑制UPR通路,同FAD相关PS1突变体一样,PS2V可与IRE1在ER膜上结合,

抑制其磷酸化,使BiP的表达量较正常细胞下降^[14]。在AD患者海马、颞叶皮层中均可见PS2V的表达,这些细胞因UPR途径受到抑制,便无法通过BiP帮助错折叠蛋白恢复正确构象,使细胞更易凋亡^[15]。

可见,在FAD和SAD患者中,FAD相关PS1突变体和PS2V均可通过增加细胞对内质网应激的敏感性而致病。在此过程中,caspase凋亡通路起到关键作用,caspase-12基因敲除鼠可对抗内质网应激及 $A\beta$ 毒性作用所致的细胞凋亡。但caspase-12仅在鼠中存在,在人类体细胞中,caspase-4与caspase-12有同源性,且作用相似。用RNA干扰技术下调caspase-4表达后,发现内质网应激介导的细胞凋亡明显减少,这不仅证明caspase-4介导内质网应激引起的细胞死亡,而且可能将其作为新药物的治疗靶点进行深入研究^[8]。

3 内质网应激与帕金森病

帕金森病(Parkinson's disease, PD)是黑质多巴胺能神经元的选择性丢失为特征的NDD。多数PD研究依靠药物损伤模型来模拟该病多巴胺能神经元变性过程,被广泛应用的PD诱导剂包括6-羟基多巴胺(6-OHDA)和甲基苯基四氢吡啶(MPTP)^[16,17]。

6-OHDA为选择性儿茶酚胺神经毒素,可由体内正常多巴胺在 Fe^{2+} 和 H_2O_2 存在的情况下通过羟化作用生成。内源性6-OHDA在PD患者大脑和尿液中含量常较高,这就提示我们6-OHDA在PD的发病过程中起到一定作用,因此被常用来制作PD模型^[16]。Holtz等^[18]观察6-OHDA对MN9D多巴胺能细胞系的影响,表明6-OHDA可同时激活3条UPR途径,显著升高PERK、eIF2 α 、Xbp1 mRNA及BiP表达水平,同时激活JNK、CHOP、caspase凋亡通路,而MPP⁺所激发的途径则相对有限。Chen等^[16]通过人类多巴胺能神经元细胞系SH-SY5Y和大鼠皮层原代颗粒细胞神经元,用6-OHDA模拟PD模型,发现可激活UPR,且一种内质网应激应答蛋白GSK3 β 也随之升高。GSK3 β 可激活caspase-3,诱导神经细胞凋亡^[19]。选择性GSK3 β 抑制剂可以消除6-OHDA的神经毒性作用。GSK3 β 靶向药物已经开始显示出治疗潜能,胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)可通过与神经营养因子受体TrkB结合,增强Akt活性,Akt为GSK3 β 的上游分子,其活性增加可导致GSK3 β 抑制,从而显著减轻了6-OHDA导致的多巴胺能细胞染色质浓集与DNA断裂,起到神经保护作用^[16]。

MPTP之所以作为一种PD诱导剂,是因为长期

暴露于 MPTP 中的人及灵长类最终会发展为 PD。MPTP 的活性衍生物是 MPP⁺, 可通过诱导氧化应激和损伤能量代谢诱导 PD。在 MN9D 细胞系中, MPP⁺ 可通过 PERK - eIF2 α 通路激活 UPR, 升高 BiP 和 CHOP 表达水平^[18]。Ghribi 等^[20] 在兔活体模型中, 发现 MPP⁺ 可通过 ATF6 途径介导 UPR, 并通过 caspase - 3 和 JNK 通路介导细胞凋亡, JNK 抑制剂可阻止 MPTP 所诱导的细胞死亡。研究还发现 MPP⁺ 剂量与 UPR 结果存在量效关系, 400 nmol MPP⁺ 引起 BiP 和 GRP94 水平升高, 激活正常的 UPR 途径。1 μ mol MPP⁺ 则可见 CHOP 在核内增多, 引发细胞凋亡过程。

在家族性 PD (FPD) 中主要涉及 Parkin 及 α - synuclein 的基因突变, Parkin 基因突变最先在日本 PD 家系, 即常染色体隐性遗传性少年型帕金森综合征 (autosomal - recessive juvenile parkinsonism, AR - JP) 中发现^[21]。Pael 受体的异常折叠与积聚是 AR - JP 患者的重要特征^[22]。Pael - R 是一种 G 蛋白偶联的跨膜蛋白, 是 Parkin 的底物之一。当 Pael - R 在细胞中过量表达时, 就会以错折叠且难容的形式存在, 正常情况下, 错折叠 Pael - R 可被 ERAD 系统消除, 在此过程中, Pael - R 作为 ERAD 的底物首先从 ER 转移至胞质, 在胞质中被泛素化并通过泛素 - 蛋白酶体途径降解^[23]。Parkin 具有 E3 泛素化酶特性, 在细胞发生 UPR 时上调, 以便泛素化更多的底物, 令其降解, 因此 Parkin 是 ERAD 的重要组成部分^[24], Parkin 的过量表达可对抗 Pael - R 异常折叠所引起的神经元损伤^[4]。当 Parkin 发生突变时, 无法正确泛素化 Pael - R, 便可导致 Pael - R 在 ER 中异常积聚, 引发以 BiP 升高为特征的严重 UPR, 便导致多巴胺能神经元选择性凋亡^[21]。在 AR - JP 脑组织中, 发现了不溶形式的 Pael - R, 且 BiP 含量均超过正常人, 提示 UPR 在 AR - JP 患者脑中被激活^[23]。

常染色体显性遗传 PD (autosomal dominant familial PD, ADPD) 与 α - synuclein 基因突变有关^[1]。 α - synuclein 的中心疏水基团在离体条件下可自发形成纤维状蛋白质聚集体^[21]。在体外培养的脑细胞中 α - synuclein 使多巴胺能神经元选择性变性, 而非多巴胺能神经元则不受损伤^[1]。在 ADPD 的病变过程中, 同样有 UPR 的参与, A53T 突变型 α - synuclein 在 PC12 细胞系中可诱发 BiP 和 CHOP 升高、eIF2 α 的磷酸化以及 caspase - 12 的激活, caspase - 12 可通过激活 caspase - 9 与 caspase - 3 来诱导细胞凋

亡^[25]。说明 α - synuclein 可通过内质网应激途径介导其神经毒性作用。

4 内质网应激与肌萎缩侧索硬化症

肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是成年起病, 以脊髓、皮层运动神经元选择性丢失为特征的慢性进行性 NDD。铜锌超氧化物歧化酶 1 (Cu, Zn - superoxide dismutase 1, SOD1) 基因突变被证明与家族性 ALS (FALS) 患者有关。SOD1 的突变体可异常聚集, 引起运动神经元死亡。SOD1 的异常折叠可产生 ALS 运动神经元神经毒性作用, 在 SOD1 突变的 ALS 转基因鼠 G93A 中, 内质网应激参与其运动神经元病变的早期进程, 以 BiP 升高和 caspase - 12 激活为标志^[26]。当 FALS 相关 SOD1 突变体转入 COS7 cells 中时, 构象异常的 SOD1 可集聚并引发 UPR, 同样证明内质网应激介入 SOD1 突变型 FALS 的发病进程^[27]。

目前对 ALS 的病因及发病机制研究尚处于初级阶段, 随着对更多种类 ALS 模型以及散发型病例研究的不断深入, 相信会有更多的内质网应激介导神经毒性证据被发现。

5 结语

蛋白质的异常积聚是 NDD 共有的病理环节之一。在 AD 中有 A β 沉积, PD 中有 α - synuclein 积聚, ALS 中则 SOD1 蛋白异常折叠与堆积。内质网应激已被证明在 3 种 NDD 中参与错折叠蛋白的神经毒性作用。除以上 3 种疾病外, 在其它 NDD, 如朊蛋白病、亨廷顿舞蹈病、溶酶体贮存病中都存在内质网应激介导其神经毒性作用的依据^[2]。在未来的几年中, 如何阻断内质网应激引起的凋亡通路将成为新的研究热点, 对 IRE1、PERK、eIF2 α 等 UPR 相关因子的活性调控和对 BiP 表达的干预可能成为未来数年内 NDD 药物研究的方向。

[参 考 文 献]

- [1] Shastry BS. Neurodegenerative disorders of protein aggregation [J]. Neurochem Int, 2003, 43(1): 1 - 7.
- [2] Lindholm D, Wootz H, Korhonen L. ER stress and neurodegenerative diseases [J]. Cell Death Differ, 2006, 13(3): 385 - 392.
- [3] Shimoke K, Kudo M, Ikeuchi T. MPTP - induced reactive oxygen species promote cell death through a gradual activation of caspase - 3 without expression of GRP78/Bip as a preventive measure against ER stress in PC12 cells [J]. Life Sci, 2003, 73(5): 581 - 593.
- [4] Forman MS, Lee VM, Trojanowski JQ. 'Unfolding' path-

- ways in neurodegenerative disease [J]. *Trends Neurosci*, 2003, 26(8): 407 – 410.
- [5] Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(24): 10690 – 10698.
- [6] Oono K, Yoneda T, Manabe T, et al. JAB1 participates in unfolded protein responses by association and dissociation with IRE1 [J]. *Neurochem Int*, 2004, 45(5): 765 – 772.
- [7] Imaizumi K, Tohyama M. Endoplasmic reticulum stress and neuronal death [J]. *J Chem Neuroanat*, 2004, 28(1 – 2): 49 – 50.
- [8] Katayama T, Imaizumi K, Manabe T, et al. Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease [J]. *J Chem Neuroanat*, 2004, 28(1 – 2): 67 – 78.
- [9] Takuma K, Yan SS, Stern DM, et al. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 97(3): 312 – 316.
- [10] Hoozemans JJ, Veerhuis R, Van Haastert ES, et al. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease [J]. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2005, 110(2): 165 – 172.
- [11] Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F, et al. Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS – mediated ASK1 activation [J]. *Cell Death Differ*, 2005, 12(1): 19 – 24.
- [12] Katayama T, Imaizumi K, Honda A, et al. Disturbed activation of endoplasmic reticulum stress transducers by familial Alzheimer's disease – linked presenilin – 1 mutations [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(46): 43446 – 43454.
- [13] Milhavel O, Martindale JL, Camandola S, et al. Involvement of Gadd153 in the pathogenic action of presenilin – 1 mutations [J]. *J Neurochem*, 2002, 83(3): 673 – 681.
- [14] Sato N, Imaizumi K, Manabe T, et al. Increased production of beta – amyloid and vulnerability to endoplasmic reticulum stress by an aberrant spliced form of presenilin 2 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(3): 2108 – 2114.
- [15] Piccini A, Fassio A, Pasqualetto E, et al. Fibroblasts from FAD – linked presenilin 1 mutations display a normal unfolded protein response but overproduce A beta₄₂ in response to tunicamycin [J]. *Neurobiol Dis*, 2004, 15(2): 380 – 386.
- [16] Chen G, Bower KA, Ma C, et al. Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) mediates 6 – hydroxydopamine – induced neuronal death [J]. *Faseb J*, 2004, 18(10): 1162 – 1164.
- [17] 毛善英, 周富友, 丁美萍, 等. 不同剂量左旋多巴对偏侧帕金森病大鼠行为学及多巴胺 D₂ 受体表达数的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2006, 22(8): 1614 – 1617.
- [18] Holtz WA, O'Malley KL. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 19367 – 19377.
- [19] Avraham E, Szargel R, Eyal A, et al. Glycogen synthase kinase 3beta modulates synphilin – 1 ubiquitylation and cellular inclusion formation by SIAH; implications for proteasomal function and lewy body formation [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(52): 42877 – 42886.
- [20] Ghribi O, Herman MM, Pramoonjago P, et al. MPP⁺ induces the endoplasmic reticulum stress response in rabbit brain involving activation of the ATF – 6 and NF – kappa B signaling pathways [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2003, 62(11): 1144 – 1153.
- [21] Burke RE. alpha – Synuclein and parkin: coming together of pieces in puzzle of Parkinson's disease [J]. *Lancet*, 2001, 358(9293): 1567 – 1568.
- [22] Takahashi R, Imai Y, Hattori N, et al. Parkin and endoplasmic reticulum stress [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 991: 101 – 106.
- [23] Imai Y, Soda M, Inoue H, et al. An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin [J]. *Cell*, 2001, 105(7): 891 – 902.
- [24] Ledesma MD, Galvan C, Hellias B, et al. Astrocytic but not neuronal increased expression and redistribution of parkin during unfolded protein stress [J]. *J Neurochem*, 2002, 83(6): 1431 – 1440.
- [25] Smith WW, Jiang H, Pei Z, et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha – synuclein – induced toxicity [J]. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(24): 3801 – 3811.
- [26] Turner BJ, Atkin JD, Farg MA, et al. Impaired extracellular secretion of mutant superoxide dismutase 1 associates with neurotoxicity in familial amyotrophic lateral sclerosis [J]. *J Neurosci*, 2005, 25(1): 108 – 117.
- [27] Tobisawa S, Hozumi Y, Arawaka S, et al. Mutant SOD1 linked to familial amyotrophic lateral sclerosis, but not wild – type SOD1, induces ER stress in COS7 cells and transgenic mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 303(2): 496 – 503.