

文章编号: 1004-0374 (2010) 04-0326-05

内质网应激与帕金森病

王晟东, 白洁*

(昆明理工大学生物工程技术研究中心, 昆明 650224)

摘要: 内质网是细胞内最重要的细胞器之一, 内质网功能与细胞状态密切相关。异常蛋白在内质网的堆积、胆固醇代谢异常、钙代谢紊乱等均能引起内质网应激。内质网应激在细胞生理病理中发挥重要作用。研究表明: 内质网应激与神经退行性疾病, 如帕金森病密切相关。该文简单概述了内质网应激与帕金森病之间的关系。

关键词: 内质网应激; 未折叠蛋白应答; 帕金森病

中国分类号: Q189; R749.16 **文献标识码:** A

Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease

WANG Sheng-dong, BAI Jie*

(Biotechnology Research Center, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

Abstract: Endoplasmic reticulum (ER) is one of the most important organelles in cells. ER function is related with the state of cells. The accumulating of the unfolded or malfolded proteins in ER, dysfunction of the cholesterol metabolism and the calcium metabolism evoke ER stress. Abnormal ER stress plays important role in cell pathophysiological processes. It has been showed that ER stress is involved in neurodegenerative diseases, such as Parkinson's disease. This article reviews the ER function, and the mechanism of ER stress, the relationships between ER stress and Parkinson's disease.

Key words: endoplasmic reticulum stress; UPR; Parkinson's disease

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是常见神经退行性疾病, 尤以老年人发病率高, 其主要的临床症状为肌肉僵直、四肢震颤、运动迟缓以及步态不稳。该病表现为黑质多巴胺能神经元变性坏死, 从而导致纹状体内多巴胺水平下降, 病理特点有神经元内路易小体 (Lewy body) 的形成。到目前为止, 对于多巴胺能神经元变性坏死的分子机制还不十分清楚, 其原因在于其发病因素的多样性。例如, 氧化应激、线粒体功能障碍、泛素蛋白酶系统损伤、异常蛋白沉积等均与帕金森病发病有关。而最近的研究表明内质网应激 (endoplasmic reticulum stress) 在帕金森病发病过程起重要作用。

内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 是真核细胞重要的细胞器, 它是由封闭的膜系统和围成的腔形成互相沟通的网状结构。内质网膜占细胞内膜结构的 50% 以上, 整个内质网腔占细胞体积的 10% 以

上。内质网是除核酸以外的重要生物大分子合成的基地, 主要有以下功能: 合成蛋白质信号肽; 储存细胞内钙离子; 合成脂质和胆固醇; 释放正确折叠蛋白质。

1 内质网应激和内质网应激应答

1.1 内质网应激

许多因素均可导致内质网的功能异常, 蛋白质折叠程序紊乱, 葡萄糖缺乏所致糖基化异常; 胆固醇代谢异常, 钙代谢紊乱及缺氧等可引起内质网应

收稿日期: 2009-07-27; 修回日期: 2009-09-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30860085); 云南省中青年学术技术带头人后备人才资助项目 (2006PY01-07); 云南省自然科学基金 (2007C177M)

*通讯作者: E-mail: jiebai662001@yahoo.com.cn

激。在内质网应激发生初期,细胞会对其作出应答,通过调节某些程序来重新建立内质网微环境的平衡。未折叠蛋白应答(unfolded protein response, UPR)就是一种进化过程中保留下来、相对保守的应答,对机体具有保护作用。最初,UPR可以通过调节转录程序提高蛋白折叠能力或异常蛋白的降解能力,从而减少内质网异常蛋白质的堆积,降低内质网受迫情况,重新建立内质网环境的平衡。当内质网压力超出细胞自身调节范围时,内质网应激将触发细胞凋亡信号途径,最终引起细胞死亡^[1,2]。目前研究表明,由内质网应激诱发的神经细胞凋亡与神经退行性疾病,如帕金森病的发生密切相关。

1.2 内质网应激信号通路

当异常蛋白在内质网堆积时,内质网分子伴侣从内质网跨膜蛋白游离,触发UPR反应。正常情况下,跨膜蛋白N端的结合位点与葡萄糖调节蛋白(glucose regulate protein, Grp78/Bip)结合,跨膜蛋白自身的聚合被抑制。当内质网有异常蛋白堆积时,Grp78从跨膜蛋白N端结合位点脱落,跨膜蛋白则发生聚合反应,引发UPR。

内质网跨膜蛋白主要有以下几种:PERK、Ire1和ATF6^[3-5]。

PERK(PKR-like ER kinase)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其催化位点与真核转录起始因子2 α (eIF2 α)家族的其他激酶底物同源。当Grp78从内质网腔移除后,PERK在内质网膜寡聚化,随即诱导自身磷酸化,激活其激酶活性。PERK磷酸化eIF2 α 后将其灭活,阻断了mRNA翻译,减少内质网负荷。

Ire1 α (inositol requirement 1 α)是一类I型跨膜蛋白,不但具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性,而且还有核酸内切酶活性,Ire1 α 切除X box protein-1(XBP-1)的内含子,使该mRNA翻译成XBP-1蛋白,之后XBP-1蛋白帮助将错误折叠蛋白反向从内质网转运至胞液^[5],从而减少内质网的负荷。因此,在内质网应激的过程中,该蛋白将可能发生改变。例如:百草枯可以通过活化Ire1而导致Ask1(apoptosis signal kinase 1)/JNK途径活化,从而引起多巴胺能神经元SH-SY5Y细胞凋亡。内质网应激抑制剂salubrinal、Ask1抑制物硫氧还蛋白以及JNK抑制剂SP600125均可削弱帕金森病环境诱因之一百草枯对多巴胺能神经元的损伤^[6]。

ATF6(activating transcription factor 6)与PERK和Ire1 α 不同,当Grp78从其N端释放后,会触发

完全不同的蛋白活化作用。在Grp78从其结合位点释放后,ATF6从内质网移至高尔基体,被切割形成转录因子,释放至细胞质中,可再进入细胞核调节相关基因的表达来缓解内质网压力。ATF6还能与Ire1共同作用诱导XBP-1 mRNA的增加。

1.3 内质网应激诱导的细胞凋亡

当内质网异常蛋白堆积超出了自身调节的范围时,内质网应激将触发细胞程序性死亡(cell programmed death),即细胞凋亡(apoptosis)。一些物质在内质网应激所触发的细胞凋亡过程中起了重要作用,如蛋白酶、激酶、转录因子、Ca²⁺等。

天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(cysteiny aspartate-specific protease, caspase)是细胞凋亡所必需的一类蛋白酶家族,该蛋白酶家族中的Caspase12与内质网应激密切相关^[7]。Caspase12基因缺失的小鼠对一些药物诱导的内质网应激表现出一定的抗性,如在衣霉素(蛋白N端糖基化抑制剂)和thapsigargin(内质网Ca²⁺依赖的ATP酶抑制剂)作用于细胞时,诱导内质网途径的凋亡^[8]。Caspase12基因缺失的小鼠表现出对这些药物毒性的抵抗性。目前,人源caspase12还未被发现,人caspase4是与小鼠caspase12同源性最高的蛋白酶,其功能可能与caspase12的相似。利用siRNA技术将人神经母细胞瘤细胞的caspase4表达量下调后,能部分减少内质网压力引起的细胞凋亡。而HeLa细胞里caspase4表达量下调后对于内质网压力诱导的细胞凋亡没有影响。所以该蛋白酶与内质网的关系表现出了组织特异性。

内质网应激也可通过激活糖原合酶激酶3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β),诱导GSK3 β 9位丝氨酸的去磷酸化激活GSK3 β ,之后活化caspase3,从而促发细胞凋亡。此外,内质网应激诱导的细胞凋亡途径还有PI3K/Akt/GSK3 β ^[9]。

细胞凋亡激酶(Ask1)参与了TNF家族受体信号途径诱导的细胞凋亡。在内质网受迫时,TRAF2与Ire1形成低聚复合体,使下游激酶活化,从而导致下游的Ask1、JNK和p38 MARK等相继活化。此外,酪氨酸激酶c-Abl(abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1)在内质网应激时,从内质网表面移至线粒体,在内质网途径的细胞凋亡中起重要作用。例如,c-Abl基因缺陷型成纤维细胞对Ca²⁺载体、brefeldinA及衣霉素诱导的细胞死亡表现出抗性。然而,c-Abl促进内质网凋亡途径的分子机

制尚不清楚。

CHOP (C/EBP homologous protein) 是bZIP转录因子C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein) 家族的成员, 内质网压力诱导其表达^[10]。CHOP 蛋白的过量表达会诱导细胞凋亡, *chop*^{-/-}小鼠对于衣霉素诱导的肾损伤和小脑动脉阻塞引起的脑损伤等具有抗性^[11]。因此, CHOP 是内质网应激引起的细胞凋亡中必需因子。*Chop* 基因启动子含有 UPR 主要诱导物, 如 ATF4、ATR6、XBP-1 等的结合位点。在内质网压力存在时, *perk*^{-/-}、*atf*^{-/-} 细胞以及 eIF2 α 突变 (S51A) 的细胞, *chop* 基因的表达受抑制^[12-14]。此外, Ask1 通过活化 p38 MAPK, 使 CHOP 蛋白的 78 和 81 位丝氨酸残基磷酸化, 增加其转录活性, 而最终导致细胞凋亡^[15]。CHOP 与神经退行性疾病发生有关。百草枯诱发的多巴胺能神经元凋亡过程中, CHOP 表达增加^[6]。此外, CHOP 还在 6-OHDA 及 MPTP 诱导的神经元凋亡中起重要作用^[16]。

内质网在细胞内钙离子平衡调节过程中起重要作用, 因此, 内质网钙离子释放, 在内质网应激信号传导中起着重要的作用。组织缺氧、自由基、IP3 生成的刺激物以及肌浆网钙 ATP 酶 (sarcoplasmic reticular Ca⁺-ATPase, SERCA) 的药理拮抗剂等均可刺激内质网释放钙离子, 从而触发细胞凋亡的信号途径^[2]。内质网应激蛋白 Herp 可以挽救钙离子失衡导致的多巴胺能神经元凋亡, 将 Herp 沉默后的 PC12、MN9D 细胞对于 MPP⁺ 的神经毒性更敏感^[17]。这提示, 在神经元中内质网调节的钙离子平衡与帕金森病有密切关系。

2 内质网应激和帕金森病

帕金森病是一种以黑质纹状体通路功能减退为主要特征的神经退行性疾病。它的病理特征为黑质致密区多巴胺神经元变性伴胞浆内嗜酸性包涵体——路易小体的形成。路易小体的主要成分是 α 共核蛋白, 对于 α 共核蛋白的功能尚不清楚, 但已有研究证明 α 共核蛋白异常聚集可引起内质网应激, 在帕金森病发病过程中起重要的作用。

常染色体突变显性遗传的帕金森病, 是由编码 α 共核蛋白的基因错义突变 (A30P, E46K 或 A53T) 引起。异常表达的 α 共核蛋白在神经元内质网中聚集, 堆积, 触发内质网应激, 最终诱导神经元变性坏死。另外, 转染了突变型 α 共核蛋白 (A53T) 的细胞模型中, α 共核蛋白异常表达, CHOP 和

GRP78 的表达升高, eIF2 α 磷酸化水平上调, 激活 caspase12 活性^[18], 诱导神经元变性坏死。 α 共核蛋白的变异和表达增加均对神经元产生毒性作用^[19], 例如增加变异的 α 共核蛋白表达, 则产生黑质中多巴胺神经元损伤^[20]。变异的 C 末端缺失的 α 共核蛋白的转基因小鼠, 也是很好的帕金森病模型^[21]。而低表达 α 共核蛋白将保护多巴胺神经元^[22]。最新的研究结果与上述结果一致, α 共核蛋白积累或聚集与神经轴突的损害相关^[23]。抑制 α 共核蛋白积累的化合物可以改变神经元的功能异常^[24]。

Parkin 是与帕金森病相关的基因, 其编码一个具有泛素连接酶功能的蛋白, 在内质网应激过程中 PARKIN 表达增加。它与内质网相关蛋白降解 (endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD) 机制有关, 在内质网应激过程中起重要作用。目前, 已经确认了 PARKIN 的底物蛋白, 例如错误折叠蛋白、有聚合倾向蛋白和路易小体的成分等。PARKIN 可以在 Hsp70 的帮助下, 标记这些底物, 并通过泛素蛋白酶系统将这些异常蛋白降解, 从而清除内质网里的异常蛋白。PARKIN 功能异常或活性丧失后, 导致神经元内质网 PARKIN 底物蛋白的堆积, 触发内质网应激, 甚至引起细胞凋亡^[25]。最近的研究还表明有些激酶可以改变 PARKIN 的活性, 例如 p25 和 CDK5, 也可以成为帕金森病的治疗靶点^[26]。Pael-R (Parkin-associated endothelin receptor-like receptor) 是 PARKIN 的底物蛋白之一, Pael-R 的堆积可以引起内质网应激诱导的神经元凋亡。而 PARKIN 的泛素化作用促进不可溶性 Pael-R 的降解, 从而抑制神经元死亡^[27]。

另一方面, 具有泛素酶活性的蛋白 HRD1 在 ERAD 过程中具有重要作用。有报道表明小鼠大脑黑质多巴胺能神经元在内质网应激时, HRD1 表达增加, 促进内质网应激过程中的未折叠蛋白降解, 保护神经元免受内质网应激引起的细胞死亡^[28]。HRD1 也可以降低改变 α 共核蛋白的神经毒性, 抑制帕金森病^[29]。

有关帕金森病的研究, 已有动物和细胞模型, 例如 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP), 6-羟多巴胺、鱼藤酮等物质均能引起多巴胺能神经元坏死。这些物质可以抑制线粒体复合物 I 功能, 产生过多的活性氧诱发氧化应激而使神经元变性坏死。同时, 研究表明内质网应激也参与了其过程。用以

上物质刺激神经细胞后, 可以检测到UPR信号通路一些靶蛋白的变化, 如转录因子CHOP显著上调, GRP78、切割后的XBP1、PERK等蛋白水平增加^[30-32]。研究还显示, 在MPTP帕金森病模型中, 与对照组相比, 硫氧还蛋白高表达转基因小鼠Caspase12活性降低, 多巴胺神经元存活率增高, 提示如果抑制了内质网应激, 则可起到保护多巴胺神经元的作用^[33]。从上得出, 如果干预了内质网应激的途径, 则可能有效防治帕金森病。

目前, 已证明多种激酶与内质网应激有关, 如CaMKII途径与内质网相关, CaMKII缺失的小鼠表现对内质网应激引起的神经元的损害抵抗, 同样, CaMKII的抑制剂可以降低内质网应激引起的神经元损害, 这就意味着CaMKII抑制剂将来可以用于帕金森病的治疗^[34]。

3 结论

综上所述, 内质网应激在帕金森病发病过程中具有重要作用。因此, 利用内质网这一潜在的作用靶点可有效地治疗帕金森病, 通过激活细胞保护应答或抑制神经元变性坏死信号通路的来减少神经元受损。目前, 有关内质网应答相关途径研究很多, 具有许多的靶点, 如能阐述清楚, 将会产生许多防治帕金森病的新手段。

[参 考 文 献]

- [1] Xu C, Bailly-Maitre B and Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest*, 2005, 115(10): 2656-64
- [2] Belmont PJ, Tadimalla A, Chen WJ, et al. Coordination of growth and endoplasmic reticulum stress signaling by regulator of calcineurin 1 (RCAN1), a novel ATF6-inducible gene. *J Biol Chem*, 2008, 283(20): 14012-21
- [3] Schroder M and Kaufman RJ. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, 2005, 569(1-2): 29-63
- [4] Shen X, Zhang K and Kaufman RJ. The unfolded protein response—a stress signaling pathway of the endoplasmic reticulum. *J Chem Neuroanat*, 2004, 28(1-2): 79-92
- [5] Rao RV and Bredesen DE. Misfolded proteins, endoplasmic reticulum stress and neurodegeneration. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(6): 653-62
- [6] Yang W, Tiffany-Castiglioni E, Koh HC, et al. Paraquat activates the IRE1/ASK1/JNK cascade associated with apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Toxicol Lett*, 2009, 191(2-3): 203-10
- [7] Momoi T. Caspases involved in ER stress-mediated cell death. *J Chem Neuroanat*, 2004, 28(1-2): 101-5
- [8] Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid- β . *Nature*, 2000, 403(6765): 98-103
- [9] Srinivasan S, Ohsugi M, Liu Z, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis is partly mediated by reduced insulin signaling through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and increased glycogen synthase kinase-3 β in mouse insulinoma cells. *Diabetes*, 2005, 54(4): 968-75
- [10] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 381-9
- [11] Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev*, 1998, 12(7): 982-95
- [12] Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, et al. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*, 2000, 5(5): 897-904
- [13] Scheuner D, Song B, McEwen E, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*, 2001, 7(6): 1165-76
- [14] Harding HP, Zhang Y, Zeng H, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 2003, 11(3): 619-33
- [15] Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, 1996, 272(5266): 1347-9
- [16] Silva RM, Ries V, Oo TF, et al. CHOP/GADD153 is a mediator of apoptotic death in substantia nigra dopamine neurons in an in vivo neurotoxin model of parkinsonism. *J Neurochem*, 2005, 95(4): 974-86
- [17] Chigurupati S, Wei Z, Belal C, et al. The homocysteine-inducible endoplasmic reticulum stress protein counteracts calcium store depletion and induction of CCAAT enhancer-binding protein homologous protein in a neurotoxin model of Parkinson disease. *J Biol Chem*, 2009, 284(27): 18323-33
- [18] Smith WW, Jiang H, Pei Z, et al. Endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cell death pathways mediate A53T mutant alpha-synuclein-induced toxicity. *Hum Mol Genet*, 2005, 14(24): 3801-11
- [19] Cookson MR. α -Synuclein and neuronal cell death. *Mol Neurodegener*, 2009, 4: 9
- [20] Wakamatsu M, Ishii A, Iwata S, et al. Selective loss of nigral dopamine neurons induced by overexpression of truncated human alpha-synuclein in mice. *Neurobiol Aging*, 2008, 29(4): 574-85
- [21] Daher JP, Ying M, Banerjee R, et al. Conditional transgenic mice expressing C-terminally truncated human α -synuclein (alphaSyn119) exhibit reduced striatal dopamine without loss of nigrostriatal pathway dopaminergic neurons. *Mol Neurodegener*, 2009, 4: 34
- [22] Lewis J, Melrose H, Bumcrot D, et al. *In vivo* silencing of alpha-synuclein using naked siRNA. *Mol Neurodegener*, 2008, 3: 19
- [23] McCormack AL, Mak SK, Shenasa M, et al. Pathologic modifications of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine (MPTP)-treated squirrel monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2008, 67(8): 793-802
- [24] Nonaka T, Hasegawa M. A cellular model to monitor

- proteasome dysfunction by α -synuclein. *Biochemistry*, 2009, 48(33): 8014-22
- [25] Xiong H, Wang D, Chen L, et al. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest*, 2009, 119(3): 650-60
- [26] Rubio de la Torre E, Luzon-Toro B, Forte-Lago I, et al. Combined kinase inhibition modulates parkin inactivation. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(5): 809-23
- [27] Imai Y, Soda M, Inoue H, et al. An unfolded putative trans-membrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, 2001, 105(7): 891-902
- [28] Omura T, Kaneko M, Okuma Y, et al. A ubiquitin ligase HRD1 promotes the degradation of Pael receptor, a substrate of Parkin. *J Neurochem*, 2006, 99(6): 1456-69
- [29] Gitler AD, Chesi A, Geddie ML, et al. α -synuclein is part of a diverse and highly conserved interaction network that includes PARK9 and manganese toxicity. *Nat Genet*, 2009, 41(3): 308-15
- [30] Holtz WA, O'Malley KL. Parkinsonian mimetics induce aspects of unfolded protein response in death of dopaminergic neurons. *J Biol Chem*, 2003, 278(21): 19367-77
- [31] Yamamuro A, Yoshioka Y, Ogita K, et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress on the cell death induced by 6-hydroxydopamine in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Res*, 2006, 31(5): 657-64
- [32] Ryu EJ, Harding HP, Angelastro JM, et al. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in cellular models of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2002, 22(24): 10690-8
- [33] Bai J, Nakamura H, Kwon YW, et al. Does thioredoxin-1 prevent mitochondria- and endoplasmic reticulum-mediated neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine? *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(5): 603-8
- [34] Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways. *J Clin Invest*, 2009, 119(10): 2925-41