

DOI: 10.13376/j.cbls/2017043

文章编号: 1004-0374(2017)04-0331-05

葡萄糖调节蛋白78的研究进展

麻庆乐, 卢德赵*

(浙江中医药大学生命科学学院, 杭州 310000)

摘要: 葡萄糖调节蛋白 78(glucose regulated protein 78 kD, GRP78) 是位于内质网上的重要分子伴侣, 在蛋白质折叠和转运过程及内质网应激反应中发挥重要作用。近年来发现, GRP78 高表达与多种疾病发生发展密切相关, 其生物学功能受到广泛关注。现综述国内外文献, 对 GRP78 的生物学功能及与肿瘤、心血管疾病、糖尿病之间的关系进行分析与研究, 为临床疾病治疗靶点提供理论依据。

关键词: 葡萄糖调节蛋白 78; 内质网应激; 未折叠蛋白反应; 细胞凋亡; 疾病

关键词: Q51 文献标志码: A

Research progress on GRP78

MA Qing-Le, LU De-Zhao*

(College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000, China)

Abstract: Glucose-regulated protein 78 (GRP78) is an important chaperone located in the endoplasmic reticulum, playing an important role in protein folding and transport as well as endoplasmic reticulum stress. In recent years, it has been found GRP78 overexpression is closely related to the development of several diseases. The biological function of GRP78 has attracted widespread attention. The relationship between the biological function of GRP78 and cancer, cardiovascular disease, diabetes is reviewed, providing a theoretical basis for the targets of clinical treatment.

Key words: GRP78; endoplasmic reticulum stress; unfolded protein response; apoptosis; disease

葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78 kD, GRP78) 又称免疫球蛋白重链结合蛋白 (immunoglobulin heavy chain binding protein, Bip), 与热休克蛋白 70 (heat shock protein, Hsp70) 家族具有高度同源性, 被认为是 Hsp 家族的成员之一。GRP78 分子及其 DNA 分子序列结构在许多生物中高度保守, 其在内质网腔内能促进蛋白质正确折叠, 起到缓解内质网应激、保护细胞的作用。近年来众多学者发现, GRP78 在肿瘤、心血管疾病和糖尿病患者中呈高表达。因此, GRP78 应用前景丰富, 为疾病的发病机制和治疗提供了新的研究思路。

1 GRP78的结构

GRP78 作为内质网中的固有成分, 是唯一一定位在内质网上的结合蛋白, 如图 1, 能够识别内质

网蛋白信号序列, 广泛存在于各种生物中。其蛋白结构包括两个域, 分别是位于肽链 N 端的 ATP 酶结构域 (ATP binding domain) 和位于肽链 C 端的肽结合结构域 (peptide substrate binding domain), 其中 N 端氨基酸的保守性远高于 C 端。ATP 酶结构域的活性中心由 4 个 α 螺旋构成, 具有 ATP 酶活性, 可水解 ATP 为蛋白质折叠提供能量; 而肽结合结构域的活性中心由 4 个反向平行的 β 折叠和 1 个 α 螺旋构成, 具有结合非折叠蛋白质小肽的能力, 参与体内多种重要复合物的形成^[1]。

收稿日期: 2016-09-23; 修回日期: 2016-11-11

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY15H280008);
浙江省中医药科技计划(2012ZA066)

*通信作者: E-mail: ludezhao@126.com; Tel: 0571-86613626

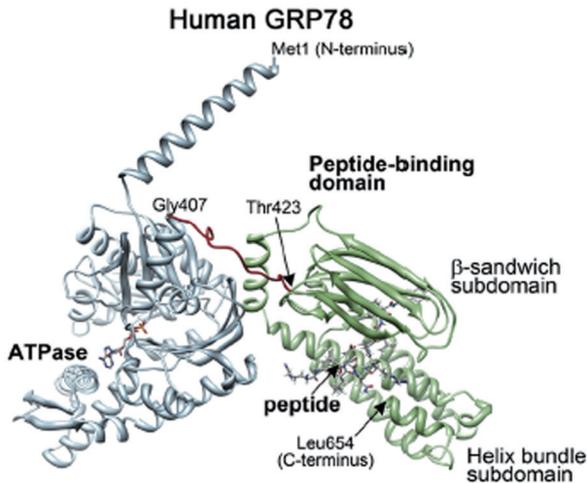


图1 人GRP78蛋白结构图

2 GRP78的生物学功能

GRP78 是一种内质网上的多功能钙结合蛋白, 在内质网蛋白质合成、内质网稳态维持、细胞信号控制、细胞生存等多方面起着关键作用^[2]。GRP78 可参与细胞表面信号转导, 调控细胞凋亡, 也可参与细胞内质网应激反应, 其中最重要的功能是依靠 ATP 去磷酸化释放的能量结合内质网中新生多肽的疏水性口袋, 阻止内质网内新生肽聚集, 参与蛋白质在内质网的正确折叠和转运^[3]。

2.1 GRP78参与细胞表面信号转导

GRP78 蛋白以受体形式存在于细胞表面, 常选择性地表达于恶性病变细胞表面^[4], 而不表达于正常细胞或者良性病变的细胞表面, 并通过 N 端结构域和 C 端结构域分别与其他蛋白配合物结合, 调节促增殖、抗凋亡信号通路和促凋亡、抗增殖信号通路^[5]。例如, 在前列腺癌细胞表面上, GRP78 作为活性 $\alpha 2$ - 巨球蛋白受体, 通过激活 PAK-2 信号通路, 并使 Limk1 和 Cofilin 磷酸化, 从而增强细胞转移性和侵袭能力^[6]。此外, 细胞表面 GRP78 与 $\alpha 2$ - 巨球蛋白的相互作用还可激活 ERK1/2、p38-MAPK、PI3K, 并通过 Akt 和 NF- κ B 信号通路诱导细胞增殖^[7]。GRP78 作为特异受体, 在动脉粥样硬化患者血管内皮细胞中可以抑制组织因子 (tissue factor, TF) 介导的细胞表面促凝血过程^[8]。在肿瘤细胞表面高表达的 GRP78 可分泌到细胞外, 而分泌的 GRP78 继而结合到内皮细胞的细胞表面受体, 通过激活 ERK 和 AKT 途径, 保护血管内皮细胞, 抑制硼替佐米的抗血管生成作用^[9]。

2.2 GRP78参与未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)

未折叠蛋白反应是包括蛋白质合成暂停、内质网分子伴侣和折叠酶表达上调、内质网相关性降解等在内的一系列综合性反应。内质网稳定时, 内质网腔内的 GRP78 与位于内质网膜上的 IRE-1 (inositol-requiring enzyme 1)、PERK (PKR-like ER kinase)、ATF6 (activating transcription factor 6) 等 3 种应激信号跨膜感受蛋白分别结合形成复合物, 且处于无活性状态。当内质网中未折叠蛋白含量增加且超过正常范围时, GRP78 与 3 种感受蛋白从其复合物中解离出来, 感受蛋白在解离激活的同时触发未折叠蛋白反应, 使 GRP78 表达上调并与增多的新生未折叠蛋白结合, 以降低内质网中未折叠蛋白的积累, 从而达到恢复内质网正常功能的目的^[10]。

2.3 GRP78参与内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)

内质网应激主要是指内质网腔内大量错误折叠或未折叠蛋白蓄积以及钙离子平衡紊乱导致的内质网生理功能紊乱。此应激可激活未折叠蛋白反应、内质网超负荷反应和 caspase-12 介导的凋亡通路等信号途径, 既能诱导 GRP78、GRP94 等内质网分子伴侣表达从而产生细胞保护效应, 亦能调控内质网特异性介导的凋亡途径诱导细胞凋亡。在应激过程中, 作为内质网分子伴侣及钙结合蛋白, 过表达的 GRP78 与错误折叠或未折叠蛋白疏水性残基端以及钙离子识别结合, 减少内质网上错误折叠或未折叠蛋白的积累并维持钙离子平衡, 恢复内质网生理功能; 此外, GRP78 作为内质网应激标志蛋白, 可与内质网应激激活的促凋亡受体结合, 抑制其信号表达, 从而保护细胞, 维持机体内环境稳态^[11]。

3 GRP78与疾病相关的研究

3.1 GRP78在肿瘤中的作用

Cal 等^[12]研究表明, 肿瘤发生发展过程中, GRP78 通常表达上调。GRP78 高表达抑制肿瘤细胞凋亡并促进肿瘤的耐药、复发及转移。大多数肿瘤组织由于生长过快, 易形成缺氧缺血等恶性环境, 导致组织营养供应不足及内质网应激, 通过激活 GRP78 基因转录诱导产生 GRP78, 可促进肿瘤血管新生, 利于营养供给, 维持内环境稳态, 保护肿瘤细胞。付荣^[13]的研究发现了分泌型 GRP78 在肿瘤微环境中一个新的作用模式: 分泌的 GRP78 通过与其受体——细胞表面的 GRP78 结合, 激活

PI3K 信号通路, 继而活化 Wnt 信号和细胞周期 G₁ 期关键蛋白, 最终促进肿瘤细胞增殖和存活。Chen 等^[14] 构建了一个肝脏特异性缺失 PTEN 和 GRP78 双等位基因的小鼠模型, 发现除特异性 PTEN 敲除引起脂肪肝和肝损伤外, 由于肝脏 GRP78 特异性敲除与其他组织特异性敲除模型不同, 组织中存在残留的 GRP78, 建模 8~9 月时, 肝细胞癌 (HCC) 和胆管细胞癌 (CC) 明显加快进展, 且在癌细胞区域检测到 GRP78 高表达, 表明肝癌进展与 GRP78 阳性细胞再增殖相关, 其可进一步促进肿瘤的发生。Wu 等^[15] 通过分析前列腺癌细胞中 GRP78 所涉及的信号转导通路发现, 沉默 GRP78 后, 抑癌基因 maspin 表达上调, maspin 的表达上调和 COX-2 的表达下调可能会导致细胞增殖能力和侵袭能力的下降。因此, GRP78 的沉默可以通过调控 maspin 和 COX-2 来抑制前列腺癌细胞的增殖、黏附和迁移, 证实了 GRP78 高表达促进肿瘤细胞增殖。

临床治疗发现, GRP78 是肿瘤治疗的一种新的标志物, 其表达水平与肿瘤发展有极密切的关系。如在人乳腺癌患者中, GRP78 高表达于乳腺癌后期; 人肝癌患者中, GRP78 的表达水平越高, 肿瘤的进展程度往往也越高; 在前列腺癌患者中, GRP78 检测阳性的病例化疗后癌症的复发和死亡率均较高; 在胃癌患者中, GRP78 表现强阳性的病例比弱阳性的病例淋巴结转移程度更深且病情更加严重^[16-19]。可见, GRP78 的表达水平与癌症患者的预后及肿瘤的发展有紧密的相关性。目前在乳腺癌、肝癌、前列腺癌和胃癌病例中都可以通过评估 GRP78 的表达水平来判断临床分期, 分析其复发周期。另外, GRP78 的表达水平与实体瘤大小、肿瘤细胞的有丝分裂指数呈正相关。基于这些理论, 可以将 GRP78 作为肿瘤治疗的一个靶点进行临床实践研究。目前相关研究表明, 敲除 GRP78 可以抑制肿瘤细胞的增殖, 并提高治疗药物和方法对肿瘤治疗的有效性 & 敏感性。Ji 等^[20] 利用 siRNA 干扰人结肠癌细胞系 GRP78 表达, 发现沉默 GRP78 可抑制细胞周期 G₁/S 期转换, 从而抑制癌细胞的体内外增殖。同样有实验运用细胞毒素抑制 GRP78 的表达来抑制肿瘤细胞系的生长, 表明 GRP78 表达促进肿瘤细胞生长^[21]。

3.2 GRP78在心血管疾病中的作用

心血管疾病是威胁人类健康的一大杀手, 其发病是多种因素共同作用的结果。研究发现, 过度的内质网应激经独立的信号途径诱导细胞凋亡, 参与多种心血管疾病的发病机制^[22]。在内质网应激过程

中, 内质网应激分子伴侣 GRP78 与内质网应激跨膜感受性蛋白 PERK、ATF6 和 IRE1 α 受体蛋白解离, 继而激活 UPR 下游的效应分子, 发挥 UPR 的促细胞存活功能。

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心血管疾病的主要原因和病理基础, 过度的内质网应激诱导的血管内皮细胞凋亡是 AS 发生的关键环节^[23]。在黄明宜等^[24] 的 AS 动物模型实验中, 高脂组家兔血管内皮细胞 GRP78 基因表达水平高于对照组, 细胞实验中模型组血管内皮细胞凋亡率高于对照组, 提示内质网应激参与 AS 病变成形。而不管是在人类还是动物模型的动脉粥样硬化斑块中, 已证实 GRP78 升高预示内质网应激存在, 可反映内质网应激水平^[25]。与异常的炎症反应、血小板功能紊乱等一样, 病理性的血管生成也是促进心血管疾病尤其是动脉粥样硬化性疾病发生、发展的重要因素之一。Abcouwer 等^[26] 研究发现, 所有能激活内质网应激的环境或者化学因素都能相应地促进 VEGF mRNA 及转录后水平的表达, 且 GRP78 mRNA 的表达与 VEGF mRNA 的表达相一致。血管内皮细胞培养实验中发现, 可以通过快速激活 PI3K-Akt 和 MAPK 信号通路来保护缺血再灌注损伤^[27]。Wu 等^[28] 在实验中通过激活 PI3K-Akt、p38-MAPK 可有效抑制 GRP78 的降解, 维护内质网稳态, 抑制内质网应激, 保护血管内皮细胞。Raiter 等^[29] 的研究表明, 内皮细胞受刺激后 GRP78 在细胞膜上的表达与血管生成过程有关。而 Yoo 等^[30] 的研究表明, GRP78 对诱导的体外血管生成起关键作用, siRNA 干扰 GRP78 后几乎能完全抑制诱导的脐静脉血管内皮细胞 (HUVEC) 增生, 明显地抑制血管生成, 提示升高的 VEGF 通过 GRP78 发挥促血管生成的作用。

3.3 GRP78在糖尿病中的作用

糖尿病患者体内存在多种可刺激内质网应激的因素, 如脂质代谢障碍、RAS 系统激活、高血糖、氧化应激等。近年来, 已有大量文献报道^[31-32] 证实, 内质网应激在包括糖尿病肾病、糖尿病肝病、糖尿病视网膜膜病变及糖尿病心肌病等在内的多种糖尿病并发症的发生发展过程中发挥重要作用, 表明内质网应激是引起糖尿病及慢性并发症发生发展的关键机制之一。而 GRP78 在内质网应激时起到保护细胞内稳态的作用^[33-34]。诸军等^[35] 研究表明, 在糖尿病大鼠肠平滑肌细胞中, GRP78 表达水平上调, 表明糖尿病大鼠肠道平滑肌细胞存在内质网应激反应。

临床研究表明, 糖尿病肾病患者体内的氧化应

激水平会增高, 由此认为氧化应激介入了糖尿病肾病的发生^[36]。游娜等^[37]研究发现, 高糖刺激肾小管上皮细胞 NRK-52E 能明显增加肾小管上皮细胞 NOX4 蛋白的表达, 同时内质网应激的标志蛋白 GRP78 的表达也明显增加。糖尿病与非酒精性脂肪性肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 通常在患者中被同时鉴定。最近的证据表明, 内质网应激与细胞自噬在肝细胞损伤和肝脂质代谢中起重要作用, 而糖尿病和 NAFLD 之间的相互作用机理尚未阐明。在 Zhang 等^[38]的研究中使用了糖尿病小鼠模型来研究内质网应激、细胞自噬与 NAFLD 发病的作用机制。结果显示, 炎性肝损伤和肝脏甘油三酯 (TGS) 储存脂肪滴共存于糖尿病小鼠中, ATF6、GRP78、CHOP 和 Caspase12 表达增加; 自噬作用发生在早期阶段, 后期被抑制。提示适应性内质网应激及细胞自噬在此过程中发挥重要作用, 加剧了脂质代谢紊乱, 从而导致脂肪肝、糖尿病。夏玲玲等^[39]研究发现, 糖尿病肝组织内质网应激相关蛋白 GRP78、p-Perk 及 p-Eif 2 α 表达明显增加, 同时炎症巨噬细胞浸润也明显增多, 提示 ERS 参与糖尿病肝损害过程中脂肪肝的发生及炎症的产生。

4 展望

虽然各种疾病的发病机制不同, 但在肿瘤、心血管疾病、糖尿病中 GRP78 均呈现高表达状态, 而抑制 GRP78 基因表达或抑制其功能可缓解疾病的发生发展。因此, 可在生理和临床上将 GRP78 作为疾病治疗的靶点, 并在未来进一步深入研究 GRP78 在不同类型疾病中的作用机制, 为治疗人类疾病提供新的思路和方法。

[参 考 文 献]

- [1] 杨伟. 人热休克蛋白质GRP78的表达纯化与ATP酶活性及初步晶体学研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013
- [2] Luo B, Lee AS. The critical roles of endoplasmic reticulum chaperones and unfolded protein response in tumorigenesis and anticancer therapies. *Oncogene*, 2013, 32: 805-18
- [3] 张欣, 王玉明, 段勇. GRP78研究新进展. *现代检验医学杂志*, 2014, 6: 5-8
- [4] Zhang Y, Liu R, Ni M, et al. Cell surface relocation of the endoplasmic reticulum chaperone and unfolded protein response regulator GRP78/BiP. *J Biol Chem*, 2010, 285: 15065-75
- [5] Ray R, de Ridder GG, Eu J, et al. The *Escherichia coli* subtilase cytotoxin A subunit specifically cleaves cell surface GRP78 protein and abolishes COOH-terminal-dependent signaling. *J Biol Chem*, 2012, 287: 32755-69
- [6] Vlachostergios PJ, Balmiki RL, Daya R, et al. GRP78 and α 2-macroglobulin are new promising targets for metastatic castrate-resistant prostate cancer treatment. *Clin Transl Oncol*, 2015, 17: 932-4
- [7] Kuo L J, Huang CY, Cheng WL, et al. Glucose-regulated protein 78 mediates the anticancer efficacy of shikonin in hormone-refractory prostate cancer cells. *Tumour Biol*, 2015, 36: 5063-70
- [8] Bhattacharjee G, Ahamed J, Pedersen B, et al. Regulation of tissue factor-mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1737-43
- [9] Kem J, Untergasser G, Zenzmaier C, et al. GRP-78 secreted by tumor cells blocks the antiangiogenic activity of bortezomib. *Blood*, 2009, 114: 3960-7
- [10] 扎西英派, 张涛杰, 霍生东, 等. 葡萄糖调节蛋白GRP78研究进展. *西北民族大学学报*, 2015, 36: 48-58
- [11] Grkovic S, Reilly VC, Han S, et al. IGFBP-3 binds GRP78, stimulates autophagy and promotes the survival of breast cancer cells exposed to adverse microenvironments. *Oncogene*, 2013, 32: 2412-20
- [12] Cal G, Insabato L, Conza D, et al. GRP78 mediates cell growth and invasiveness in endometrial cancer. *J Cell Physiol*, 2014, 229: 1417-26
- [13] 付荣. 自分泌型GRP78对肠癌细胞增殖影响及机制研究[D]. 太原: 山西大学, 2013
- [14] Chen WT, Zhu G, Pfaffenbach K, et al. GRP78 as a regulator of liver steatosis and cancer progression mediated by loss of the tumor suppressor PTEN. *Oncogene*, 2014, 33: 4997-5005
- [15] Wu CT, Wang WC, Chen MF, et al. Glucose-regulated protein 78 mediates hormone-independent prostate cancer progression and metastasis through maspin and COX-2 expression. *Tumour Biol*, 2014, 35: 195-204
- [16] Wang RC, Huang CY, Pan TL, et al. Proteomic characterization of Annexin I (ANX1) and heat shock protein 27 (HSP27) as biomarkers for invasive hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*, 2015, 10: e0139232
- [17] Yerushalmi R, Raiter A, Nalbandyan K, et al. Cell surface GRP78: A potential marker of good prognosis and response to chemotherapy in breast cancer. *Oncol Lett*, 2015, 10: 2149-55
- [18] Yao Z, Sun B, Hong Q, et al. PACE4 regulates apoptosis in human prostate cancer cells via endoplasmic reticulum stress and mitochondrial signaling pathways. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 5911-23
- [19] Ye Y, Miao S, Wang Y, et al. 3,3'-diindolylmethane potentiates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of gastric cancer cells. *Oncol Lett*, 2015, 9: 2393-97
- [20] Ji QX, Liu LL, Li L, et al. Roles of glucose-regulated protein 78 in proliferation and migration of human colorectal carcinoma cell line RKO. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, 2016, 45: 401-6

- [21] Boussabbeh M, Ben Salem I, Prola A, et al. Patulin induces apoptosis through ROS-mediated endoplasmic reticulum stress pathway. *Toxicol Sci*, 2015, 144: 328-37
- [22] Tcherpakov M, Delaunay A, Toth J, et al. Regulation of endoplasmic reticulum-associated degradation by RNF5-dependent ubiquitination of JNK-associated membrane protein (JAMP). *J Biol Chem*, 2009, 284: 12099-109
- [23] Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13: 89-102
- [24] 黄明宜, 王建新, 沈晓君. 丹参酮II A 拮抗血管内皮细胞凋亡相关机制研究. *中医学报*, 2013, 28: 533-4
- [25] Zhang T, Hu Q, Shi L, et al. Equol attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by inhibiting endoplasmic reticulum stress via activation of Nrf2 in endothelial cells. *PLoS One*, 2016, 11: e0167020
- [26] Abcouwer SF, Marjon PL, Loper RK, et al. Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2002, 43: 2791-8
- [27] Ueda K, Karas RH. Emerging evidence of the importance of rapid, non-nuclear estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. *Steroids*, 2013, 78 : 589-96
- [28] Wu QL, Shen T, Shao LL, et al. Ischemic postconditioning mediates cardioprotection via PI3K/GSK-3beta/beta-catenin signaling pathway in ischemic rat myocardium. *Shock*, 2012, 38: 165-9
- [29] Raiter A, Weiss C, Bechor Z, et al. Activation of GRP78 on endothelial cell membranes by an ADAM15-derived peptide induces angiogenesis. *J Vasc Res*, 2010, 47: 399-411
- [30] Yoo SA, You SY, Yoon HJ, et al. A novel pathogenic role of the ER chaperone GRP78/Bip in rheumatoid arthritis. *J Exp Med*, 2012, 209: 871-86
- [31] Takada A, Miki T, Kuno A, et al. Role of ER stress in ventricular contractile dysfunction in type 2 diabetes. *PLoS One*, 2012, 7: e39893
- [32] Lakshmanan AP, Harima M, Suzuki K, et al. The hyperglycemia stimulated myocardial endoplasmic reticulum (ER) stress contributes to diabetic cardiomyopathy in the transgenic non-obese type 2 diabetic rats: A differential role of unfolded protein response (UPR) signaling proteins. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45: 438-47
- [33] Firczuk M, Gabrysiak M, Barankiewicz J, et al. GRP78 targeting subtilize cytotoxin sensitizes cancer cells to photodynamic therapy. *PLoS One*, 2013, 8: e741
- [34] Martin S, Lamb HK, Brady C, et al. Inducing apoptosis of cancer cells using small-molecule plant compounds that bind to GRP78. *Br J Cancer*, 2013, 109: 433-43
- [35] 诸军, 马瑶, 陈婷, 等. 大黄素对糖尿病大鼠肠平滑肌内质网应激及调控机制的研究. *重庆医学*, 2015, 44: 2750-2
- [36] Sari FR, Watanabe K, Thandavarayan RA, et al. 14-3-3 protein protects against cardiac endoplasmic reticulum stress (ERS) and ERS-initiated apoptosis in experimental diabetes. *J Pharmacol Sci*, 2010, 113: 325-34
- [37] 游娜, 王雅云, 董成龙, 等. 白藜芦醇对高糖状态下大鼠肾小管上皮细胞增殖、凋亡的影响及机制. *南京医科大学学报*, 2015, 35: 485-9
- [38] Zhang Q, Li Y, Liang T, et al. ER stress and autophagy dysfunction contribute to fatty liver in diabetic mice. *Int J Biol Sci*, 2015, 11: 559-68
- [39] 夏玲玲, 周仲松, 谢琴秀, 等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肝脏内质网应激的调节作用. *安徽医科大学学报*, 2015, 50: 1451-55