

DOI: 10.13376/j.cblls/2019039

文章编号: 1004-0374(2019)03-0270-09

# 热休克蛋白70: 生物学功能与作用机制研究进展

樊欣, 彭仁\*

(江西师范大学生命科学院, 南昌 330022)

**摘要:** 热休克蛋白是一类广泛存在于原核生物和真核生物体内且结构上高度保守的蛋白质。有机体在应激条件下, 为克服压力会诱导其表达, 因此, 热休克蛋白又被称为应激蛋白。作为进化上最保守的蛋白质之一, 热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, Hsp70) 是生物细胞中含量最高的一种热休克蛋白, 可诱导性最强, 具有多种生物学功能, 因此, 又被称为主要热休克蛋白。由于蛋白质是细胞重要成分之一, 几乎涉及所有的生物学过程, Hsp70 家族成员控制着细胞蛋白质稳态的所有方面, 因此, Hsp70 一直是科学研究的热点之一。该文总结了近年来 Hsp70 的生物学功能和作用机制研究进展, 并对该领域的研究进行了展望。

**关键词:** 热休克蛋白 70; 生物学功能; 作用机制

**中图分类号:** Q51; R341 **文献标志码:** A

## Heat shock protein 70: biological function and the mechanism for its function

FAN Xin, PENG Ren\*

(College of Life Sciences, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China)

**Abstract:** Heat shock proteins widely exist in the prokaryotic and eukaryotic organisms, the structure of which are always highly conservative. They are also known as stress proteins, which are induced owing to the response of organism upon stress condition. As one of the most evolutionarily conserved proteins, heat shock proteins 70 (Hsp70) is the most abundant heat shock protein with the strongest inducibility and many biological functions in cells. It is thus also called the main heat shock protein. As one of the main components in cells, protein is involved in almost all kinds of biological processes. Hsp70 family members control all aspects of cellular protein homeostasis, and hence Hsp70 is one of hot topics in researches all the time. The recent studies related to the biological functions and molecular mechanisms of Hsp70 were summarized here, the future prospective is also presented.

**Key words:** heat shock protein 70; biological function; molecular mechanism

热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, Hsp70) 作为分子伴侣和折叠催化剂的细胞网络的中心组分<sup>[1]</sup>, 与共伴侣和相关系统协调, 发挥诸多生物学功能, 包括帮助新合成蛋白质折叠和装配、对折叠错误及聚集的蛋白质重新折叠<sup>[2-3]</sup>、调控细胞器和分泌蛋白质的膜移位以及控制调控蛋白质的活性等<sup>[4-7]</sup>。因此, Hsp70 是折叠和信号转导通路的内置组件, 在细胞中具有管家功能, 能够校正蛋白质结构和修复错误折叠构象异构体。同时, 细胞外 Hsp70 充当参与 MHC-I 分子交叉呈递的免疫原<sup>[8]</sup>, 它在面对毒蛋白时通过增强细胞活力或促进损伤蛋

白修复, 从而增加生物存活寿命, 具有细胞保护和免疫调节等功能<sup>[9-10]</sup>。此外, 通过在凋亡信号转导途径上的相互作用而增加的 Hsp70 能够抑制细胞凋亡, 已有研究证明 Hsp70 会在人类肿瘤细胞中广泛表达, 并且涉及到肿瘤细胞的增殖、入侵、转移和凋亡<sup>[11-12]</sup>。Hsp70 在肿瘤细胞中的表达上调可能是通过对抗化疗而促进肿瘤发生和形成, 因此, 抑制

收稿日期: 2018-04-11; 修回日期: 2018-11-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560018)

\*通信作者: E-mail: renpeng@jxnu.edu.cn

Hsp70 功能已成为治疗人类恶性肿瘤癌症耐药疗法的重要途径<sup>[13-14]</sup>。为了充分理解 Hsp70 的各种生物学功能,弄清其作用机制显得尤为关键。Hsp70 协助细胞中多种蛋白质折叠过程实质是通过它们的底物结合结构域与其底物蛋白内暴露的短疏水性肽片段瞬时缔合来实现的,而底物的结合和释放循环过程是由低亲和性 ATP 结合状态和高亲和性 ADP 结合状态之间的转换所驱动,因此,ATP 结合和水解对于 Hsp70 发挥生物学功能至关重要<sup>[15]</sup>。ATP 酶循环则由 J 结构域蛋白(J domain protein, JDP)家族的共分子伴侣控制,其将 Hsp70 靶向其底物,同时,核苷酸交换因子决定 Hsp70-底物复合物的寿命,其他共分子伴侣微调该伴侣的周期。

## 1 热休克蛋白与Hsp70

1962年,Ritossa在果蝇幼虫的唾液腺中发现热诱导染色体膨化<sup>[16]</sup>,随后鉴定了膨化编码基因和蛋白质,引发了热休克反应研究领域的迅速发展。人们将在应激条件下(如热应激)产生的蛋白质称为热休克蛋白。后来很多实验证明,Hsp70不止在热应激下会产生,在一些其他因素,如渗透胁迫、营养缺失、氧化应激、细胞暴露于毒素(砷、微量元素、紫外线等)、感染、疾病(阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、癌症等)等应激条件下也会表达<sup>[17-19]</sup>。有研究报道指出,轻度非致死性热休克可以保护各种来源的细胞免受之后更严重的热休克以及其他致命刺激诱导的细胞死亡。生物体内的热休克蛋白按分子量大小不同可分为以下5类:Hsp110、Hsp90、Hsp70、Hsp60以及小分子热休克蛋白。大分子热休克蛋白是ATP依赖性分子伴侣;小分子热休克蛋白以不依赖ATP的方式起作用。其中,Hsp70在从古细菌和植物到人类的所有生物体中均有发现,是进化中最保守的蛋白质。DnaK作为原核生物体内的Hsp70代表,呈现了与真核生物Hsp70约50%的氨基酸序列同源性,同时,不同物种的Hsp70具有类似的生物学功能。例如,在果蝇体内的Hsp70可以在哺乳动物细胞中表达并能有效地保护它们免受热应激。Hsp70可分为4类,分别为组成型热休克蛋白70(heat shock cognate protein 70, HSC70)、诱导型Hsp70、葡萄糖调节蛋白78(glucose-regulated protein 78, GRP78)及线粒体Hsp75。其中,HSC70在细胞内能够表达,并且热刺激后也只有微量增加,它主要具有调节蛋白质的内吞和自噬途径作用。与HSC70不同的是正常情况下,诱导型Hsp70

在生物体内表达量很少,甚至没有,但应激条件下,表达量会快速增加,它主要发挥分子伴侣功能,能够结合错误折叠的蛋白质并协助其正确折叠。GRP78存在于内质网腔内,充当应激中心的传感器,感受和适应肿瘤细胞内微环境的改变,而线粒体Hsp75主要位于线粒体内,参与蛋白质的运输和折叠过程。总之,精细的分子伴侣调节网络存在于生命的各个领域,而热休克蛋白家族位于该网络的中心节点并发挥极其重要的作用。

## 2 Hsp70作用机制

### 2.1 Hsp70的结构

Hsp70由45 kDa N末端核苷酸结合结构域(nucleotide binding domain, NBD)和25 kDa的C末端底物结合结构域(substrate binding domain, SBD)组成。NBD具有结合和水解ATP的功能,由两个亚结构域(I和II)组成,两个亚结构域又被进一步分成4个子域(IA、IIA、IB、IIB)。在I和II两个亚结构域间有裂缝,核苷酸结合位点位于裂缝的底部。ATP水解成ADP会导致NBD的构象发生变化。SBD可以与底物分子中的疏水性氨基酸相互作用,结合底物延伸多肽。SBD由具有底物结合位点的 $\beta$ 夹层结构域( $\beta$ -SBD)和能够调节错误折叠蛋白亲和力的柔性 $\alpha$ 螺旋盖结构域( $\alpha$ -SBD)组成。SBD和NBD通过短而疏水的高度保守的连接链相互连接。Hsp70通过SBD与底物蛋白内的短疏水性肽片段瞬时缔合,从而协助蛋白质折叠,而底物结合和释放的循环过程是由NBD中ATP/ADP转换所驱动的<sup>[20]</sup>。因此,ATP结合和水解对于Hsp70的折叠功能起关键作用。

### 2.2 Hsp70与底物的作用

Hsp70发挥分子伴侣功能的关键之处在于SBD的开放与闭合构象之间的转变。在NBD与ATP结合的状态下,SBD的底物结合腔处于开放构象, $\alpha$ -SBD与 $\beta$ -SBD彼此分离并对接于NBD的不同面,从而使得SBD对底物产生低亲和力和快速交换速率。当SBD与底物结合后,受底物刺激并在共伴侣蛋白JDP的协同作用下,NBD中的ATP水解会增强,生成ADP,此时SBD的柔性 $\alpha$ -SBD“盖子”将关闭,使得底物与SBD紧密结合,增加SBD与底物的亲和力<sup>[21]</sup>。Hsp70的整体构象的变化阻止了功能异常蛋白的形成,抑制了底物蛋白的非正常聚积。当新的蛋白质完成合成后,核苷酸交换因子(nucleotide exchange factor, NEF)可以使NBD结合

裂缝打开,有助于ADP解离释放,释放的ADP与Pi迅速结合生成ATP,此时Hsp70打开底物结合口袋,底物蛋白被释放(图1)。如此通过底物低亲和力ATP与底物高亲和力的ADP转换使得Hsp70构象发生的变化推动了Hsp70与底物蛋白作用的循环过程。

### 2.3 Hsp70与底物作用过程中的共分子伴侣

Hsp70共分子伴侣是指在生物体内能够与Hsp70协同发挥作用的分子伴侣,它们的协同参与对于一个完整的Hsp70与底物作用循环过程是必不可少的。参与Hsp70对底物调控的共分子伴侣有很多,主要有3类。

#### 2.3.1 JDP

JDP刺激Hsp70的ATP酶活性是JDP的中心功能<sup>[22]</sup>。由于ATP水解能够触发底物结合腔的闭合以及相关底物的锁定,而ATP水解也是大多数Hsp70中ATP酶循环过程中的限速步骤,因此,ATP水解对迄今为止所知的Hsp70活性不可或缺。尽管底物可以刺激ATP水解增强,但在热力学耦合

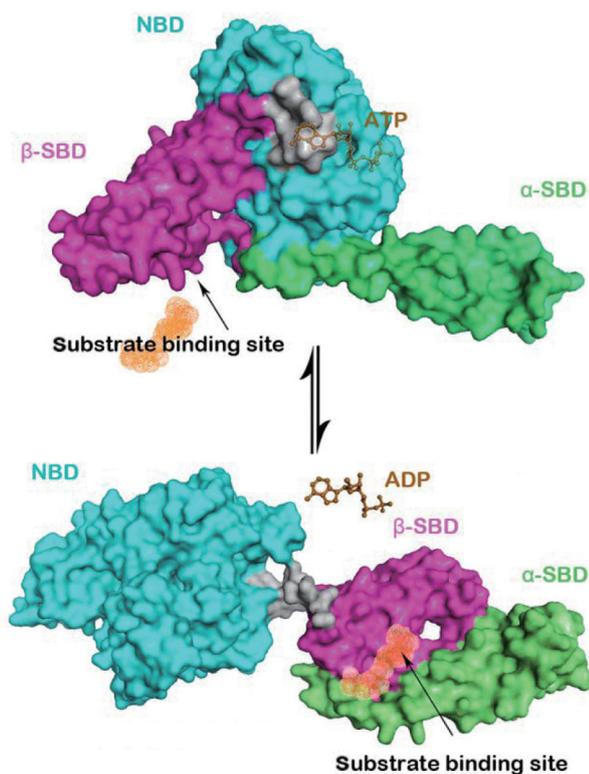
过程中,底物的刺激增强作用仍然不能驱动Hsp70功能循环。由于JDP含有与Hsp70中ATP酶结构域相互作用的保守残基J结构域,当ATP结合时,SBD停靠在NBD上,而JDP家族共分子伴侣在NBD与SBD之间,通过其保守的J结构域的作用刺激NBD从SBD中解耦,加速ATP的水解,改变底物亲和性<sup>[23-24]</sup>。大多数Hsp70具有多个JDP伴侣。虽然最近的数据表明,JDP的功能远远不止是刺激ATP水解,JDP还驱动了Hsp70在各种细胞生命过程中发挥作用<sup>[25-26]</sup>,但JDP驱动的Hsp70多功能性实质上是由于JDP细胞内的精确定位和与底物蛋白结合的特异性,它们将Hsp70募集靶向特定的底物多肽。

#### 2.3.2 NEF

NEF作为Hsp70的协同共分子伴侣主要是通过促进ADP的释放,加速ADP-ATP交换发挥其作用<sup>[27]</sup>。ATP酶循环过程是指在ATP水解后,解离的ADP与Pi结合重新生成ATP,SBD的底物结合腔打开从而释放结合的底物,重新建立循环起始点的过程。在生理条件下,核苷酸的解离限制了底物释放的速率,而NEF能够绑定到NBD的IB和IIB子域上,刺激NBD打开结合裂缝,释放ADP,从而使底物从SBD中释放<sup>[28-29]</sup>。GrpE作为细菌中唯一的一种NEF,其作用研究较为清楚。GrpE由 $\alpha$ 螺旋二聚化结构域和与Hsp70同源物DnaK相互作用的 $\beta$ 结构域组成。 $\alpha$ 螺旋结构域在C末端形成具有四螺旋束的茎状卷曲螺旋结构,在与DnaK的NBD复合物中, $\beta$ 结构域插入到核苷酸结合裂口中,迫使NBD通过IIB子区域的旋转而打开,这种NBD构象大大减少了其对核苷酸的亲和力,加速了核苷酸的解离。对高度保守的NBD的模拟表明,通过灵活的铰链连接可以促进子域IIB运动,除了 $\beta$ 结构域之外,GrpE的部分茎杆和柔性N末端还有助于DnaK结合,阻止了共伴侣与DnaK底物复合物结合,限制了无效的循环和ATP消耗<sup>[30]</sup>。

#### 2.3.3 肽重复结构域(tetratricopeptide repeat, TPR)

TPR家族,包括CHIP、HOP、PP5等成员,这些共分子伴侣对Hsp70功能调节非常重要,它们能够结合Hsp70的C末端并介导底物的募集,对蛋白质复合物产生了一些特定的催化作用。其中,CHIP是一种与底物降解有关的E3泛素连接酶,能够抑制JDP刺激的Hsp70的ATP酶活性。当Hsp70结合一种不可再生的蛋白质,CHIP将通过E3泛素酶活性将其降解<sup>[31-32]</sup>。HOP是一种四聚肽重复结构域



蓝绿色: NBD区域(核苷酸结合区); 灰色: 连接链, 连接NBD与SBD; 紫红色:  $\alpha$ -SBD区域(柔性盖子); 绿色:  $\beta$ -SBD(具有底物结合位点); 褐色: ATP和ADP; 橘红色: 底物。

图1 Hsp70与底物的作用示意图

蛋白,能够耦合 Hsp70 与其共伴侣蛋白 Hsp90 的相互作用。PP5 是一种作用于 Hsp70 底物的磷酸酶<sup>[33]</sup>。

## 2.4 Hsp70与底物作用的选择机制

分子识别是实现生物学功能的基础。针对 Hsp70 与底物作用的选择机制,现已提出了构象选择机制 (conformation selection mechanism, CS) 与诱导拟合机制 (induced fitting mechanism, IF) 这两种使 Hsp70 与其靶底物结合的构象选择机制<sup>[34]</sup>。构象选择机制是从相互转化的配体中挑选某一构象进行结合的,而 IF 机制是一旦配体形成就立刻结合。一般来说,为了区分 CS 和 IF 机制,需要考虑结构和动力学。例如为了确定通过 CS 机制发生特定的结合作用,必须在不存在结合物的情况下,对结合状态非常相似的构象进行取样,并且通过动力学途径证明复合物的形成。为确定 Hsp70 如何与底物结合,研究人员利用磁化交换法及化学交换饱和转移磁共振法分别探测大肠杆菌及人体内的 Hsp70 与两个二级结构非常不同的底物( $\alpha$ 螺旋和 $\beta$ 折叠)的结合反应,分析结果表明所有的结合情况都是以 CS 为结合机制,这暗示了 CS 机制是 Hsp70 与底物作用的保守选择机制<sup>[35-38]</sup>。

## 3 Hsp70基因调控

在应激条件下,细胞通过增强体内的热休克蛋白表达来响应压力的过程称为热休克应答 (heat shock response, HSR), HSR 是一种传统复杂的细胞保护机制<sup>[39]</sup>。作为减少细胞应激损伤的关键细胞防御系统,热休克蛋白响应细胞外或内在的刺激和应激,在维持细胞稳态中起重要作用<sup>[40]</sup>。参与 Hsp70 转录调控的有热休克因子 (heat shock factor, HSF) 和热休克蛋白上游启动子热休克元件 (heat shock element, HSE), 而转录后的调节与 microRNA 有关,同时, Hsp70 的翻译过程与 Hsp70 mRNA 的稳定性增强及优先翻译有关。

### 3.1 Hsp70基因转录调节

转录是从 DNA 模板产生 RNA 的关键细胞过程<sup>[41]</sup>。Hsp70 转录是控制 Hsp70 表达的主要步骤,因此,了解其调控转录的机制很重要。

在非应激情况下, HSF 与 Hsp70 结合,以无活性单体形式存在于细胞质中。不同生物体含有不同的 HSF,且不同的 HSF 在生物体内的作用差别很大。现研究比较清楚的 HSF 有 3 种,分别是 HSF1、HSF2 及 HSF3。例如在应激发生的短时间内, HSF1 会由最初的无活性单体转化为高度磷酸化的活性三

聚体,与 HSE 结合,参与 Hsp70 转录调节<sup>[42]</sup>。HSF2 的作用更主要的体现在细胞分裂过程中,参与细胞分裂周期的调控。由于在应激情况下, Hsp70 和应激产生的损伤蛋白之间也具有亲和力,因此,损伤蛋白会与 HSF 竞争结合 Hsp70,使得产生的游离态 HSF 结合 HSE,进而启动 Hsp70 的转录,产生更多的 Hsp70 与 HSF 结合<sup>[43]</sup>。

### 3.2 Hsp70基因转录后调节

microRNA (miRNAs) 作为一类对转录、分化、增殖至关重要的内生小 RNA (长度较短, 20~24 个核苷酸), 有许多研究表明,其在 Hsp70 的转录后水平发挥作用<sup>[44-46]</sup>。NOXA 是 B 细胞淋巴瘤 2 (B cell lymphoma 2, Bcl-2) 家族中具有促凋亡作用的 BH3 的唯一成员,与 NOXA 的促凋亡作用相反, CDK5 作为一种非典型的细胞周期蛋白依赖性激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 家族成员,可以抑制热诱导引发的细胞凋亡,对热应激状态下的细胞具有保护作用。CDK5 抑制剂的使用和热休克均能够通过降低 miR-23a 的表达来增加 NOXA mRNA 导致 NOXA 的积累增加,而过表达 CDK5 激活剂 p35 及高温诱导产生的大量 Hsp70 分别能够减弱抑制剂和热应激对 miR-23a 和 NOXA 表达的影响,在 CDK5 活性受到抑制的条件下, miR-23a 的过度表达阻止了细胞凋亡,这些结果表明, CDK5 通过 miR-23a 的表达和随后抑制 NOXA 合成提供对热诱导的细胞凋亡的抗性, Hsp70 的促存活功能归因于其预防应激诱导的 CDK5 被抑制,阻止 NOXA 积累的能力<sup>[47-51]</sup>。除此之外,在小鼠心脏组织中,发现 miR-1、miR-21 和 miR-24 在缺血后也能够上调 HSF-1 和 Hsp70-1<sup>[52]</sup>。由于多个 miRNAs 可以共同调节某个基因,单个 miRNA 也能调节多个基因,因此,分析不同 miRNAs 在热休克蛋白表达中的调节能力将有助于阐明热休克蛋白转录后的调控过程。

### 3.3 Hsp70基因翻译调节

正常情况下, Hsp70 的 mRNA 很不稳定,半衰期比应激条件下的短得多。研究常温情况下 Hsp70 的 mRNA 序列,发现在其 3' 端非翻译区富含 AU 碱基。通过基因敲除等手段将该区域删除,发现能增加正常情况下的 Hsp70 mRNA 的稳定性。在应激胁迫下,细胞内其他 mRNA 虽不被降解,但无法翻译,然而 Hsp70 的 mRNA 却大量翻译,研究发现,这是因为在 Hsp70 的 mRNA 5' 端非翻译区有两个能够在热应激条件下与某些因子结合的保守序列,它们促进 Hsp70 mRNA 与核糖体结合从

而使其优先翻译。因此,热应激下转录后 Hsp70 的翻译过程受其 mRNA 的稳定性增强及优先翻译调控。

### 3.4 Hsp70磷酸化

虽然 HSF1 仍被认为是细胞中控制 Hsp70 活性的主要方式,但已有证据表明,Hsp70 磷酸化是调节 Hsp70 活性的另一种有效策略<sup>[53]</sup>。过去在 11 个物种的 Hsp70 上共发现了 313 个磷酸化物,最新研究主要集中于两个区域的磷酸位点,分别是与核苷酸结合域相邻区域 1 及与底物结合域相邻的区域 2。区域 1 的 T36 和 T38 以及区域 2 的 T492、S495 和 T499 这 5 个磷酸化位点常被作为伴侣调节的推定位点。Hsp70 磷酸化可以调节许多重要的细胞过程<sup>[54]</sup>,具体如下:

#### 3.4.1 调控细胞周期的进展

在出芽酵母中,Hsp70 能够结合并调节 G<sub>1</sub> 期的细胞周期蛋白 Cln3 的稳定性。由于 Cln3 能够编码一个类似 JDP 中的 J 结构域,使之与共伴侣 Ydj1 竞争结合 Hsp70。当与 Hsp70 结合的 Cln3 被 Ydj1 置换出来后会进入细胞核,驱动细胞周期进程。细胞由 G<sub>1</sub> 期向 S 期转化主要受 G<sub>1</sub> 期的 CDK 控制,而此过程直接受 Hsp70 上 T36 磷酸化控制。在营养缺乏期间,CDK 磷酸化 Hsp70 的 T36 位点,导致 Hsp70-Ydj1 解离和 Cln3 降解,使细胞停滞在 G<sub>1</sub> 中调控细胞周期。该作用机制属于保守机制,也存在于在哺乳动物中。在哺乳动物中,Hsp70 的 T38 位点上的磷酸化也会导致分子伴侣介导的细胞周期素 D1 的破坏和细胞周期控制信号的抑制<sup>[55]</sup>。

#### 3.4.2 改变细胞对化疗药物的抗性

Hsp70 磷酸化可介导癌细胞的生长和细胞对癌症化疗的抗性。Hsp70 在 Y288 位点上的磷酸化可降低 Hsp70 对抗肿瘤药物甲氨蝶呤的亲和力,使得甲氨蝶呤进入细胞,发挥其抗癌药性<sup>[56]</sup>。若要充分利用此性质,还需要进一步确定介导磷酸化和去磷酸化的关键参与者。展望未来,在临床上改变 Hsp70 的 Y288 位点上磷酸化状态以降低癌细胞的抗药性可能成为一种抗癌治疗的有效手段。

#### 3.4.3 促进Hsp70二聚化

一般情况下,Hsp70 以单体形式存在,Hsp70 的二聚化有利于协助蛋白质折叠。通过结合质谱技术和结构建模发现在哺乳动物内 Hsp70 上的 T504 位点磷酸化能够调节 Hsp70 二聚化,并促进其形成有助于底物折叠稳定的复合物<sup>[57]</sup>。

#### 3.4.4 调节Hsp70底物蛋白的稳定性

在 Hsp70 的 C 末端的共伴侣 HOP 和 CHIP 存

在与 Hsp70 的竞争结合。正常情况下,当 Hsp70 结合的底物为一种不可再生的蛋白质时,它将通过蛋白酶体将这个底物蛋白降解,在此过程中共伴侣 CHIP 发挥重要作用。Hsp70 磷酸化可改变 HOP 和 CHIP 与 Hsp70 的结合情况,从而起到调节 Hsp70 底物蛋白的稳定性的作用。当 Hsp70 的 C 末端结合结构域上的 T636 位点发生磷酸化会导致 Hsp70 与 HOP 共伴侣结合增强,底物蛋白稳定性增加。这种磷酸化的缺少则会减弱共伴侣 HOP 与 Hsp70 的结合,加强 CHIP 与 Hsp70 的结合,使得 CHIP 发挥作用,导致底物蛋白被降解<sup>[58]</sup>。

## 4 Hsp70生物学功能

Hsp70 参与细胞正常的生长、发育和分化过程。生物体内的 Hsp70 可以由不同的应激条件来诱导,而这些不同应激条件诱导产生的 Hsp70 会在不同的区域内发挥作用。一般来说,诱导合成的 Hsp70 具有如下生物学作用:

### 4.1 分子伴侣功能:帮助蛋白质折叠

Hsp70 作为最普遍的分子伴侣之一,能够帮助蛋白质折叠。在非天然蛋白质折叠过程中,Hsp70 的作用可分防止聚集、促进形成天然构象以及聚集蛋白质的溶解和重折叠等 3 方面<sup>[59-61]</sup>。Hsp70 在错误折叠的蛋白质质量控制以及新生蛋白质的合成和翻译后的折叠过程中也发挥重要作用<sup>[62]</sup>。此外,Hsp70 还能够和一些细胞中的蛋白质结合,帮助蛋白质完成细胞内迁移<sup>[63]</sup>。

### 4.2 保护细胞:增强细胞耐受性

Hsp70 的产生具有非特异性,它不仅在热应激下会被诱导产生,在其他刺激原下也会表达,同时,Hsp70 也具有交叉耐受性。细胞在某种应激刺激诱导产生的 Hsp70 不仅能增强细胞对该刺激的耐受性,也会增加细胞对其他应激原刺激的耐受性,从而对细胞起到更好的保护作用。

### 4.3 抗细胞凋亡作用

细胞凋亡是一种由多种基因调控的主动的程序性死亡。正常的细胞凋亡有助于机体及时清除一些坏死或损失的异常细胞,这对于细胞稳态发生、发育和维持具有不可或缺的重要作用<sup>[64-65]</sup>。当外在的一些不良应激条件,如高温、金属离子胁迫等导致非正常细胞凋亡时,为保护机体的正常生长,Hsp70 会充分发挥其抗细胞凋亡作用<sup>[66]</sup>。细胞的凋亡通常可分为内在线粒体依赖性凋亡和外在线粒体非依赖性凋亡两种,Hsp70 作为一类强大的抗细胞凋亡蛋白在两

种凋亡途径中均有参与,一方面 Hsp70 通过阻断线粒体的易位从而阻断线粒体膜透化和促凋亡因子的释放<sup>[67]</sup>;另一方面 Hsp70 抑制死亡诱导信号物及死亡受体的形成<sup>[68-69]</sup>。

#### 4.4 抗氧化作用

老化的一个标志是由氧化蛋白质的展开导致蛋白质聚集体的积累<sup>[70-71]</sup>。由于大多数氧化蛋白质修饰是不可修复的,大部分氧化蛋白质必须被细胞质、细胞核和内质网中的蛋白酶体系统降解<sup>[72]</sup>。蛋白酶体系统主要由 20S 蛋白酶体和 26S 蛋白酶体两种组成。26S 蛋白酶体由 20S 核心和一个或两个结合的 19S 调节子组成,这些调节子可以进行多泛素化蛋白质底物的识别和结合、ATP 依赖性泛素去除和底物去折叠<sup>[73]</sup>。20S 蛋白酶体的作用底物是氧化蛋白质,与 26S 蛋白酶体相反,它能够以 ATP 和泛素非依赖性方式降解未折叠的蛋白质,防止氧化蛋白质的聚集。先前已经表明,在氧化应激时,Hsp70 可防止氧化蛋白质的积累,并直接促进 26S 蛋白酶体解离成 20S 形式,使得游离 20S 蛋白酶体增加,提高降解氧化蛋白质的能力。

#### 4.5 免疫作用

细胞内的 Hsp70 在蛋白质平衡中起了关键作用,细胞外 Hsp70 被发现作为 MHC-I 分子交叉呈递的免疫原,具有免疫调节功能<sup>[74]</sup>。Hsp70 因自身抗原和特异抗原的双重性而具有双重免疫调节作用,它既能通过其在细胞内抗原呈递过程中结合抗原肽的能力充当适应性免疫应答的刺激物,又能以受体介导的方式通过自吞作用刺激 T 淋巴细胞的 MHC-I 呈递途径从而作为刺激先天性与适应性免疫反应的刺激物与靶标,形成抗感染和肿瘤防护<sup>[75-76]</sup>,发挥免疫保护作用,但与此同时它还会诱导先天免疫细胞释放促炎细胞因子,从而增加共刺激分子的表达,导致产生多种自身免疫疾病及感染炎症<sup>[77]</sup>。因此,合理利用 Hsp70 的免疫双重性,使其在免疫过程中发挥积极作用十分重要。

#### 4.6 Hsp70与肿瘤

不论对于外在刺激或内在刺激,Hsp70 家族都具有细胞应激的强效缓冲作用,而肿瘤细胞在很大程度上依赖于这个缓冲系统生存。临床研究表明,在肿瘤形成期间,在非恶性细胞中以低水平表达的组成型 Hsp70 会在恶性细胞中过量表达,促进癌细胞增殖和抑制癌细胞凋亡<sup>[78]</sup>。因此,Hsp70 被称为“肿瘤发生的伴侣”,在致癌作用中扮演潜在肿瘤标志物的角色<sup>[79-81]</sup>。通过抑制 Hsp70 在生物体内的表

达,降低其抗凋亡活性,有望成为治疗癌症的新手段,因此,Hsp70 抑制剂的研究可能为治疗癌症带来新的曙光<sup>[82-84]</sup>。

## 5 总结与展望

Hsp70 具有诸多生物学功能,对正常和非正常状态下生物体的生存作用极其重要。由于体内 Hsp70 的变化与健康 and 患病状况相关,因此,它可作为各种疾病的生理和病理状况以及药物靶标的生物标志物。近年来对 Hsp70 的研究主要集中于临床医学研究,但在明确如何最佳利用这一分子伴侣之前,还有大量工作尚未完成,如在复杂的分子伴侣网络系统中,共分子伴侣如何将 Hsp70 靶向底物,高度保守的 Hsp70 家族中少数碱基的不同所带来的生物学差异,Hsp70 中 Y288 位点磷酸化和去磷酸化的关键介导者,Hsp70 在抗凋亡信号转导途径中与相关蛋白质相互作用的具体机制以及如何合理使用免疫双重性等一些重要的科学问题有待于解决。然而,可以预期的是利用现代生物医学的新方法和新技术,加强 Hsp70 的基础研究,致力解决上述这些科学问题,将会给未来一些疾病的治疗提供新思路和新视角。

### [参 考 文 献]

- [1] Mayer MP, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62: 670-84
- [2] Tiwari S, Thakur R, Shankar J, et al. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi. *Biotechnol Res Int*, 2015, 2015: 132635
- [3] Shiber A, Ravid T. Chaperoning proteins for destruction: diverse roles of Hsp70 chaperones and their co-chaperones in targeting misfolded proteins to the proteasome. *Biomole*, 2014, 4: 704-24
- [4] Li XK, Shao H, Isabelle R, et al. Targeting allosteric control mechanisms in heat shock protein 70 (Hsp70). *Curr Top Med Chem*, 2016, 16: 2729-40
- [5] Chaturvedi SK, Siddiqi MK, Alam P, et al. Protein misfolding and aggregation: mechanism, factors and detection. *Process Biochem*, 2016, 51: 1183-92
- [6] Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. *Microb Cell Fact*, 2015, 14: 41
- [7] Behnke J, Mann M, Scruggs FL, et al. Members of the Hsp70 family recognize distinct types of sequences to execute ER quality control. *Mol Cell*, 2016, 63: 739-52
- [8] Asea A, Kraeft SK, Kurtjones EA, et al. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine.

- Nat Med, 2000, 6 : 435-42
- [9] Multhoff G, Pockley AG, Streffer C, et al. Dual role of heat shock proteins (HSPs) in anti-tumor immunity. *Curr Mol Med*, 2012, 12: 1174-82
- [10] Multhoff G, Pockley AG, Schmid TE, et al. The role of heat shock protein 70 (Hsp70) in radiation-induced immunomodulation. *Cancer Lett*, 2015, 368: 179-84
- [11] Jian L, Jing L, Guo SY, et al. HSP70 inhibitor combined with cisplatin suppresses the cervical cancer proliferation *in vitro* and transplanted tumor growth: an experimental study. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10: 184-8
- [12] Bausero MA, Page DT, Osinaga E, et al. Surface expression of Hsp25 and Hsp72 differentially regulates tumor growth and metastasis. *Tumor Biol*, 2004, 25: 243-51
- [13] Budina-Kolomets A, Basu S, Belcastro L, et al. The Hsp70 family of heat shock proteins in tumorigenesis: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities [M]// In: Wondrak GT ed. *Stress response pathways in cancer: from molecular targets to novel therapeutics*. Netherlands: Springer Sciences, 2015: 203-24
- [14] Coskun KA, Tutar L. Current drug design studies for hsp70 in oncological applications. *Cell Dev Biol*, 2016, 5: 140
- [15] Clare DK, Saibil HR. ATP-driven molecular chaperone machines. *Biopolymers*, 2013, 99: 846-59
- [16] Calderwood SK. Introduction: heat shock proteins—from *Drosophila*, stress proteins to mediators of human disease [M]// In: Calderwood SK eds. *Cell stress proteins. protein reviews*, vol 7. New York: Springer, 2007: 1-4
- [17] Jahangirizadeh Z, Ghafouri H, Sajedi RH, et al. Molecular cloning, prokaryotic expression, purification, structural studies and functional implications of heat shock protein 70 (Hsp70) from *rutilus frisii kutum*. *Int J Biol Macromol*, 2018, 108: 798-807
- [18] Ellison MA, Ferrier MD, Carney SL. Salinity stress results in differential Hsp70 expression in the *Exaiptasia pallida* and *Symbiodinium* symbiosis. *Mar Environ Res*, 2017, 132: 63-7
- [19] Ninomiya H, Ohgami N, Oshino R, et al. Increased expression level of Hsp70 in the inner ears of mice by exposure to low frequency noise. *Hearing Res*, 2018, 363: 49-54
- [20] Kityk R, Kopp J, Sinning I, et al. Structure and dynamics of the ATP-bound open conformation of Hsp70 chaperones. *Mol Cell*, 2012, 48: 863-74
- [21] Clerico EM, Tilitzky JM, Meng W, et al. How hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *J Mol Biol*, 2015, 427: 1575-88
- [22] Craig EA, Marszalek J. How do J-proteins get Hsp70 to do so many different things? *Trends Biochem Sci*, 2017, 42: 355-68
- [23] Kampinga HH, Craig EA. The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11: 579-92
- [24] Mayer MP. Hsp70 chaperone dynamics and molecular mechanism. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38: 507-14
- [25] Balchin D, Hayer-Hartl M, Hartl FU. *In vivo* aspects of protein folding and quality control. *Science*, 2016, 353: aac4354
- [26] Needham PG, Patel HJ, Chiosis G, et al. Mutations in the yeast Hsp70, *sa1*, at P417 alter ATP cycling, interdomain coupling, and specific chaperone functions. *J Mol Biol*, 2015, 427: 2948-65
- [27] Bracher A, Verghese J. The nucleotide exchange factors of Hsp70 molecular chaperones. *Front Mol Biosci*, 2015, 2: 10
- [28] Bauer D, Merz DR, Pelz B, et al. Nucleotides regulate the mechanical hierarchy between subdomains of the nucleotide binding domain of the Hsp70 chaperone DnaK. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112:10389-94
- [29] Alderson TR, Kim JH, Markley JL. Dynamical structures of Hsp70 and Hsp70-Hsp40 complexes. *Structure*, 2016, 24: 1014-30
- [30] Ulbricht A, Eppler FJ, Tapia VE, et al. Cellular mechanotransduction relies on tension-induced and chaperone-assisted autophagy. *Autophagy*, 2013, 23: 430-5
- [31] Petrucelli L, Dickson D, Kehoe K, et al. CHIP and Hsp70 regulate tau ubiquitination, degradation and aggregation. *Hum Mol Genet*. 2004, 13: 703-14
- [32] Qian SB, McDonough H, Boellmann F, et al. CHIP-mediated stress recovery by sequential ubiquitination of substrates and Hsp70. *Nature*, 2006, 440: 551-5
- [33] Connarn JN, Assimon VA, Reed RA, et al. The molecular chaperone Hsp70 activates protein phosphatase 5 (PP5) by binding the tetratricopeptide repeat (TPR) domain. *J Biol Chem*, 2014, 289: 2908-17
- [34] Changeux JP, Edelstein S. Conformational selection or induced fit? 50 years of debate resolved. *F1000 Biol Rep*, 2011, 3: 19
- [35] Chakrabarti KS, Agafonov RV, Pontiggia F, et al. Conformational selection in a protein-protein interaction revealed by dynamic pathway analysis. *Cell Rep*, 2015, 14: 32-42
- [36] Vallurupalli P, Sekhar A, Yuwen T, et al. Probing conformational dynamics in biomolecules *via* chemical exchange saturation transfer: a primer. *J Biomol NMR*, 2017, 67: 1-29
- [37] Anthis NJ, Clore GM. Visualizing transient dark states by NMR spectroscopy. *Q Rev Biophys*, 2015, 48: 35-116
- [38] Sekhar A, Velyvis A, Zoltsman G, et al. Conserved conformational selection mechanism of Hsp70 chaperone-substrate interactions. *Elife*, 2018, 7: 32764
- [39] Lu K, Chen X, Liu W, et al. Characterization of heat shock protein 70 transcript from *Nilaparvata lugens* (Stål): its response to temperature and insecticide stresses. *Pestic Biochem Physiol*, 2017, 142: 102-10
- [40] Cappelletti P, Binda E, Tunesi M, et al. Recombinant human Tat-Hsp70-2: a tool for neuroprotection. *Protein Expres Purif*, 2016, 138: 18-24
- [41] Bunch H, Lawney BP, Burkholder A, et al. RNA polymerase II promoter-proximal pausing in mammalian long non-coding gene. *Genomics*, 2016, 108: 64-77

- [42] Hentze N, Breton LL, Wiesner J, et al. Molecular mechanism of thermosensory function of human heat shock transcription factor Hsf1. *Elife*, 2016, 5: 11576
- [43] Bunch H. RNA polymerase II pausing and transcriptional regulation of the HSP70 expression. *Eur J Cell Biol*, 2017, 96: 739-45
- [44] Radons J. The human HSP70 family of chaperones: where do we stand? *Cell Stress Chaperone*, 2016, 21: 379-404
- [45] Mackenzie TN, Mujumdar N, Banerjee S, et al. Triptolide induces the expression of miR-142-3p: a negative regulator of heat shock protein 70 and pancreatic cancer cell proliferation. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12: 1266-75
- [46] Ouyang YB, Giffard RG. microRNAs regulate chaperone network in cerebral ischemia. *Transl Stroke Res*, 2013, 4: 693-703
- [47] Tu J, Liao J, Luk AC, et al. MicroRNAs mediated targeting on the Yin-yang dynamics of DNA methylation in disease and development. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 67: 115-20
- [48] Morey TM, Roufayal R, Johnston DS, et al. Heat shock inhibition of CDK5 increases NOXA levels through miR-23a repression. *J Biol Chem*, 2015, 290: 11443-54
- [49] Roufayal R, Johnston DS, Mosser DD. The elimination of miR-23a in heat-stressed cells promotes NOXA-induced cell death and is prevented by HSP70. *Cell Death Dis*, 2015, 6: e1546
- [50] Tang W, Liu DF, Kai H, et al. miRNA-mediated regulation of heat shock proteins in human ejaculated spermatozoa. *Turkish J Med Sci*, 2015, 45: 1285-91
- [51] Gaca S, Reichert S, Multhoff G, et al. Targeting by cmHsp70.1-antibody coated and survivin miRNA plasmid loaded nanoparticles to radiosensitize glioblastoma cells. *J Control Release*, 2013, 172: 201-6
- [52] Yin C, Salloum FN, Kukreja RC. A novel role of microRNA in late preconditioning: upregulation of endothelial nitric oxide synthase and heat shock protein 70. *Circ Res*, 2009, 104: 572-5
- [53] Nitika, Truman AW. Cracking the chaperone code: cellular roles for Hsp70 phosphorylation. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42: 932-5
- [54] Truman A, Kristjansdottir K, Wolfgeher D, et al. CDK-dependent Hsp70 phosphorylation controls G<sub>1</sub> cyclin abundance and cell-cycle progression. *Cell*, 2012, 151: 1308-18
- [55] Chen YJ, Lai KC, Kuo HH, et al. HSP70 colocalizes with PLK1 at the centrosome and disturbs spindle dynamics in cells arrested in mitosis by arsenic trioxide. *Archi Toxicol*, 2014, 88: 1711-23
- [56] Liu T, Dean A, Ashwini S, et al. Identification and characterization of a 66-68-kDa protein as a methotrexate-binding protein in murine leukemia L1210 cells. *Cell Stress Chaperones*, 2013, 18: 223-34
- [57] Morgner N, Schmidt C, Beilstedt V, et al. Hsp70 forms antiparallel dimers stabilized by post-translational modifications to position clients for transfer to Hsp90. *Cell Rep*, 2015, 11: 759-69
- [58] Muller P, Ruckova E, Halada P, et al. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances. *Oncogene*, 2013, 32: 3101-10
- [59] Jian L, Jing L, Guo SY, et al. HSP70 inhibitor combined with cisplatin suppresses the cervical cancer proliferation *in vitro* and transplanted tumor growth: an experimental study. *Asian Pac J Trop Med*, 2017, 10: 184-8
- [60] Budinokolomets A, Webster MR, Leu JI, et al. HSP70 inhibition limits FAK-dependent invasion and enhances the response to melanoma treatment with BRAF inhibitors. *Cancer Res*, 2016, 76: 2720-30
- [61] Coto ALS, Seraphim TV, Batista FAH, et al. Structural and functional studies of the *Leishmania braziliensis*, SGT co-chaperone indicate that it shares structural features with HIP and can interact with both Hsp90 and Hsp70 with similar affinities. *Int J Biol Macromol*, 2018, 118: 693-706
- [62] Manos-Turvey A, Brodsky JL, Wipf P. The effect of structure and mechanism of the Hsp70 chaperone on the ability to identify chemical modulators and therapeutics. *Top Med Chem*, 2015, 19: 81-129
- [63] Horowitz S, Koldewey P, Stull F, et al. Folding while bound to chaperones. *Curr Opin Struc Biol*, 2018, 48: 1-5
- [64] Pintoteixeira F, Konstantinides N, Desplan C. Programmed cell death acts at different stages of *Drosophila* neurodevelopment to shape the central nervous system. *FEBS Lett*, 2016, 590: 2435-53
- [65] Lee G, Sehgal R, Wang Z, et al. Essential role of grim-led programmed cell death for the establishment of corazonin-producing peptidergic nervous system during embryogenesis and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Biol Open*, 2013, 2: 283-94
- [66] Kumar S, Singh UP, Scissum GK, et al. Targeting Hsp70: a possible therapy for cancer. *Cancer Lett*, 2016, 374: 156-66
- [67] Duncan EJ, Cheetham ME, Chapple JP, et al. The role of HSP70 and its co-chaperones in protein misfolding, aggregation and disease. *Subcell Biochem*, 2015, 78: 243-73
- [68] Yang X, Wang J, Zhou Y, et al. Hsp70 promotes chemoresistance by blocking Bax mitochondrial translocation in ovarian cancer cells. *Cancer Lett*, 2012, 321: 137-43
- [69] Liu J, Liu J, LI SZ, et al. Inhibiting HSP70 expression enhances cisplatin sensitivity of cervical cancer cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2017, 37: 475-81
- [70] Reeg S, Jung T, Castro JP, et al. The molecular chaperone Hsp70 promotes the proteolytic removal of oxidatively damaged proteins by the proteasome. *Free Radical Biol Med*, 2016, 99: 153-66
- [71] Bobkova NV, Evgen'Ev M, Garbuz DG, et al. Exogenous Hsp70 delays senescence and improves cognitive function in aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 16006-11
- [72] de Toda I M, Vida C, Ortega E, et al. Hsp70 basal levels, a tissue marker of the rate of aging and longevity in mice. *Exp Gerontol*, 2016, 84: 21-8

- [73] Kästle M, Grune T. Proteins bearing oxidation-induced carbonyl groups are not preferentially ubiquitinated. *Biochimie*, 2011, 93: 1076-9
- [74] Pawel S, Dickinson AM. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Dis*, 2012, 2012: 617213
- [75] Zheng Q, Huang C, Guo J, et al. Hsp70 participates in PINK1-mediated mitophagy by regulating the stability of PINK1. *Neurosci Lett*, 2017, 662: 264-70
- [76] Nigro A, Mauro L, Giordano F, et al. Recombinant *Arabidopsis* HSP70 sustains cell survival and metastatic potential of breast cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2016, 15: 1063-73
- [77] Cui X, Xing J, Liu Y, et al. COPD and levels of Hsp70 (HSPA1A) and Hsp27 (HSPB1) in plasma and lymphocytes among coal workers: a case-control study. *Cell Stress Chaperons*, 2015, 20: 473-81
- [78] Sheng L, Tang T, Liu Y, et al. Inducible HSP70 antagonizes cisplatin-induced cell apoptosis through inhibition of the MAPK signaling pathway in HGC-27 cells. *Int J Mol Med*, 2018, 42: 2089-97
- [79] Tang Q, Yuan Q, Li H, et al. miR-223/Hsp70/JNK/JUN/miR-223 feedback loop modulates the chemoresistance of osteosarcoma to cisplatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497: 827-34
- [80] Kaczmarek M, Lagiedo M, Masztalerz A, et al. Concentrations of SP-A and HSP70 are associated with polarization of macrophages in pleural effusions of non-small cell lung cancer. *Immunobiology*, 2017, 223: 200-9
- [81] Wu J, Liu T, Rios Z, et al. Heat shock proteins and cancer. *Trends Pharmacol Sci*, 2017, 38: 226-56
- [82] Cao X, Zhou Y, Sun H, et al. EGFR-TKI-induced HSP70 degradation and BER suppression facilitate the occurrence of the EGFR T790 M resistant mutation in lung cancer cells. *Cancer Lett*, 2018, 424: 84-96
- [83] Mohammadi-Ostad-Kalayeh S, Hrupins V, Helmsen S, et al. Development of a microarray-based assay for efficient testing of new HSP70/DnaK inhibitors. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25c: 6345-52
- [84] Fontaine SN, Martin MD, Dickey CA. Neurodegeneration and the heat shock protein 70 machinery: implications for therapeutic development. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16: 2741-52