

14-3-3:保护性信号转导调节蛋白*

陈晓钎^{1,2} 乌维宁¹ 于常海¹

(¹ 北京大学神经科学研究所,北京 100083;² 华中科技大学同济医学院病理生理学系,武汉 430030)

摘要 14-3-3 蛋白家族是真核细胞中高度保守的可溶性蛋白。在哺乳动物,14-3-3 蛋白主要存在于脑。14-3-3 蛋白与许多蛋白结合,在细胞凋亡、生长、增殖的信号转导过程中发挥关键的调节作用,是细胞内重要的保护性蛋白。14-3-3 蛋白还是一些脑疾病的诊断标志。14-3-3 蛋白有可能成为治疗一些疾病的靶点。

关键词 14-3-3 蛋白;信号转导;调节蛋白;凋亡;脑疾病

中图分类号 Q513; R363

早在 1967 年就发现脑内存在大量、特异的 14-3-3 蛋白,但长期以来 14-3-3 蛋白的功能却是一个谜。近年来,14-3-3 蛋白已成为研究信号转导的一个热点。现有的研究表明:14-3-3 蛋白通过调节细胞内多个信号转导通路而参与多种细胞生命活动的调控。14-3-3 蛋白表达或功能的异常与多种疾病有关。本文结合近年来的研究进展对 14-3-3 蛋白的特点、作用机制和主要功能做一简要综述。

一、14-3-3 蛋白的特点

14-3-3 蛋白是一种酸性可溶性蛋白,等电位点在 4~5 之间。用 SDS/PAGE 凝胶电泳分析得出它的单体分子量范围为 27~32 kD。X 射线对 14-3-3 蛋白结构的分析结果显示未与配体结合的 14-3-3 和 都有一个杯状结构,该杯状结构都含有一个高度保守的凹陷表面。该凹陷表面是一个双亲性凹槽,具有强大的肽链结合能力^[1]。由此不难理解为什么 14-3-3 蛋白能结合许多其他的蛋白。

14-3-3 蛋白家族成员高度保守,如酵母的 14-3-3 蛋白(BMH1)和人的 14-3-3 在氨基酸序列水平上有近 70%的相似性(Aitken 等,1992),提示在真核细胞 14-3-3 蛋白具有重要且保守的功能。自然状态下 14-3-3 蛋白主要以同源或异源二聚体存在。14-3-3 蛋白的 N-末端约 26 个氨基酸残基组成的结构域可能在 14-3-3 蛋白的二聚化中发挥了重要作用。最近发现 14-3-3 在其第 58 个氨基酸残基位点(丝氨酸-58, Ser-58)的磷酸化是导致 14-3-3 二聚体解体的重要原因^[2],这提示 14-3-3 双体的形成与其去磷酸化有关。

二、14-3-3 蛋白的表达

14-3-3 蛋白在很长一段时间内被认为是脑特异的蛋白,因为在脑组织中 14-3-3 蛋白含量最高,约占脑可溶性蛋白的 1% (Boston 等,1982)。现在已经清楚 14-3-3 蛋白存在于所有的真核细胞中。已知哺乳动物细胞有 7 个 14-3-3 同工蛋白(、、、、和)。编码这些同工蛋白的基因分别位于不同的染色体,它们在组织中的表达谱有很大的差异。14-3-3 在很多组织都有表达,但在淋巴组织(如胸腺和脾)表达最高。14-3-3 在脑组织的表达范围较广泛,表达水平在大鼠出生后随年龄逐渐增加(Watanabe 等,1993)。14-3-3 的表达与 有很大的不同,主要表达于脑,在小鼠其表达随出生后下降;在其它的组织如心、肝、脾、肺、肾 14-3-3 表达极低(图 1-a)^[3]。我们用原代培养的小鼠大脑皮质星形胶质细胞证明 14-3-3 基因和蛋白(图 1-b)在神经胶质细胞也有表达^[3,4],因此 14-3-3 蛋白不是神经元特有的。由于 14-3-3 在星形胶质细胞的表达远低于神经元,这就解释了为什么原位杂交结果显示 主要表达于神经元集中区。在脑组织的表达较其他组织为高,表达区域与 相近;在各种组织中表达水平相近,遍及于整个中央神经系统的灰质中;主要在 T 细胞和睾丸中表达;而 则主要表达于上皮细胞中。不同类型的 14-3-3 在不同组织或细胞中表达的差异提示不同的 14-3-3 同工蛋白可能有其独特的功用。

14-3-3 蛋白在不同的细胞中其亚定位也有很大的不同。在大多数细胞,14-3-3 主要分布在胞质,与很多胞质信号转导蛋白结合。如 14-3-3 蛋白在星

* 国家自然科学基金(30270426)和北京市自然科学基金(7032026)资助课题

星胶质细胞主要分布于胞质并且与 Raf (图 1-c)^[3,4]、Bad 等信号转导蛋白结合。但在某些细胞, 14-3-3 蛋白可有特殊的分布形式。如在神经元有近 40% 的 14-3-3 分布在细胞膜(主要是突触中囊泡的膜)(Martin 等, 1994)。在膜上, 14-3-3 蛋白可与许多分子如磷脂(Roth 等, 1994)、膜蛋白(如糖皮质激素受体)^[5]和细胞骨架蛋白^[4]等结合。最近, 我们发现

14-3-3 蛋白在同一种细胞内既可以呈均匀点状分布, 也可以呈纤维丝状甚至堆积成块状, 这种分布形式的改变与细胞所处的不同细胞周期或细胞是否损伤有关^[3]。这表明 14-3-3 蛋白在细胞内有很大的活动性。考虑到 14-3-3 蛋白可以结合许多的其他蛋白, 14-3-3 蛋白分布的改变必然影响许多其他蛋白的亚细胞定位。

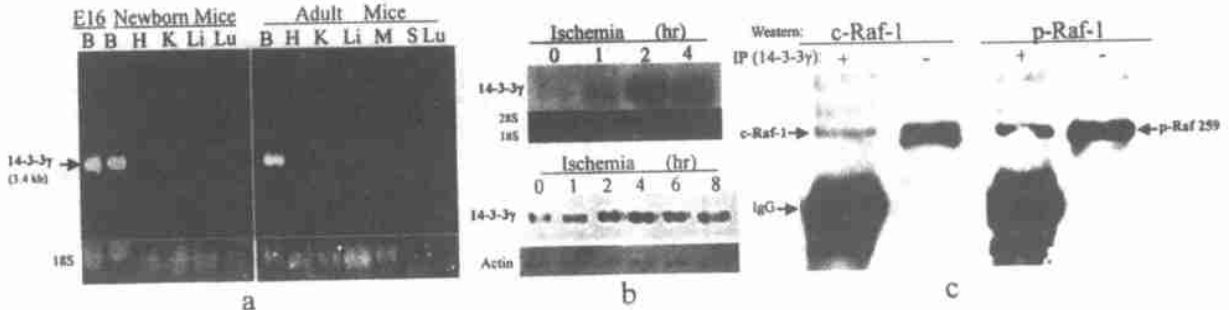


图 1 14-3-3 的表达与功能

a: Northern 结果显示 14-3-3 (3.4 kb) 在小鼠组织中的表达; B: 脑; H: 心; K: 肾; Li: 肝; Lu: 肺; M: 肌肉; S: 胃。
 b: Northern (上) 和 Western (下) 结果分别显示 14-3-3 基因和蛋白在缺血损伤的星形胶质细胞中的表达。
 c: 免疫共沉淀结果显示星形胶质细胞内源性 14-3-3 与 Raf 蛋白结合。(摘自文献^[3])

三、14-3-3 蛋白的作用机制

14-3-3 蛋白是通过与其它蛋白相结合来发挥其独特的作用。14-3-3 蛋白结合范围比任何已知的其他蛋白都广得多。已知的 14-3-3 蛋白配体有 100 多种, 而这一数目还在不断增加。与 14-3-3 蛋白结合的磷酸化蛋白中很大一部分有 RSXpSXP 或 RXXXpSXP 序列(X 代表任意氨基酸, pS 代表磷酸化的丝氨酸)。从以上 14-3-3 蛋白结合的基序可以看出 14-3-3 蛋白的结合要求很低, 只有 3-4 个氨基酸序列是固定的, 由此不难理解为什么 14-3-3 蛋白有很广的蛋白结合谱。除此之外, 14-3-3 蛋白还可以结合一些不含以上基序的磷酸化蛋白以及许多非磷酸化蛋白。

14-3-3 蛋白通过结合其他蛋白可以起到以下几个方面的作用: (1) 改变其配体与其他蛋白结合的能力, 如 ISR-1 与 14-3-3 蛋白结合后其激活 PF3 激酶的能力被减弱; (2) 改变其配体的亚细胞定位, 如 14-3-3 蛋白与 Cdc25 结合后可以阻断 Cdc25 的核易位, 从而使细胞周期中止; (3) 易化其配体与蛋白间的相互作用, 这一作用被 Raf-PKC 及 Raf-A20 间的相互作用所证明; (4) 改变其配体的催化活性, 如 Raf 与 14-3-3 蛋白结合后其丝氨酸和酪氨酸羟化酶激酶活性有所增强; (5) 保护其配体不被去磷酸化或水解。14-3-3 的上述作用对某一个具体的 14-3-3 配体来说

可以同时存在 (Tzivion 等, 2001)。如 14-3-3 与磷酸化的 Bad 结合即可以保护 Bad 不被去磷酸化又阻断了 Bad 进入线粒体同 Bcl-X_L 的结合。另外, 一些 14-3-3 配体可以有几个 14-3-3 蛋白结合位点, 如已知 Raf^[6]和 Bad 有 3 个不同的 14-3-3 结合位点, 这些不同的 14-3-3 结合位点是否与 14-3-3 不同的作用机制有关还不清楚。

14-3-3 如此强大的蛋白结合能力及其多样化的功能提示 14-3-3 蛋白可能是细胞内处理蛋白间相互作用的中心。我们在星形胶质细胞中发现 14-3-3 蛋白有特殊的环状结构^[4], 这可能就是 14-3-3 蛋白处理各种信号的中心。14-3-3 蛋白不仅调控许多关键的信号蛋白如 Raf、Bad、Cdc25 和 PKC 等的信号转导(图 2), 而且可以作用于同一信号通路上不同的信号蛋白。另外, 14-3-3 蛋白以二聚体形式存在, 这样它就可以同时结合两个不同的信号分子, 协调不同的信号转导通路。14-3-3 蛋白如何在细胞内有条不紊地协调如此众多蛋白之间的相互作用还是一个谜。我们推测这可能与 14-3-3 蛋白同细胞骨架蛋白的联系有关。已经知道 14-3-3 蛋白可以与中间丝、肌动蛋白以及多种调控细胞骨架蛋白组装的蛋白酶如 PKC、-Catanin 等结合, 而 14-3-3 蛋白在细胞内的动态分布可以改变与它结合的蛋白的分布。通过细胞骨架 14-3-3 蛋白就有可能按功能需求把各种蛋白

聚集在一起发挥作用,成为细胞内的信息处理中心。

四、14-3-3 蛋白的生物学功能及其在信号转导通路中的作用

最近的一些研究表明,14-3-3 蛋白在细胞生长、增殖和凋亡过程中具有重要的作用。14-3-3 的这些生理功能与 14-3-3 蛋白同一些重要的信号转导蛋白间的结合有关(图 2)。

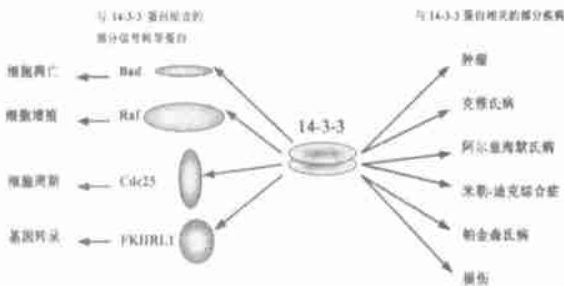


图 2 14-3-3 蛋白在信号转导中的作用及与其相关的疾病

14-3-3 对真核生物的生长、发育十分重要。在酵母,如果删除一个 14-3-3 基因,则出现酵母的发育和形态异常(Cognetti 等, 2002);若删除全部两个 14-3-3 基因则导致酵母死亡。对线虫的研究也发现,14-3-3 基因对于胚胎早期的发育是必需的(Morton 等, 2001),14-3-3 蛋白的异常分布导致许多其他发育相关蛋白的分布异常。

14-3-3 蛋白是抑制细胞凋亡的一个极为重要的蛋白。在 Cos7 细胞中表达一个特异抑制 14-3-3 与其它蛋白之间相互作用的多肽就可以诱发细胞的凋亡^[7],表明细胞内源性 14-3-3 蛋白与其他蛋白间的相互作用其总的结果是对抗凋亡的。另外,在成纤维细胞中发现,过量表达显性负突变的 14-3-3 显著加速细胞在紫外线照射时的凋亡(Xing 等, 2000)。最近,我们也发现 14-3-3 蛋白在缺血损伤的星形胶质细胞中有抑制凋亡的作用。

14-3-3 蛋白抑制凋亡的机制可能与其同许多蛋白如 Bad、FKHR1、Ask1、MEKK 或 A20 等的结合有关。在所有的 14-3-3 配体中,Bad(Bcl-2 相关死亡蛋白)在细胞凋亡的信号转导中作用最明确,它是连接胞内存活/凋亡信号与线粒体凋亡机制的重要环节。在正常细胞,Bad 分布在胞质;当有凋亡信号时,Bad 进入线粒体与 Bcl-X_L 或 Bcl-2 结合而促进细胞凋亡。现在已经清楚,14-3-3 与磷酸化的 Bad 结合对阻断 Bad 进入线粒体与 Bcl-X_L 的结合是必需的。在

不同的研究体系,14-3-3 蛋白与不同形式的磷酸化 Bad(p-Bad 112、p-Bad 136 和 p-Bad 155) 结合起到抗凋亡的作用(Zha 等, 1996, Tan 等, 2000),这表明由 14-3-3 蛋白调节的 Bad 所介导的凋亡信号转导机制是复杂的。最近,我们发现在缺血损伤的星形胶质细胞中,14-3-3 蛋白主要是通过结合 p-Bad 112 抑制细胞凋亡,而不是结合 p-Bad 136 或 p-Bad 155。目前,14-3-3 蛋白调控 Bad 信号转导的详情还不甚清楚。

五、14-3-3 蛋白与疾病

现在,越来越多的证据表明 14-3-3 蛋白表达或功能的异常与多种疾病有关(图 2)。尽管在疾病的发病过程中 14-3-3 蛋白的作用机制还远不清楚,但相信这与 14-3-3 蛋白在信号转导中的作用有关。

研究发现 14-3-3 的异常表达与肿瘤有关。在各型肺癌中均可以检测到 14-3-3 蛋白的高水平表达(Nakanishi 等, 1997)。在对化学药物耐受的黑色素瘤细胞中 14-3-3 蛋白是四个特异增高的蛋白中的一个。14-3-3 蛋白可能通过 MT(Polyomavirus middle T antigen)(Cullere 等, 1998)、胰岛素样生长因子 I 受体(Craparo 等, 1997)等对肿瘤的生长起作用。在 MT 缺陷性突变小鼠,14-3-3 不能与 MT 蛋白结合,小鼠很难被诱发而产生唾液腺瘤。在肿瘤细胞中表达抑制 14-3-3 与其它蛋白之间相互作用的多肽可诱导肿瘤细胞凋亡。靶向 14-3-3 蛋白有望为治疗肿瘤开辟一个新途径。14-3-3 蛋白在细胞周期调控中的作用已经很明显,这可能与 14-3-3 蛋白在肿瘤细胞中的作用有关。如在结直肠癌细胞,14-3-3 与 Cdc2/ cyclin B1 复合体间的相互作用可使癌细胞中止于 G₂ 期(Osada 等, 2002)。

14-3-3 蛋白与神经系统疾病之间的联系受到更多的关注,因为脑是 14-3-3 蛋白表达的主要场所。如在阿尔采末病(AD)和唐氏综合征患者的一些脑区,14-3-3 蛋白的表达显著增多(Burkhard 等, 2001);而在 Miller-Dieker 综合征患者,14-3-3 基因所在染色体区(17p13.3)缺失,这一缺失与 Miller-Dieker 综合征症状的进展密切相关(Hirotsume 等, 1997)。最近,有关 14-3-3 蛋白在神经系统疾病中的作用机制也有重要进展。研究发现,在帕金森病,14-3-3 与 Tau 蛋白结合,这使 14-3-3 蛋白不能发挥其抗凋亡作用^[8]。在 I 型脊髓小脑共济失调,14-3-3 蛋白与该疾病的特征蛋白 ataxin-1 结合而使该蛋白降解速度减慢,从而增加了 ataxin-1 的神经毒性^[9]。

近年来,14-3-3 蛋白在脑脊液中的检测还被认

为是诊断脑损伤、判断脑疾病预后的一个指标。14-3-3 不是分泌型蛋白,在正常人脑脊液中检测不到;但在老年痴呆、克雅氏病(Aksamit 等, 2001, Saiz 等, 1999)、多发性硬化症^[10]、细菌性脑膜炎(Bonora 等, 2003)等患者的脑脊液中,14-3-3 蛋白不仅可以被检测到,而且其量的多少还与这些脑疾病的病情呈正相关。目前,许多神经系统疾病还缺乏有效的早期诊断方法。如多发性硬化症,最好的诊断仍是对中枢神经系统的 MRI 扫描,但只能预测 11%~80% 的病情进展。研究发现,所有在脑脊液中检测到 14-3-3 蛋白的多发性硬化症病人都伴有严重的中枢神经系统损伤;而所有检测不到 14-3-3 蛋白的病人都没有严重的中枢神经系统损伤。检测 14-3-3 蛋白有可能成为预测多发性硬化症疗效、预后的一个指标^[10]。

14-3-3 蛋白在一些脑疾病中的改变很可能与脑细胞的损伤有关。已知 14-3-3 基因/蛋白的表达受各种不同的损伤因素(如紫外线、机械性损伤、化学性损伤和代谢性损伤等)所诱导,如脊髓的压迫性损伤诱导 14-3-3 表达的上调(Springer 等, 2000),缺血性损伤诱导 14-3-3 的表达^[3]。14-3-3 表达受损伤诱导可能是 14-3-3 在真核细胞进化过程中的一个保守功能。14-3-3 不仅受损伤诱导,而且对损伤非常敏感。利用星形胶质细胞,我们研究了 14-3-3 蛋白在缺血损伤整个过程中的变化。14-3-3 基因及其蛋白的表达在缺血损伤早期(1 小时)就升高 1 倍多,而此时其它的细胞损伤指标如 LDH 释放、细胞形态改变还都不明显。随着缺血损伤的加重(1~4 小时),14-3-3 蛋白的表达持续升高(图 1-b)。当损伤继续时,绝大部分细胞都会死亡(6~8 小时),但在所有存活的细胞中,14-3-3 蛋白含量都是很高的^[4]。这提示 14-3-3 蛋白对损伤细胞的存活是必要的。14-3-3 蛋白通过多种机制来保护细胞。如前所述,14-3-3 蛋白与 Bad、FKHR1、Ask1、MEKK、Cdc25 和 p53 等结合,从而通过不同的信号转导途径对细胞产生保护作用。除此之外,14-3-3 蛋白与其它蛋白的结合还能保护这些蛋白不被降解。我们发现,在缺血损伤的诱导下,14-3-3 蛋白很快形成粗大的条索状结构,包围着肌动蛋白纤维;但在凋亡细胞,14-3-3 蛋白则与肌动蛋白分离^[4]。这些结果表明,14-3-3 蛋白可以通过保护细胞的骨架蛋白而保护细

胞。到现在为止,还没有关于 14-3-3 蛋白破坏性作用的报道。

六、结语

14-3-3 蛋白可以与许多蛋白结合,为多功能蛋白,但 14-3-3 的本质功能还不清楚。研究 14-3-3 蛋白对理解细胞内蛋白或信号转导相互作用的网络有重要意义。14-3-3 蛋白与多种脑疾病有关,深入认识 14-3-3 蛋白可能为治疗一些脑疾病开辟新思路。

参 考 文 献

- 1 Xiao B, Smerdon SJ, Jones DH, et al. Structure of a 14-3-3 protein and implications for coordination of multiple signalling pathways. *Nature*, 1995, 376: 181~191.
- 2 Woodcock JM, Murphy J, Stomski FC, et al. The dimeric versus monomeric status of 14-3-3zeta is controlled by phosphorylation of Ser58 at the dimer interface. *J Biol Chem*, 2003, 278: 36323~36327.
- 3 Chen XQ, Chen J, Zhang Y, et al. 14-3-3gamma is upregulated by in vitro ischemia and binds to protein kinase Raf in primary cultures of astrocytes. *Glia*, 2003, 42: 315~324.
- 4 Chen XQ, Yu ACH. The association of 14-3-3g and actin plays a role in cell division and apoptosis in astrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296: 657~663.
- 5 Kino T, Souvatzoglou E, De Martino MU, et al. Protein 14-3-3sigma interacts with and favors cytoplasmic subcellular localization of the glucocorticoid receptor, acting as a negative regulator of the glucocorticoid signaling pathway. *J Biol Chem*, 2003, 278: 25651~25656.
- 6 Dumaz N, Marais R. Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem*, 2003, 278: 29819~29823.
- 7 Masters SC, Fu H. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *J Biol Chem*, 2001, 276: 45193~45200.
- 8 Xu J, Kao SY, Lee HJ, et al. Dopamine-dependent neurotoxicity of alpha-synuclein: a mechanism for selective neurodegeneration in Parkinson disease. *Nature Med*, 2002, 8: 600~606.
- 9 Chen HK, Fernandez Funez P, Acevedo SF, et al. Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell*, 2003, 113: 457~468.
- 10 Satoh J, Yukitake M, Kurohara K, et al. Detection of the 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid of Japanese multiple sclerosis patients presenting with severe myelitis. *J Neurol Sci*, 2003, 212: 11~20.