

综述与专论

氧化应激与 cfos 和 cjun 转录和 AP-1 激活

陈 媛 周 玫

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 激活剂蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 是近年来受到关注的与氧化应激基因表达调控有关的转录因子. 文章就氧化应激与 cfos 和 cjun 基因表达, AP-1 的激活, AP-1 对氧化应激反应的调控, AP-1 与亲电子反应元件等有关内容作了简要的综述.

关键词 cfos, cjun, AP-1, 氧化应激, 转录因子

大量研究说明, 活性氧作为第二信使激活转录因子可能是细胞对外环境刺激的反应以调控基因表达的普遍机制. 在原核细胞, 调节蛋白 OxyR 和 SoxR 能特异性地分别受到 H_2O_2 和 O_2^- 激活. 激活的 OxyR 由还原型转变为氧化型, 将氧化应激信号 (H_2O_2) 转导给 RNA 聚合酶, 诱导 oxyR 调节子基因的表达. 这些基因有: 过氧化氢酶基因 katG、烷氢过氧化物还原酶基因 ahpC、ahpF 以及谷胱甘肽还原酶基因 gorA 等. O_2^- 激活的 SoxR 触发 soxS 基因表达, SoxS 含量增加, 诱导 soxRS 调节子基因表达, 其中包括 MnSOD 基因 sodA, DNA 修复酶内切酶 IV 基因 nfo、G6pD 基因 zwf 等^[1]. 近年来已有报道说明, 真核细胞中的转录因子核因子 Kappa B (NF- κ B) 可以受到很多诱导剂激活. 它们激活 NF- κ B 有一条共同的道路, 通过 H_2O_2 生成. 这现象似乎说明与原核细胞 OxyR 调节蛋白相类似^[2]. 激活剂蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 是近年受到大家注意的与氧化应激基因表达调控有关的又一转录因子. 对氧化应激基因表达调控机理的阐明将从基因水平揭示活性氧在某些疾病发生发展中的作用. 本文就氧化应激与 cfos 和 cjun 基因表达以及转录因子 AP-1 激活的有关内容作一简要综述.

1 氧化应激与 cfos 和 cjun 基因表达^[3~8]

cfos 和 cjun 基因都属于立早基因家族 (immediate early gene family) 或感受态基因家族 (competence gene family), 也有称谓早期反应基因 (early response gene). 其特点是静止细胞受到有丝分裂原刺激能很快地瞬时性地增强表达. 除分裂原外也可受到其他诱导剂诱导.

细胞受到 O_2^- 作用, cfos 和 cjun 表达增高, 其时间过程是: cfos 先于 cjun, cfos 15 min 即见表达增加, 30 min 达高峰, 3 h 回到组成性表达水平; cjun 30 min 表达增加, 2 h 达高峰, 3 h 仍比组成性表达水平高^[4]. H_2O_2 和佛波醇豆蔻酸醋酸酯 (PMA 或 TPA) 有类似的作用. 其他刺激剂虽也都可诱导 cfos 和 cjun 基因表达, 但它们表达的时程、程度和高峰出现时间则不完全相同, 如紫外线 (UV) 诱导 cjun 表达先于和强于 cfos, 30 min cjun mRNA 明显增加, 90 min 达最高值; 电离辐射诱导 cjun 和 cfos 表达最大值都是在 180 min, 至 24 h 恢复到对照水平. 大多数细胞 cfos 和 cjun 的基础表达水平是低的.

蛋白质合成抑制剂放线菌酮(cycloheximide)对刺激剂诱导 cfos 和 cjun 表达不但无抑制作用,而且有增强作用,即超诱导作用(superinduction).这说明 cfos 和 cjun 基因表达不需要合成新的蛋白质.

已有很多事实说明,活性氧生成是生长因子或 TPA 正性调控细胞生长的最早事件.活性氧 O_2^- 、 H_2O_2 和其他氧化剂都能作为休止细胞的有丝分裂刺激剂,诱导 DNA 合成和转录,激活立早基因 cfos 和 cjun 等.静止细胞经血小板生长因子或 TPA 处理后 10 min 即有内源性 H_2O_2 生成增加.

大部分刺激剂通过激活细胞蛋白的磷酸化将信号转导给核. Nose 等^[5]用蛋白激酶抑制剂的研究揭示:对 cAMP 依赖性蛋白激酶和蛋白激酶 C (PKC) 都有抑制作用的 H7 能完全抑制 H_2O_2 对 cfos 和 cjun 的诱导作用;对 PKC 的抑制作用大于 H7 的 H9 对 cfos 无抑制作用,对 cjun 只有轻微的抑制作用;事先用 TPA 处理 24 h 能下调 PKC 活性和钝化 PKC 信号传递通路,但这样处理对 H_2O_2 对 cjun 的诱导作用没有影响,对 cfos 的诱导作用还有所增强; H_2O_2 与细胞温育并不增加 PKC 基质 P80 的磷酸化.结果说明, H_2O_2 诱导 cfos 和 cjun 基因表达是通过激活对 H7 敏感的不同于 PKC 的蛋白激酶.最近 Devary 等^[6]对 UV 激活 cjun 转录机制研究揭示,UV 能刺激 Hela S3 细胞 cJun 蛋白磷酸化;Ha-Ras 和 Raf-1 参与 UV 诱导 cjun 启动子活性;酪氨酸激酶参与信号转导以及 N-乙酰-半胱氨酸(NAC)能抑制 UV 对 cjun 的诱导作用和酪氨酸激酶活性.结果提示 UV 刺激 cjun 转录的机制是首先激活 Src 酪氨酸激酶,随后激活 Ha-Ras 和 Raf-1,信号传递级联(signalling cascade)导致位于 cJun 反式激活结构域上的 Ser-63 和 Ser-73 两个丝氨酸残基磷酸化,增强 cJun 蛋白活性,激活 cjun 基因转录. cfos 的转录激活也可能是通过类似的机制使 cFos 蛋白磷酸化^[3].已有报道,B 细胞的酪氨酸激酶 P72^{src}和 T 细胞酪氨酸激酶 ZAP-70 对活性氧有很高的反应性^[8].

2 AP-1 的激活^[9~12]

cfos 和 cjun 的基因产物 cFos 和 cJun 蛋白的功能是通过结合成二聚体 AP-1 作为转录调节蛋白,将细胞外刺激信号转导给细胞核,激活 AP-1 位点的靶基因转录.虽然激活 cfos 和 cjun 基因转录的最初一步不需要合成新的蛋白,但对 AP-1 活性的增加则需要蛋白合成.因为需要新的 cFos 和 cJun 蛋白形成 AP-1,这对激活 AP-1 位点靶基因是必需的. AP-1 位点原先是在病毒和细胞基因的调控区发现的,所用的诱导剂是 TPA.因此 AP-1 位点又称 TPA 反应元件(TPA response element, TRE),位于靶基因的启动子中,其共同序列为 TGACTCA.

对 Fos 和 Jun 缺失和点突变对蛋白二聚体形成和与 DNA 结合的影响研究说明, Fos 和 Jun 通过亮氨酸拉链(leucine zipper)结构域平行地相互作用形成二聚体.二聚作用还可使二个蛋白质保守的碱性氨基酸区并列形成一个由两部分碱性区构成的 DNA 结合功能区.

Abate 等^[11]发现一种核因子能刺激 Fos 和 Jun DNA 结合活性.这因子既不结合于 Fos-Jun 二聚体,又不结合于 AP-1 位点,说明它的调节作用是间接的.这因子能受到巯基修饰剂的抑制,高浓度的还原剂可以使抑制作用部分消除,可能是核因子对 Fos 和 Jun 中的关键性半胱氨酸残基的还原作用.这氨基酸残基可能与蛋白二聚体 DNA 结合活性有关.考虑到 Fos 和 Jun 亮氨酸拉链和邻近碱性区是为 DNA 结合所必需,截取含有亮氨酸拉链和 DNA 结合功能区的 Fos 和 Jun 多肽(Fos116~211, Jun224~334)进行试验,其中一个半胱氨酸 C_1 位于碱性区,另一个 C_2 位于亮氨酸拉链 COOH 末端(图 1).在 Fos 和 Jun 形成二聚体前加入特异性巯基修饰剂 N-ethylmaleimide (NEM)能抑制二聚体 DNA 结合活性,当蛋白质与含有 AP-1 位点的核苷酸温育后加入 NEM 不影响二聚体 DNA 结合活性,说明两个蛋白质的半胱氨酸残基贡献于 DNA 结合.

对 Fos 和 Jun 点突变试验进一步说明 C₁ 是必需的. C₁ 半胱氨酸是高度保守的 3 个氨基酸 Lys、Cys、Arg 序列的中间的一个, 在 cfos 和 cjun 基因家族中是不变的. 这特殊的局部环境使半胱氨酸残基的反应性增加几个数量级, 局部的碱基环境使它对氧化更敏感.

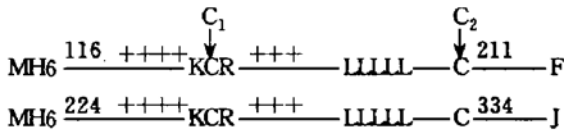


图 1 在 Fos 和 Jun 亮氨酸拉链和碱性 DNA 结合结构域中的半胱氨酸残基的位置

亮氨酸拉链 (LLLLL) 和碱性区 (+++++) 在 Fos 氨基酸 116 到 211 内; 在 Jun 氨基酸 224 到 334 内.

Xanthoudaki 等^[12]从 Hela 细胞核提取物中纯化和鉴定了一种 37 ku 蛋白 Ref-1, 相当于 AP-1 氧化还原因子, 发现硫氧还蛋白存在

可使 AP-1 DNA 结合活性增加 3~4 倍, 硫氧还蛋白能使 Ref-1 活性再生. 但在没有 Ref-1 的情况下, 它对 AP-1 DNA 结合活性无激活作用. 因此 Ref-1 是 AP-1 的电子供体, 参与氧化还原. 可能 AP-1 氧化还原信号通路包括几个还原 Ref-1 的成分. 在体内硫氧还蛋白是否能再生 Ref-1 活性, 尚不清楚, 但可以肯定其在体外不能取代 Ref-1 活性.

3 AP-1 对氧化应激反应的调控

氧化应激诱导 cfos 和 cjun 基因表达和 AP-1 转录因子形成. AP-1 与 AP-1 位点结合介导特异性基因表达 (图 2) 和引起细胞增生、分化等. H₂O₂ 和 UV 处理细胞, 激活 cfos 和 cjun 基因表达和 AP-1 形成, 诱导胶原酶和金属硫蛋白^[3].

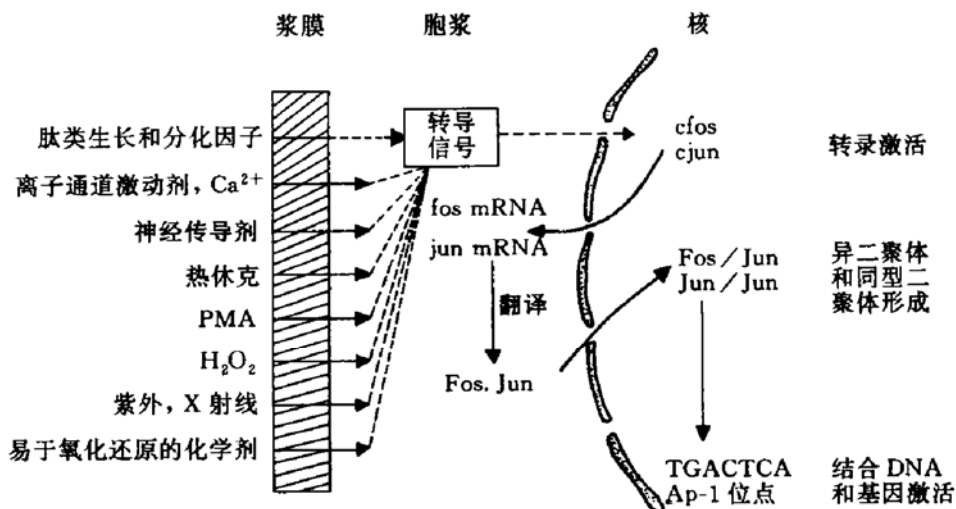


图 2 各种刺激剂诱导 cfos 和 cjun 基因表达、Fos-Jun 二聚体形成及其对含有 AP-1 位点的靶基因表达调控

Liang 等^[13]揭示药物代谢酶 II 期酶谷胱甘肽硫转移酶 (GST)、葡萄糖醛酸转移酶、NAD(P)H 醌还原酶及抗氧化酶 CuZnSOD、硒谷胱甘肽过氧化物酶、谷胱甘肽还原酶和葡萄糖 6 磷酸脱氢酶是在一个共同的基因控制下, 它们的含量能协同地被调节以对氧化应激反应. 在含有 Albino (c) Locus 白化病位点的染色体上载有辐射诱导的纯合子缺失 1.2 centimorgan

的 14COS/14COS 小鼠肺中, 所有这 7 个酶的活性都增加, 推测可能存在调节染色体 7 基因的蛋白产物, 一个反式作用负性因子, 调控涉及细胞对氧化应激反应的基因. 这基因作者命名为 Nmo-in, 能编码提高上述酶活性基因的反式作用负性因子. 这个基因二个等位拷贝的缺失引起负性调控, 氧化应激酶成为组成性表达. 编码氧化应激反应的主开关 (master

switch) 调节子基因尚待进一步确定. 从现有资料看, 较多的是有关氧化应激对原癌基因 *cfos* 和 *cjun* 表达的影响, 但进一步联系到 AP-1 激活和靶基因特别是抗氧化酶基因的表达式的研究还仅仅是开始, 急待深入.

4 AP-1 与亲电子反应元件^[3]

最近研究说明, Fos 和 Jun 转录因子亦参与化学应激反应. 一些化学物质如平面芳香族化合物 (planar aromatic compounds) (类黄酮、多环芳香烃、偶氮染料)、酚性抗氧化剂、双香豆素、芳香异硫氰酸酯和吡啶等, 尽管它们的结构不同, 但它们都能使细胞药物代谢酶 II 期酶 GST、葡萄糖醛酸转移酶和 NAD (P) H 醌还原酶活性升高. 这些酶的主要作用是防止化学应激和致癌作用. 现在知道这些结构无关的化合物通过不同的代谢途径和不同的机制产生活性氧 (如形成醌类物质通过氧化还原环生成活性氧, 或抑制线粒体中电子传递链, 或抑制抗氧化酶等使活性氧增加). 其中平面芳香族化合物是通过与胞浆 Ah 受体结合转位至核内, 然后与特异性增强子序列外源性物质反应元件 (xenobiotic response element, XRE) (5' - TCGGTG-3') 作用, 诱导药物代谢酶 I 期酶细胞色素 P₄₅₀ 基因表达. 细胞色素 P₄₅₀ 将平面芳香族化合物代谢成易氧化还原的酚类或醌类物质, 成为 II 期酶基因的诱导剂. II 期酶诱导剂中的大多数是亲电子化合物, 具有类似于 GST 基质的结构特征.

对小鼠 GST_{ya} 基因顺式调节元件的研究发现, 存在亲电子反应元件 (electrophile response element, EPRE), 它含有 9 bp 的重复序列, 相互间隔 6 bp (TGACA (A/T) (A/T) GC TAATGGTGA (A/T) (A/T) GC). 这两个相邻的 9 bp 基元实际上是 AP-1 位点 (TGACTCA) 的变体. 实验证实 AP-1 二聚体是 EPRE 的识别因子, 它的丰度和活性用亲电子剂处理是增加的. 用凝胶移动分析说明, 合成的 cFos 和 cJun 协同地与 EPRE 反应. Fos 和 Jun 反式激活作用已在 EPRE_{ya} CAT

构建物与 *cfos* 和 *cjun* 表达载体的共转染细胞中得到证实. 这细胞无内源性 AP-1, EPRE 无基础性和诱导性活性, 外源性 cFos 和 cJun 能增加 EPRE 基础活性达 100 倍. cJun-cJun 二聚体无激活作用. EPRE 的诱导性高于单个 AP-1 位点的诱导性.

前已提及 H₂O₂ 及其他过氧化物对真核细胞转录因子 NF- κ B 的激活有一定的特异性, 这与原核细胞 OxyR 调节蛋白的激活相类似. 最近 Maki 等^[4]的研究揭示, O₂⁻ 诱导 *cfos* 基因表达并有明显的量效关系; H₂O₂ 对 *cfos* 基因表达无诱导作用; SOD 能抑制 O₂⁻ 对 *cfos* 表达的诱导作用, CAT 则无这种作用. 这结果似乎说明 cFos 蛋白与原核细胞的另一调节蛋白 SoxR 相类似, 它们都只受 O₂⁻ 激活. 同时, O₂⁻ 诱导 *cfos* 基因表达, cFos 含量增加, 其与 cJun 形成异二聚体 AP-1, 激活靶基因表达, 在原核细胞受到 O₂⁻ 激活的 SoxR 诱导 SoxR 表达使 SoxS 含量增加, 由此激活 SoxSR 调节子表达. 它们似乎都有类似的级联反应. 由于 O₂⁻ 在细胞内能被歧化生成 H₂O₂, 因此, O₂⁻ 应激时两种转录因子 NF- κ B 和 AP-1 常同时被激活. 这给正确认识两种转录因子调控靶基因表达增加了困难. 同时已有很多文献报道, H₂O₂ 能诱导 *cfos* 和 *cjun* 基因表达和 AP-1 激活, 这些矛盾结果都有待深入研究.

参 考 文 献

- 1 陈 媛, 周 玫. 生命的化学, 1994; 14 (6): 3
- 2 Schreck R, Albermann K, Baeuerle P A. Free Rad Res Comms, 1993; 17 (4): 221
- 3 Daniel V. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1993; 28 (3): 173
- 4 Maki A, Berezesky I K, Faranoli J *et al.* FASEB J, 1992; 6: 919
- 5 Nose K, Shibamura M, Kikucki K *et al.* Eur J Biochem, 1991; 201: 99
- 6 Devary Y, Gottlieb R A, Lau L F *et al.* Oncogene, 1990; 5: 1025
- 7 Sherman M L, Datta R, Hallahan D E *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1990; 87: 5663
- 8 Schieven L G, Kirihaara J M, Geahlen R L *et al.* Free Rad Biol Med, 1993; 15 (5): 546

- 9 Turner R, Tjian R. Science, 1989; **243**: 1689
- 10 Gentz R, Rauscher F J, Abate C *et al.* Science, 1989; **243**: 1695
- 11 Abate C, Patel L, Rauscher F J *et al.* Science, 1990; **249**: 1157
- 12 Xanthoudaki S, Curran T. EMBO J, 1992; **11** (2): 653
- 13 Liang H C L, Shertzer H G, Nebert D W. Biochem Biophys Res Comm, 1992; **182** (3): 1160

Relation of Oxidative Stress to the Transcription of cfos and cjun Genes and the Activation of AP-1. Chen Yuan, Zhou Mei (*Research Laboratory of Free Radical Medicine, The First Military Medical University of PLA,*

Guangzhou 510515, China).

Abstract Activator protein 1 (AP-1) is a transcription factor that is recently interested and related to the regulation of genes expression induced by oxidative stress. The contents about the relation of oxidative stress to cfos and cjun genes expression, activation of AP-1, regulation of oxidative stress response by AP-1 and electrophile responsive element are simply reviewed.

Key words cfos, cjun, AP-1, oxidative stress, transcription factor

整合素研究新进展

曹立环 查锡良

(上海医科大学生物化学教研室, 上海 200032)

摘要 整合素是一类广泛存在于细胞表面的粘连分子. 文章介绍了整合素的结构和功能, 整合素是由 α 和 β 亚基 (均属跨膜蛋白) 通过非共价键形成异质二聚体分子, 可参与细胞与胞外基质、细胞与细胞之间的粘连, 并通过酪氨酸蛋白激酶系统和丝氨酸蛋白激酶系统介导细胞的信息传递. 细胞恶变时, 整合素表达的种类和数量均可发生改变.

关键词 整合素, 细胞粘附, 信息传导

整合素 (integrins) 是一类广泛存在于细胞表面的蛋白质, 它介导细胞和胞外基质、细胞和细胞之间的粘连, 也参与细胞内外信息传递. 现已证明, 整合素在细胞分化、胚胎发育、凝血、免疫反应、组织修补、肿瘤侵袭等方面均具有重要功能.

1 整合素的结构和分类

整合素均由 α 和 β 两个亚基组成, α 亚基 (分子量 120 000~180 000) 和 β 亚基 (分子量 95 000~145 000) 经非共价键而组成异质二聚体 (heterodimer), 目前至少已发现 8 种 α 亚基和 16 种 β 亚基, 理论上, 由此相互杂合可以形成一百多种二聚体, 但实际上至今仅发现 20 多

种. 整个整合素家族又可依照 β 亚基的不同而分为不同的亚族. 整合素的分类见表 1^[1].

早期, 整合素命名极不统一, 且很多整合素常常不只有一个名称. 例如, 血小板的整合素 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 经常被称为 $GP_{IIb-IIIa}$, 白细胞的整合素 $\alpha_M\beta_2$ 在早期又被称为 Mac-1, Mo-1 或 CR3, 但目前 $\alpha\beta$ 亚基命名法已被广泛接受. 整合素在不同细胞上的表达差异颇大, 不同的培养细胞可拥有 2~10 种不同的整合素, 有些整合素具有细胞专一性, 例如 LFA-1, MAC-1, P150/95 仅在白细胞表达, 同时整合素的表达也受某些影响细胞生长和分化的作用物的调节, 例如转