

泛素-蛋白水解酶复合体通路 在生殖系统中的研究进展*

王红梅 祝 诚**

(中国科学院动物研究所, 计划生育生殖生物学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要 泛素-蛋白水解酶复合体通路 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP) 广泛参与机体多种代谢活动, 如细胞周期调控、细胞凋亡、免疫和变态反应、以及多种恶性肿瘤、遗传病和神经系统疾病的发生, 但 UPP 在生殖系统的研究目前仍处于起步阶段。新近的研究资料表明 UPP 不仅参与精子发生、精子变态, 以及雌雄配子结合后精子线粒体的降解等雄性生殖系统的多种生理活动, 也与妊娠早期和正常月经周期子宫内膜的组织重建、甾体激素受体的代谢等雌性生殖系统的生理活动密切相关。

关键词 泛素, 蛋白水解酶复合体, 泛素-蛋白水解酶复合体通路, 生殖系统

学科分类号 Q132

在正常代谢条件下, 细胞内合成和降解蛋白质必须有精确的时空调节和选择。如果蛋白质降解速率和位点出现异常, 就会出现病态。目前已发现多种蛋白质降解途径: a. 溶酶体途径, 主要降解入胞蛋白 (如受体介导的蛋白质胞饮), 应急状态下降解细胞内蛋白, 尤其是结构蛋白; b. 特殊细胞器的水解系统, 如线粒体内 La 蛋白酶、高尔基体内 Kex2 水解酶、植物叶绿体内 ClpAP 等; c. 细胞膜表面水解酶系统; d. Caspase 蛋白酶家族; e. 高度保守的泛素-蛋白水解酶复合体通路 (ubiquitin-proteasome pathway, UPP)^[1]。UPP 是细胞质和细胞核内依赖于 ATP、非溶酶体途径的蛋白质降解通路, 高效并高度选择性进行细胞内蛋白质转换, 尤其降解半衰期短的功能蛋白、癌基因产物和变性、变构蛋白等, 应急状态下也降解细胞内结构蛋白。UPP 已被认为是十分重要的细胞功能调节因素, 该蛋白质水解通路的发现被认为是细胞周期、细胞恶性转化和免疫学研究的转折点。

1 泛素-蛋白水解酶复合体通路

泛素-蛋白水解酶复合体通路由相互连续的两步组成: a. 泛素 (ubiquitin) 分子与靶蛋白的共价结合; b. 多聚泛素化的蛋白被 26 S 蛋白水解酶复合体 (proteasome) 降解, 同时泛素被重新活化。

泛素由 76 个氨基酸组成, 分子质量为 8.45 ku。它存在于哺乳动物、鱼类、昆虫、高等植物、酵母菌及某些细菌内, 是一种从胞核到胞质、从生殖细

胞到体细胞广泛存在并高度保守的多肽, 在增殖活跃的肿瘤组织和胚胎组织表达量很高。泛素 C 端甘氨酸羧基在泛素连接酶^[2]的协助下可与靶蛋白赖氨酸 α -或 ϵ -氨基结合, 泛素 48 位赖氨酸的 ϵ -氨基必须进一步泛素化形成多聚泛素化的蛋白质, 才能被蛋白水解酶复合体识别和水解。

蛋白水解酶复合体^[3]由 30 多种不同的蛋白质及水解酶组成, 其沉降系数为 26 S, 在机体内主要发挥能量和泛素依赖性的蛋白质水解作用。26 S 蛋白水解酶复合体的水解核心 (20 S) 呈圆柱状, 两端各有 19 S 帽状结构。帽状结构能特异识别多聚泛素化靶蛋白的泛素链并与之结合, 在 ATP 存在下, 使靶蛋白构象改变, 并将其运至 20 S 水解核心的柱状通道中, 将靶蛋白水解为短肽或氨基酸, 而泛素链则在去泛素化酶的作用下与底物解离。

去泛素作用 (deubiquitination)^[4]是泛素化过程的逆转, 它们参与泛素分子合成后与核糖体的分离、蛋白质降解后泛素分子的再利用及对多聚泛素链的修饰, 使它更适合被 26 S 复合体识别, 从而加快蛋白质的降解等过程。去泛素化酶还能将错误识别的底物蛋白从泛素化复合体中释放出来, 因此, 它是 UPP 的重要调节步骤。去泛素酶属半胱

* 国家重点基础研究发展规划 (G1999055903) 及中国科学院知识创新工程资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-62555872, E-mail: Zhuc@panda.ioz.ac.cn

收稿日期: 2001-05-14, 接受日期: 2001-06-28

氨酸蛋白酶, 目前已发现 90 多种.

2 泛素-蛋白水解酶复合体通路的作用

自从 1975 年 Goldstein 发现泛素以来, 每年都有大量论文报道这一系统在多种生命事件中作用的重大进展, 对 UPP 功能的研究主要集中在以下几方面:

细胞周期的运转: 不同周期蛋白 (cyclins) 和周期蛋白依赖激酶 (cyclin-dependent kinase, Cdk) 的相继替换推动细胞周期时相的运转. 大多数 cyclins 都是通过 UPP 降解的^[5], 一些周期蛋白 (如 UBC9、CDC34、APC 等) 还充当泛素连接酶, 它们本身就是 UPP 的一份子.

疾病发生: 肿瘤抑制因子 p53 及一些癌基因产物如 C-Jun, C-Fos 等都与恶性肿瘤的发生密切相关, 它们都被证实通过 UPP 降解^[6]; 一些遗传病如囊性纤维化 (CF), Angelman 综合症, 利德尔综合症等的发生都与 UPP 密切相关; 神经性疾病如 Alzheimer's 综合症 (AD)、Parkinson's 综合症等的发生在一定程度上也与该途径受阻有关^[7]; 蛋白水解酶复合体的抑制剂还能明显缓解患肌肉萎缩症病人的病情.

此外, UPP 还参与 MHC-I 类抗原的呈递、细胞凋亡、一些转录因子如 NF- κ B、I κ B α 、E2F-1 等的降解、某些膜蛋白的修饰及核糖体的组装等.

3 泛素-蛋白水解酶复合体通路与生殖

UPP 在生殖事件中作用的报道很少, 但已有的研究足以证明 UPP 参与包括雌、雄配子发生、精卵结合以及雌、雄生殖系统的多种生理活动.

3.1 UPP 在雄性生殖系统中的研究

此方面研究主要集中在精子发生不同阶段 UPP 家族成员的表达变化上^[8], 泛素尤其在精子变态过程所涉及的细胞与细胞间的相互作用、蛋白质翻转及染色质结构变化中起重要作用. 附睾中的一些蛋白质具有泛素活性, 它们与上皮细胞骨架蛋白的高度有序组装有关. 这些结果尚不能详尽阐明 UPP 在雄性生殖系统中的作用, 因此有待进一步深入研究. 包括人在内的多种哺乳动物线粒体是完全母性遗传的, 尽管父方也为受精卵贡献了大约 100 个线粒体, 但它们却被选择性降解了. 最近 Sutovsky 等^[9]发现, UPP 决定着精卵结合后精子线粒体的命运, 恒河猴和牛卵细胞中的精子线粒体

早在精子发生过程中就被打上了泛素标签, 这个死亡信号使它们一旦面对卵细胞的蛋白质降解体系, 就无法逃脱被降解的命运.

3.2 UPP 在雌性生殖系统中的研究

3.2.1 UPP 在正常月经周期和妊娠早期子宫内膜组织重建中的作用: 哺乳动物子宫内膜是一复杂的动态组织, 它是机体内发生周期性变化和规则再生的仅有组织. 正常分泌晚期子宫内膜的基质细胞发生剧烈变化, 这种变化在妊娠的子宫内膜中受甾体激素的影响更为明显, 导致这些变化的一个原因是细胞本身发生了巨大变化. 已有实验表明, 培养的人足月蜕膜细胞能分泌泛素^[10], 正常周期或妊娠牛的子宫冲洗物中也能检测到泛素, 此外, 人和狒狒正常周期和妊娠早期子宫内膜都显著表达泛素^[11], 它主要分布在正常周期子宫内膜的腺上皮, 随周期或妊娠进程, 泛素表达发生相应变化. 妊娠早期, 子宫内膜基质细胞中泛素的表达量随蜕膜化进程而逐渐增加, 这些都说明泛素系统可能参与月经周期和妊娠早期子宫内膜广泛的组织重建过程.

3.2.2 UPP 对甾体激素受体代谢的影响: 细胞内甾体激素受体的浓度有精确的调控, 它们如何在特定时间出现或被降解, 不同的激素有不同方式. 哺乳动物雌激素受体 (ER) 在雌二醇不存在的情况下, 半衰期约为 5 d, 当雌二醇存在时, ER 水平在 1 h 内就下降. 研究表明 UPP 与 ER 的降解密切相关. MCF-7 乳腺癌细胞是研究 ER 代谢的一个常规手段, 溶酶体的抑制剂 (bafilomycin 和 NH₄Cl 等)、钙激活中性蛋白酶的抑制剂 (calpastatin 和 PD150606) 以及蛋白水解酶复合体的抑制剂 (lactacystin 等) 都被用于研究 ER 的降解, 但只有蛋白水解酶复合体的抑制剂能阻止 ER 被水解. 此外, 大鼠子宫中存在泛素化的 ER, 而且 ER 的泛素化依赖于雌二醇^[12]. 其他类固醇激素受体, 如孕酮受体, 与孕酮结合后也会受到胞内泛素蛋白的修饰. Lange 等^[13]在用一种抗雌激素的 T47Dco 乳腺癌细胞研究孕酮受体 (PR) 代谢机制时发现, 人孕酮受体 294 位丝氨酸的磷酸化是它被 26 S 蛋白水解酶复合体水解的前提, 而且, 蛋白水解酶复合体的抑制剂也能阻止孕酮依赖的 PR 蛋白的降解. 总之, UPP 在甾体激素受体的消亡中发挥重要作用.

3.2.3 干扰素与泛素表达的关系: 妊娠早期, 着床前的胚胎通过分泌干扰素 (IFN) 等对子宫内膜施加旁分泌影响. 已有报道表明, 妊娠早期干扰素

能诱导猪子宫内膜腔上皮泛素的表达^[14]。这一过程的可能机制是: IFN 与其受体结合, 能诱导 STAT-1 (signal transducer and activator of transcription 1) 的磷酸化并促使其向胞内转移, 因而导致包括泛素在内的一系列基因的表达。泛素反过来通过 UPP 降解磷酸化的 STAT-1, 使 STAT-1 浓度降低, 借此调控其自身的转录。此外, IFN 还能诱导合成一些泛素结合蛋白 (如 p36), p36 与 CELF-25b5.4 基因 (在果蝇中编码泛素) 有极强的相似性, 而且 p36 蛋白是两种蛋白质的共价结合物, 其中之一是泛素。

3.2.4 泛素交叉反应蛋白 (ubiquitin cross-reactive protein, UCRP) 在雌性生殖系统中的研究: 随着对 UPP 研究的深入, 人们发现一种首尾相连的泛素泛素的类似物——UCRP^[15]。UCRP 来源于 17 ku 的前体, 成熟形式为 15 ku。它能与泛素的抗血清发生反应, C 端也保留着泛素特有的 Leu-Arg-Gly-Gly, 它也能象泛素一样与胞质中的蛋白质结合并指导其水解, 其水解方式也类似于 UPP。培养的牛子宫内膜细胞以及牛子宫冲洗物中都含有 UCRP, 妊娠 15~26 d 牛子宫内膜分泌 UCRP^[16]。此外, 妊娠开始时, 蜕膜化的子宫内膜 UCRP 基因表达增高。目前研究热点集中在 UCRP 表达的调节上, 已有报道表明, UCRP 的表达主要受 IFN 和孕酮的调节^[17], 如妊娠和 IFN- τ 能诱导牛的 UCRP 与子宫细胞胞质中的蛋白结合, 人细胞中的 UCRP 的表达能被 IFN- α 和 β 上调, 羊子宫中 UCRP 的表达也受到 IFN- τ 和孕酮的调节。

4 国内研究现状

国内有关 UPP 在生殖系统中作用的研究大约起步于 1994 年, 主要集中在 UPP 在精子发生、精子体外获能和顶体反应、精子体外穿卵、以及卵母细胞成熟过程中的可能作用方面。泛素在卵母细胞排放第一极体的部位显著高表达, 提示 UPP 在卵母细胞的这种不对称细胞分裂中发挥选择性酶解作用, 没有这种特异性蛋白质水解过程, 极体将不能与卵母细胞分离。此外, 精子发生过程的圆型精子细胞和长型精子细胞中泛素结合蛋白显著高表达, 同时, 成熟精子中出现一些新的泛素结合蛋白, 表明 UPP 在精子变态过程中发挥重要作用。用蛋白水解酶复合体的抑制剂或抗泛素的抗体阻断 UPP, 发现精子体外获能和顶体反应都未发生显著变化, 但精子体外穿卵能力被显著抑制, 说明 UPP 在受

精过程精子与卵细胞的相互识别和结合中也发挥重要作用^[18]。

5 UPP 在生殖系统中的研究与展望

5.1 UPP 在胚泡植入过程中作用的研究

恶性肿瘤的扩散往往开始于它们对基膜的破坏, 基质金属蛋白酶-2 和-9 (MMP-2, MMP-9) 作为水解基膜主要成分——IV型胶原的蛋白酶, 在肿瘤发生与扩散中发挥重要作用, 多种肿瘤的发生都伴随 MMP-2, MMP-9 表达活性的升高。在培养的人口腔鳞状细胞癌细胞培养液中加入蛋白水解酶复合体的抑制剂 (ALLN), 能明显降低 MMP-9 的活性^[19], ALLN 同时还抑制细胞内 NF- κ B 的活性及其向细胞核的转移, NF- κ B 已被证明在人口腔鳞状细胞癌细胞中调节 MMP-9 的活性, 因此, 至少在人口腔鳞状细胞癌细胞中, UPP 直接参与 MMP-9 表达的调节, 同时参与调节 MMP-9 表达的上游事件。野生型和突变型 p53 都能抑制基质金属蛋白酶组织抑制因子-3 (TIMP-3) 基因的表达^[20]。胚泡植入与肿瘤发生有很多相似性, 而且 MMPs-TIMPs 系统也广泛参与胚泡植入过程中子宫内膜的组织重建。因此, UPP 在肿瘤浸润方面的研究也会为研究胚泡植入过程中 UPP 对 MMP 家族的调节提供新思路。目前有很多成熟的动物模型用以研究影响胚泡着床的因素, 比如用 UPP 的抑制剂或抗体阻断 UPP, 观察正常的胚泡植入是否受影响以及 MMP 家族成员的活性有无变化, 可以最直观地反映 UPP 与胚泡植入的关系及其可能机制。此外, 筛选妊娠子宫内膜与正常月经周期子宫内膜中 UPP 成员的特异性基因, 也将使我们更全面地了解 UPP 在雌性生殖系统中的作用。

5.2 UPP 在雄性生殖系统中作用的研究

精子变态是精子成熟过程的重要阶段, 这一阶段特异表达的泛素结合蛋白一直都是研究热点, 筛选精子变态不同时期特异表达的蛋白质并研究其可能功能、克隆每一阶段特异表达的泛素相关基因, 并用基因敲除方法研究它们的可能影响, 会为研究雄性生殖调控提供有力佐证。

总之, UPP 在生殖事件中作用的研究目前仍处于起步阶段, 此方面研究的深入都有可能是开创性的工作, 并将为促进生殖健康, 控制生育提供新手段和新思路。

参 考 文 献

- 1 Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin

- mediated protein degradation. *J Cell Physiol*, 2000, **182** (1): 1~11
- 2 Scheffner M, Nuber U, Huibregtse J M. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature*, 1995, **373** (6509): 81~83
 - 3 DeMartino G N. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem*, 1999, **274** (32): 22123~22126
 - 4 Chung C H. Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **266** (3): 633~640
 - 5 Koepp D M, Harper J W, Elledge S J. How the cyclin became a cyclin: Regulated proteolysis in the cell cycle. *Cell*, 1999, **97** (4): 431~434
 - 6 Salvat C, Aquaviva C, Jariet-Encounter I, *et al.* Are there multiple proteolytic pathways contributing to c-Fos, c-Jun and p53 protein degradation *in vivo*? *Mol Biol Rep*, 1999, **26** (1-2): 45~51
 - 7 Alves-Rodrigues A, Gregori L, Figueiredo-Pereira M E. Ubiquitin, cellular inclusions and their role in neurodegeneration. *Trends Neurosci*, 1998, **21** (12): 516~520
 - 8 Tokunaga Y, Imai S, Torri R, *et al.* Cytoplasmic liberation of protein gene product 9.5 during the seasonal regulation of spermatogenesis in the monkey (*Macaca fuscata*). *Endocrinology*, 1999, **140** (4): 1875~1883
 - 9 Sutovsky P, Moreno R D, Ramalho-Santos J, *et al.* Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*, 1999, **402** (6760): 371
 - 10 Ren S G, Braunstein G D. Production of superoxide dismutase, β 2-microglobulin and ubiquitin by human term decidua *in vitro*. *Early pregnancy*, 1995, **1** (2): 124~129
 - 11 Bebington C, Bell S C, Doherty F J, *et al.* Fleming localization of ubiquitin and ubiquitin-reactive protein in human and baboon endometrium and deciduas during the menstrual cycle and early pregnancy. *Biol Reprod*, 1999, **60** (4): 920~928
 - 12 Nawaz Z, Lonard D M, Dennis A P, *et al.* Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96** (5): 1858~1862
 - 13 Lange C A, Shen T, Horwitz K B. Phosphorylation of human progesterone receptors at serine 294 by mitogen-activated protein kinase signals their degradation by the 26 S proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (3): 1032~1037
 - 14 Chewtzoff S, d'Andrea S. Ubiquitin is physiologically induced by interferons in luminal epithelium of porcine uterine endometrium in early pregnancy: global RT-PCR cDNA in place of RNA for differential display screening. *FEBS letters*, 1997, **405** (2): 148~152
 - 15 Johnson G A, Spencer T E, Hansen T R, *et al.* Expression of the interferon tau inducible ubiquitin cross reactive protein in the ovine uterus. *Biol Reprod*, 1999, **61** (1): 312~318
 - 16 Bebington C, Doherty F J, Fleming S D, *et al.* Ubiquitin cross-reactive protein gene expression is increased in decidualized endometrial stromal cells at the initiation of pregnancy. *Mol Hum Reprod*, 1999, **5** (10): 966~972
 - 17 Johnson G A, Spencer T E, Burghardt R C, *et al.* Interferon-tau and progesterone regulate ubiquitin cross reactive protein expression in the ovine uterus. *Biol Reprod*, 2000, **62** (3): 622~627
 - 18 王红梅, 宋长城, 段崇文, 等. 泛素-蛋白水解酶复合体通路在小鼠精子体外获能、顶体反应及穿卵中的作用. *科学通报*, 2001, **46** (18): 1541~1546
 - 19 Wang H M, Song C C, Duan C W, *et al.* *Chinese Science Bulletin*, 2001, **46** (18): 1541~1546
 - 19 Ikebe T, Takeuchi H, Jimi E, *et al.* Involvement of proteasomes in migration and matrix metalloproteinase-9 production of oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 1998, **77** (4): 578~585
 - 20 Loging W T, Reisman D. Inhibition of the putative tumor suppressor gene TIMP-3 by tumor-derived p53 mutants and wild type p53. *Oncogene*, 1999, **18** (52): 7608~7615

Ubiquitin-proteasome Pathway in Reproductive Tissues*

WANG Hong-Mei, ZHU Cheng**

(The State Key Laboratory of Reproductive Biology, Institute of Zoology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract The potential importance of ubiquitin-proteasome pathway (UPP) as a mechanism for a series of processes including cell cycle progression, apoptosis, immune and inflammatory responses, tumorigenesis and metastasis, as well as some genetic and neurodegenerative diseases has long been recognized. Nevertheless, roles of UPP in different reproductive events are only beginning to be clarified. UPP has recently been shown to be related to a variety of male reproductive events, such as spermatogenesis, spermiogenesis, as well as many female reproductive events, including tissue remodeling of the endometrium during normal menstrual cycle and early pregnancy and the degradation of the steroid receptors. Combined with domestic situation, the emerging roles of UPP in reproductive tissues are also presented.

Key words ubiquitin, proteasome, ubiquitin-proteasome pathway, reproductive tissues

* This work was supported by a grant from the Special Funds for Major State Basic Research Project (G1999055903) and the Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences.

** Corresponding author. Tel: 86-10-62555872, E-mail: zhuc@panda.ioz.ac.cn

Received: May 14, 2001 Accepted: June 28, 2001