

• 综述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.06.048

ROS 介导的 JNK 信号通路及其对细胞自噬的调节

唐锦华¹综述,吴江¹,连继勤²审校

(1. 第三军医大学学员旅五营,重庆 400038;2. 第三军医大学生物化学与分子生物学教研室,重庆 400038)

关键词:ROS;JNK 信号通路;细胞自噬

中图分类号:R34

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2015)06-0848-03

活性氧簇(reactive oxygen species,ROS)是生物有氧代谢过程中产生的一类活性含氧化合物的总称,作为细胞内的一种信号分子,ROS 可通过多种途径激活 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun NH₂-terminal kinase,JNK)。调节细胞自噬是 ROS 介导的 JNK 信号通路的一个重要功能,其能够以 ROS 水平依赖的方式激活细胞自噬和凋亡。下面本文仅就近年来研究发现的 ROS 介导 JNK 信号通路激活的主要途径,以及其对细胞自噬的作用作简要综述。

1 ROS 与 JNK 信号通路

ROS 是一类可以氧化蛋白质、脂质和 DNA 的小分子,是生物有氧代谢过程中产生的一类活性含氧化合物的总称,包括超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢(H_2O_2)和自由基(超氧化物、羟自由基)等。正常生理状态下,ROS 的产生被严格控制,且 ROS 作为一种信号分子参与调节了细胞内多种信号通路,而 JNK 信号通路就是受 ROS 调控的一条重要通路^[1]。

JNK 是丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase,MAPK)家族中的一员,能有效地磷酸化 c-Jun 的氨基末端并激活 c-Jun,是哺乳动物细胞内广泛存在的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。由于 JNK 信号通路可被环境中的应激因素(如电离辐射、渗透压改变、营养因素撤除、热休克及活性氧等)激活,因此 JNK 又被称为应激激活蛋白激酶(stress-activated protein kinase,SAPK)^[2]。在细胞活动过程中,ROS 可通过多种途径激活 JNK 在细胞内发挥重要的生理功能。

2 ROS 通过多种途径激活 JNK

2.1 凋亡信号调节激酶 1(ASK1)途径 ASK1 在 ROS 介导的 JNK 通路活化过程中起桥梁作用。在 MAPK 信号传递过程中,ASK1 是一个通过磷酸化 MKK4 和 MKK7、进而激活 JNK 通路的上游 MAPKKK,可被 ROS 等多种信号所激活^[3]。在 ROS 的作用下,硫氧还蛋白(thioredoxin,Trx)分子上第 32 位与第 35 位的半胱氨酸残基被氧化形成二硫键,从而失去对 ASK1 的抑制作用。游离的 ASK1 之间可通过 N 端和 C 端的卷曲螺旋域形成寡聚体,并进一步被磷酸化而激活,最终导致 JNK 激活^[4]。Trx 是一种结合在 ASK1 蛋白 N 端卷曲螺旋域的负性调节因子。有研究提示在 ASK1 的 C 端卷曲螺旋域也存在一个负性调节因子谷氧还蛋白(glutaredoxin,Grx),Grx 可与氧化型谷胱甘肽(GSSG)反应形成复合物(Grx-SSG 及 Grx^[S-S]),促使 Grx 与 ASK1 解离^[5]。在 Trx 和 Grx 从 ASK1 解离下来之后,作为 ASK1 正性调节因子的肿瘤坏死因子受体相关因子 2(tumor necrosis factor receptor-associated factor 2, TRAF2)和 TRAF6 可以结合到 ASK1 上,组成了一个活化的大分子复合物,即活化的 ASK1 信号小体,进而激活 JNK。研

究表明,Trx 可以抑制 ASK1 信号小体的形成,而 TRAF2 的过表达则可以抑制 Trx 与 ASK1 的相互作用,使 ASK1 活化并激活 JNK^[6]。

2.2 Src 激酶途径 Src 家族激酶(Src-family kinases,SFKs)目前由 LYN、FYN、LCK、HCK、FGR、BLK、YRK、YES 和 Src 等 9 个成员组成,其中,Src 蛋白是目前研究最多的成员。Src 广泛存在于组织细胞中,通过与信号转导通路中重要分子相互作用,调控细胞的生长、发育、分化和死亡等过程。在 ROS 介导的 JNK 信号通路中,Src 的缺失将严重抑制 JNK 的活化,Src 途径是 ROS 激活 JNK 的信号通路之一。Chen 等^[7]发现内皮细胞暴露 H_2O_2 后 15 min 内可观察到的 JNK 通路快速激活,认为 H_2O_2 可诱导表皮因子受体磷酸化,通过 Src 依赖性的途径启动 JNK 的信号通路。在肿瘤的发生和转移过程中,高活性的 Src 可使 Bruton 蛋白激酶 Btk29A 肽链上的 551 位酪氨酸去磷酸化而活化,同时活化连接蛋白 p120ctn,后者可通过小 G 蛋白 Rho1 激活 JNK^[8-9]。

2.3 谷胱甘肽 s-转移酶 π (GST π)途径 GST π 也是 ROS 介导 JNK 活化的另一重要中间分子。最新的研究发现,两种单体形式的 GST π 可以通过与 JNK 底物活化转录因子 2(activating transcription factor 2,ATF2)的直接作用来抑制 ATF2 的磷酸化,进而抑制 JNK1 或 JNK2 的激活^[10]。 H_2O_2 可使原来与 JNK 羧基末端结合的 GST π 寡聚化并从 GST π -JNK 复合体上分离下来,从而恢复被抑制的 JNK 活性^[11]。

2.4 混合谱系激酶 3(MLK3)途径 MLK3 是 MAPKKK 家族 MLKs 亚家族的成员之一,也是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。它通过磷酸化激活 MAPK 通路的丝/苏氨酸蛋白激酶,介导下游信号通路激活,是连接 ROS 和 JNK 的重要纽带。Zhao 等^[12]的研究发现,混合谱系结构域样激酶(MLKL)是 RIP3 诱导细胞坏死样凋亡的重要下游分子,MLKL 的缺失会严重影响 JNK 的磷酸化,进而降低 ROS 对 JNK 的激活作用。van den Berg 等^[13]发现,氧化应激引起的 ROS 水平增加可通过 c-Jun 氨基末端相互作用蛋白 1(JIP1)支架复合体激活小 G 蛋白 RALA,进而调控 JNK 的磷酸化,而 MLK3 则是直接激活 MKK4 并与 MKK4 组成 JIP1 支架复合体的重要分子。

2.5 受体相互作用蛋白(receptor-interacting protein,RIP)-TRAF2 复合体途径 RIP-TRAF2 复合体途径是 ROS 激活 JNK 的又一重要途径。RIP 与 TRAF2 是 TNF 与 TNF 受体 1(TNF-R1)结合后,激活核转录因子 NF- κ B、触发信号传导级联导致细胞凋亡的重要信号分子。近年来的研究表明,RIP 和 TRAF2 可以相互结合在靶细胞膜上的脂筏区,形成一个 RIP-TRAF2 信号复合体,在 ROS 的诱导下直接激活 JNK 通路^[14]。

2.6 抑制丝裂原活化蛋白激酶磷酸酶(MAPK phosphatases, MKPs)途径 MKPs 的活性是 ROS 激活 JNK 的另一有效途径。Kamata 等^[15]的研究表明,细胞内 H_2O_2 可以通过氧化 MKPs 的半胱氨酸残基而抑制 MKPs 的活性,被氧化的 MKPs 很快被泛素-蛋白酶体途径降解,从而消除了 MKPs 对 JNK 的抑制作用,导致 JNK 通路持续激活。Hou 等^[16]进一步证实,ROS 介导的 MKP 失活就是导致 JNK 通路持续激活的原因。Lornejad-Schfer 等^[17]在 ARPE-19 细胞中通过光诱导的方法也发现随着 ROS 产生的增加,MKP-1 的水平会显著下降并导致 JNK 激活。

3 ROS-JNK 通路对细胞自噬的调节作用

细胞自噬是细胞依赖溶酶体途径对胞质蛋白和细胞器进行降解的过程,是细胞清除受损蛋白与细胞器的重要途径,通常在饥饿、氧化损伤、内质网应激等条件下水平增强^[18]。因此,自噬是细胞的一种自我保护机制,它的作用受到多种因素的诱导和调节。其中,ROS-JNK 通路就是诱导和调节细胞自噬的一条重要通路。

3.1 通过影响 Bcl-2 磷酸化激活细胞自噬 研究发现,JNK1 被 ROS 激活后可直接磷酸化 Bcl-2 蛋白,使 Bcl-2 从自噬关键蛋白 Beclin 1 上解离下来,Beclin 1 被活化后可形成 Beclin 1-Vps34-PI3K 多蛋白复合体,从而激活自噬。当使用 JNK1 的抑制剂或外源性导入磷酸化位点突变的 Bcl-2 蛋白时,自噬被抑制;而结构性激活 JNK1,则会引起 Bcl-2 的多位点磷酸化,导致自噬激活^[19]。尽管 Bcl-2 和 Bcl-xL 之间具有相似的结构及相同的磷酸化位点,但 Beclin 1 与 Bcl-xL 间的结合能不能受到 JNK1 介导的磷酸化调节目前仍不清楚^[20]。

3.2 通过上调 ATG7 激活细胞自噬 Wang 等^[21]的研究表明,ROS-JNK 信号通路还可通过 Beclin 1 非依赖的方式直接上调自噬关键基因 ATG7 与 ATG5,激活细胞自噬。这一激活方式只存在于肿瘤细胞中,而在良性组织及正常细胞中不存在。

3.3 通过激活凋亡信号间接抑制细胞自噬 细胞凋亡与自噬是细胞的两种重要功能,对凋亡与自噬相互作用的研究是当前一个热点。凋亡可以通过多种途径抑制自噬的发生,反之自噬亦可以抑制凋亡。在研究二者发生机制的过程中,研究人员发现信号分子(如 JNK、Akt 等)在二者信号通路中频繁交叉出现,提示着凋亡与自噬存在必然的联系^[22]。ROS 通过双特异性激酶 JNKK(包括 MKK4、MKK7)激活 JNK,而激活的 JNK 又可以通过转录因子 AP-1 促进 p53、Bax、FasI、TNF 等促凋亡蛋白的表达。高表达的促凋亡蛋白如 Bax、Bak 等作用于线粒体,可促使细胞色素 C 释放入胞浆,细胞色素 C 和 caspase-9 结合,最终作用于 caspase-3,而使 caspase-3 活化。活化的 caspase 具有十分重要的作用,它们可以裂解自噬相关蛋白,裂解的自噬相关蛋白可进入线粒体,促进细胞色素 C 的释放而进一步促进细胞凋亡的发生。有研究表明,Beclin 1 可以被 caspase-3 裂解产生 C 端 Beclin 1 片段,它可进入线粒体内促进细胞色素 C 的释放,抑制自噬,诱发凋亡^[23]。另外,表达的 FasI、TNF 等配体与细胞膜上的死亡受体(Fas、TNFR 等)结合形成死亡诱导信号复合物(death-inducing signaling complex, DISC),DISC 促进前体 caspase-8 裂解,生成活化的 caspase-8, caspase-8 一方面可以激活细胞凋亡的下游 caspase,启动凋亡信号,另一方面可以诱导产生 c-FLIP、v-FLIP 等物质与 Atg3 结合,从而抑制 Atg3 和 LC3 的结合,抑制细胞自噬的发生。

用 caspase-8 的广谱抑制剂 zVAD 处理小鼠 L929 纤维肉瘤细胞发现,zVAD 可以促进这细胞发生自噬性死亡,这表明细胞的凋亡信号受到抑制后,其自噬途径反而被激活。而进一步的研究发现,抑制 caspase-8 可能与 ROS 的产生及 JNK 的激活关系密切^[24]。

3.4 ROS-JNK 通路对自噬的调节作用依赖于细胞内 ROS 水平 ROS-JNK 通路既可介导细胞凋亡也可以介导细胞自噬,其关键在于细胞内的 ROS 水平。适度水平的 ROS 可导致 JNK 信号短暂激活,通过 Beclin1 途径诱导细胞自噬水平增加,但还不足以引起细胞凋亡。但当 ROS 超过一定水平后则会导致 JNK 的持续激活,引起线粒体途径介导的细胞凋亡^[25-26]。最近的研究发现,使用冬凌草甲素处理多发性骨髓瘤细胞 RPMI8226 细胞可以诱导细胞内高水平的 ROS 产生,以及随之而来的细胞凋亡的增加和自噬抑制^[27]。相反,低水平的 ROS 则可促进自噬、抑制凋亡。在低 ROS 水平(即基本氧化应激)下,JNK 可通过活化 Atg7 介导细胞自噬的发生。研究证明,在基本的氧化应激下,敲除自噬相关基因 Atg7 会显著降低药物引起的 H_2O_2 介导的细胞自噬反应,而进一步的研究提示 ROS 依赖的 JNK 和 ERK 的激活均是介导 H_2O_2 升高、促进自噬水平增加的重要上游调控机制^[21]。

4 展 望

ROS 的产生作为重要的第二信使参与多种生物学效应的启动,而 ROS-JNK 通路作为细胞信号转导研究中备受关注的一条重要通路,参与了细胞增殖、分化、存活、死亡(凋亡为主,包括自噬性细胞死亡)等许多生命过程。在哺乳动物细胞内存在着 ROS-JNK 通路直接或间接激活或调控细胞自噬的复杂机制,ROS 的水平直接影响了这一过程。至于 ROS-JNK 通路作用于自噬的结果及其对凋亡的影响,目前尚不明确,但最新的研究表明可能与 ROS 激活 JNK 的途径等关系密切。总之,ROS 介导 JNK 信号通路的调控网络相当繁琐,不断深入研究 ROS 激活 JNK 的实现过程以及 ROS-JNK 激活自噬介导细胞存亡的作用机制,将有助于阐明与自噬相关的某些肿瘤性疾病的发病机制,为临床治疗提供更为有意义的研究方向。

参考文献:

- [1] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology[J]. *Trends Biol Sci*, 2011, 36(1): 30-38.
- [2] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases[J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239-252.
- [3] Ray PD, Huang BW, Tsuiji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling[J]. *Cell Signal*, 2012, 24(10): 981-990.
- [4] Soga M, Matsuzawa A, Ichijo H. Oxidative stress-induced diseases via the ASK1 signaling pathway[J]. *Int J Cell Biol*, 2012, 20(12): 1301-1305.
- [5] Lee BC, Park BH, Kim SY, et al. Role of Bim in diallyl trisulfide-induced cytotoxicity in human cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(1): 118-127.
- [6] Fujino G, Noguchi T, Matsuzawa A, et al. Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of

- ASK1[J]. *Mol Cell Biol*, 2007, 20(3):152-163.
- [7] Chen K, Vita JA, Berk BC, et al. c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(19):16045-16050.
- [8] Fernández BG, Jezowska B, Janody F. Drosophila actin-Capping Protein limits JNK activation by the Src proto-oncogene[J]. *Oncogene*, 2013, 155(3):210-213.
- [9] Rudrapatna VA, Bangi E, Cagan RL. A Jnk-Rho-Actin remodeling positive feedback network directs Src-driven invasion[J]. *Oncogene*, 2013, 23(2):111-121.
- [10] Thévenin AF, Zony CL, Bahnson BJ, et al. GST pi modulates JNK activity through a direct interaction with JNK substrate, ATF2[J]. *Pro Sci*, 2011, 20(7):834-848.
- [11] D' Autréaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules; mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(10):813-824.
- [12] Zhao J, Jitkaew S, Cai Z, et al. Mixed lineage kinase domain-like is a key receptor interacting protein 3 downstream component of TNF-induced necrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(14):5322-5327.
- [13] van den Berg MC, van Gogh IJ, Smits AM, et al. The Small GTPase RALA Controls c-Jun N-terminal Kinase-mediated FOXO Activation by Regulation of a JIP1 Scaffold Complex[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(30):21729-21741.
- [14] Morgan MJ, Kim YS, Liu Z. Lipid rafts and oxidative stress-induced cell death[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(9):1471-1483.
- [15] Kamata H, Honda S, Maeda S, et al. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases[J]. *Cell*, 2005, 120(5):649-661.
- [16] Hou N, Torii S, Saito N, et al. Reactive oxygen species-mediated pancreatic β -cell death is regulated by interactions between stress-activated protein kinases, p38 and c-jun N-terminal kinase, and mitogenactivated protein kinase phosphatases [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(4):1654-1665.
- [17] Lornejad-Schfer MR, Schfer C, Schffl H, et al. Cytoprotective role of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in light-damaged human retinal pigment epithelial cells[J]. *Phot Photobiol*, 2009, 85(3):834-842.
- [18] Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease[J]. *N Eng J Med*, 2013, 368(7):651-662.
- [19] Wei Y, Pattingre S, Sinha S, et al. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy[J]. *Mol Cell*, 2008, 30(6):678-688.
- [20] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy[J]. *Autophagy*, 2008, 4(5):600-606.
- [21] Wang CH, Iskandar KB, Yadav SK, et al. Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation [J]. *PLoS One*, 2010, 5(4):e9996.
- [22] Moretti L, Cha YI, Niermann KJ, et al. Switch between apoptosis and autophagy: radiation-induced endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(7):793-798.
- [23] Zhu Y, Zhao L, Liu L, et al. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis[J]. *Protein Cell*, 2010, 1(5):468-477.
- [24] Chen SY, Chiu LY, Maa MC, et al. zVAD-induced autophagic cell death requires c-Src-dependent ERK and JNK activation and reactive oxygen species generation[J]. *Autophagy*, 2011, 7(2):217-228.
- [25] Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis; a double-edged sword[J]. *Cell Res*, 2005, 15(1):36-42.
- [26] Tang D, Kang R, Zeh HJ 3rd, et al. High-mobility group Box 1, oxidative stress, and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(7):1315-1335.
- [27] 曾蓉, 陈燕, 崔国惠. 抑制自噬促进冬凌草甲素诱导的多发性骨髓瘤细胞凋亡涉及胞内 ROS 产生[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2011, 20(4):296-300.
- (收稿日期:2014-10-10 修回日期:2014-11-10)
-
- (上接第 839 页)
- [10] Ali MS, Attash SM. Laparoscopic cholecystectomy in a patient with situs inversus totalis; case report with review of literature[J]. *BMJ*, 2013, 10(7):1-3.
- [11] Lochman P, Hoffmann P, Koči J. Elective laparoscopic cholecystectomy in a 75-year-old woman with situs viscerum inversus totalis[J]. *Wideochir Inne Tech Malo Inwazyjne*, 2012, 7(3):216-219.
- [12] Arya SV, Das A, Singh S, et al. Technical difficulties and its remedies in laparoscopic cholecystectomy in situs inversus totalis; a rare case report[J]. *Int J Surg Case Rep*, 2013, 4(8):727-730.
- [13] 张峰, 陈珂. 腹腔镜胆囊切除术中出血的防治体会[J]. *中国医药指南*, 2013, 11(32):436-437.
- [14] Iusco DR, Sacco S, Ismail I, et al. Three-trocar laparoscopic cholecistectomy in patient with situs viscerum inversus totails. Case report and review of the literature [J]. *G Chir*, 2012, 33(1/2):10-13.
- (收稿日期:2014-08-11 修回日期:2014-10-18)