

文章编号: 1004-616X(2003)04-0253-04

· 综述 ·

JNK/MAPK 途径调控机制研究进展<sup>①</sup>

张文伶, 金勇丰, 朱成钢, 张耀洲\*

(浙江大学生物化学研究所, 浙江 杭州 310029)

**【摘要】** JNK 信号途径与多种疾病的发病机制有关, 如癌症、中风、鳞皮病、心脏病、发炎和神经萎缩等疾病。抑制 JNK 途径的药物具有一定的临床应用价值, 因此 JNK 是一个分子治疗靶。JNK 信号途径中的各成员相互作用的机制是目前研究热点之一, 本文就此研究的进展作一综述。

**【关键词】** JNK; 相互作用; 停泊位点; 支架蛋白

中图分类号: R730.2

文献标识码: A

JNK(c-Jun NH2-terminal kinases) 家族, 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶, 也被称为应激活化蛋白激酶(stress-activated MAP kinases, SAPK), 是哺乳动物内发现的第三类 MAPK(mitogen-activated protein kinases) 家族。JNK 在传导胞外信号至核转录因子时起着重要作用, 可以提高转录能力。JNK 信号途径存在于多种生命过程中, 如细胞生长、癌基因转化、细胞分化和细胞

死亡。有多种刺激信号都可介导 JNK 的活化, 如生长因子、细胞因子和环境应激。近来研究表明, JNK 与多种疾病发生机制有关, 从而使 JNK 在临床上可做为一个潜在的分子治疗靶。

## 1 JNK 的表达形式

JNK 蛋白可由 3 个基因编码。Jnk1 和 Jnk2 基因

① 收稿日期: 2003-04-28; 修订日期: 2003-05-26

作者简介: 张文伶(1976-), 女, 安徽省人, 医师, 硕士, 研究方向: 基因表达与调控。

\* 通讯作者: Tel: 0571-86971414, E-mail: yzhzhang@zju.edu.cn

- hypermethylation in the tumor and serum of patients with gastric carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(6): 1761-1766.
- [14] Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, et al. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(1): 67-70.
- [15] Vis AN, Oomen M, Schroder FH, et al. Feasibility of assessment of promoter methylation of the CD44 gene in serum of prostate cancer patients [J]. *Mol Urol*, 2001, 5(4): 199-203.
- [16] Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(12): 6870-6875.
- [17] Esteller M, Levine R, Baylin SB, et al. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas [J]. *Oncogene*, 1998, 17(18): 2413-2417.
- [18] Zou HZ, Yu BM, Wang ZW, et al. Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(1): 188-191.
- [19] Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(4): 892-895.
- [20] Inbal B, Cohen O, Polak-Charcon S, et al. DAP kinase links the control of apoptosis to metastasis [J]. *Nature*, 1997, 390(6656): 180-184.
- [21] Wong IH, Lo YM, Yeo W, et al. Frequent p15 promoter methylation in tumor and peripheral blood from hepatocellular carcinoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(9): 3516-3521.
- [22] Usadel H, Brabender J, Danenberg KD, et al. Quantitative adenomatous polyposis coli promoter methylation analysis in tumor tissue, serum, and plasma DNA of patients with lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(2): 371-375.
- [23] Liang JT, Chang KJ, Chen JC, et al. Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival [J]. *Oncology*, 1999, 57(2): 149-156.
- [24] Brabender J, Usadel H, Metzger R, et al. Quantitative (6) methylguanine DNA methyltransferase methylation analysis in curatively resected non-small cell lung cancer: associations with clinical outcome [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(1): 223-227.

存在于多种组织,而 *Jnk3* 基因局限于在脑、心脏、睾丸中表达。*JNK* 基因通过选择性剪接而产生 10 种 *JNK* 形式<sup>[1]</sup>。*JNK* 基因编码的蛋白具有或无 COOH-末端,结果产生 46 kDa 和 55 kDa 两种蛋白。第二种剪接是选择性编码 *JNK* 功能区的两个外显子中的一个,但仅限于 *Jnk1* 和 *Jnk2* 基因。不同的组织发出不同的指令,通过选择性剪接,*JNK* 改变了停泊位点与底物结合能力,决定了作用底物的特异性<sup>[2,3]</sup>。在果蝇中只有一种 *JNK* 蛋白, DJNK<sup>[4]</sup>。

## 2 JNK 作用底物

*JNK* 可调控转录因子 AP-1 蛋白,如 c-Jun、JunB、JunD,和 ATF2,提高转录活性。被磷酸化的位点 Ser/Thr-Pro 都位于转录因子的活性区。*JNK* 磷酸化 c-Jun 的 Ser<sup>63</sup> 和 Ser<sup>73</sup> 位点。*JNK* 调控转录因子的机制目前有两种解释:*JNK* 磷酸化可提高转录因子的稳定性,*JNK* 可调控 ATF2 内在的组蛋白乙酰基转移酶活性和泛素蛋白介导的 AP-1 蛋白降解;CBP/p300 有助于 c-Jun 的磷酸化作用<sup>[4]</sup>。其他依赖 *JNK* 途径也有助于 AP-1 的调控作用。如 *JNK* 可调控 ATF2 内在的组蛋白乙酰基转移酶活性和泛素介导的 AP-1 蛋白降解<sup>[5]</sup>。在环境应激和某些细胞因子诱导的 AP-1 活性过程中 *JNK* 是必需的,而对其他刺激引起的 AP-1 作用并不是必需的。对 *JNK* 做出反应时,AP-1 之间可在目的基因的启动区互相作用。近来又发现 *JNK* 也可磷酸化 Ets 转录因子 Elk-1<sup>[5]</sup>。

*P53* 也是 *JNK* 的作用底物,*JNK* 磷酸化 *P53*,抑制泛素介导的降解,从而稳定 *P53* 蛋白。*JNK* 通过调节 *P53* 的半衰期来控制 *P53* 的表达水平<sup>[6]</sup>。但最近研究发现紫外线刺激引起的 *P53* 的聚集并不需要 *JNK*<sup>[7]</sup>。所以,*JNK* 可以调整 *P53* 的稳定性,但并非此过程所必需的。c-Myc 也可能是 *JNK* 促凋亡信号的靶基因,Ser<sup>62</sup> 和 Thr<sup>71</sup> 被磷酸化<sup>[8]</sup>。

## 3 JNK 作用机制

### 3.1 JNK/MAPK 的停泊位点(docking site)

在 *JNK* 信号通路中存在着多种机制以确保各成员的作用特异性,同时也防止了成员之间的交叉反应。位于 *JNK*/MAPK 上的停泊位点(docking site)就是其中之一。这些停泊位点是保守的,对于调控的特异性和提高转录有重要的作用。

MAPK 上的停泊位点有 CD(common docking)功能区和 ED 功能区。CD 功能区存在于所有已知的 MAPK

家族的 C 末端,包含酸性和疏水残基,可以直接与 MAPKK(MAPK kinase)目的区(targeting domains),双特异性磷酸酶和 MAPK 底物发生作用。然而,单单 CD 功能区不能保证停泊的特异性。ED 功能区与 CD 功能区一起可确保停泊的特异性。ED 功能区和 CD 功能区一样,位于 MAPK 活性位点的对面。ED 功能区在表面形成一个停泊凹槽(见图 1)。CD 功能区是必需的,而 ED 功能视情况而定,如 *P38* 的 ED 功能区的 Glu60 和 Asp161 可被 Thr 替代,但消弱了结合作用<sup>[9]</sup>。另外还可有其他的机制决定停泊特异性。比如,MAPK 的 C 末端和子域 III 中的 C 环有助于停泊特异性<sup>[9]</sup>。

### 3.2 与 JNK/MAPK 作用的目的区(targeting domains)

在与 MAPK 作用的蛋白上存在着目的区,其中最具有广泛性的特征的是 D 停泊区(delta docking domain)。D 停泊区由疏水残基 Leu-X-Leu(或 Leu-X-Leu-X-Leu)组成,中间 X 约有 2-6 残基,至少含两个碱性残基(Lys, Arg)。其他的疏水性残基可代替 Leu。D 停泊区的碱性和疏水性残基对于结合、锚定、特异性和磷酸化具重要的作用。c-Jun 就含有保守的 LX3~5L 序列,可区分不同形式的 *JNK*。其 C 端的 B-2LPDNA 结合区是个辅助的停泊位点,在 *JNK* 结合 c-Jun 过程中是必需的<sup>[5]</sup>(图 1)。类似的位于细胞外信号调节激酶(exttracellular signal regulated kinase, ERK)上的 Phe-Xaa-Phe-Pro 目的功能区,在 ERK 磷酸化中起着关键的作用,但是对于 *JNK* 的磷酸化和停泊却无作用。研究表明,底物中目的功能区决定了底物特定残基的磷酸化<sup>[5]</sup>。

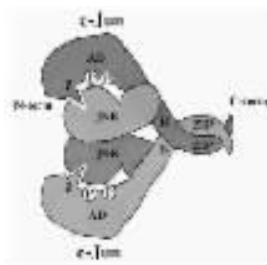


图 1. *JNK*/c-Jun 复合物推测构型

Figure 1. Hypothetical model of the *JNK*/c-Jun complex

### 3.3 支架蛋白(scaffold proteins)

*JNK* 信号途径中还存在着支架蛋白,作用是对于某一刺激,集合 *JNK* 信号,促使蛋白激酶形成有序的二元复合物来发挥作用。已经报道 4 种支架蛋白<sup>[2]</sup>。

#### 3.3.1 CrkII

*Crk* 基因最先是从小鼠肉瘤病毒株 CT10 分离出来的转化基因 v-crk,后来在人类细胞中相继发现了 *CrkI* 和 *CrkII* 等。*Crk* 蛋白属于衔接蛋白家族。*CrkII* 的氨基末端 SH3(Src homology 3)功能区可与

JNK 表面的富含脯氨酸序列 PPxIPxK 相互作用<sup>[10]</sup>。在由 Rac1 激活 JNK 过程中, 这种相互作用是必需的。CrkII 蛋白与 Crk 相关作用物 p130Cas (Crk - associated substrate, 130 kDa 蛋白) 先组成复合物, 再通过 SH3 序列引起 JNK 的募集, 形成了含有 JNK、p130Cas 和 MKK4 的多蛋白的复合物。MKK4 属于 MAPKK (MAPK kinase) 家族, 是 JNK 的激活酶之一。因此, 在 Rac1 诱导 JNK 的信号途径中, CrkII 可能是个支架蛋白<sup>[10]</sup>。

**3.3.2 细丝蛋白 (filamin)** 细丝蛋白也被称为 ABP280 (actin - binding protein - 280) 可结合 MKK4 和肿瘤坏死因子受体相关因子 2 (tumor necrosis factor receptor - associated factor 2, TRAF2)<sup>[11]</sup>。在缺乏细丝蛋白的黑素瘤细胞中, 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 不能活化 JNK, 异位表达的细丝蛋白可弥补缺陷。TRAF2 是 TNF 活化 JNK 时必需的成分, 现在发现它可以与细丝蛋白结合。因此对于 TNF 信号途径, 细丝蛋白可能是个支架蛋白。然而, MKK4 与细丝蛋白的相互作用的意义不清, 因为 MKK4 可促进 TNF 活化 JNK, 而并非是必需<sup>[12]</sup>。细丝蛋白是否与其他 JNK 信号通路成员作用未见报道。

**3.3.3  $\beta$ -抑制蛋白质 ( $\beta$ -arrestin)**  $\beta$ -抑制蛋白质属于衔接蛋白 (adaptor proteins) 的抑制蛋白家族, 有  $\beta$ -抑制蛋白质 - 1 和  $\beta$ -抑制蛋白质 - 2。这些蛋白与配体结合后, 被 GPCR 激酶 (G - protein - coupled receptor kinase) 磷酸化后与 GPCRs (G - protein - coupled receptor) 结合。衔接蛋白阻断了 GPCRs 与异源三聚体 G 蛋白相互作用, 使受体内化并滞留在内质网中。抑制蛋白分子在由 GPCPs 诱导的异源三聚体 G 蛋白极性化中起着重要的作用。抑制蛋白也可募集其他信号分子给受体。如  $\beta$ -抑制蛋白质 - 1 募集 c - Src 给  $\beta$ -抑制蛋白质受体。近来实验表明,  $\beta$ -抑制蛋白质 - 2 可募集 ASK1, MKK4 和 JNK3 给血管紧张素 II 受体 (angiotensin II receptor)<sup>[13]</sup>。 $\beta$ -抑制蛋白质 - 2 可直接结合 ASK1 和 JNK3, 间接结合 MKK4。 $\beta$ -抑制蛋白质 - 2 不与 JNK1 或 JNK2 结合。

**3.3.4 JIP (JNK interacting protein)** JIP 家族最初认为是与 JIK 结合的蛋白, 后来发现, JIP 还可以与 MLKs (mixed - lineage protein kinases) 和 MKK7 (MAPK kinase 的一种) 作用。JIP 蛋白包括 JIP1 和 JIP2 (也分别称为 IB1 和 IB2)。JIP 蛋白含 SH3 功能区和 PTB (polypyrimidine - tract - binding) 功能区。SH3 功能用的配体还未发现。已报道几种 PTB 功能区的配体: p190Rho - GEF, amyloid precursor 蛋白, LDL 受体

(lowdensity lipoprotein receptor) 相关家族成员 ApoER2、Megalin、和 LRP - 1<sup>[2]</sup>。JIP3 蛋白结构上与 JIP1 和 JIP2 无关, 但也可与 MIK、MKK7、JNK 相互作用。JIP3 的另一种剪接体 JSAP 与 JNK、MKK4、MEKK1 可结合形成复合物。近来在果蝇中发现, JIP3 的同源区与 Sunday driver 基因有关。JIP3 通过一个卷曲螺旋与驱动蛋白 (kinesin) 轻链的 TPR 功能区相互作用。JIP1 与 JIP2 的 C 末端区也类似的与驱动蛋白轻链的 TPR 功能区相互作用。这些表明, JIP 不仅作为 JNK 的信号途径的支架蛋白, 也可运输微管动力蛋白激酶 - 1 (microtubule motor protein kinesin - 1)<sup>[14]</sup>。JIP 蛋白不仅帮助 JNK 信号成员的亚细胞定位, 还可作为衔接蛋白使分子定位容易。例如, amyloid precursor 蛋白结合 JIP1 的 PTB 功能区, JNK 磷酸化 amyloid precursor 蛋白的 Thr - 668 位点, 提高蛋白水解, 便于分泌过程<sup>[2]</sup>。

#### 4 JNK 信号途径的新成员

最近发现了 JNK 信号通路中新的负调控因子双特异性 MAP 激酶磷酸化酶 MKP7 (MAP kinase phosphatase), 它可以选择性地与 JNK 和某些 P38 MAP 激酶相互作用<sup>[15]</sup>。还发现热休克蛋白 Hsp72 是 JNK 的天然抑制蛋白。NIH3T3 细胞株经轻度热休克 (43 °C 20 min) 预处理后可以抑制由紫外光 (UV) 所激发的 JNK 的活性。在轻度热休克反应中, Hsp72 的反义寡核苷酸抑制了 Hsp72 的产生, 同时废除了热休克对 UV 所致的 JNK 激活和凋亡的抑制作用。体外结合实验和激酶研究都表明 Hsp72 可与 JNK1 结合, 且 Hsp72 的多肽结合域对结合和抑制 JNK1 是重要的。通过免疫共沉淀证实内源性 Hsp72 可与 JNK1 结合, 并抑制依赖 JNK 的细胞凋亡。总之, Hsp72 通过直接抑制 JNK 来调节应激活化信号。可抑制 JNK 因此可调控环境应激诱导的 JNK 作用和凋亡<sup>[16]</sup>。另外, Ev1 癌基因产物也被发现可抑制 JNK, 从而抑制环境应激所致的细胞死亡<sup>[17]</sup>。“NO”是一氧化氮可通过共价修饰, 亚硝基化 JNK 来抑制 JNK 作用<sup>[18]</sup>。

Pin1 是脯氨酰基异构酶 (prolyl isomerase)<sup>[19]</sup>, 可激活 cyclin D1 启动子。Pin1 含有 WW 功能区可与磷酸化 Ser/Thr - Pro 位点相互作用。Pin1 与已被 JNK 双磷酸化的 c - Jun 之间相互作用, 与 c - Jun 活性区的顺/反构造有关。转染研究表明, Pin1 可提高依赖 JNK 的 c - Jun 转录活性, Pin1 过量表达会促进肿瘤生长。

在神经元中也发现了新的 JNK 凋亡信号成员 Bim, 是 BH3 唯一的 Bcl2 家族成员<sup>[20]</sup>。神经生长因子

退化引起了 BimEL 的表达, 细胞色素 c 释放, 发生了细胞凋亡。这些实验表明在神经元中依赖 JNK 的细胞凋亡过程中, Bim 是重要参与者。

## 5 结 语

JNK 信号通路中还有许多未知的问题, 支架蛋白 CrkII、细丝蛋白、 $\beta$ -抑制蛋白、JIP 还有激活 JNK 的 MAPKKK(MAPK kinase kinase) 成员, 这些蛋白的功能还需要进一步探索。基因剔除技术是解决上述问题的一个重要手段。早期已经建立的小鼠模型还需要更细致的细胞生物动力学 (cell biology dynamics) 和 JNK 信号通路作用于基因表达的研究。JNK 参与了多种病理过程, 如心脏肥大反应, 糖尿病相关高血糖引起的内皮细胞凋亡和糖尿病相关的胰腺  $\beta$  细胞凋亡, 神经萎缩等疾病。近来发现 PSNL(partial sciatic nerve ligation) 活化了 JNK/MAPK 途径<sup>[21]</sup>, JNK 也许与神经痛的发病机制有关。在鳞皮病中, 过多的磷酸化 JNK 与细胞异常分化和增殖有关系<sup>[22]</sup>。因此 JNK 可作为一个分子治疗靶。如利用 CEP-11004 抑制 MLK, 间接抑制 JNK, 可控制细胞色素 c 的释放。JNK 抑制剂可作为治疗 Alzheimer's 和 Parkinson's 病的新型药物, 现已进入临床 II 期实验<sup>[23]</sup>。进一步的工作是确定 JNK 在各种疾病中的作用、分子机制以及在疾病防治中的意义。

## 参考文献:

- [1] Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, et al. Selective interaction of JNK prote in kinase is forms with transcription factors[J]. *EMBO J*, 1996, 15:2760-2770.
- [2] Claire R, Roger J. The JNK signaling transduction pathway[J]. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2002, 12:14-21.
- [3] Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. *Cell*, 2000, 103:239-252.
- [4] Jonathan B. Weitzman. JNK [J]. *Current Biology*, 2000, 10(8):R290.
- [5] Catherine Dunna, Carolyn Wiltshire, Ann MacLarena, et al. Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor[J]. *Cellular Signalling*, 2002, 14:585-593.
- [6] Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, et al. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells [J]. *Gene Dev*, 1998a, 12:2658-2663.
- [7] Tournier C, Hess P, Yang DD, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway [J]. *Science*, 2000, 288:870-874.
- [8] Noguchi K, Kitanaka C, Yamana H, et al. Regulation of c-Myc through phosphorylation at Ser-62 and Ser-71 by c-Jun N-terminal kinase [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274:32580-32587.
- [9] Tanoue Takuji, Nishida, et al. Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades[J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 93(2-3):193-202.
- [10] Girardin SE, Yaniv M. A direct interaction between JNK1 and CrkII is critical for Rac1-induced JNK activation [J]. *EMBO J*, 2001, 20:3437-3446.
- [11] Leonardi A, Ellinger-Ziegelbauer H, Frazoso G, et al. Physical and function interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:271-278.
- [12] Tournier C, Dong C, Turner TK, et al. MKK7 is an essential component of the JNK signal transduction pathway activated by pro-inflammatory cytokines [J]. *Genes Dev*, 2001, 15:1419-1426.
- [13] McDonald PH, Chow CW, Miller WE, et al. Beta-arrestin 2: a receptor-regulated MAPK scaffold for the activation of JNK 3 [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:27770-27777.
- [14] Meyer D, Liu A, Margolis B. Interaction of c-Jun amino-terminal kinase interacting protein-1 with p190 rho GEF and its localization in differentiated neurons [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274:35113-35118.
- [15] Tanous T, Yamamoto T, Maeda R. A Novel MAPK phosphatase MKP-7 acts preferentially on JNK/SAPK and p38 alpha and beta MAPKs [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276:26629-26639.
- [16] Park HS, Lee JS, Huh SH, et al. Hsp 72 functions as a natural inhibitory protein of c-Jun N-terminal kinase [J]. *EMBO J*, 2001, 20:446-456.
- [17] Kurokawa M, Mitani K, Yamagata T, et al. The evi-1 oncoprotein inhibits c-Jun N-terminal kinase and prevents stress-induced cell death [J]. *EMBO J*, 2000, 19:2958-2968.
- [18] Park HS, Huh SH, Kim MS, et al. Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:14382-14387.
- [19] Wulf GM, Ryo A, Wulf GG, et al. Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1 [J]. *EMBO J*, 2001, 20:3459-3472.
- [20] Putcha GV, Oulder KL, Golden JP, et al. Induction of BIM, a proapoptotic BH3-only BCL-2 family member, is critical neuronal apoptosis [J]. *Neuron*, 2001, 29:615-628.
- [21] Weiya Ma, Remi Quirion. Partial sciatic nerve ligation induces increase in the phosphorylation of extra cellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) in astrocytes in the lumbar spinal dorsal horn and the gracile nucleus [J]. *Pain*, 2002, 99:175-184.
- [22] Hidetoshi Takahashi, Masaki Ibe, Satoshi Nakamura, et al. Extracellular regulated kinase and c-Jun N-terminal kinase are activated in psoriatic involved epidermis [J]. *J Dermatological Science*, 2002, 30(2):94-99.
- [23] Ute Hidding, Kirsten Mielke, Vicki Waetzig, et al. The c-Jun N-terminal kinase in cerebral microglia: immunological functions in the brain [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2002, 64(5-6):781-788.