

◇ 综 述 ◇

解离素 - 金属蛋白酶 17 活性调控机制的研究进展

朱可馨¹综述 王 冰², 王志成³审校

摘要 血小板在发生活化或凋亡的同时伴随有黏附受体糖蛋白(GP) I b α 酶切, GP I b α 酶切作为血小板发生活化或凋亡的一个重要生物标志物。目前, GP I b α 酶切主要由解离素 - 金属蛋白酶 17 (ADAM17) 所介导。ADAM17 是锌离子依赖的金属蛋白酶, 属于 adamalysin 蛋白家族, 与其他金属酶密切相关。现就近年来 ADAM17 的结构、功能以及活性调节等方面的研究进行综述。

关键词 金属蛋白酶; 血小板; 酶切

中图分类号 R 34; R 331.1 + 43

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492 (2014) 08 - 1185 - 04

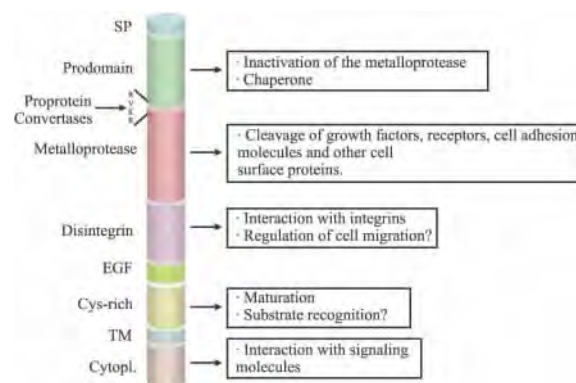


图 1 ADAM17 不同结构域及其功能示意图

1 ADAM17 结构

ADAM17 由 824 个氨基酸残基组成的 I 型跨膜蛋白, 编码基因定位在染色体 2p25^[1]。ADAM17 具有显著的结构特点, 含有多个结构域, 见图 1。从 N 端开始包括: ① 信号肽 (1 ~ 17 位氨基酸残基); ② 前域 (18 ~ 214 位氨基酸残基); ③ 金属蛋白酶或催化域 (215 ~ 473 位氨基酸残基); ④ 解离素域 (474 ~ 572 位氨基酸残基); ⑤ 表皮生长因子样域 (573 ~ 602); ⑥ 半胱氨酸富含域 (603 ~ 671 位氨基酸残基); ⑦ 跨膜域 (672 ~ 694 位氨基酸残基); ⑧ 胞质域 (695 ~ 824 位氨基酸残基)^[2]。

2 ADAM17 功能

2.1 酶切膜蛋白胞外域 ADAM17 最重要的功能是在水解酶切各种跨膜蛋白的胞外域, 酶切位点通常位于胞外域的近膜处^[3]。目前被证实的 ADAM17 底物已超过 50 个, 而且随着研究的深入还会有越来

越多的底物被发现。ADAM17 底物包括表皮生长因子受体配体、促炎症细胞因子、黏附分子、淀粉前体蛋白等^[2-3]。

2.2 调节的膜内蛋白水解 (regulated intramembrane proteolysis, RIP) 有些膜蛋白胞外域被 ADAM17 或其他蛋白酶酶切以后, 跨膜域能被进一步水解酶切, 称为 RIP^[4]。Christian^[5] 研究发现, Notch 蛋白胞外域首先在 α 酶切位点被 ADAM17 或 ADAM10 酶切后, 接着在膜内被由多个蛋白酶组成的 γ -分泌酶 (如早老蛋白 presenilin) 所酶切, 被 γ -分泌酶酶切以后剩余的胞内部分被转移到细胞核, 调节不同基因的转录^[6]。

3 ADAM17 活性调节

3.1 ADAM17 不同结构域对 ADAM17 活性调节

3.1.1 前域 ADAM17 前域能抑制 ADAM17 金属蛋白酶域的酶活性。有研究^[7]表明, ADAM17 解离素域能提高前域的抑制功能。ADAM17 前域在细胞内高尔基体网络被蛋白原转化酶家族成员 furin 在金属蛋白酶域之前的 4 个氨基酸残基 (精氨酸 - 缬氨酸 - 赖氨酸 - 精氨酸) 处酶切^[8]。

3.1.2 催化域或金属蛋白酶域 ADAM17 催化域含有典型的锌离子螯合序列 HEXXHXXGXXH (X 代表任意氨基酸残基), 负责加工膜结合的蛋白 例如: 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF α)。使用突变分析研究显示, 金属蛋白酶域第

2014 - 04 - 14 接收

基金项目: 上海市教委科技创新项目 (编号: 12YZ068); 上海市自然科学基金 (编号: 12ZR1429900)

作者单位: ¹ 上海中医药大学中药学院, 上海 201203

² 上海中医药大学教学实验中心, 上海 201203

³ 上海市中医医院实验中心, 上海 200071

作者简介: 朱可馨, 女, 硕士研究生;

王志成, 男, 助理研究员, 责任作者, E-mail: ahwzc@126.com

王 冰, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: annabel_cn@sina.com

225 位半胱氨酸和 435 位蛋氨酸以及解离素域第 600 位半胱氨酸残基对于 ADAM17 催化活性是必需的^[9]。第 435 位蛋氨酸残基对于 ADAM17 活性中心的重要性在 M435I, M435L 和 M435S 突变研究中进一步被证实^[9]。

金属蛋白酶组织抑制剂 3 (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMP-3) 是 ADAM17 天然的抑制剂,能结合 ADAM17 催化域。然而,TIMP-3 抑制效果受到 ADAM17 C-端组分(解离素域和半胱氨酸富含域)的影响,这些 C-端组分能明显削弱 TIMP-3 对 ADAM17 催化域的抑制活性^[9]。Janes et al^[9] 研究 TIMP-3 与 ADAM17 催化域结合构成的复合物的晶体结构发现,TIMP-3 伸展到 ADAM17 表面独特的疏水袋,通过两个亮氨酸残基有效的将 TIMP-3 结合到 ADAM17 催化域。

3.1.3 解离素域 目前能与 ADAM17 解离素域结合的整合素是 $\alpha 5 \beta 1$,ADAM17 能抑制 $\alpha 5 \beta 1$ 介导的细胞迁移^[10]。然而, $\alpha 5 \beta 1$ 结合 ADAM17 解离素域在体内的生理意义以及是否影响 ADAM17 酶切活性目前尚不明确。

3.1.4 半胱氨酸富含域 有报道^[11]表明,ADAM17 半胱氨酸富含域对于 IL-1R-III 胞外域的酶切是必需的,而对于 TNF α 或 p75TNFR 胞外域酶切不是必需的。ADAM17 解离素/半胱氨酸富含域含有 2 个高度保守邻近的半胱氨酸模序(CXXC, X 代表 2 个其他氨基酸),CXXC 模序在其他蛋白中已被证实受到氧化-还原修饰^[9]。在任何一个模序中,使用丙氨酸代替半胱氨酸,明显抑制 ADAM17 活性^[9],表明半胱氨酸富含域在调节 ADAM17 活性中发挥重要作用。

3.1.5 跨膜域 过表达截断型 ADAM17 研究^[11]显示,在佛波酯(phorbol 12-myristate-13-acetate, PMA)刺激的细胞,只有表达具有跨膜域的 ADAM17 才能有效酶切 TNF α ,表明跨膜域对于 ADAM17 的活性非常重要。

3.1.6 胞内域 ADAM17 胞内域是由脯氨酸富含的 130 个氨基酸残基组成,含有 1 个潜在的跨膜域近端酪氨酸磷酸化位点 DKKLDKQYESL,和 1 个 SH3 结合位点(第 731 ~ 738 位氨基酸残基)^[9]。有研究^[11]显示 ADAM17 胞内域对于 PMA 诱导的 ADAM17 底物的酶切不是必需的。PMA 是诱导金属蛋白酶活化强的诱导剂,对于研究 ADAMs 酶活性改变是很好的工具。但是,PMA 不是生理性诱导剂,因此需要进一步研究在生理性诱导剂刺激条件下,

胞质域对 ADAM17 酶活性的影响。

3.2 翻译后修饰对 ADAM17 活性调节 ADAM17 最重要的翻译后修饰是在高尔基体网络进行的前域酶切,导致 ADAM17 成熟^[9]。其他翻译后修饰包括 ADAM17 的糖基化和磷酸化。在成熟的 ADAM17 有 6 个潜在的 N-连接糖基化位点^[9],这表明糖基化可能是重要的 ADAM17 活化的调节机制。ADAM17 分子量为 130 ku 是 ADAM17 糖基化形式^[9]。然而,到目前为止还不清楚 ADAM17 糖基化怎样影响 ADAM17 活化和转运。

另一个重要的翻译后修饰是磷酸化。ADAM17 胞质域丝氨酸和苏氨酸的磷酸化已进行广泛的研究。但是,不同研究小组得到的结果不同,有的甚至相反。Waheed et al^[12] 研究发现,在 CHO 和 HEK293 细胞株,PMA 和表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)刺激能诱导 ADAM17 在 735 位苏氨酸残基发生磷酸化,磷酸化由有丝分裂原活化蛋白激酶 ERK 催化,同时伴有跨膜蛋白 TrkA 神经营养因子受体酶切增加。其他研究^[13]显示,PMA 和 EGF 诱导 ADAM17 在 819 位丝氨酸残基而不是苏氨酸残基(或酪氨酸残基)磷酸化,磷酸化由 ERK 催化;同时发现生长因子刺激能诱导 ADAM17 在 791 位丝氨酸残基脱磷酸^[13]。然而,很少有报道关于非 PMA 刺激介导的 ADAM17 磷酸化。Adrain et al^[14] 研究发现,在癌细胞系,G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor, GPCR)刺激物胃泌素释放肽能诱导 Src-PI3K-PDK1 信号通路活化,磷酸肌醇依赖的蛋白激酶 1(phosphoinositide-dependent kinase 1, PDK1)能直接磷酸化 ADAM17 的苏氨酸和丝氨酸残基,但是,ADAM17 胞内域具体磷酸化位点和胞内域在 ADAM17 活性中的具体作用需要进一步研究。在 HEK293 细胞系,另一个 GPCR 刺激物卡巴可能诱导 ADAM17 735 位苏氨酸残基和 702 位酪氨酸残基发生磷酸化。Yin et al^[15] 研究发现,通过 GPCR 活化信号通路,创伤、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)或溶血磷脂酸(lysophosphatidic acid, LPA)处理的角膜上皮细胞能诱导 ERK 依赖的 ADAM17 丝氨酸磷酸化。上述这些研究结果有些是相反的,可能原因是研究者采用的是仿真系统:过表达 ADAM17 的转化或转染细胞,以及主要使用非生理性诱导剂 PMA 来研究 ADAM17 磷酸化过程。另一种可能原因是 ADAM17 在不同的残基发生磷酸化取决于细胞类型和刺激。因此,为了更好的理解这种现象,今后在研究 ADAM17 翻译后修饰

时,最好采用原代未转染的细胞,而且也要使用生理性刺激物来代替 PMA。

3.3 ADAM17 胞内转运对其活性调节 与翻译后修饰一样,ADAM17 胞内转运可能也调控其酶切活性。最近研究^[9]表明,在 furin 酶切 ADAM17 前域期间和酶切之后,活化的 ADAM17 定位在胆固醇富含的膜性微区,这种膜性微区称为脂筏。定位在脂筏的活化 ADAM17 在空间上与其底物分离,因此从空间上限制其活性^[10]。同时发现,将细胞膜胆固醇消耗后能增加 ADAM17 酶切底物的活性,表明在细胞膜表面 ADAM17 酶切活性可能受到胆固醇运转的调节。最近有报道^[11]表明,高密度脂蛋白 (high density lipoproteins, HDLs) 能改变脂筏结构,进而活化 ADAM17,引起 ADAM17 底物的酶切增加。另外,ERK-依赖的 ADAM17 胞内域 735 位苏氨酸残基磷酸化对于 ADAM17 在成熟过程中转运到分泌通路是必需的^[12]。Ebsen et al^[13]研究发现,使用 PMA,ADAM17 在细胞表面表达减少,认为是 ADAM17 内化和降解的结果。相反,其他研究小组研究^[14]发现,PMA 刺激并不引起 ADAM17 在细胞中重新分布,但能减少细胞内总的 ADAM17 含量。尽管这方面的研究报道很多,但是目前对于调控 ADAM17 转运的机制还不清楚。

4 ADAM17 与人类疾病

ADAM17 涉及许多人类的疾病,包括癌症、败血症、糖尿病、多发性硬化症、老年性痴呆等。

4.1 内毒素休克和败血症 在脑膜炎双球菌或脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激的单核细胞,其表面 TNF- α 的量迅速减少,表明 ADAM17 在败血症中发挥重要的作用^[15]。脑膜炎患者的血液和腹水中 ADAM17 活性增加,同时分叶核中性粒细胞表面 TNF α 和 L-选择素减少。而且,最近研究^[16]显示,在骨髓细胞缺乏 ADAM17 活性的小鼠,通过抑制循环中 TNF α 的量,能减少内毒素休克引起小鼠的致死率,表明 ADAM17 在内毒素休克中的作用。

4.2 多发性硬化症 ADAM17 也涉及神经炎症性疾病,如多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS)。在急性 MS 患者,外周单核细胞 ADAM17 活化增加。而且,采用免疫组化,对死于 MS 患者的尸体进行研究^[17]显示,ADAM17 和 TNFR2 存在活化 MS 斑块,同时,患者脑脊液中,ADAM17 和可溶性 TNFR2 含量增加。在急性 MS 损伤,内皮细胞,小胶质细胞,星形胶质细胞的 ADAM17 表达增加。ADAM17 在

MS 中的作用可能是通过酶切酪氨酸激酶 Ax1 和 Mer 诱饵受体,促进斑块形成,改变生长因子信号和延长损伤活动^[18],然而,这种可能性需要进一步验证。

4.3 老年性痴呆 ADAM17 在老年性痴呆中扮演重要角色,ADAM17 作为 α -分泌酶酶切淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 产生可溶性 APPs α ,APPs α 不参与构成细胞外老年斑。如果 APP 被 β -分泌酶所酶切,产生 β 淀粉样多肽 ($A\beta$ 多肽), $A\beta$ 多肽是构成细胞外老年斑的主要成分。在老年痴呆患者大脑淀粉样斑块周围,观察到小胶质细胞和星形胶质细胞活化,以及增加的炎症介质,证实 $A\beta$ 多肽能诱导炎症^[19]。ADAM17 定位在脑部含有淀粉样斑块的区域。最近研究^[20]显示,能调节 ADAM17 活性的 ADAM17 胞内域结合蛋白 FHL2 对于 APPs α 的形成也是必需的。

4.4 恶性肿瘤 ADAM17 通过酶切肿瘤生长过程中必需的生长因子而参与癌症的形成。已发现,肿瘤组织 ADAM17 活性升高,伴有组织中表皮生长因子配体酶切增加,能促进肿瘤恶性程度的发展。ADAM17 在各种恶性肿瘤中的作用,目前了解最深入的是乳腺癌。在乳腺癌,ADAM17 过表达与 TGF α 表达、肿瘤级数和转移相关联,而且 ADAM17 活化增加预示着乳腺癌患者存活期缩短^[21]。在乳腺癌转移的患者,血清中能检测到乳腺癌标志物 nectin-4,nectin-4 是被 ADAM17 所酶切。体外实验^[22]显示,ADAM17 诱导乳腺癌细胞增殖、转移是通过活化 EGFR-PI3K-AKT 信号通路。而且,通过小 RNAs 干扰技术干扰 ADAM17 活性后,乳腺癌细胞恶性表型能恢复到正常表型,进一步表明 ADAM17 在乳腺癌中的重要病理生理作用。

5 结语

ADAM17 表达在大多数哺乳动物细胞,在调控生理性和病理性过程中发挥重要作用。ADAM17 作为重要的 sheddase,对于正常哺乳动物的发育和正常生命的维持是必需的。鉴于 ADAM17 的重要作用,研究 ADAM17 活化机制就显得非常重要。例如:怎样做到一种药物只针对癌症细胞的 ADAM17,而不影响其他正常组织细胞的 ADAM17 功能? 虽然一些 ADAM17 特异性抑制药物能特异性抑制 ADAM17 活性而不抑制其他金属蛋白酶活性,但是其副作用还是非常大的。由于 ADAM17 具有双重特性 (既能促进细胞增殖又能抑制细胞增殖),所以

有些效果可能对于某些组织或疾病是有利的,但对其他组织是有害的。因此,ADAM17 活性必需在细胞所处的特定环境下进行考虑,这主要取决于与 ADAM17 信号通路相连的其他信号通路和分子在不同组织细胞所处的环境下,对 ADAM17 活化影响是不同的。总之,理解体内 ADAM17 活性调控的机制对于与 ADAM17 有关疾病的治疗具有重要意义。

参考文献

- [1] Rose-John S. ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets [J]. *Pharmacol Res*, 2013, 71(5): 19–22.
- [2] Edwards D R, Handsley M M, Pennington C J. The ADAM metalloproteinases [J]. *Mol Aspects Med*, 2008, 29(5): 258–89.
- [3] Menghini R, Fiorentino L, Casagrande V, et al. The role of ADAM17 in metabolic inflammation [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228(1): 12–7.
- [4] Gooz M. ADAM-17: the enzyme that does it all [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2010, 45(2): 146–69.
- [5] Christian L M. The ADAM family: insights into Notch proteolysis [J]. *Fly (Austin)*, 2012, 6(1): 30–4.
- [6] Li X, Yan Y, Huang W, et al. The regulation of TACE catalytic function by its prodomain [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(4): 641–51.
- [7] Tape C J, Willems S H, Dombernowsky S L, et al. Cross-domain inhibition of TACE ectodomain [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(14): 5578–83.
- [8] Perez L, Kerrigan J E, Li X, et al. Substitution of methionine 435 with leucine, isoleucine, and serine in tumor necrosis factor alpha converting enzyme inactivates ectodomain shedding activity [J]. *Biochem Cell Biol*, 2007, 85(1): 141–9.
- [9] Janes P W, Saha N, Barton W A, et al. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans [J]. *Cell*, 2005, 123(2): 291–304.
- [10] Gooz P, Dang Y, Higashiyama S, et al. A disintegrin and metalloenzyme (ADAM) 17 activation is regulated by $\alpha 5 \beta 1$ integrin in kidney mesangial cells [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e33350.
- [11] Li X, Perez L, Fan H. Inhibitory role of TACE/ADAM17 cytotail in protein ectodomain shedding [J]. *World J Biol Chem*, 2011, 2(11): 246–51.
- [12] Waheed F, Dan Q, Amoozadeh Y, et al. Central role of the exchange factor GEF-H1 in TNF- α -induced sequential activation of Rac, ADAM17/TACE, and RhoA in tubular epithelial cells [J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(7): 1068–82.
- [13] Li X, Perez L, Fan H. Inhibitory role of TACE/ADAM17 cytotail in protein ectodomain shedding [J]. *World J Biol Chem*, 2011, 2(11): 246–51.
- [14] Adrain C, Zettl M, Christova Y, et al. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE [J]. *Science*, 2012, 335(6065): 225–8.
- [15] Yin J, Yu F S. ERK1/2 mediate wounding- and G-protein-coupled receptor ligands-induced EGFR activation via regulating ADAM17 and HB-EGF shedding [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50(1): 132–9.
- [16] Tellier E, Canault M, Rebsomen L, et al. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts [J]. *Exp Cell Res*, 2006, 312(20): 3969–80.
- [17] Tellier E, Canault M, Poggi M, et al. HDLs activate ADAM17-dependent shedding [J]. *J Cell Physiol*, 2008, 214(3): 687–93.
- [18] Soond S M, Everson B, Riches D W, et al. ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF α -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking [J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt11): 2371–80.
- [19] Ebsen H, Schroder A, Kabelitz D, et al. Differential surface expression of ADAM10 and ADAM17 on human T lymphocytes and tumor cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(10): e76853.
- [20] Guo S, Peng M, Zhao Q, et al. Role of ADAM10 and ADAM17 in CD16b shedding mediated by different stimulators [J]. *Chin Med Sci J*, 2012, 27(2): 73–9.
- [21] Yousef A A, Suliman G A. The predictive prognostic values of serum TNF- α in comparison to SOFA score monitoring in critically ill patients [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 258029.
- [22] Becker-Pauly C, Rose-John S. TNF α cleavage beyond TACE/ADAM17: matrix metalloproteinase 13 is a potential therapeutic target in sepsis and colitis [J]. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(7): 902–4.
- [23] Warren K M, Reeves T M, Phillips L L. MT5-MMP, ADAM-10, and N-cadherin act in concert to facilitate synapse reorganization after traumatic brain injury [J]. *J Neurotrauma*, 2012, 29(10): 1922–40.
- [24] Weinger J G, Omari K M, Marsden K, et al. Up-regulation of soluble Axl and Mer receptor tyrosine kinase negatively correlates with Gas6 in established multiple sclerosis lesions [J]. *Am J Pathol*, 2009, 175(1): 283–93.
- [25] Pluta R, Furmaga-Jablonska W, Maciejewski R, et al. Brain ischemia activates β - and γ -secretase cleavage of amyloid precursor protein: significance in sporadic Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 47(1): 425–34.
- [26] Tanahashi H, Yoshioka K. RNA interference silencing of DRAL affects processing of amyloid precursor protein [J]. *Neurosci Lett*, 2008, 439(3): 293–7.
- [27] McGowan P M, McKiernan E, Bolster F, et al. ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer [J]. *Ann Oncol*, 2008, 19(6): 1075–81.
- [28] Duffy M J, Mullooly M, O'Donovan N, et al. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer [J]. *Clin Proteomics*, 2011, 8(1): 9.