

## 14-3-3 蛋白家族及其临床应用研究进展

# The Basics of 14-3-3 Protein Family and Research Progress on Therapeutic Applications of 14-3-3 Protein

孔令印, 张耀洲\*

KONG Ling-Yin and ZHANG Yao-Zhou\*

浙江理工大学生命科学学院 生物化学研究所 杭州 310018

*Institute of Biochemistry, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China*

**摘 要** 14-3-3 蛋白家族是一组高度保守的可溶性酸性蛋白质,分子量在 28 ~ 33kD 之间,广泛分布于各种真核生物之中。该蛋白能够特异地结合含有磷酸化丝氨酸或苏氨酸的肽段,参与多种信号转导途径。14-3-3 蛋白调节着许多重要细胞生命活动,如 新陈代谢、细胞周期、细胞生长发育、细胞的存活和凋亡以及基因转录,该蛋白家族异常与疾病的发生密切相关,尤其是 14-3-3 蛋白在脑脊液中的分布与一些神经系统疾病密切相关。14-3-3 蛋白已成为一些疾病的临床诊断指标,其作为疾病治疗的靶点也在研究之中。主要阐述了 14-3-3 蛋白的结构、功能、及其在疾病治疗中的应用。

**关键词** 14-3-3 蛋白家族,信号转导,临床应用,癌症

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0781-08

**Abstract** The 14-3-3 proteins comprise a family of highly conserved acidic protein with subunit molecular mass 28 ~ 33kD and are widely found in different eukaryotic cells. 14-3-3 proteins were the first polypeptides shown to have phosphoserine/threonine (pSer/Thr) binding properties which firmly established its importance in cell signaling. 14-3-3 proteins tend to form dimeric proteins to modulate protein-protein interactions. 14-3-3 proteins have been shown to contribute to the regulation of such crucial cellular processes as metabolism, signal transduction, cell cycle control, cell growth and differentiation, apoptosis, protein trafficking, transcription, stress responses and malignant transformation. Many reports link 14-3-3 to disorders, particularly the neurological disorders and cancer. The 14-3-3 test has been used for the diagnosis of prion diseases. 14-3-3 could be exploited for therapeutic purposes. In this review, we discuss the structure function of 14-3-3 protein and the related research progress in therapeutic applications.

**Key words** 14-3-3 protein family, signal transduction, therapeutic applications, cancer

14-3-3 蛋白家族是真核生物细胞中一类含量丰富的高度保守的蛋白质,其不同生物中的种类也是不同的,从 2 种到 13 种不等,14-3-3 蛋白之间易

形成同源或异源二聚体。1994 年 Morrison 和 Muslin 发现 14-3-3 蛋白能够特异地结合到含有磷酸化丝氨酸和苏氨酸的肽段上<sup>[1]</sup>,从此 14-3-3 蛋白作为第一

Received: January 10, 2007; Accepted: February 16, 2007.

This work was supported by the grants from the National High Technology Research and Development Programs of China (No. 2005AA206120 and No. 2005BA711A07), National Basic Research Program of China (No. 2005CB121000) and Zhejiang Natural Science Foundation (No. Z204267).

\* Corresponding author. Tel: +86-571-86843198; Fax: +86-571-86843198; E-mail: yaozhou@chinagene.com

国家高技术研究与发展项目(No. 2005AA206120 和 No. 2005BA711A07) 国家重点基础研究发展计划(973)项目(No. 2005CB121006)和浙江省自然科学基金(No. Z204267)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

个特异地结合磷酸化丝氨酸和苏氨酸的信号转导分子,引起了人们的普遍关注。研究表明与 14-3-3 蛋白结合并受其调节的分子有 200 多种,这些分子主要涉及到新陈代谢、细胞周期、细胞凋亡、细胞的分化与发育、基因转录、信号转导等生命活动,而这些生命活动的任何异常都与疾病密切相关。目前已在许多疾病中发现 14-3-3 蛋白家族的异常现象,尤其是在多种脑疾病病人的脑脊液中发现了 14-3-3 蛋白的异常,并且以 14-3-3 蛋白为靶点进行疾病治疗的手段正在研究之中。

1 14-3-3 蛋白的发现

14-3-3 蛋白首先是 Moored 等在分离牛脑蛋白的过程中发现的,其名字是根据其在作者自制的 DEAE 纤维素柱层析中的流分以及在淀粉凝胶电泳中的位置命名的<sup>[2]</sup>。后来也有根据其功能命名为其它的名字,但是随着研究的进展发现 14-3-3 蛋白的功能越来越多,没有一个统一的名字能概括其功能,因此这个名字一直沿用至今,并得到了大家的认可。14-3-3 蛋白陆续在许多真核生物中发现,到目前为止发现的 14-3-3 蛋白的种类已有 200 多种,并且在

一个物种至少有两种 14-3-3 蛋白,哺乳动物(人类,小鼠)中有 7 种亚型,酵母以及果蝇中有 2 种,在植物中一般多达十几种,如拟南芥中有 13 种(可能 15 种)亚型<sup>[3]</sup>。目前我们实验室在家蚕中发现了两种 14-3-3 蛋白,依据其推测的氨基酸序列进行序列比对,发现这两种 14-3-3 蛋白分别与 14-3-3 $\zeta$  和 14-3-3 $\epsilon$  同源性比较高。目前几乎在所有真核生物中发现了 14-3-3 蛋白,而在原核生物中至今没发现,14-3-3 蛋白起源和进化仍然是个谜。

2 14-3-3 蛋白家族结构特征

14-3-3 蛋白家族在氨基酸序列上是高度保守的,如非洲爪蟾与人类 14-3-3 蛋白在氨基酸序列上就有 84% 的同源性<sup>[4]</sup>。首先获得是 14-3-3 $\zeta$  和  $\tau$  的晶体结构,后来各种 14-3-3 蛋白结构被研究,目前已有 23 种 14-3-3 蛋白以及与其配体复合物的结晶结构被报道。每个 14-3-3 蛋白单体的氨基酸序列可以大致分为三部分:氨基端、保守的核心区域以及羧基端。每个 14-3-3 蛋白单体由九个反平行的  $\alpha$  螺旋形成一种类似马鞍形的结构,14-3-3 蛋白之间形成“U”型的同源或异源二聚体(如图 1)。

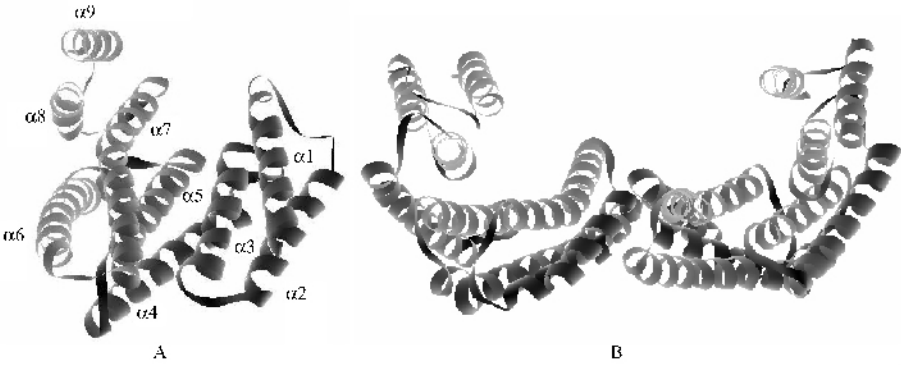


图 1 人类 14-3-3 $\epsilon$  的结晶结构<sup>[5]</sup>(PDB 号为 2BR9, A :14-3-3 $\epsilon$  单体, B :14-3-3 $\epsilon$  二聚体)

Fig.1 The crystal structure of human 14-3-3 $\zeta$  (PDB ID 2BR9)

A :14-3-3 $\epsilon$  monomer ; B :14-3-3 $\epsilon$  dimer.

14-3-3 蛋白主要通过其核心区域的双亲沟与含有磷酸化丝氨酸或苏氨酸的肽段结合。通过研究 14-3-3 蛋白与 Raf-1 的结合位点<sup>[1]</sup>以及扫描所有哺乳动物和芽殖酵母的磷酸化肽库<sup>[6]</sup>发现了两种 14-3-3 蛋白结合基序,基序 1(RSXpSXP)和基序 2(RXXpSXP, pS 为磷酸化丝氨酸, X 为任意氨基酸)这两种基序几乎能与所有 14-3-3 蛋白结合。但是有的 14-3-3 蛋白结合位点不同于这两种基序,有的甚至不需要磷酸化,如植物 H<sup>+</sup>-ATP 酶结合基序为 YpTV<sup>[7]</sup>;ADP-核糖基转移酶外酶 S 为 DALDL<sup>[8]</sup>;

血小板糖蛋白 Ib-IX-V 复合物为 GSHL<sup>[9]</sup>。后来 Coblitz 等又鉴定出第三种 14-3-3 蛋白结合基序,这个基序位于蛋白质的 C 端为-SWTX-COOH(X 非脯氨酸)<sup>[10]</sup>。

3 14-3-3 蛋白的生物学功能

14-3-3 蛋白家族是一个高度保守的蛋白家族,在细胞中具有重要生物学功能。在 HEK293 细胞中,与 14-3-3 蛋白可能结合的 117 种蛋白质中有 45% 的与细胞交流和信号转导有关,10% 的与细胞

组织结构有关,3%的与新陈代谢有关,15%与核酸的合成和加工有关,这些蛋白见表 1<sup>[11]</sup>。这表明 14-

3-3 蛋白参与了信号转导、细胞周期、细胞凋亡、酶活性调节等多种生命活动。

表 1 14-3-3 蛋白在 HEK293 细胞中的结合蛋白

Table 1 The binding proteins of 14-3-3 protein in HEK293 cell

Protein name	Function/Homology
Cytoskeletal organization and dynamics	
ABLIM	actin-binding protein
apical protein 2	actin-binding protein
RhoE	Rho-binding protein
ARHGAP11A	Rho inhibition by GTP hydrolysis
RhoGAP10	Rho inhibition by GTP hydrolysis
TIM oncogene	Rho activation by GDP/GTP exchange
Rho GEF 17	Rho activation by GDP/GTP exchange
Rho GEF 16	Rho activation by GDP/GTP exchange
BAIL-associated protein 1	scaffold for GEFs at tight junctions
p130Cas *	actin reorganization SRC transformation
cingulin	tight junction regulation
C-terminal tensin-like	tensin-like with focal adhesion function
gigaxonin	intermediate filament organization
GRB7	RTK-substrate ;invasion
ladinin 1	anchoring filament of basement membrane
MARK1	phosphorylation of microtubule proteins
MARK2	phosphorylation of microtubule proteins
rho interacting protein 3	PHD domain
PAK 4	actin cytoskeleton reorganization ;filopodia
partitioning-defective 3-like protein	cellular polarity
partitioning-defective 3 protein	cellular polarity
plakophilin 2a	connects desmosomal plaque to IF
plakophilin 3	connects desmosomal plaque to IF
liprin-beta 1	focal adhesion disassembly regulation
liprin-beta 2	PTPase binding protein
PTPN3	cytoskeletal regulation ;PTPase
Rac GTPase activating protein 1	negatively regulates Rho-mediated signals
RALGPS2	Ral-A exchange factor
rhophilin 2	inhibits rho activity
Rho GTPase-activating protein	involved in β-catenin /N-cadherin /NMDA signaling
sciellin	comified envelope formation ;LIM domain
shroom-related protein	binds F-actin ;regulation of cytoskeletal org.
signal-induced proliferation-A1L1	RAP1-GAP protein target of HPV-E6
signal-induced proliferation-A1L3	putative GAP protein
Spir-1 protein	actin organizer
tight junction protein 2	organization of epithelial intercellular junctions
Mitogenic signaling	
adenomatosis polyposis coli	tumor suppressor ;wnt signalling
A-RAF1	proto-oncogene ;serine/threonine kinase
B-RAF *	proto-oncogene ;serine/threonine kinase
c-RAF *	proto-oncogene ;serine/threonine kinase
casein kinase II alpha 1 subunit	phosphorylates acidic proteins as p53 and XRCC1
deltex homolog 2	notch signaling
DYRK1A	proliferating regulation ;serine/threonine kinase
insulin receptor substrate 1 *	insulin signaling
insulin receptor substrate-2 *	insulin signaling
MEKK2b *	regulates SAPK and ERK pathways
MAPKAP1	growth factor regulated kinase
Mig-6	negative regulator of EGFR signaling

续表 1

Protein name	Function/Homology
Mitogenic signaling	
oxysterol-binding protein-like 3	intracellular lipid receptor
PI3K-C2beta	EGFR-signaling
PIK4CB	phosphoinositide cascade
PPP1R3D	glycogen-targeting subunit of protein phosphatase 1
PTPN2	dephosphorylation of tyrosine residues
SAM and SH3 domain 1	adapter molecule for receptor signaling
Nsp1	activation of JNK1
SH3-domain binding protein 4	SH3 domain
SHCBP1	Shc adaptor protein
suppression of tumorigenicity 5	inhibitor of RAS signaling
TNK1	non-receptor tyrosine kinase
Cell cycle	
ajuba	G2/M progression
kinesin family member 23	cytokinesis
C-TAK1 *	phosphorylates CDC25C
prostate tumor overexpressed gene 1	promotes S phase entry
wee1 *	inactivates CDC2 by phosphorylation
AZK kinase	inhibition of cyclin E expression
Protein degradation	
Arg/Abl-interacting protein 2	degradation of c-Abl
ITCH	E3 ubiquitin-protein ligase
NEDD4-like	regulation of epithelial sodium channel
NEDD4La	ubiquitin-protein ligase
ubiquitin specific protease 8	deubiquinating enzyme
Chromatin structure and DNA-binding	
histone deacetylase 4 *	repression of transcription
histone deacetylase 7A *	repression of transcription
LISCH7	BR-HLH-ZIP transcription factor
nuclear protein NP220	DNA-binding
protein associated with Myc	negative regulation of the TSC1 complex
tripartite motif protein TRIM32	mediates activity of HIV-1 Tat protein
Intracellular traffic	
kinesin 1 *	microtubule based movement
kinesin light chain 2	microtubule associated transport
kinesin 2	microtubule associated transport
cytohesin 2	involved in vesicle coating
RAE1	clathrin mediated endocytosis
synaptojanin 2	nucleocytoplasmic transport
mRNA processing	
FUS interacting protein	splicing
HNRPU	Pol II pre-RNA binding
SRm300	splicing coactivator subunit
Metabolism	
H <sup>+</sup> -ATP synthase *	ATP synthesis
ISCU2	iron-sulfur cluster biosynthesis

\* Known 14-3-3 binding proteins ,the rest are potential 14-3-3 proteins .

3.1 14-3-3 蛋白与信号转导

14-3-3 蛋白可与信号转导过程中重要分子相互作用 ,调节他们的活性或者是改变他们的亚细胞定位 ,是信号转导中的重要调节因子。其中研究得比较清楚的就是原癌基因 *raf-1* ,Raf-1 是丝裂素活化

蛋白激酶信号转导途径中的重要调节因子 ,14-3-3 蛋白既可以抑制其活性 ,也可以刺激其活性。当 14-3-3 蛋白与 Raf-1 的磷酸化 Ser-621 结合时可以刺激其活性 ,而与 Ser-259 相互作用时 ,可以抑制其活性。因此 14-3-3 蛋白通过调节丝裂素活化蛋白激酶信号

转导途径,调节细胞的增殖和分化。14-3-3 蛋白通过与整合蛋白  $\beta 2$ 、 $\beta 3$ 、 $\beta 4$ 、 $\alpha 6\beta 4$  以及 p130cas 相互作用,调节整合蛋白信号转导途径,从而影响细胞的形态及迁移能力。14-3-3 蛋白还可激活表皮钠离子通道(ENaC),抑制  $\text{Ca}^{2+}$  激活的  $\text{Cl}^-$  通道( $\text{CaCC}$ )<sup>[12]</sup>,动态地调节 HERG  $\text{K}^+$  通道<sup>[13]</sup>。此外 14-3-3 蛋白还可与受体酪氨酸激酶信号转导途径中的 Grb10<sup>[14]</sup>以及 G 蛋白信号转导途径中的 RGS3 相互作用<sup>[11]</sup>。这表明 14-3-3 蛋白可能成为各种信号转导途径的交叉点,通过对 14-3-3 蛋白的研究可更好地了解复杂的细胞信号转导网络。

### 3.2 14-3-3 蛋白与细胞的存亡密切相关,可以抑制细胞凋亡,促进细胞存活

当细胞的 DNA 受到损伤时,会激活一种称为检验点激酶 CH1K,CH1K 磷酸化 CDC25C,磷酸化的 CDC25C 可与 14-3-3 蛋白结合而滞留于细胞质中,从而使细胞滞留于 G2/M 期,直到损伤的 DNA 完全修复,从而也就避免了由于 DNA 损伤造成的细胞死亡,促进了细胞存活,详细综述参考文献[15]。另外 14-3-3 蛋白还可以抑制细胞的凋亡,14-3-3 主要是通过抑制凋亡蛋白 BAD<sup>[16]</sup>、凋亡信号相关激酶(ASK)<sup>[17]</sup>以及 FKHRL1(a member of forkhead family of transcription factors)<sup>[18]</sup>的活性,抑制细胞凋亡;另外 14-3-3 蛋白还是 Akt 介导的细胞存活机制中的一个成分,促进细胞的存活,Porter G.W. 和 Rosenquist M. 对 14-3-3 蛋白在细胞凋亡中的作用以及方式进行了详细描述<sup>[19-20]</sup>。

### 3.3 14-3-3 与细胞周期

细胞周期的准确调控对生物的生存、繁殖、发育和遗传均是十分重要的。使细胞进入有丝分裂的分子动力是细胞周期蛋白 B/CDC2 蛋白激酶。在整个动物细胞周期中这个激酶可以在细胞核与细胞质之间穿梭,除 M 期,它主要位于细胞质中,在间期细胞中由于核内激酶 Wee1 和胞质内的激酶 Myt1 使之在 Thr-14 和 Try-15 上磷酸化,从而使之无活性。当细胞将要进入 M 期时,CDC25 家族的 CDC25B 或 CDC25C 激活细胞周期 B/CDC2 使细胞进入 M 期。这个过程的具体机制是在间期细胞中 CDC25C 可能是在 TAK1 或者其它不知名的蛋白激酶作用下,在 Ser-216 处磷酸化,14-3-3 蛋白与这个磷酸化位点结合,抑制了 CDC25C 的活性,从而使细胞滞留于间期<sup>[21]</sup>。当外界条件成熟时,14-3-3 蛋白会从 CDC25C 上释放下来,进而 Ser-216 脱去磷酸化,同时 Ser-214 磷酸化,使 CDC25C 即使被磷酸化也不会再与 14-3-3

蛋白重新结合,使 CDC25C 具有活性,使细胞进入 M 期。

另外 14-3-3 蛋白还可以与磷酸化的  $\text{H}^+$ -ATP 酶的  $\beta$  亚基相结合,而抑制了  $\text{H}^+$ -ATP 酶的活性<sup>[22]</sup>,参与了新陈代谢活动。14-3-3 蛋白与众多的生命活动都密切相关,因而对 14-3-3 蛋白的深入研究有助于更好地了解整个生命活动之间的关联,更好地阐明生命活动的规律。

## 4 14-3-3 蛋白的临床应用

### 4.1 14-3-3 蛋白与疾病的发生

4.1.1 14-3-3 蛋白与神经系统疾病:14-3-3 蛋白首先是在大脑中发现,且在大脑中大量表达,这说明 14-3-3 蛋白在大脑中发挥着重要作用,实验证明 14-3-3 蛋白异常与许多脑疾病有关。14-3-3 蛋白通常位于胞浆中,在脑脊液(CSF)中含量甚微。1986 年在散发型克雅氏病人(spCJD)的 CSF 中发现两种蛋白质 p130 和 p131,后来证明它们属于 14-3-3 蛋白家族成员,接着大量研究表明 CSF 中 14-3-3 蛋白的存在与 spCJD 密切相关,后来随着检测手段的改进,14-3-3 蛋白可以作为 spCJD 病的辅助性诊断指标。因此 1998 年世界卫生组织将 14-3-3 蛋白阳性作为 spCJD 病的一个辅助性诊断指标<sup>[23]</sup>。后来在其它神经系统疾病的 CSF 中发现了 14-3-3 蛋白,如:线粒体脑肌病伴乳酸酸中毒和卒中样发作综合征(mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS)<sup>[24]</sup>、桥本氏脑病(Hashimoto's encephalopathy)<sup>[25]</sup>、多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)<sup>[26]</sup>、副肿瘤性神经系统疾病(paraneoplastic neurological disorders, PNDs)<sup>[27]</sup>等,但在这些疾病中 14-3-3 蛋白的特征与 spCJD 中不同,如在 PNDs 的 CSF 中 14-3-3 蛋白的免疫印迹大部分为两条带,而在 spCJD 中大部分为一条带。因此 14-3-3 蛋白也可作为这些疾病的辅助性诊断指标。

在对帕金森病(PD)和阿尔茨海默氏病(AD)研究中发现 14-3-3 蛋白也参与其中。PD 疾病的主要特征是在细胞内具有路易氏小体(Lewy Bodies),路易氏小体主要成分为  $\alpha$ -synuclein( $\alpha$ -SN), $\alpha$ -SN 可以紧密地与 14-3-3 蛋白结合,而 PD 病人的  $\alpha$ -SN 具有 A30P 和 A53T 突变,使之不能与 14-3-3 蛋白结合。parkin 基因(编码一种 E3 泛肽连接酶)的突变是引发常染色体隐性遗传早发型帕金森病(ARJP)的主要原因,14-3-3 蛋白可以与正常 parkin 结合,抑制其泛肽连接酶活性,而  $\alpha$ -SN 可以紧密地与 14-3-3 蛋白

结合,使其与 parkin 分离。通过对  $\alpha$ -SN 对 parkin 的激活和 14-3-3 蛋白对 parkin 抑制的研究有可能揭示 PD 的致病机理<sup>[28]</sup>。AD 疾病的一个主要的特点是拥有神经原纤维缠结(NFT),NFT 的主要组成成分是异常过度磷酸化的微管相关蛋白 Tau,这种 Tau 蛋白以聚集的双螺旋丝(PHF)存在。Tau 蛋白的正常功能是稳定微管蛋白,它的非正常磷酸化导致微管不稳定,从而形成神经原纤维缠结。Layfield 等发现 14-3-3 $\zeta$  为海马趾 NFT 的一个关键成分<sup>[29]</sup>,后来 Hashiguchi 等又发现 14-3-3 $\zeta$  可以与 Tau 蛋白紧密结合,并刺激 PKA 磷酸化 Tau 蛋白微管结合区的 Ser-262/Ser-356<sup>[30]</sup>。因此推测可能机制为 PKA 磷酸化 Tau 蛋白,产生 14-3-3 蛋白结合位点,从而使 14-3-3 蛋白与微管蛋白竞争结合 Tau 蛋白,因而导致微管不稳定。

**4.1.2 14-3-3 蛋白与癌症** 癌细胞的形成是复杂的过程,主要包括细胞具有不受控制的增殖能力、逃避免疫系统而存活的能力、抗凋亡能力、侵袭和移植能力。研究发现 14-3-3 蛋白通过与一些蛋白相互作用参与和调节了癌变的每一个过程,这些蛋白包括:原癌基因产物(Raf、Bcr、Bcr-Abl 等)、与细胞凋亡有关的蛋白(Bad、Bax、Ask-1 等)、肿瘤抑制蛋白(p53、TSC2、p27 等)、细胞周期调节蛋白(Cdc25A、B 和 C、Wee1、Chk1 等)以及与细胞迁移有关的蛋白(p130 Cas、整合蛋白  $\beta$ 1、 $\beta$ 2 和  $\beta$ 3、Ron 等),这些说明 14-3-3 蛋白与癌症具有密切的关系。另外 14-3-3 蛋白通过 Raf 影响着丝裂素活化蛋白激酶信号转导途径,而该信号转导途径的异常导致细胞非正常增殖,且经常会导致细胞恶性转化。目前 14-3-3 蛋白与癌症相关的主要证据来源于 14-3-3 $\sigma$ ,14-3-3 $\sigma$  的表达水平在各种各样的转染细胞系以及乳腺癌、胃癌、肝癌中都有显著下降,这种表达水平的下降主要由于 14-3-3 $\sigma$  的启动子被甲基化<sup>[31]</sup>。14-3-3 $\sigma$  基因的后天性甲基化修饰是癌症发生的早期性事件,并且可以引起形态学上的改变。而在直肠癌中 14-3-3 $\sigma$  具有过表达的现象。因此在尿中和体液中 14-3-3 $\sigma$  甲基化水平有可能对检测癌症病人的复发以及一些疾病的早期诊断有所帮助。关于 14-3-3 蛋白在癌症中的作用,Tzivion G、Wilker E 和 Hermeking H 等对此专门进行了详细阐述<sup>[31-33]</sup>。

## 4.2 14-3-3 蛋白与疾病治疗

14-3-3 蛋白与众多疾病密切相关,因此 14-3-3 蛋白作为疾病治疗的手段受到了人们的密切关注,目前对其作为疾病治疗靶点的研究主要集中在以下

几个方面。

首先是开发 14-3-3 蛋白的特异性抑制剂。Masters 和他的同事研究出一种 14-3-3 蛋白的肽抑制剂 R18,该抑制剂是通过噬菌体展示技术筛选出来的由 18 个氨基酸组成的肽段<sup>[34]</sup>。它可以抑制所有 14-3-3 蛋白亚型,并且其亲和系数基本一致。试验证明 R18 成功地抑制了 14-3-3 蛋白与 ASK1、BAD、Raf-1 的结合<sup>[35-37]</sup>。为了增加抑制剂对 14-3-3 蛋白二聚体的亲和力,他们通过一个连接肽设计了二聚体的 R18 抑制剂,命名为 difopein(dimeric fourteen-three-three peptide inhibitor)<sup>[38]</sup>。在细胞内表达 difopein 导致凋亡细胞急剧增加,而癌细胞经常逃避细胞凋亡,而无限地存活。Master 和他的同事通过控制 difopein 表达量,并加入传统的抗凋亡因子,导致大量细胞凋亡,而当它们单独应用时,在一定剂量上均没有导致大量细胞凋亡。因此我们可以利用 difopein 并结合传统的治疗方法,更好地对一些疑难疾病进行治疗。

另一种策略是抑制一些磷酸化激酶的活性。因为 14-3-3 蛋白的结合位点经常是磷酸化的,因而通过抑制磷酸化激酶可以使 14-3-3 蛋白不能与之配体结合,从而达到治疗疾病的目的。许多癌症的治疗方法是使 DNA 受到损伤,从而杀死正在分化的肿瘤细胞,但是目前治疗的最大障碍是由于治疗一段以后肿瘤就会出现抗性。其可能的原因是当 DNA 受到损伤时,由于细胞周期中的 DNA 损伤检验点,细胞就会停在这一阶段,避免了立即死亡,而使肿瘤细胞具有抗性。那么废除检验点,可增加由 DNA 损伤诱导的细胞死亡。如抗癌因子 UCN-01 几乎可以抑制所有使 CDC25C Ser-216 磷酸化的激酶,包括 CHK1、TAK、CHK2 以及一种未知的激酶,从而阻止了 14-3-3 蛋白与 CDC25C 的结合,从而废除细胞周期检验点。利用 UCN-01 和另一种 CHK1 抑制剂——SB-218078 极大地提高了 DNA 损伤试剂的毒性<sup>[39]</sup>。UCN-01 说明通过抑制使 14-3-3 蛋白结合基序磷酸化的一些激酶活性可以成功地破坏 14-3-3 蛋白与癌细胞中靶蛋白的结合,废除其对癌细胞的保护作用,从而起到更好的治疗作用。

以上两种策略都是阻止 14-3-3 蛋白与其配体结合,抑制 14-3-3 蛋白的功能,增加细胞对传统癌症治疗方法的敏感度,从而达到更好的治疗效果。但目前这些方法只是停留在实验阶段,是否在临床上具有重大作用,有待进一步研究。

在许多类型的癌症中 14-3-3 $\sigma$  表达沉默,主要是

由于其启动子 CpG 的甲基化。利用甲基转移酶抑制剂 5-aza-2-deoxycytidine(5-Aza)和组蛋白脱乙酰基酶抑制剂可以逆转超甲基化现象,体外实验表明利用 5-Aza 处理过的细胞,14-3-3 $\sigma$  又重新表达,并且 14-3-3 $\sigma$  的表达水平以一种剂量依赖的方式增加<sup>[40,41]</sup>。因此甲基转移酶抑制剂(5-Aza)可作为潜在的治疗药物,该方面的研究已进入临床阶段。

随着 RNAi 和目的基因转导技术的发展,可发展出新的针对 14-3-3 蛋白的疾病治疗方法。利用基因转导技术可增加某个 14-3-3 蛋白亚型的表达水平或利用 RNAi 干扰技术降低某个 14-3-3 蛋白亚型的表达水平从而达到治疗疾病的目的,如敲除 14-3-3 $\zeta$  基因可能可以预防阿尔茨海默氏病或减缓其进一步恶化。14-3-3 蛋白参与众多细胞生命活动,因此针对 14-3-3 蛋白的疾病治疗,也许会产生有害的作用,如果能够利用靶向治疗,并结合传统治疗方法,也许可以研究出较好针对疑难疾病的治疗方法。

## 5 展望

14-3-3 蛋白可与多种蛋白质相互作用,具有多种重要功能。目前在研究 14-3-3 蛋白的配体、14-3-3 蛋白的功能及其调节机制等方面取得了巨大进展,但是仍有许多问题值得我们研究如:可利用最近发展起来的蛋白质组学技术、生物信息学并借助于传统的基因组学技术,发现更多的 14-3-3 蛋白的配体尤其是与疾病有关的蛋白,同时还可以进一步了解 14-3-3 蛋白对信号转导、细胞的生长发育、细胞凋亡、细胞周期等生命活动的调节机制,为疾病治疗提供更好的理论基础。14-3-3 蛋白在磷酸化时可以解聚成单体,14-3-3 蛋白单体也可以结合配体,那么 14-3-3 蛋白单体又是怎么行使功能的呢?这些都有待于我们进一步研究。相信通过对 14-3-3 蛋白的研究可以更好地了解细胞的各种信号转导途径以及它们之间的相互作用,从而更好地阐明细胞的各种生命活动。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM, et al. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, 1996, **84**(6): 389 – 397.
- [2] Moore BW, Perez VJ. Specific acidic proteins of the nervous system. In: Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration. Edited by Carlson FD. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1967, pp. 343 – 359.
- [3] Gardino AK, Smerdon SJ, Yaffe MB. Structural determinants of 14-3-3 binding specificities and regulation of subcellular localization of 14-3-3-ligand complexes: a comparison of the X-ray crystal structures of all human 14-3-3 isoforms. *Semin Cancer Biol*, 2006, **16**(3): 173 – 182.
- [4] Kousteni S, Tura F, Sweeney GE, et al. Sequence and expression analysis of a *Xenopus laevis* cDNA which encodes a homologue of mammalian 14-3-3 zeta protein. *Gene*, 1997, **190**(2): 279 – 285.
- [5] Yang X, Lee WH, Sobott F, et al. Structural basis for protein-protein interactions in the 14-3-3 protein family. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, **103**(46): 17237 – 17242.
- [6] Yaffe MB, Rittinger K, Volinia S, et al. The structural basis for 14-3-3 phosphopeptide binding specificity. *Cell*, 1997, **91**(7): 961 – 971.
- [7] Fuglsang AT, Visconti S, Drumm K, et al. Binding of 14-3-3 protein to the plasma membrane H<sup>+</sup> -ATPase AHA2 involves the three C-terminal residues Tyr(946)-Thr-Val and requires phosphorylation of Thr(947). *J Biol Chem*, 1999, **274**(51): 36774 – 36780.
- [8] Henriksson ML, Francis MS, Peden A, et al. A nonphosphorylated 14-3-3 binding motif on exoenzyme S that is functional *in vivo*. *Eur J Biochem*, 2002, **269**(20): 4921 – 4929.
- [9] Du X, Fox JE, Pei S. Identification of a binding sequence for the 14-3-3 protein within the cytoplasmic domain of the adhesion receptor, platelet glycoprotein Ib alpha. *J Biol Chem*, 1996, **271**(13): 7362 – 7367.
- [10] Coblitz B, Shikano S, Wu M, et al. C-terminal recognition by 14-3-3 proteins for surface expression of membrane receptors. *J Biol Chem*, 2005, **280**(43): 36263 – 36272.
- [11] Benzinger A, Muster N, Koch HB, et al. Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(6): 785 – 795.
- [12] Chan HC, Wu WL, So SC, et al. Modulation of the Ca<sup>2+</sup> -activated Cl<sup>-</sup> channel by 14-3-3epsilon. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **270**(2): 581 – 587.
- [13] Kagan A, Melman YF, Krumerman A, et al. 14-3-3 amplifies and prolongs adrenergic stimulation of HERG K<sup>+</sup> channel activity. *EMBO J*, 2002, **21**(8): 1889 – 1898.
- [14] Urschel S, Bassermann F, Bai RY, et al. Phosphorylation of grb10 regulates its interaction with 14-3-3. *J Biol Chem*, 2005, **280**(17): 16987 – 16993.
- [15] Hermeking H, Benzinger A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Semin Cancer Biol JT-Seminars in Cancer Biology*, 2006, **16**(3): 183 – 192.
- [16] Zha J, Harada H, Yang E, et al. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell*, 1996, **87**(4): 619 – 628.
- [17] Subramanian RR, Zhang H, Wang H, et al. Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. *Exp Cell Res*, 2004, **294**(2): 581 – 591.
- [18] Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 1999, **96**(6): 857 – 868.

- [ 19 ] Porter GW , Khuri FR , Fu H. Dynamic 14-3-3/client protein interactions integrate survival and apoptotic pathways. *Semin Cancer Biol* 2006 **16**( 3 ):193 – 202.
- [ 20 ] Rosenquist M. 14-3-3 proteins in apoptosis. *Braz J Med Biol Res* , 2003 **36**( 4 ) 403 – 408.
- [ 21 ] Peng CY , Graves PR , Thoma RS , *et al.* Mitotic and G2 checkpoint control :regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* ,1997 **277**( 5331 ) :1501 – 1505.
- [ 22 ] Bunney TD ,van Walraven HS ,de Boer AH. 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 **98**( 7 ) 4249 – 4254.
- [ 23 ] Green AJ. Use of 14-3-3 in the diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease. *Biochem Soc Trans JT-Biochemical Society Transactions* , 2002 **30**( 4 ) 382 – 386.
- [ 24 ] Fujii K ,Tanabe Y ,Kobayashi K ,*et al.* Detection of 14-3-3 protein in the cerebrospinal fluid in mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes. *J Neurol Sci* 2005 **239**( 1 ):115 – 118.
- [ 25 ] Vander T ,Hallevy C ,Alsaed I ,*et al.* 14-3-3 protein in the CSF of a patient with Hashimoto 's encephalopathy. *J Neurol* ,2004 **251**( 10 ) :1273 – 1274.
- [ 26 ] Colucci M ,Roccatagliata L ,Capello E ,*et al.* The 14-3-3 protein in multiple sclerosis :a marker of disease severity. *Mult Scler* 2004 **10**( 5 ) 477 – 481.
- [ 27 ] Saiz A ,Graus F ,Dalmau J ,*et al.* Detection of 14-3-3 brain protein in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic neurological disorders. *Ann Neurol* ,1999 **46**( 5 ) :774 – 777.
- [ 28 ] Sato S ,Chiba T ,Sakata E ,*et al.* 14-3-3eta is a novel regulator of parkin ubiquitin ligase. *EMBO J* 2006 **25**( 1 ) 211 – 221.
- [ 29 ] Layfield R ,Fergusson J ,Aitken A ,*et al.* Neurofibrillary tangles of Alzheimer 's disease brains contain 14-3-3 proteins. *Neurosci Lett* , 1996 **209**( 1 ) 57 – 60.
- [ 30 ] Hashiguchi M ,Sobue K ,Paudel HK. 14-3-3zeta is an effector of tau protein phosphorylation. *J Biol Chem* ,2000 **275**( 33 ) :25247 – 25254.
- [ 31 ] Wilker E ,Yaffe MB. 14-3-3 Proteins——a focus on cancer and human disease. *J Mol Cell Cardiol* 2004 **37**( 3 ) 633 – 642.
- [ 32 ] Tzivion G ,Gupta VS ,Kaplun L ,*et al.* 14-3-3 proteins as potential oncogenes. *Semin Cancer Biol* 2006 **16**( 3 ) 203 – 213.
- [ 33 ] Hermeking H. The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* , 2003 **3**( 12 ) 931 – 943.
- [ 34 ] Wang B ,Yang H ,Liu YC ,*et al.* Isolation of high-affinity peptide antagonists of 14-3-3 proteins by phage display. *Biochemistry* , 1999 **38**( 38 ) :12499 – 12504.
- [ 35 ] Obsil T ,Ghirlando R ,Klein DC ,*et al.* Crystal structure of the 14-3-3zeta -serotonin N-acetyltransferase complex. a role for scaffolding in enzyme regulation. *Cell* 2001 **105**( 2 ) 257 – 267.
- [ 36 ] Yang H ,Masters SC ,Wang H ,*et al.* The proapoptotic protein Bad binds the amphipathic groove of 14-3-3zeta. *Biochim Biophys Acta* , 2001 **1547**( 2 ) 313 – 319.
- [ 37 ] Zhang L ,Chen J ,Fu H. Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1999 **96**( 15 ) 8511 – 8515.
- [ 38 ] Masters SC ,Fu H. 14-3-3 proteins mediate an essential anti-apoptotic signal. *J Biol Chem* 2001 **276**( 48 ) :45193-45200.
- [ 39 ] Graves PR ,Yu L ,Schwarz JK ,*et al.* The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem* 2000 **275**( 8 ) 5600 – 5605.
- [ 40 ] Ferguson AT ,Evron E ,Umbricht CB ,*et al.* High frequency of hypermethylation at the 14-3-3 sigma locus leads to gene silencing in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* ,2000 **97**( 11 ) :6049 – 6054.
- [ 41 ] Iwata N ,Yamamoto H ,Sasaki S ,*et al.* Frequent hypermethylation of CpG islands and loss of expression of the 14-3-3 sigma gene in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 2000 **19**( 46 ) :5298 – 5302.