

小凹蛋白 1 可能参与血管紧张素转化酶 2 介导的病毒感染

杨慧龄^{1,2}, 徐阳炎², 罗迪贤², 廖端芳²

(1. 南华大学附属第一医院临床医学研究所; 2. 南华大学药物药理研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 小凹; 病毒感染; 信号传导; 骨架区域; 血管紧张素转化酶 2

[摘要] 小凹是细胞信号在细胞膜区域的枢纽结构, 为细胞内外信号转导发生、募集、串联、级联、交汇 (cross-talk) 的集散单元。其表面标志蛋白是小凹蛋白。小凹蛋白基因家族的结构与功能在进化中从蠕虫到人都是非常相似与保守的, 其生物学功能研究是近年的热点研究领域之一。本文就小凹/小凹蛋白在介导血管紧张素转化酶 2 介导的病毒感染作用提出一些新思路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

小凹为 Palade 等于 1950 年发现的直径为 50~100 nm 大小的质膜内陷, 现在其含义已扩展。小凹能够内陷, 能在质膜平面展平, 也能够和质膜分离成为囊泡; 此外, 小凹内吞泡之间能相互融合形成葡萄串状结构和直径远大于 100 nm 的管状结构^[1,2]。其表面标志蛋白是小凹蛋白^[3]。小凹蛋白有小凹蛋白 1、小凹蛋白 2 和小凹蛋白 3 三种, 其中, 小凹蛋白 1 又有 α 、 β 两种异构体^[4]。小凹蛋白 1 和小凹蛋白 3 可独自形成同聚物, 而小凹蛋白 2 往往和小凹蛋白 1 结合形成异聚物在各种组织中表达^[5], 特别是在内皮细胞、脂肪细胞、I 型肺泡上皮细胞中表达丰富^[5]; 小凹蛋白 3 主要在肌肉组织中表达^[6]。而且, 小凹蛋白基因家族的结构与功能在进化中从蠕虫到人都是非常相似与保守的, 其生物学功能研究是近年的热点研究领域之一。研究表明小凹—小凹蛋白在介导细胞内外大分子物质转运 (胞饮/胞吐)、细胞黏附、迁移与增殖以及参与信号传导和病毒感染等方面起着重要的作用^[7,8]。

早有人认为小凹是细胞信号在细胞膜区域的枢纽结构, 为细胞内外信号转导发生、募集、串联、级联、交汇 (cross-talk) 的集散单元^[9,10]。研究发现, 许多细胞外信号的受体, 尤其是与细胞增殖相关的受体, 如血小板源生长因子受体 (PDGF)、上皮细胞生长因子受体 (EGF)、血管内皮细胞生长因子受体、神经生长因子 (NGF) 受体、内皮素受体、胰岛素受体、血管紧张素 ET 受体等均分布或优势分布于小凹区域。小凹蛋白的氨基酸序列有一段高度保守的骨架区域 (scaffolding domain, 第 82~101 个氨基酸残基)^[11], 这一区域在正常情况下可使小凹蛋白象分子伴侣一样, 结合并失活一些细胞内信号传导的重要分子。研究发现, 小凹蛋白 1 可与多种酪氨酸蛋白激酶、苏氨酸蛋白激酶、丝氨酸蛋白激酶, 如 Src 家族酪氨酸蛋白激酶、G 蛋白的 α 亚单位、EGF 受体、PKC α 、H-Ras 等结合, 并抑制这些蛋白激酶活性。

小凹虽然在很多类细胞类均有分布, 但不同组织与小凹蛋白 1 结合的信号分子也有所不同, 因而, 小凹蛋白在不同的细胞其功能有差别。例如小凹蛋白 1 是一种抑癌基因, 而小凹蛋白 1 基因敲除小鼠首先表现肺部功能紊乱并且是乳腺癌的易感模型^[12]。在单核细胞、脂肪细胞中小凹蛋白主要与脂质代谢有关, 因此动脉粥样硬化发生时的泡沫细胞上可见小凹表达下调。

关于小凹蛋白与病毒的关系, Cai 等^[13]利用分子模拟和分子对接的方法发现 SARS 冠状病毒蛋白质的有 36 个小凹蛋白结合模体 (在小凹蛋白结合分子内与小凹蛋白 1 骨架区域识别的一致序列, 如 $\Phi X \Phi X X X X \Phi$ 、 $\Phi X X X X \Phi X X \Phi$ 和 $\Phi X \Phi X X X X \Phi X X \Phi$, 其中 Φ 代表芳香族氨基酸色氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸^[14])。其中筛选出 8 个多肽基序可能和小凹蛋白 1 骨架区域结合。但尚无实验证实。令人感兴趣的是此基序与 Couet 筛选得到小凹蛋白 1 与信号分子反应的关键多肽基序完全一致, 说明 SARS 冠状病毒可能能够与小凹蛋白的骨架区域 (scaffolding domain, 第 82~101 个氨基酸残基) 结合。但结合后的意义又是什么呢?

正由于小凹上集中多种信号分子的受体, 小凹—小凹蛋白可介导许多分子、毒素、病原体 (包括病毒和细菌) 的内吞。通过小凹介导内吞的病毒包括 SV40、人乳头状瘤病毒、流感病毒、埃博拉病毒 (Ebola Zaire virus)、马尔堡病毒 (Marburg virus)、人类获得性免疫缺陷病毒 I 型 (HIV)、麻疹病毒、疱疹病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、呼吸合胞病毒 (RSV)、肝炎病毒 C (HCV)、ECHO 病毒、柯萨奇病毒等^[15]。小凹/小凹蛋白介导病毒感染参与病毒的吸附、内吞、转运、脱壳、生物合成、组装与出胞。吸附主要是通过病毒的包膜或无包膜病毒衣壳表面的配体位点与细胞表面的特异性受体结合所介导。通过小凹介导内吞的病毒一般在小凹内富含这些病毒的受体。不同的病毒受体不同。

病毒结合到小凹可触发一系列的信号传导, 诱发小凹的内陷、封闭开口, 最终形成内吞泡, 脱离细胞膜。含病毒颗粒的小凹内吞泡脱离质膜后, 形成一个小泡; 然后可能与空的小凹内吞泡融合形成一个大的内吞泡, 它不具有内涵体、溶酶体、内质网 (ER) 和高尔基体 (Golgi) 的表面标志物, 是另外

[收稿日期] 2005-03-23 [修回日期] 2006-03-04

[基金项目] 国家自然科学基金 (30400265) 资助课题

[作者简介] 杨慧龄, 博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要从事动脉硬化疾病分子药理学研究, 联系电话 0734-8279417, E-mail 为 xuhengyuy999@yahoo.com.cn。廖端芳, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事动脉硬化疾病分子药理学研究, E-mail 为 dfliao@yahoo.com。

一种细胞器,叫做 Caveosome(小凹蛋白小体,注作者自译)。Caveosome 内是非酸性的,只存在于细胞质中^[16,17]。有趣的是可溶性血管紧张素转化酶(angiotensin converting enzyme, ACE)2 与 SARS 病毒复合物也是在中性 pH 条件下才能相互作用,酸性条件(低 pH 值)将干扰 ACE2 与 SARS 病毒复合物的形成^[17]。后来发现 Caveosome 上还存在着 beta-COP,它是在 Golgi 到 ER 回收路径所需的 COPI 包被复合物中的成分。在感染几个小时后,在这种细胞器中,SV40 病毒被分到一个无小凹蛋白的管状囊中。这些囊泡迅速沿着微管移动,堆积在核周的光面内质网(SER)中。这个过程绕过了内涵体/溶酶体以及高尔基体。小凹蛋白又随同热休克蛋白胆固醇复合物一起重新返回到质膜,重新利用,完成小凹蛋白循环^[18]。用人造的病毒样颗粒(artificial virus-like particles, VP1 pseudocapsids)感染纤维母细胞和上皮细胞,通过电子共聚焦显微镜可以在近核区微管和有丝分裂微管上观察到 VPI 颗粒^[16]。Richterova 等^[16]报道,多瘤病毒通过小凹介导内吞后沿着微丝到达内质网。实际上,微管微丝都参加了小凹内吞泡和 Caveosome 的转运。根据病毒的种类不同,病毒复制和蛋白质合成以及病毒组装的部位是不同的。在生物合成后,脊髓灰质炎病毒在小凹和(或)脂质筏上发生组装^[16]。小凹蛋白 1 还被组装到了成熟的 RSV 颗粒中^[19]。许多包膜病毒的出胞位点就在小凹和(或)脂质筏处,如流感病毒 A、人类获得性免疫缺陷病毒 I 型(HIV)、麻疹病毒、疱疹病毒等^[15]。

最近, Li 等^[20]发现血管紧张素转化酶 2 是 SARS 冠状病毒的功能性受体,它和 SARS 冠状病毒的棘突(Spike, S)蛋白的 S1 段结合。介导 SARS 冠状病毒感染与复制,但 SARS 病毒如何进入细胞内、脱壳、转运、生物合成、组装与出胞过程及所参与的相互作用蛋白仍不清楚。血管紧张素转化酶 2 是一种新型血管紧张素转化酶,传统血管紧张素转化酶抑制剂对其无效。ACE2 能特异将血管紧张素 II 降解为 Ang 1~7;而小凹蛋白 1 在 I 型肺泡细胞高表达,有研究表明 ACE2 作用底物血管紧张素 II 受体等均分布或优势分布于小凹区域。那末血管紧张素转化酶 2 有可能是通过小凹/小凹蛋白进行胞内下游信号转导的。由此我们大胆提出假设:小凹/小凹蛋白 1 可能参与了 SARS 冠状病毒感染细胞?而小凹蛋白 3 为肌肉型特异表达,与此无关。Li 等^[20]利用体外重组 SARS 冠状病毒 S 蛋白研究其与其它蛋白质相互作用的成功经验提示人们不需要在研究中直接面对这种致命的病毒。从而为更多不具备 P3 实验室的科学家可在安全状态下研究 SARS 冠状病毒的生物学性状、生物阻断剂研制及药物靶点筛选提供新思路。血管紧张素转化酶 2 在多种组织如心、肾等均有分布,但未见 SARS 病毒侵犯心、肾等组织的报道,人们推测肺组织中可能还有其它未知特异或伴侣受体参与 SARS 病毒的感染^[15],综上所述,我们推测它与 SARS 病毒感染的未知伴侣受体蛋白可能特异性地存在于肺组织小凹内,是功能与介导细胞内外大分子物质转运(胞饮/胞吐)有关的信号分子;正常情况下分布于小凹内并与小凹蛋白 1 骨架区域(scaffolding domain,第 82~101 个氨基酸残基)偶联,因

此在一般情况下表现为失活状态,当血浆型血管紧张素转化酶 2 与 SARS 冠状病毒结合后,引起 SARS 病毒 S 蛋白结构构象改变,使 S 蛋白与小凹蛋白 1 脚手架域识别的一致序列暴露,并通过暴露的一致序列与小凹蛋白 1 脚手架域优势结合,从而使“未知蛋白”从与小凹蛋白 1 脚手架域的偶联中释放出来,即由失活状态转变为激活状态,从而启动和介导 SARS 病毒的胞吞。而其它组织虽然也有小凹蛋白 1 分布但缺乏这种未知的肺组织特异性伴侣受体,所以可溶性血管紧张素转化酶 2 虽在多种组织如心等均有分布,但 SARS 病毒却不能侵犯这些组织。国内多家科研机构已有成功鉴定 SARS 病毒基因序列及用质谱鉴定 SARS 病毒 S、M、N 蛋白的经验及早期诊断 SARS 方法,我们已构建好小凹蛋白 1 各种功能域缺失突变体^[21,22]。欲将小凹蛋白 1 有否参与血管紧张素转化酶 2 介导的病毒感染过程及所参与的相互作用蛋白的变化及作用进行深入研究。

[参考文献]

- [1] Jun Liu, Wang XB, Park DS, Lisanti MP. Caveolin-1 expression enhances endothelial capillary tubule formation [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 10 661-668
- [2] Dvorak AM, Dian Feng. The Vesicular/Vacuolar Organelle (VVO): A new endothelial cell permeability organelle [J]. *J Histochem Cytochem*, 2001, **49**: 419-432
- [3] Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP. Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe [J]. *J Biol Chem*, 1995, **270**: 16 395-401
- [4] Das K, Lewis RY, Scherer PE, Lisanti MP. The membrane spanning domains of caveolin-1 and 2 mediate the formation of caveolin hetero-oligomers. Implications for the assembly of caveolae membranes in vivo [J]. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 18 721-726
- [5] Scherer PE, Lewis RY, Volonté D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, et al. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolin-1 and 2 core-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo [J]. *J Biol Chem*, 1997, **272**: 29 337-346
- [6] Marek Drab, Paul Verkade, Marlies Elger, Michael Kasper, Matthias Lohn, Birgit Lauterbach, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice [J]. *Science*, 2001, **293**: 2 449-452
- [7] Sukumaran SK, Quon MJ, Nemani V. Prasadarao escherichia coli K1 internalization via caveolae requires caveolin-1 and protein kinase C interaction in human brain microvascular endothelial cells [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 50 716-724
- [8] Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion [J]. *Cancer Cell*, 2003, **4** (6): 499-515
- [9] Leonardo V, Nore BF, Anna B, Heinonen JE, Mattsson PT, Edvard Smith CI, et al. Molecular functional interaction of caveolin-1 with Bruton's tyrosine kinase and Bmx [J]. *J Biol Chem*, 2002, **277**: 9 351-357
- [10] Okamoto T, Schlegel A, Scherer PE, Lisanti MP. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 5 419-422
- [11] Felley-Bosco E, Bender F, Quest AF. Caveolin-1-mediated post-transcriptional regulation of inducible nitric oxide synthase in human colon carcinoma cells [J]. *Biol Res*, 2002, **35** (2): 169-176
- [12] Empig CJ, Goldsmith MA. Association of the caveola vesicular system with cellular entry by filoviruses [J]. *J Virol*, 2002, **76** (10): 5 266-270
- [13] Cai QC, Jiang QW, Zhao GM. Putative caveolin binding sites SARS-COV protein [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2003, **24** (10): 1 051-059

(下转第 358 页)

(上接第 354 页)

- [14] Brown G, Aitken J, Rixon HW, Sugrue RJ. Caveolin-1 is incorporated into mature respiratory syncytial virus particles during virus assembly on the surface of virus-infected cells [J]. *J Gen Virol*, 2002, **83** (Pt 3): 611-621
- [15] 罗迪贤, 杨慧龄, 廖端芳, 万艳萍. Caveolae/Caveolins 与病毒感染[J]. *生理科学进展*, 2004, **35** (4): 321-324
- [16] Richterova Z, Liebl D, Horak M. Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei [J]. *J Virol*, 2001, **75** (22): 10 880-891
- [17] Wang P, Chen J, Zheng A, Nie Y, Shi X, Wang W, et al. Expression cloning of functional receptor used by SARS coronavirus [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **315** (2): 439-444
- [18] Paul Towler, Bart Staker, Prasad SG, Saurabh Menon, Jin Tang, Thomas Parsons, et al. Pantoliano ACE2 structures reveal a large hinge-bending motion

important for inhibitor binding and catalysis [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279**: 10 174-200

- [19] Dimitrov DS. The secret life of ACE2 as a receptor for the SARS virus [J]. *Cell*, 2003, **115** (6): 652-653
- [20] Li W, Moore MJ, Vasilieva N, et al. Angiotensin converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus [J]. *Nature*, 2003, **426**: 450-454
- [21] 徐阳炎, 杨慧龄, 覃丽, 涂剑. 可提高窖蛋白基因扩增特异性的逆转录聚合酶链方法[J]. *中华医学遗传学杂志*, 2006, **1**: 59-62
- [22] 徐阳炎, 杨慧龄, 涂剑, 何淑雅, 廖端芳. pcDNA3.1/NT-GFP-小凹蛋白 1 及突变体表达载体的构建及功能鉴定[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2005, **13** (3): 297-300

(此文编辑 胡必利)