

细胞骨架蛋白调节囊泡转运及其与神经疾病的关系*

吴越阳 铁璐 李学军[△]

(北京大学医学部基础医学院药理学系, 北京 100191)

摘要 细胞内囊泡转运依赖于细胞骨架系统, 细胞骨架为囊泡转运提供了轨道, 而细胞骨架表面的马达蛋白则为其提供了动力。近年来, 随着活细胞成像技术以及相关的生化、药理实验方法的不断进步, 人们对囊泡转运的分子机制有了更加深入的认识。越来越多的实验结果表明, 细胞骨架蛋白对囊泡转运有着重要的调节作用。囊泡转运的紊乱与多种神经疾病相关。囊泡转运分子调控机制的研究, 将为多种神经疾病的治疗提供新的思路。

关键词 肌动蛋白; 微管相关蛋白; 囊泡转运; 神经疾病

中图分类号 R741.02

真核细胞具有完善的内膜系统(如溶酶体、高尔基体、内质网等)。蛋白质或颗粒物质的跨膜运输需要借助囊泡来完成。囊泡以芽生方式从供给的细胞器生成后, 携带着被转运的物质到达接受的细胞器并与其发生膜融合, 这一过程称为囊泡转运。囊泡转运过程需要一系列具有重要功能的蛋白质的参与, 并且由它们介导了纷繁复杂的蛋白质相互作用网络和高度特异的信号通路调控机制。近年研究发现囊泡转运离不开细胞骨架的参与, 细胞骨架为囊泡转运提供了轨道。位于细胞骨架表面的细胞骨架蛋白, 必然与囊泡存在相互作用, 并且可能直接或者间接通过改变细胞骨架调节囊泡转运。囊泡转运在细胞内发挥着重要的作用, 其功能的紊乱会导致多种神经疾病的发生。

一、细胞骨架

细胞骨架是真核细胞中的蛋白质纤维网架结构, 是细胞中复杂的蛋白质细丝网系统。细胞骨架由微丝(microfilament, MF)、微管(microtubule, MT)及中间纤维(intermediate filaments, IF)组成。微丝主要是由肌动蛋白(actin)组成的细丝, 又称为肌动蛋白纤维(actin filament)。肌动蛋白与肌动蛋白结合蛋白(actin binding protein)、肌球蛋白(myosin)等共同组成不同的特定结构, 执行不同的功能。微管是由微管蛋白(tubulin)和微管相关蛋白(microtubule associated protein, MAP)组成的中空圆柱状结构。微管具有极性, 通常负极指向细胞内部, 而正极指向细胞周围。中间纤维呈中空管状, 直径介于微管和微丝之间。微丝、微管和中间纤维三者高

度协调分布, 与胞核、质膜、细胞器相连, 构成了细胞形态骨架和运动协调系统^[1]。

二、细胞骨架蛋白与囊泡转运

(一) 微丝相关蛋白通过影响肌动蛋白的聚合调节胞吞作用 网格蛋白介导的囊泡内吞在真核细胞中常见于内吞营养物质、抗体和生长因子等过程, 也参与脂质和蛋白质的运输, 同时它还是回收突触囊泡膜的主要方式。

Merrifield等(2002)运用实时显微技术发现在囊泡内吞的最后阶段, 包被小窝处存在一个瞬时的肌动蛋白聚集现象。Merrifield等推测这一聚合活动与囊泡从细胞膜表面分离和远离细胞膜的运动有关。肌动蛋白为囊泡转运提供轨道, 而肌动蛋白表面的肌球蛋白则为囊泡从膜表面分离和远离膜的运动提供动力。在肌动蛋白和肌球蛋白的作用下, 囊泡逐渐向胞内运动。

肌动蛋白相关蛋白 2/3 复合物(actin related protein 2/3, Arp2/3)在肌动蛋白聚合过程中起重要的调节作用, Arp2/3与肌动蛋白单体的结构非常相似, 可作为成核位点, 促进肌动蛋白聚合。失活状态下的 Arp2/3必须经成核促进因子(nucleation-promoting factor, NPF)的激活后才能行使功能。肌动蛋白结合蛋白(actin-binding protein, Abp)是 NPF

* 国家自然科学基金(30772571)、国家基础科学人才培养基金(J0630853/J0108)和北京大学中央高校基本科研业务费资助课题

[△] 通讯作者

的一种。D Agostino等^[2]研究发现,相对于其它的NPF, Abp1p与Ap2/3的亲合力更强,但Abp1p的成核促进活性(nucleation-promoting activity)却非常弱。因此D Agostino和Goode推测, Abp1p很有可能通过与其它NPFs竞争结合Ap2/3对肌动蛋白的聚合起负性调节作用。Abp1p还可以通过磷酸化的方式来抑制Ap2/3的活性。Abp1p可以将两种激酶Ark1p和Prk1p募集到胞吞作用的位点,这两种激酶可以将Pan1p(一种NPF)磷酸化。Toshima等^[3]发现, Pan1p的磷酸化可以抑制其激活Ap2/3依赖的肌动蛋白的聚合。

(二)微管相关蛋白以磷酸化依赖的方式调节囊泡转运 微管相关蛋白与微管特异地结合在一起,对微管的功能有重要的辅助作用。MAPs由MAP-1、MAP-2、tau蛋白和MAP-4组成。目前发现的微管马达蛋白,可以归属于两大类:动力蛋白(dynein)和驱动蛋白(kinesin)。前者是一类微管激活的ATP酶,介导沿微管向极的运动,后者同样具有ATP酶的活性,介导沿微管向正极的运动^[1]。很多研究表明,MAPs是以一种磷酸化依赖的方式调节细胞内囊泡转运。

Mandelkow等(2004)发现细胞内微管结合调节激酶(microtubule affinity regulating kinase, MARK)的表达能够引起MAPs的磷酸化,导致MAPs与微管分离,从而促进囊泡转运。在原始视网膜神经节细胞中转染tau蛋白,可以抑制轴突内线粒体、APP囊泡和其它细胞成分的运输,然而这种对运输的抑制作用可以由MARK对tau蛋白的磷酸化消除。已知MAPs的磷酸化能够减弱其同微管的作用,因而是一个很好的调节胞内运输的方式。在初级神经节细胞中,高分子量的tau蛋白是MAPs的主要成分。Sato-Harada等(1996)试图证实在初级感觉神经元中调节cAMP依赖的蛋白激酶通路对胞内运输的影响,在使用双丁酰环磷腺苷(cAMP的类似物)后,轴突内大细胞器和囊泡的运输活动增强。而且这种药物作用使内源性tau蛋白磷酸化,进而减少了tau蛋白在微管上的黏附。

Dkit等^[4]发现,tau蛋白可以通过调节马达蛋白来调节囊泡转运,实验发现在遇到tau蛋白后,动力蛋白会趋向相反的方向,而驱动蛋白则会与微管分离。抑制驱动蛋白的tau蛋白浓度相当于抑制动力蛋白浓度的十分之一。其它实验也有类似的结果。Ebner等(1998)的研究显示,tau蛋白的过量表达可以通过抑制驱动蛋白来抑制囊泡沿微管的正

向运动,从而使动力蛋白介导的沿负向的运动占主导地位,结果导致了胞吐作用的减慢。在此基础上,Ebner等(1999)试图进一步探求tau蛋白抑制驱动蛋白的具体机制,他们研究活CHO细胞内被荧光标记的单个囊泡的实时运动。Ebner等比较了转染tau蛋白后对囊泡转运的不同因素的影响,包括运动速率、运动长度以及反向频率。结果显示,tau蛋白通过减少由负向运动转到正向运动的频率来扰乱囊泡双向运动的平衡。tau蛋白主要抑制向细胞表面的运输。然而,运动的速率并没有产生改变,表明马达蛋白的活性并没有受到影响。同时,tau蛋白还作为马达蛋白对微管吸附作用的抑制因子优先影响驱动蛋白。Itner等^[5]发现突变tau蛋白转基因K3小鼠神经元内驱动蛋白复合物的形成受到了干扰。JNK作用蛋白1(JNK interacting protein 1, JIP1)与驱动蛋白复合物的合成有关,参与调节囊泡与驱动蛋白的结合。实验结果表明,高度磷酸化的tau蛋白与JIP1存在相互作用,并且与驱动蛋白的轻链竞争结合JIP1。通过这种方式,高度磷酸化的tau蛋白影响了神经元沿轴突的顺向转运。

(三)MAPs通过磷酸化调节微管间距影响囊泡转运 细胞内的微管纵横交错,既作为囊泡转运的轨道,也可能对囊泡转运产生一定的阻碍作用。因此微管间距(inter-microtubular spaces, MS)对于囊泡转运起重要的调节作用,MAPs可以通过调节MS来调节囊泡转运。

人们最早认为MAPs在微管之间起的是交联蛋白(cross-linker protein)的作用。然而Max等(2000)通过研究提出,MAPs并不起交联微管的作用,而是起间隔器(spacer)的作用,并表示MAPs的一个可能功能就是保持微管之间具有足够的距离,以确保囊泡在微管表面的运动畅通。关于微管-MAPs间的相互作用机制,目前比较公认的模式是Mukhopadhyay等提出的聚合物刷模型(polymer brush model)(图1)。位于微管表面的MAPs存在两个域:一个是微管结合域(microtubule binding domain),带正电,吸附在微管的表面。另一个是突出域(projection domain),带负电,伸出微管表面。突出域的特点是没有固定结构、非常灵活,并且不停地做布朗运动。以纳秒为计量单位,每一个时刻MAPs的突出域会出现在一定的位置,但由于这个域时刻做着布朗运动,因而总的来看,MAPs的突出域会在微管周围形成一个球状的带负电的区域,这就导致相邻的微管-MAPs间存在着排斥力,进而防

止相邻的微管距离过近或者过度松散 (Mukhopadhyay 等, 2004)。因此, 当运输体积较大的囊泡时, 微管必须向四周移动来为囊泡提供足够的空间。为了能够有效地运输囊泡, 必然存在一个机制来快速调节 MS。决定 MS 的因素主要是由 MAPs 的突出域产生的排斥力所引起的对整个空间的限制作用。因此, 对 MAPs 的调节能够通过影响 MS 来调节囊泡转运。

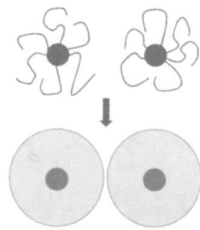


图 1 聚合物刷模型

(修改自 Mukhopadhyay 等, *Bioessays* 2004 26 1017~1025)

控制 MS 的一个重要的调节因素是 tau 蛋白和 MAP-2 突出域的磷酸化。在 tau 蛋白和 MAP-2 的突出域存在大量的磷酸化位点。随着磷酸基的不断增多, 突出域的硬度会逐渐加强, 突出域的范围加大, 排斥力增强, 进而导致 MS 的增加 (图 2)。由此可以推测, MAPs 以一种磷酸化的方式通过调节 MS 来调节囊泡转运。MAPs 的去磷酸化可以使囊泡周围的微管间的距离缩短, 从而为囊泡的前进创造更多的空间。囊泡后方 MAPs 的复磷酸化使囊泡后方的空间变小, 从而产生向前的推动力, 有助于囊泡转运。

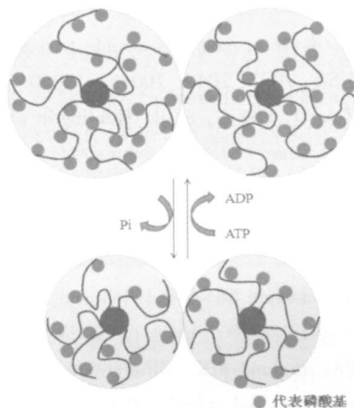


图 2 MAP 通过磷酸化状态改变调节 MS

(修改自 Mukhopadhyay 等, *Bioessays* 2004 26 1017~1025)

(四) 细胞骨架蛋白调节囊泡转运的生物学意义 囊泡转运可以实现细胞从胞外获得营养物质、蛋白质等重要成分, 以及胞内的物质转运, 可将营养

物质输送到细胞各处, 并确保功能蛋白准确的发挥效用。这一点在神经元中体现得尤为明显, 轴突末端到细胞体的距离很长, 并且轴突末梢要释放大量的神经递质, 所以神经元必须不断合成、供给大量的物质, 包括蛋白质、膜, 以补充因轴突部位的胞吐而丧失的成分。由于核糖体只存在于细胞体和树突中, 所以蛋白质必须在细胞体中合成, 然后通过顺向转运转移到轴突。轴突的物质也可通过逆向转运转移到胞体, 实现细胞内的物质循环。一旦这一循环遭到破坏, 就会引发严重的疾病。

三、细胞骨架蛋白调节囊泡转运与神经疾病的关系

(一) 细胞骨架蛋白调节囊泡转运与亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease, HD) HD 是一种致命性脑部退化疾病。HD 基因指导合成的蛋白称 Huntingtin (Htt)。在正常情况下, Htt 中存在一段重复的谷氨酸残基 (6~35), 然而在 HD 患者中, 重复的谷氨酸残基的数目大大增加。实验表明, Htt 对神经元内的囊泡转运起重要的调节作用。

在微管表面, 动力蛋白和动力蛋白激活蛋白 (dynein) 组成复合物, 介导沿微管向负极的运动。Caviston 等^[6]发现, Htt 直接同动力蛋白相连, 并且与 Htt 相关蛋白-1 (Htt-associated protein-1, HAP-1) 和动力蛋白激活蛋白组成复合物, 促进囊泡转运。Colin 等^[7]发现, Htt 的磷酸化可以作为神经元轴突顺向/逆向转运的分子开关 (molecular switch)。Htt 的磷酸化引起了驱动蛋白-1 在囊泡和微管处的聚集, 进而增加了囊泡沿轴突的顺向转运。当 Htt 去磷酸化后, 驱动蛋白-1 从微管和囊泡表面释放, 因此囊泡继续在 Htt 驱动蛋白-1 动力蛋白激活蛋白复合物的介导下向微管负极运动, 即沿轴突的逆向转运。

HD 患者神经元内 Htt 的突变, 造成神经元内囊泡转运的紊乱, 破坏了神经元胞体和轴突之间的物质循环, 进而可能导致神经元的死亡。

(二) 细胞骨架蛋白调节囊泡转运与阿尔采末病 (Alzheimer's disease, AD) AD 是一种以老年斑、神经纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)、突触密度减少和神经元丢失为主要病理改变的神经退行性疾病。NFTs 中的主要成分是大量异常磷酸化的纤维状 tau 蛋白。

淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 是一种跨膜蛋白, 在神经系统发育阶段及轴突受损时都起到了维持和保护轴突结构的重要作用。

Gunawardena等(2001)发现, APP作为驱动蛋白-1的受体参与了顺向转运过程。LaPointe等^[8]发现, tau纤维丝可以选择性抑制驱动蛋白介导的顺向快速轴突转运(fast axonal transport FAT),并引起驱动蛋白与囊泡的解离。药理学实验表明 tau纤维丝对于FAT的这种作用是由蛋白磷酸酶-1(protein phosphatase 1, PP1)和糖原合酶激酶-3(glycogen synthase kinase 3, GSK-3)介导的。Trimmer等^[9]用杂交细胞制成AD的模型,实验观察到神经元突触末端囊泡缺失,而胞体囊泡堆积,线粒体运输速度减慢或停滞,这些现象都证明微管依赖的囊泡转运发生了障碍。由上我们可以推断,由于神经元的微管、马达蛋白的异常改变,轴突运输发生了障碍,使重要物质无法运输到轴突末梢,影响轴突末梢与胞体的交流,使突触功能失调,导致神经元死亡,细胞间通讯中断,最终导致认知功能发生障碍。这可能是AD的发病原因之一。

(三)细胞骨架蛋白调节囊泡转运与运动神经元病 运动神经元病(motor neuron disease, MND)是一类以运动神经元退行性病变为特征的神经性疾病。这类疾病包括肌萎缩性脊髓侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)、脊髓延髓肌肉萎缩症(spinal bulbar muscular atrophy, SBMA)和脊髓性肌萎缩(spinal muscular atrophy, SMA)等。研究显示运动神经元的退化与动力蛋白复合物功能异常和轴突逆向转运受损有关。

Hafezparast等(2003)发现,动力蛋白重链的错义点突变使轴突内囊泡的逆向转运受损,并导致了小鼠运动神经元的退化,镜下观察发现退化的神经元中存在包涵体,这与人体病理中的关键特征相类似。Laird等^[10]发现,动力蛋白激活蛋白的错义点突变与ALS的发病有关。通过对转基因小鼠的研究发现,突变的动力蛋白激活蛋白P150^{Ghd1}特异地引起了运动神经元轴突内囊泡的逆向转运受损,轴突肿胀、退化,并最终导致了小鼠的运动神经元病。

四、结语与展望

囊泡转运的紊乱与多种神经疾病关系密切。目前,造成神经元内囊泡转运紊乱的具体机制还不很清楚。细胞骨架蛋白直接与细胞骨架和囊泡相接触,因而很可能起到下游蛋白的作用,即神经元内功能异常的蛋白通过影响细胞骨架蛋白进而导致囊泡转运的紊乱。因此这一通路可以作为药物的靶点,通过药物阻断功能异常蛋白对细胞骨架的影响来控

制疾病的发展。同时细胞骨架蛋白本身也起到调节囊泡转运的作用,因而可以直接以细胞骨架蛋白为药物靶点,通过增强或者抑制细胞骨架蛋白的功能来恢复紊乱的囊泡转运,起到缓解疾病症状的效果。细胞囊泡及运输功能的分子机制已经渗透到其它许多学科,如神经生物学、内分泌学、病毒学、胚胎学等,并且其影响在进一步扩大。相信,随着各方面研究的不断深入,最终必将阐明细胞囊泡转运更精确的分子机制,为生命科学的研究提供更详实的理论基础,并为多种神经疾病的治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- 1 高娜,赵铁耘. 细胞骨架与胰岛素相关信号转导通路. 生理科学进展, 2008, 39: 124~128
- 2 DAgostino JL, Goode BL. Dissection of Arp2/3 complex actin nucleation mechanism and distinct roles for its nucleation-promoting factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 2005, 171: 35~47.
- 3 Toshina J, Toshina JY, Martin AC, et al. Phosphoregulation of Arp2/3-dependent actin assembly during receptor-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 2005, 7: 246~254.
- 4 Dikic R, Ross JL, Goldman YE, et al. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* 2008, 319: 1086~1089
- 5 Itner LM, Ke YD, Gotz J. Phosphorylated tau interacts with e-Jun N-terminal kinase (JNK) interacting protein 1 (JIP1) in Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 2009, 284: 20909~20916
- 6 Caviston JP, Ross JL, Antony SM, et al. Huntingtin facilitates dynein/dynactin-mediated vesicle transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 10045~10050
- 7 Colin E, Zak D, Liot G, et al. Huntingtin phosphorylation acts as a molecular switch for anterograde/retrograde transport in neurons. *EMBO J* 2008, 27: 2124~2134.
- 8 LaPointe NE, Morfini G, Piquino G, et al. The amino terminus of tau inhibits kinesin-dependent axonal transport: implications for filament toxicity. *J Neurosci Res* 2009, 87: 440~451.
- 9 Trimmer PA, Borland MK. Differentiated Alzheimer's disease trans-mitochondrial cybrid cell lines exhibit reduced organelle movement. *Antioxid Redox Signal* 2005, 7: 1101~1109
- 10 Laird EM, Farah MH, Ackerley S, et al. Motor neuron disease occurring in a mutant dynactin mouse model is characterized by defects in vesicular trafficking. *J Neurosci* 2008, 28: 1997~2005.