

RTNs 家族研究进展

陈益存 陆东东 张锡然*

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省分子医学生物技术重点实验室, 南京 210097)

摘要 编码内质网蛋白家族的基因 (*RTNs*) 是一类广泛存在于真核生物的基因家族, 它有着特殊的拓扑结构。*RTNs* 蛋白的羧基端存在一个大约 200 个氨基酸的保守区 (RHD), 此保守区包含 2 个疏水区段。*RTNs* 蛋白定位内质网膜上, 高等脊椎动物中枢神经受损时, *RTN4-A/Nogo-A* 起抑制神经生长的作用, *RTNs* 蛋白家族其余成员的功能还不是很清楚, 可能与胞内运输, 细胞分裂和细胞凋亡等有关。现就 *RTNs* 成员的基本结构、表达分布、亚细胞定位、拓扑结构和 *RTNs* 蛋白的功能等进行综述。

关键词 *RTNs*; *RTN4/Nogo*; 拓扑结构; *RTNs* 蛋白功能

1991 年, Wiczorek 等^[1]从大鼠大脑 cDNA 库中克隆了 *RTN1*, 当时称为 C1-13, 发现 *RTN1* 在神经组织里特异表达。1993 年, Roebroek 等^[2]从小细胞肺癌细胞系 (NCI-H82) 和神经内分泌细胞中分离到在神经内分泌细胞中特异表达的基因, 命名为神经内分泌特异蛋白 (neuroendocrine-specific protein, NSP) 基因。1994 年, van de Velde 等^[3]对 NSP-A、NSP-C 的生物化学特征和亚细胞定位进行了研究, 发现两种蛋白质均锚定在内质网膜上, 推测是一个新的基因家族, 重新命名为 *RTNs* (reticulons)。*RTNs* 基因家族在 3' 端有高度同源性, 其编码蛋白质在羧基端存在一个大约 200 个氨基酸的保守区。近年对 *RTNs* 功能的研究集中在 *RTN4-A/Nogo-A* 的神经抑制作用以及 *RTN4-B/Nogo-B* 诱导肿瘤细胞凋亡的作用。对其余成员的生理功能研究很少。

1 *RTNs* 成员的基本结构

RTNs 在很多真核生物中存在。哺乳动物 *RTNs* 分 4 类: *RTN1*、*RTN2*、*RTN3*、*RTN4*, 其中 *RTN4* 又命名为 *Nogo* (*RTN4/Nogo*)。每一类成员又因为启动子和剪切方式的不同产生不同的转录本。人类 *RTN1* 定位在 14q21~q22, *RTN2* 定位在 19q13.3, *RTN3* 定位于 11q13, *RTN4* 定位在 2p14 → 2p13。*RTNs* 由内含子丰富的基因进化而来, 因为丢失不同的内含子形成不同类别。*RTNs* 蛋白的氨基端没有同源性, 在羧基端存在一个大约 200 个氨基酸的

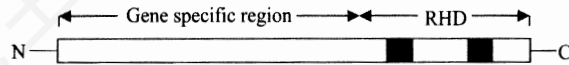


Fig.1 The basic structure of *RTNs* protein^[4]

RHD, reticulon-homology domain; ■, putative transmembrane (TM) domains

保守区 (reticulon-homology domain, RHD), 包含两个疏水区 (图 1^[4])。 *RTN1* 是 *RTNs* 蛋白家族中最大的一员, 其氨基端外显子序列是 *RTN1* 抑制神经轴突生长的功能结构域, 这种外显子只存在于两栖类, 而在鱼类中没有, 猜测其可能是在鱼类向陆生脊椎动物过度中出现。分析 *RTN4/Nogo* 的启动子发现, *RTN4-A/Nogo-A*、*RTN4-B/Nogo-B* 的调节由启动子上游 500 个核苷酸处保守的 GC 盒和 CCAAT 盒负责。*RTN4-A/Nogo-A*、*RTN4-B/Nogo-B* 的表达与否与启动子的甲基化无关, 因此基因的沉默不是发生在转录的起始, 而可能在转录后和翻译水平上。*RTN4-C/Nogo-C* 的启动子受近端和远端元件调控, 在 5' 端招募了一些反式作用因子^[5]。

2 *RTNs* 的组织特异性

哺乳动物 *RTNs* 在组织中广泛表达。其中 *RTN1* 的转录本几乎只在神经细胞和神经内分泌细胞中表达^[1,5~7]。*RTN2* 在不同组织中均有一定的表达, *RTN2-C* 在骨骼肌中显著高表达^[5]。*RTN3* 的 3 个转

收稿日期: 2004-05-31 接受日期: 2004-10-20

* 通讯作者。Tel: 025-83598779, E-mail: Xrzhang_99@sina.com

录本在很多组织和胚胎中有表达,但 *RTN3-A* 在神经组织中高表达^[8,9]。*RTN4-A/Nogo-A* 在少突胶质细胞、成人中枢神经系统有髓神经纤维细胞中高表达,在心脏和睾丸中有微弱表达,在胚胎的肌肉中也有表达^[10,11],在去神经小鼠的骨骼肌中表达量增加^[12];*RTN4-B/Nogo-B* 在中枢和外周神经系统中以及外周组织均有表达;*RTN4-C/Nogo-C* 在肌肉中特异表达^[11],在去神经的小鼠的骨骼肌中表达量减少^[12]。比较而言,*RTN3*、*RTN4-A/Nogo-A*、*RTN4-B/Nogo-B* 有着广泛的表达,它们的启动子缺少规范的 TATA 盒子,并且富含 GC。

3 RTNs 的亚细胞定位及拓扑结构

免疫组化发现 NSP-A 和 NSP-C (即 *RTN1-A*, *RTN1-C* 蛋白) 两种蛋白质连接在内质网上^[3]。进一步用免疫荧光显微术证实 NSP-A 和 NSP-C 定位在内质网上^[7]。哺乳动物中 *RTN1*、*RTN3* 和 *RTN4/Nogo* 已证实定位于内质网膜上。*RTNs* 蛋白均缺少正常的氨基端,因此猜测它们的膜定位由内部的信号区如跨膜区域引导。*RTN4-B* 跨膜区域中第 2 个疏水

区域的缺失可导致蛋白质的定位从内质网转移到细胞质^[13]。有些 *RTNs* 蛋白与细胞骨架有关。在成肌细胞中,*RTN2* 与中间纤维桥粒蛋白联系,而在肌管中它与 α 肌动蛋白联系,似乎与肌腱 Z 带有关^[14]。*RTN4-A/Nogo-A* 除了定位内质网膜上,在少突胶质细胞和成纤维细胞的细胞质膜中也有少量存在^[10]。

RTNs 蛋白的亚细胞定位可能与它们的 mRNA 分布有关。大鼠 *RTN1* 的两个转录本 mRNA 集中在某些神经细胞的轴突极和突触小体上^[15],这种区室化分布与 mRNA 3' 端一段未翻译保守区有关^[16]。

RTNs 蛋白的拓扑结构很特别,它们有 2 个疏水区域(各大约由 35~36 个氨基酸组成)可跨膜 2 次或 3 次(图 2)。研究发现,*RTN3* 蛋白的羧基端和氨基端面向胞质^[8,10]。*RTN4/Nogo* 蛋白的跨膜结构中有 66 个氨基酸的胞外区域^[10](称为 Nogo-66),位于 2 个疏水区之间。在培养的少突胶质细胞表面,*RTN4-A/Nogo-A* 蛋白的氨基端,特异的第 3 个外显子区域和 Nogo-66 都可以用抗体检测,然而在胞膜经过透化(permeabilization)处理后,氨

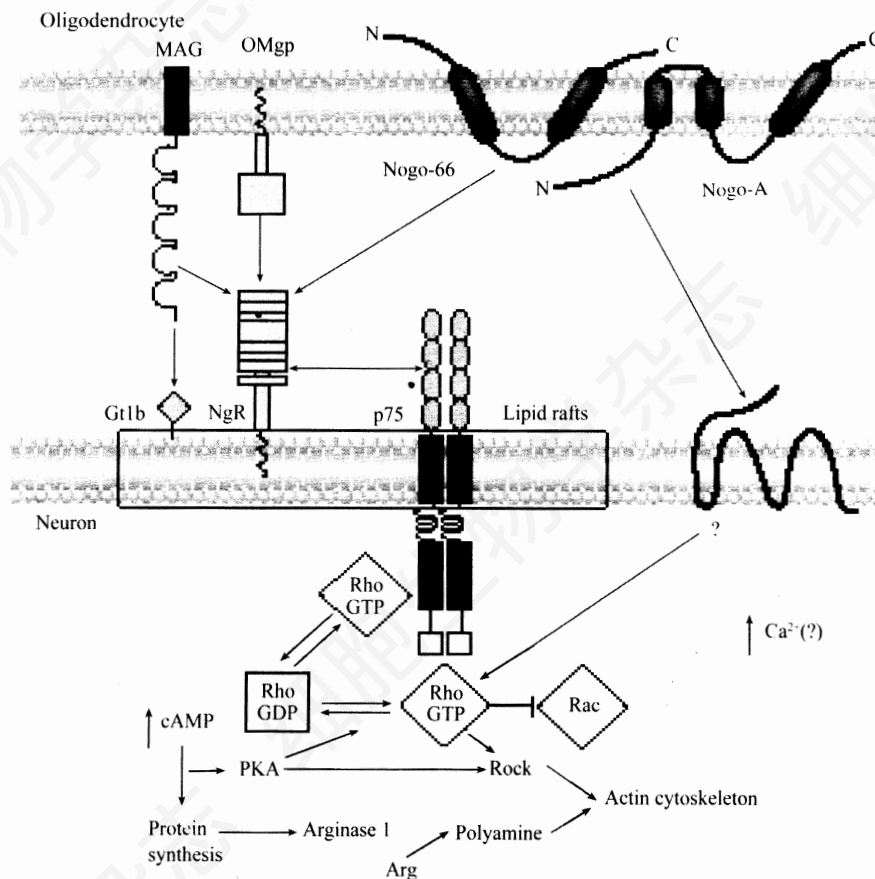


Fig.2 Molecular basis of *RTN4-A/Nogo-A* mediated neurite outgrowth inhibition^[4]

基端和第3个外显子区域在细胞质中仍能检测到^[10,16]。因此推测在这类细胞中RTN4-A/Nogo-A蛋白有2种跨膜的拓扑结构,不同的拓扑结构在胞内胞外起不同的作用。

4 RTNs的生物学功能及其作用机制

4.1 RTN4-A/Nogo-A对神经再生的抑制作用及其作用机制

RTN4-A/Nogo-A是中枢神经系统髓鞘质神经元轴突生长抑制因子。RTN4-A/Nogo-A存在3个活性部位:①氨基端可以抑制成纤维细胞的迁移^[16];②特异的第3个外显子区域,可以抑制神经生长、细胞迁移和导致生长锥瘫痪^[16,17];③羧基端66个氨基酸(Nogo-66)的胞外片段,可以抑制轴突延伸并使后根神经节锥体瘫痪^[10,16]。最近RTN4-A/Nogo-A的自身抗体被尝试用于神经类疾病的免疫治疗。

RTNs抑制神经再生的作用机制可从图2的信号通路解释^[4]:Nogo-66的受体NgR先与神经营养因子p75形成复合物,然后与Nogo-66,以及另外两种轴突生长抑制蛋白MAG(myelin-associated glycoprotein)和OMgp(oligodendrocyte myelin glycoprotein)结合^[18],启动下游Rho/Rock信号通路,传递神经抑制作用。用神经营养因子提高cAMP水平,激活蛋白激酶A(PKA),使Rho磷酸化失活,阻断Nogo-A对轴突生长的抑制作用。细胞内Ca²⁺浓度的升高也可激活PKA,使Rho磷酸化失活,促进生长锥延伸。因此认为,中枢神经系统受损时,少突胶质细胞表面的,或者从受损少突胶质细胞表面脱落下来含Nogo-66的膜片段,与损伤神经元的NgR结合,通过第二信使cAMP和Ca²⁺作用于Rho,Rho通过激活下游靶分子Rock调节细胞微丝骨架蛋白,参与细胞的行为和功能,使生长锥瘫痪,抑制轴突生长。

4.2 RTNs与胞内运输、细胞分裂、细胞迁移和细胞凋亡有关

对RTN4-A/Nogo-A抑制神经轴突生长的作用已经比较明确,RTNs其余成员的功能还不清楚,只有一些初步的研究成果。

RTN4-A/Nogo-A可能在细胞分裂过程中发挥作用。RTN4-A/Nogo-A可与 α 微管蛋白及髓鞘质蛋白(MBP)结合。哺乳动物RTN4-A/Nogo-A蛋白在细胞有丝分裂分离时形成环状结构围绕在纺锤体周围,RTNs可能负责在有丝分裂两个子细胞分离时内

膜的分配^[19]。

RTN4-B/Nogo-B可能促进肿瘤细胞的凋亡。RTN4-B/Nogo-B的异常表达可诱导肿瘤细胞的凋亡^[20],在一些癌细胞中,RTN4-B/Nogo-B的转录受到抑制,可能该基因抑制肿瘤^[21]。又发现,RTN1-C蛋白与Bcl-XL结合,RTN1-XL蛋白与抗凋亡蛋白Bcl-2和Bcl-XL结合,定位在内质网上^[22]。然而又有结果显示,用化学药物诱导成骨肉瘤细胞株(SaOS₂)和中国仓鼠卵巢细胞株(CHO)细胞凋亡时,过表达RTN4-B/Nogo-B并没有使细胞凋亡增强^[13]。

RTN4-B/Nogo-B与细胞迁移有关。Acevedo等^[23]发现RTN4-B/Nogo-B的氨基端可促进内皮细胞迁移,抑制血管平滑肌细胞迁移。在RTN4-A/Nogo-A和RTN4-B/Nogo-B基因剔除的小鼠中转染RTN4-B/Nogo-B可援救异常的血管扩张。

RTNs某些成员可能参与由内质网向高尔基体、突触囊泡和质膜的运输。线虫(*Caenorhabditis elegans*)只在胚胎发生中表达的nRTN-C蛋白可与RME-1的羧基端相互作用^[24],RME-1定位于胞内并参与蛋白质由胞内向质膜或高尔基体运输的网络活动,因此推测nRTN-C可能在胚胎发生中参与蛋白质由胞内向质膜或高尔基体运输。RTN2和渗透因子(osmosensor,SHO1)之间的作用说明RTNs可能与渗透敏感性有关。RTN1-A和RTN1-B能与网格蛋白相关蛋白(clathrin-associated protein,AP50)结合,AP50与细胞内吞作用有关,RTN1-A和RTN1-B在氨基端的168氨基酸的同源区可能在胞内吞过程中起作用^[25]。

RTNs可能形成聚合物起作用。RTN1-A和RTN1-B可以形成大约500 kDa含有同源或异源复合物的超分子聚合物^[26],而RTN1-A和RTN1-C不能形成复合物^[7],这是因为RTN1-A和RTN1-B在氨基端有168个氨基酸的同源区,RTN1-C则没有^[25]。因为多聚化时保守区仍为羧基端,推测高度同源的RTNs(RTN1,RTN3,RTN4/Nogo)在同一种细胞中表达时也会形成同源或异源复合物。

4.3 作为某些疾病诊断标志

RTN1-A和RTN1-C在绝大多数神经内分泌肿瘤细胞如小细胞肺癌细胞系(SCLCs)和成神经细胞瘤中表达,因此RTN1可作为此类疾病的诊断标志^[27]。RTN1-C与神经分化有密切关系,在成神经

细胞瘤细胞系中发现分化越高, *RTN1-C* 表达量也越高^[28]。*RTN1-C* 在唐氏综合症和老年痴呆症病人的颞和前沿皮层中表达量减少^[29]。在肌肉萎缩性脊髓侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)病人中, *RTN4-A/Nogo-A* 表达量升高, *RTN4-C/Nogo-C* 表达量降低, 可作为诊断标志^[30]。最近又发现星形细胞瘤中 *RTN3* 过表达, 正常神经胶质细胞中 *RTN3* 几乎没有表达, 这种差异可以为星形细胞瘤疾病的研究提供帮助^[9]。

5 小结

关于 RTNs 的基因组结构, 表达方式已经研究得较为清楚。除了 *RTN4-A* 起神经抑制作用, 其余成员在细胞内的功能均有待深入研究。需要研究的问题主要包括 ①引导 RTNs 蛋白膜定位的机制, RTNs 蛋白跨膜区域的三维结构; ②在细胞内 RTNs 蛋白各成员之间是怎么联系的; ③识别两种拓扑结构的分子机制或者分子伴侣是什么; ④ *RTNs* 某些成员与肿瘤细胞凋亡的关系; ⑤ *RTNs* 某些成员在肌肉中高表达, 其生理学作用和生物学功能等。

参考文献 (References)

- [1] Wiczorek DF *et al.* *Brain Res Mol Brain Res*, 1991, **10**: 33
- [2] Roebroek AJ *et al.* *J Biol Chem*, 1993, **268**:13439
- [3] van de Velde HJK *et al.* *J Cell Sci*, 1994, **107**: 2403
- [4] Oertle T *et al.* *Trends Cell Biol*, 2003, **13**: 187
- [5] Oertle T *et al.* *J Mol Biol*, 2003, **325**: 299
- [6] Ninkina NN *et al.* *Gene*, 1997, **184**: 205
- [7] Senden NH *et al.* *Eur J Cell Biol*, 1996, **69**: 197
- [8] Hamada N *et al.* *Cell Mol Biol*, 2002, **48**: 163
- [9] Huang X *et al.* *Clin Neuropathol*, 2004, **23**:1
- [10] Grand Pre T *et al.* *Nature*, 2000, **403**: 439
- [11] Huber AB *et al.* *J Neurosci*, 2002, **22**: 3553
- [12] Magnusson C *et al.* *Mol Cell Neurosci*, 2003, **22**: 298
- [13] Oertle T *et al.* *Oncogene*, 2003, **22**: 1390
- [14] Geisler JG *et al.* *J Muscle Res Cell Motil*, 1999, **20**: 661
- [15] Baka ID *et al.* *Mol Cell Neurosci*, 1996, **7**: 289
- [16] Oertle T *et al.* *J Neurosci*, 2003, **23**: 5393
- [17] Oertle T *et al.* *FASEB J*, 2003, **17**: 1238
- [18] Wang KC *et al.* *Nature*, 2002, **420**: 74
- [19] Taketomi M *et al.* *Neurosci Lett*, 2002, **332**: 37
- [20] Li Q *et al.* *Oncogene*, 2001, **20**: 3929
- [21] Watari A *et al.* *Apoptosis*, 2003, **8**: 5
- [22] Tagami S *et al.* *Oncogene*, 2000, **19**: 5736
- [23] Acevedo L *et al.* *Nat Med*, 2004, **10**: 382
- [24] Iwahashi J *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293**: 698
- [25] Iwahashi J *et al.* *Cell Mol Biol(Noisy-le-Grand)*, 2003, **49** (Online Pub): OL467
- [26] Senden NH *et al.* *Eur J Cell Biol*, 1994, **65**: 341
- [27] van de Velde HJ *et al.* *Cancer Res*, 1994, **54**: 769
- [28] Hens J *et al.* *Cell Tissue Res*, 1998, **292**: 229
- [29] Li Q *et al.* *Neurochem Res*, 2002, **27**: 147
- [30] Dupuis L *et al.* *Neurobiol Dis*, 2002, **10**: 358

Progress in RTNs Family

Yi-Cun Chen, Dong-Dong Lu, Xi-Ran Zhang*

(The College of Life Science, Nanjing Normal University, The Jiangsu Key Laboratory of Molecular and Medical Biotechnology, Nanjing 210097, China)

Abstract Reticulons (RTNs) were an eukaryotic gene family with peculiar topological features and broad expressions. RTNs were characterized by a ~200-amino-acid C-terminal domain, including two long hydrophobic sequences. RTNs functions might relate to those of the endoplasmic reticulum; for example, intracellular trafficking, cell division and apoptosis. Nogo/RTN4-A could inhibit neurite growth from the cell surface via specific receptors. Here, we reviewed the basic structure, the taxonomic distribution and tissue expression of RTNs, summarized recent discoveries about RTNs localization and membrane topology, and discussed the possible functions of RTNs.

Key words RTNs; RTN4/Nogo; topology; functions

Received: May 31, 2004 Accepted: October 20, 2004

*Corresponding author. Tel: 86-25-83598779, E-mail: Xrzhang_99@sina.com