

膜窖的区室化调节功能及药物设计策略探讨

傅玲琳* 许梓荣 JHA Rajeev K.

(浙江大学动物科学学院, 教育部动物分子营养学重点实验室, 杭州 310029)

摘要 膜窖是脂筏的一种特殊类型, 在哺乳动物的内皮细胞、脂肪细胞及平滑肌细胞质膜上分布尤为丰富。近年来对于膜窖的区室化调节与生理功能及其应用于药物设计方面的研究日益受到关注, 如利用基因剔除、荧光共振能量转移等技术研究窖蛋白功能及膜窖内信号蛋白的相互作用, 从而为新型药物的设计打下理论基础。

关键词 膜窖; 窖蛋白; 信号转导; 药物设计

膜窖(caveolae)和脂筏都是细胞膜上富含胆固醇和鞘磷脂的脂质有序结构域, 其中膜窖是一种特殊的脂筏结构, 通常在细胞质膜形成内陷的小窝。现已被确认为一种细胞器。早在1955年, 日本学者Yamada采用透射电镜首次观察到细胞质膜上存在一些小囊泡^[1], 之后人们一直认为它们的主要功能是参与跨膜物质转运。直到20世纪90年代, 随着膜窖表面标记蛋白——窖蛋白(caveolin, CAV)的发现, 膜窖作为信号转导枢纽的作用也日益受到人们的重视。近期研究集中于膜窖是一种能进行区室化信号转导(compartmentalizing signal transduction)的膜系统, 它们在大多数细胞表面形成了一个特殊的内吞和外排的分割空间, 能够引入分子将其分配到细胞内的特定部位; 它们又能把分子运到细胞外, 划分各样的信号活动。膜窖信号传递起始的平台调控细胞多重生物学功能, 许多学者正深入开展研究, 以期寻求更为合理的传送途径来设计药物以达到更为有效的治疗目标。

1 膜窖与窖蛋白的结构特征

膜窖直径为50~100 nm, 囊状或烧瓶状的细胞质膜内陷微区, 主要由胆固醇、糖基鞘磷脂、鞘磷脂和窖蛋白组成。广泛存在于许多类型的哺乳动物细胞中, 尤其在细胞内皮细胞、脂肪细胞及平滑肌细胞质膜上的分布更为丰富。近期在兔和豚鼠视网膜上皮细胞质膜也发现有膜窖的存在^[2]。许多信号分子均聚集在膜窖区, 如各种受体酪氨酸激酶、非活化氮合成酶(eNOS)、RAS等。膜窖主要参与胆固醇运输、内吞与跨细胞运转过程、细胞增殖与迁移以及整合调控信号转导过程^[3]。

窖蛋白(CAV)是膜窖的主要结构蛋白, 为形成

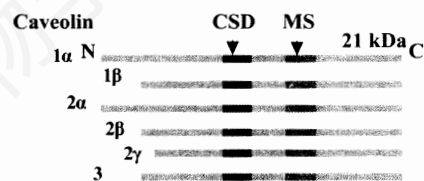


图1 窖蛋白基因家族^[4] (改绘)

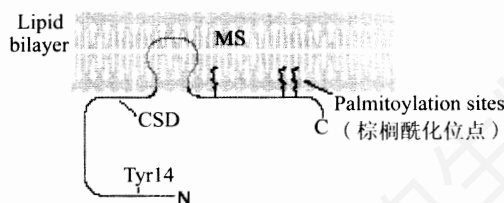


图2 窖蛋白-1α分子拓扑结构示意图^[4] (改绘)

凹陷结构所必需。CAV 支架区(caveolin scaffolding domain, CSD)与许多信号分子连接, 起负调节作用。CAV 基因家族有3个成员: CAV-1、CAV-2 和 CAV-3, CAV-1与CAV-2又分别有各自的亚型(图1)。CAV-1、CAV-2 在多数类型细胞中共同表达, 而 CAV-3 的表达具有肌细胞特异性^[4]。最近有研究表明, CAV-3 在鸡胚早期发育过程中主要分布于生肌节和神经胶质^[5]。CAV-1α 具有奇特的拓扑结构, 其N端与C端均朝向胞内, 中间跨膜疏水区域(MS)在膜内形成发夹结构; 支架区与CAV寡聚体形成有关, 并调控信号分子的活性状态; N端的Tyr14位点可被酪氨酸磷酸化, C端的棕榈酰化位点具有锚定CAV作用(图2)^[4]。

收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2005-01-21

国家自然科学基金资助项目(No.30471255)

* 通讯作者: Tel: 0571-86994963, Fax: 0571-86091820, E-mail: full1103@163.com

身磷酸化,微区内FC含量迅速下降;而进行完一系列信号过程后,PDGF/PDGFR复合物移出膜窖区,FC含量恢复^[11]。

研究表明,膜窖在调节细胞内胆固醇浓度中发挥重要作用。胞外的胆固醇接受者高密度脂蛋白(HDL)可调节胞内胆固醇转运至膜窖区,再以膜窖作为出口流出。除此之外,膜窖还参与将胞内新合成的胆固醇运往其他质膜区域,因此对维持其他质膜区的结构与功能也起着一定作用^[12]。

2.4 对细胞恶性转化与迁移的调控

目前已推测窖蛋白CAV-1为一抑癌基因。已有众多研究表明,CAV-1的高表达能抑制细胞恶性转化,如经转化的NIH-3T3成纤维细胞,CAV-1表达量及膜窖数量显著下降^[13]。但在体内实验结果却显示,转移的肿瘤细胞中CAV-1呈高表达^[14]。Carver等^[15]分析原因认为,由于体外培养环境恒定不变,转化的细胞内CAV-1水平一直处于低水平;而体内的肿瘤细胞转移后需适应新环境以利于其生存,因而CAV-1水平又上调。这也解释了化疗药物引起多药耐受性(MDR)的原因,由于肿瘤细胞的生存适应性,必须使其CAV-1表达升高,推测化疗药物可能通过CAV-1介导的胆固醇流出途径由细胞内转运到细胞膜,位于细胞膜的药物泵再将药物排出细胞^[16]。

另外,血管内皮生长因子(VEGF)依赖性信号级联反应和血管新生也受CAV-1负调控,而血管新生是肿瘤侵袭转移过程中极重要的促进因素^[17]。因而可认为膜窖调控着细胞恶性转化与迁移的过程。

3 膜窖-窖蛋白研究方法 with 药物设计策略

基于膜窖的靶向药物设计,要以寻找各种作用靶位的研究为基础。可利用基因剔除、荧光共振能量转移(FRET)等技术研究CAV功能及膜窖内信号蛋白的互相作用,从而确立目标靶位;还可通过改进分离纯化技术精确得到膜窖内目标组分,并结合蛋白质组学方法,建立不同组织膜窖的药物靶位库。

3.1 分离纯化

目前常用的从组织或组织培养细胞中纯化膜窖的方法大致可分为以下几类:①在蔗糖梯度中漂浮非离子去污剂Triton X-100不溶的膜;②在OptiPrep梯度中漂浮超声处理的质膜;③组织匀浆的不同离心分离;④通过离心或免疫吸附从阳离子化硅胶纯化的内皮细胞质膜中回收膜窖。

通过这些方法获得的膜窖不大具有可比性,主要是因为目前还没有一个判断纯度的形态学标准。

CAV-1是破碎细胞分离膜窖的标记蛋白,但它并不是评价纯度的理想分子,因为CAV在其中的浓度是变化的。此外,纯化中所用的物理手段(如阳离子化硅胶、Triton X-100、超声、高pH的碳酸盐、免疫吸附等)可以改变膜窖的分子组成,比如,提取样品所用的某些去污剂可增溶常驻蛋白,使得到的抽提物中此蛋白质含量下降甚至缺失。

最近有报道利用双水相亲和分配(affinity partitioning)技术纯化内皮细胞的膜窖^[18,19]。在PEG/葡聚糖双水相系统中,将目标质膜-一抗(anti-CAV)-二抗(生物素标记)复合物选择性地亲和分配至结合中性链亲和素的葡聚糖下相,然后用Triton X-100处理质膜纯化得到膜窖^[19]。

3.2 基因剔除与FRET技术

近年来建立的CAV基因剔除小鼠模型可作为研究CAV功能及膜窖生理作用的工具。Drab等^[20]首先用基因打靶的方法培育出完全消除CAV-1基因的cav-1^{-/-}小鼠。CAV-1基因的缺失,导致cav-1^{-/-}小鼠肺内皮细胞和上皮细胞的膜窖完全消失,其他组织器官(脂肪组织、隔膜、肾、心脏)也均缺乏膜窖。研究结果显示,cav-1^{-/-}小鼠心血管的NO与Ca²⁺信号途径受损,导致依赖内皮的舒张、收缩与肌源心律的稳定均表现异常,肺泡隔膜增厚;此外,cav-1^{-/-}小鼠还存在肺动脉高压、扩张性心脏病及间质纤维样变性。但cav-1^{-/-}小鼠仍能存活,深入的研究有待今后进一步开展。Razani等^[21]意外地发现cav-1^{-/-}小鼠减弱了在脂肪组织中贮存甘油三酸酯的能力,导致cav-1^{-/-}小鼠能抵抗食物引起的肥胖现象,且其血液中自由脂肪酸和甘油三酸酯的浓度增加。推测膜窖可能还参与调节脂肪酸的转运过程。

此外,新发展的FRET技术可在活细胞生理条件下研究蛋白质-蛋白质间的相互作用,用于鉴定膜窖区室化作用过程中关键的信号蛋白或作用位点,为开发基于膜窖的新型治疗药物打下理论基础。

3.3 药物设计策略

膜窖在内皮细胞中具有跨细胞转运功能,且在不同组织中表达各异,因此可用于开发组织靶向性药物和基因载体。通常由于内皮屏障而使药物不能通过循环血液到达目标组织,McIntosh等^[22]鉴定了内皮组织膜窖的特殊成分,制备出针对大鼠肺内皮细胞膜窖某一特定组分的单抗TX3.833,结果显示经静脉注射后能快速通过内皮屏障,30 min后80%有效到达肺组织。此研究提示,可根据膜窖的组织异性设计抗体或配体,并将其与药物偶联,使药物

迅速有效地通过内皮屏障到达目的组织发挥药效。

此内皮-膜窖-靶向技术也可应用于抗肿瘤药物的设计^[16]。制备针对特定肿瘤组织内皮膜窖某一靶点的抗体或针对其膜窖内某一受体的配体,将其与抗肿瘤药偶联,通过膜窖内吞作用使之穿过肿瘤血管内皮,药物靶向破坏其内皮细胞,血液凝聚堵塞导致肿瘤组织生存所必需的养分供给不足而梗死;或者使药物通过膜窖跨细胞运输作用透过血管内皮到达肿瘤细胞内,发挥毒性直接杀死肿瘤细胞。此外,还可设计CAV-1支架多肽模拟物,多肽能与内皮一氧化氮合成酶(eNOS)结合并持久地抑制其活性,从而阻断肿瘤血管新生的信号通路。不过,由于CAV-1支架与多种信号分子作用,此类多肽必须是针对eNOS的。总之,对膜窖结构与功能的研究将会为药物设计带来更多的信息与启示。

4 展望

由于窖蛋白的发现及基因缺失cav-1^{-/-}小鼠模型的建立,人们对膜窖的研究不断深入,尤其是近几年已有许多问题得到较清楚的解释。但仍存在不少有待深入研究的问题:蛋白质如何识别不同的膜窖,进入一个有效区;膜窖动力学调节机制;不同组织中膜窖结构与功能的关系;不同信号途径如何在膜窖区实现区室化联系;膜窖与疾病的关系究竟如何等。此外,有关基于膜窖的药物设计方面还

处于初步研究与探讨阶段,距离实际的应用还需走一段漫长的研究之路,尤其是如何寻找合适的作用靶位及真正达到理想效果,还需众多的实验证据。膜窖结构与功能的研究模型,为今后深入了解其他脂质微区打下基础,并将给生物学及医学研究带来深远的理论意义和应用价值。

参考文献 (References)

- [1] Yamada E. *J Biophys Biochem Cyto*, 1955, **1**: 445
- [2] Lo WK *et al. Exp Eye Res*, 2004, **79**: 487
- [3] Parton RG *et al. Science*, 2001, **293**: 2404
- [4] van Deurs B *et al. Trends Cell Biol*, 2003, **13**: 92
- [5] Shin DH *et al. Brain Res Dev Brain Res*, 2003, **141**: 83
- [6] Schnitzer JE. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **49**: 265
- [7] Pelkmans L *et al. Cell*, 2004, **118**: 767
- [8] Ostrom RS *et al. J Biol Chem*, 2001, **276**: 42063
- [9] Isshiki M *et al. Traffic*, 2003, **4**: 717
- [10] Oxhorn BC *et al. Cell Signal*, 2003, **15**: 489
- [11] Fielding CJ *et al. Biochim Biophys Acta*, 2003, **1610**: 219
- [12] Fielding CJ *et al. Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **49**: 251
- [13] Wiechen K *et al. Am J Pathol*, 2001, **159**: 1635
- [14] Kato K *et al. Cancer*, 2002, **94**: 929
- [15] Carver LA *et al. Nature*, 2003, **3**: 571
- [16] Lavie Y *et al. Adv Drug Deliv Rev*, 2001, **49**: 317
- [17] Massimino ML *et al. Cell Signal*, 2002, **14**: 93
- [18] Abedinpour P *et al. Anal Biochem*, 2003, **313**: 1
- [19] Barinaga-Rementería Ramírez I *et al. Anal Biochem*, 2004, **331**: 17
- [20] Drab M *et al. Science*, 2001, **293**: 2449
- [21] Razani B *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 8635
- [22] McIntosh DP *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**: 1996

Compartmentalized Regulation in Caveolae and Implications for Drug Design Strategies

Ling-Lin Fu*, Zi-Rong Xu, Rajeev K. Jha

(College of Animal Science, Educational Ministry Key Laboratory of Molecular Animal Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract As specialized lipid rafts, caveolae are present on many types of mammalian cells, particularly on endothelial cells, adipocytes and smooth muscle cells. Recent studies mostly focus on compartmentalized regulation and physiological role of caveolae with the aim to develop novel drug delivery strategies. New techniques including gene knockout and fluorescence resonance energy transfer provide valuable tools for elucidating functions of caveolin as well as investigating signaling protein interactions in caveolae, which may benefit for drug design.

Key words caveolae; caveolin; signal transduction; drug design

Received: November 29, 2004 Accepted: January 21, 2005

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471255)

*Corresponding author. Tel: 86-571-86994963, Fax: 86-571-86091820, E-mail: full1103@163.com