

内质网区蓖麻毒素的逆向转运

刘 琼 詹金彪^{1*}

(宁波大学医学院生物化学与分子生物学研究所, 宁波 315211;

¹ 浙江大学医学院生物化学与遗传学系, 杭州 310058)

摘要 蓖麻毒素是植物来源的核糖体失活蛋白。蓖麻毒素必须通过细胞的内膜系统到达内质网, 然后转位至胞质, 才能作用于胞质内的核糖体。在内质网中毒素的两条链分离, 具有催化活性的 A 链被内质网上的蛋白质识别, 并被转位到胞质内催化核糖体失活。现对内质网在参与蓖麻毒素胞内转运过程中的作用进行综述。

关键词 蓖麻毒素; 内质网; 逆向转运; 转位

蓖麻毒素亦称蓖麻毒蛋白(ricin)是大戟科植物蓖麻(*Ricinus communis*)种子中的蛋白质成分, 由 Stillmark 等在 1888 年, 首次从蓖麻籽中分离得到并命名。蓖麻毒素 A 链(RTA)具有 N-糖苷酶活性, 能催化核糖体 60S 亚基失活。蓖麻毒素 B 链(RTB)具有凝集素活性, 可识别暴露在细胞外表面的末端为半乳糖基的受体, 并协助 RTA 链进入细胞内。蓖麻毒素是一种双链核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating protein, RIPs), 其 A、B 链间由一对二硫键连接, 它能抑制真核细胞的蛋白质生物合成, 对人、动物和昆虫都具有较强的毒性作用。本文所关注的是近年来国内外关于蓖麻毒素进入哺乳动物细胞后在内质网(endoplasmic reticulum, ER)内部和周围发生的相互作用及与这一作用有关的一系列事件的研究进展。

1 蓖麻毒素的结构

完整的蓖麻毒素是分子量约为 62 kDa 的异二聚体糖蛋白, 含两条多肽链, 即 A 链和 B 链, 两者之间以一个二硫键相连^[1](图 1)。RTA 是由 267 个氨基酸组成的球形蛋白, 分子量 32 kDa, 其上有明显的催化活性裂隙(cleft), 含有 8 个 α 螺旋(A~H)和 8 个 β 折叠(a~h), N 端第 10 个残基 Asn 为糖基化部位, 接有(GlcNAc)₂(Man)₄ 寡糖链, 活性中心包括 Tyr80、Tyr123、Glu177 和 Arg180 四个关键氨基酸。在 RTA 催化底物 28S rRNA 脱腺嘌呤过程中, Tyr80、Tyr123 与底物腺嘌呤环两侧重叠, 形成“三明治”样结构, 完成 π - π 超共轭效应; Arg180 为底物腺嘌呤提供质子, 与 Glu177 共同作用完成 N-糖苷键断裂。RTA 的 Cys259 和 RTB 的 Cys4 之间由二硫键连接。RTB 是由 262 个氨基酸组成的类似伸展的哑铃形蛋

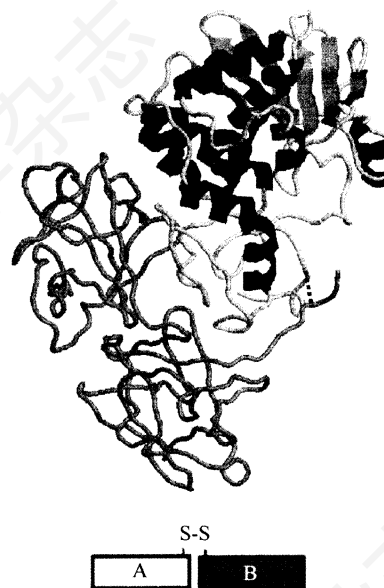


图 1 蓖麻毒素结构模式图^[1]

白, 分子量 34 kDa, 分子内有 4 个二硫键, 有两条寡糖链(GlcNAc)₂(Man)₆ 和(GlcNAc)₂(Man)₇ 分别接在第 95 位和第 135 位 Asn 残基上。寡糖链与 RTB 的凝集素活性有密切关系, 如果除去这两条寡糖链, 可导致 RTB 的凝集素活性丢失。实验发现: 如果在 Asn42 上引入寡糖链, RTB 恢复凝集素活性; 而在 Asn123 或 Asn123 和 Asn42 都引入寡糖链, RTB 不能恢复活性, 证明糖基化的位置对其活性十分重要^[2]。X 射线晶体构象显示: RTB 是一个两叶形结构的肽链, 由两个不同球形肽链区域构成, 它们具有相同

收稿日期: 2006-12-25 接受日期: 2007-02-28

国家自然科学基金(No.30270294 和 No.30070166) 和浙江省自然科学基金(No.301057) 资助项目

* 通讯作者。Tel/Fax: 0571-88208273, E-mail: jzhan2k@zju.edu.cn

的折叠拓扑结构,各包含一个结合位点,其中一个起主导作用^[3]。每一个区域又包括三个亚区(α , β , γ),每一区域似乎都是由相同的“始祖”半乳糖结合肽衍生而来,蓖麻毒素和半乳糖共结晶后,显示只有 1α 和 2β 保留明显的结合半乳糖活性^[4],可与细胞膜上的糖,如半乳糖和N-乙酰多巴胺形成氢键,借助RTB的携带作用而使RTA进入细胞发挥其毒性。只有在两个球形区域都突变时,RTB才失去凝集素活性。

2 蓖麻毒素内吞进入细胞

蓖麻毒素与真核细胞的结合主要是通过半乳糖受体介导,小部分由甘露糖受体介导。一般认为是RTB先与细胞表面含半乳糖残基的受体(糖脂或糖蛋白)结合,细胞膜内陷导致整个毒素分子被吞噬内化。蓖麻毒素的内吞有多种形式,包括网格蛋白依赖性内吞、网格蛋白非依赖性内吞、细胞膜穴样内陷及胞饮作用等^[5]。实验证明在缺乏胆固醇的条件下,细胞膜穴样内陷和网格蛋白依赖性内吞均被抑制,然而蓖麻毒素的转运仍在继续,但是效率有所降低,说明细胞可能同时采用几种内吞方式^[6]。目前对蓖麻毒素的内吞研究认为至少有50%的毒素通过网格蛋白非依赖性内吞作用被细胞内吞^[7]。在极性细胞MDCK(犬肾上皮细胞系)中发现网格蛋白非依赖性内吞发生在顶侧^[8],这种内吞方式受到高度调节,能被蛋白激酶A、C,钙调蛋白拮抗剂激活^[9]。Garred等^[10]提示GTP γ S和Rho家族中的一些小G蛋白能促进网格蛋白非依赖性内吞。此外花生四烯酸激活的磷脂酶A₂也能促进蓖麻毒素在MDCK细胞顶侧的内吞,而加入环加氧酶抑制剂后这种促进作用消失,说明环加氧酶途径也参与了对这种内吞方式的调节^[11]。

蓖麻毒素被内吞后进入吞噬体,然后沿内体、高尔基体、内质网等逆向分泌途径有序的转运,最后经内质网转位进入胞质发挥细胞毒性作用^[12](图2)。在胞浆内攻击核糖体,从而抑制细胞蛋白质的合成,导致细胞死亡^[6]。

3 蓖麻毒素从高尔基体到内质网的逆向转运

蓖麻毒素进入细胞后,只有约5%的毒素以不同途径到达高尔基体,再逆向转运至ER^[13]。在作用于细胞质内的核糖体前,蓖麻毒素必须首先通过细胞的内膜系统到达内质网,这种逆向转运对蓖麻毒素发

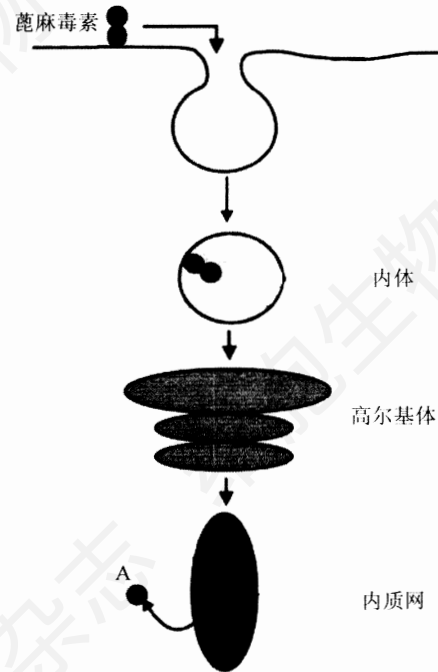


图2 蓖麻毒素的内吞和细胞内逆向转运模式图^[12]

挥细胞毒性是必需的。为了研究RTA的胞内转运途径,并使这一过程可视化,我们重组构建并表达了增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)与RTA的融合基因EGFP-RTA,利用激光扫描共聚焦显微镜和免疫电镜技术,实验中我们观察到了转运到内质网中的RTA,说明EGFP-RTA融合蛋白在细胞内可以避免被细胞内的酶降解,RTA携带EGFP蛋白在胞内逆向转运,并且到达细胞的内质网^[4]。经典的高尔基体逆向转运到内质网的方式是依赖外壳蛋白I(coat protein I, COPI)的方式。COPI是一种在高尔基体膜上的高分子蛋白复合物,它负责转运含有KDEL(一种内质网保留信号肽, Lys-Asp-Glu-Leu)或类似KDEL序列的蛋白毒素,如霍乱毒素,有证据表明霍乱毒素的A、B链在高尔基体内分离, A链通过与KDEL的受体ERD2作用被转运到内质网^[15]。Chen等^[16]用1,3-环己二醇甲胺(1,3-cyclohexanebis methylamine, CBM)处理Vero细胞(非洲绿猴肾细胞)干扰COPI与高尔基体膜的结合而抑制COPI依赖的转运方式,免疫荧光显微镜观察Vero细胞,发现霍乱毒素依然能够进入内质网中。实验结果表明细胞内存在着COPI非依赖性转运方式,包含KDEL序列的霍乱毒素可以采用COPI依赖和COPI非依赖方式进行逆向转运。Llorente等^[17]在实验中应用了一种温度敏感型 ϵ COPI(COPI的其中一个亚基)缺陷的中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO) LdlF细胞,在

非允许温度下细胞的 COPI 功能受损, 高尔基体形态异常, 结果蓖麻毒素直接进入内质网, 实验表明蓖麻毒素有 COPI 非依赖方式进行转运。目前研究的较为深入的一种 COPI 非依赖性途径是 Rab6A 依赖途径, 志贺菌毒素已被证实是依赖该途径进入内质网^[18]。为了证明蓖麻毒素是否采用该途径进入内质网, Chen 等^[19]在实验中抑制细胞的 Rab6A 和 COPI 的表达, 结果蓖麻毒素的逆向转运和毒性作用并未受到影响, 证明蓖麻毒素转运到内质网采用的是除 Rab6A 和 COPI 以外的另一种方式。

目前的研究证明, 蓖麻毒素与高尔基体内的钙网蛋白(calreticulin)相互作用, 实现从高尔基体到内质网的逆向转运。钙网蛋白是一种体内含量非常丰富的分子伴侣, 主要分布在粗面内质网的内腔里^[20], 也分布在细胞其他部位, 包括分泌途径中的其他细胞器和细胞表面, 是一种在高尔基体和粗面内质网之间穿梭的载体^[18, 21]。Day 等^[18]用布雷菲德菌素 A (brefeldin A, BFA) 处理 Vero 细胞, 发现钙网蛋白与蓖麻毒素的相互作用最初发生在反式高尔基体。由 RTB 识别钙网蛋白末端的糖基。实验发现只有具有 A、B 链的完整的蓖麻毒素才能特异的作用于钙网蛋白, 而且这种相互作用可以被乳糖竞争性的抑制, 说明蓖麻毒素与钙网蛋白之间的作用是由凝集素活性的 RTB 介导的, 是 RTB 的半乳糖结合位点和存在于高尔基体 - 内质网循环的钙网蛋白上半乳糖残基的相互作用^[18]。但是实验也发现网织蛋白缺陷的细胞株依然对 RTA 表现出敏感, 这表明这种作用不是唯一的, 可能的解释是, 在此类细胞中还存在着其他糖蛋白或糖脂也能和 RTB 相互作用^[18]。

4 蓖麻毒素在内质网中的转位作用

到达内质网的少量蓖麻毒素用普通的显微镜不能有效的观察到, 但是在应用了蛋白质突变, 转运阻滞剂, 转运抑制剂后已经有充分的证据证明蓖麻毒素的确到达内质网^[1, 22]。利用 Sec61 α (Sec61p 的一个亚基)的特异性抗体, 采用免疫共沉淀的方法分离得到了硫酸化和糖基化的 RTA, 表明毒素转位至胞液可能与位于内质网膜上的 Sec61p 有关^[23]。蓖麻毒素 ER 转运最具有说服力的证据来自于完整蓖麻毒素中的 A 链的非糖基化位点的糖基化作用。Rapak 等^[24]修饰 RTA 使之含有酪氨酸硫酸化位点和 N-糖基化位点, 并且用 35S 对 RTA 进行选择标记, 最后在细胞的胞质内发现了糖基化的 A 链, 这种糖基化修饰对于寡

糖基转移酶的作用提供了强有力的证据, 实验证明在 A 链转位到胞质前在内质网内发生了糖基化作用。

内质网中有蛋白质二硫键异构酶(protein disulfide isomerase, PDI), 蓖麻毒素进入内质网后, 在蛋白质二硫键异构酶和分子伴侣的作用下, RTA 与 RTB 分离, 暴露正常情况下隐蔽的疏水性界面, 暴露 RTA 上的活性位点, 可以为 RTA 进入胞液发挥细胞毒性做好准备^[25]。最新研究表明蓖麻毒素内部二硫键的切割不仅需要蛋白质二硫键异构酶, 硫氧还原蛋白还原酶(thioredoxin reductase)也必不可少, 该酶能够还原蛋白质二硫键异构酶的作用, 谷胱甘肽的存在能提高该还原作用的效率^[26]。实验证明, 当在植物细胞的内质网腔内表达单独的 RTA 时, 糖基化的 RTA 被逆向转位后毒性作用减弱; 当 RTA 和 RTB 共表达时, 由二硫键连接的完整的毒素被分泌而非逆向易位^[27]。因此, 只有当 RTA 从蓖麻毒素中解离, 才能够逆向转位到胞质中被去糖基化^[28]。过去普遍认为蓖麻毒素的转位与内质网内的肽运输体(peptide transporters, TAP)有关, 然而最近的实验表明一些肽运输体缺陷的细胞株对于蓖麻毒素转位的效率并不因此降低, 由此可见 TAP 对于 RTA 的转位不是唯一的因素^[29]。从完整的蓖麻毒素中分离下来的游离的 RTA 在 ER 中呈稳定、可溶、部分展开、结构紧密的过渡态^[30-32], 过渡态的 RTA 可能利用暴露的疏水面与内质网膜上带负电荷的膜脂相互作用导致 RTA 结构改变而伪装成“错误折叠”的蛋白质, 激活内质网相关的蛋白质降解途径(ER-associated protein degradation pathway, ERAD)^[33], 并作为 ERAD 的底物通过 Sec61p 转位子被转运到胞液中^[27]。ER 膜上 Sec61p 通道是由 Sec α 、Sec β 和 Sec γ 三个亚基组成的异源三聚体膜蛋白复合体。ERAD 是细胞内蛋白质的质量控制系统, 该系统能够将细胞合成的错误折叠的蛋白质转运到胞液, 并被胞液中的蛋白酶水解, 从而保证合成的蛋白质折叠成正确的构象^[34]。Simpson 等^[35]已经证实了在酵母菌中, RTA 是通过 ERAD 途径进入胞浆的。实验发现与传统 ERAD 途径不同的是, 表达于烟草细胞中的 RTA 的转位与降解之间有特殊的解耦联过程^[36]。在哺乳动物细胞, ERAD 活性和蓖麻毒素的转位之间是相关的^[37], 这种相关性已经在 RTA 作用下的中国仓鼠卵巢细胞表现的 ERAD 活性的增强和减弱上得到了证明^[38]。

5 RTA在胞液中催化核糖体失活

在胞液中RTA作为一种毒素必须避免被其中的蛋白酶降解。与错误折叠的蛋白质相比,具有酶活性的RTA是相对稳定的,这可能与RTA仅有两个赖氨酸残基有关。赖氨酸残基是通常的泛素化位点,因而低含量的赖氨酸可以防止泛素化和泛素介导的蛋白酶水解。实验证明当以不影响RTA结构、稳定性、活性的方式在其上附加4个赖氨酸残基时,RTA的降解速度明显加快,并且被修饰的RTA成为标准的ERAD底物,即转位和降解过程紧密偶联^[36]。当泛素化和泛素介导的蛋白酶活性被抑制,细胞对于RTA的敏感度增加了两倍^[33,39],这也表明并不是所有的逆向转位的RTA都避免了降解,猜测可能有非泛素依赖的降解方式存在。进入胞液的RTA小部分被蛋白酶水解,大部分在完整的核糖体诱导下重新折叠^[39,40]。体外实验发现,重新折叠既不能被人工合成的寡核苷酸诱导,也不能被去蛋白质的核糖体诱导,故推测重新折叠并不是一个完全的底物诱导过程,还需要分子伴侣参加,在体内很可能是hsp70类的蛋白质^[40]。重新折叠的RTA恢复活性,催化28S rRNA脱去腺嘌呤。

6 小结

蓖麻毒素作为一种有效的研究载体,广泛应用于细胞内转运、核糖体失活、细胞凋亡等研究。将蓖麻毒素与特异的靶向肿瘤细胞或者肿瘤脉管系统的单克隆抗体结合,能极大的提高肿瘤治疗的特异性,降低非特异性杀伤带来的严重的副作用,这些都已经在动物模型和临床试验中得到了有效的证明。在蓖麻毒素的胞内转运途径中目前仍存在许多问题有待于深入研究解决,例如:内吞的调控,逆向转运的分选信号,胞液转位效率的提高等。只有这些问题进一步明确,才能改善毒素类药物,提高其导向特异性和杀伤能力,达到更好的临床应用效果。

参考文献(References)

- [1] Sandvig K *et al.* *FEBS Lett*, 2002, **529**: 49
- [2] Zhan J *et al.* *FEBS Lett*, 1997, **407**: 271
- [3] Montfort W *et al.* *J Biol Chem*, 1987, **262**: 5398
- [4] Rutember E *et al.* *Proteins*, 1991, **10**: 260
- [5] Sandvig K *et al.* *Int J Med Microbiol*, 2000, **290**: 415
- [6] Sandvig K *et al.* *EMBO J*, 2000, **19**: 5943
- [7] Sandvig K *et al.* *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2002, **18**: 1
- [8] Vogel U *et al.* *J Cell Sci*, 1998, **111**: 825
- [9] Sandvig K *et al.* *FEBS Lett*, 1999, **452**: 67
- [10] Garred O *et al.* *Traffic*, 2001, **2**: 26
- [11] Llorente A *et al.* *J Cell Sci*, 2000, **113**: 1213
- [12] Sandvig K *et al.* *Histochem Cell Biol*, 2002, **117**: 131
- [13] van Deurs B *et al.* *J Cell Biol*, 1988, **106**: 253
- [14] Liu Q *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **343**: 857
- [15] Lencer WI *et al.* *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**: 639
- [16] Chen A *et al.* *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1589**: 124
- [17] Llorente A *et al.* *J Biol Chem*, 2003, **278**: 35850
- [18] Day PJ *et al.* *J Biol Chem*, 2001, **276**: 7202
- [19] Chen A *et al.* *J Cell Sci*, 2003, **116**: 3503
- [20] Michalak M *et al.* *Biochem J*, 1999, **344**: 281
- [21] Roberts LM *et al.* *Toxicol*, 2004, **44**: 469
- [22] Sandvig K *et al.* *Int J Med Microbiol*, 2004, **293**: 483
- [23] Wesche J *et al.* *J Biol Chem*, 1999, **274**: 34443
- [24] Rapak A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 3783
- [25] Tsai B *et al.* *Cell*, 2001, **104**: 937
- [26] Bellisola G *et al.* *Biochem Pharmacol*, 2004, **67**: 1721
- [27] Frigerio L *et al.* *J Biol Chem*, 1998, **273**: 14194
- [28] Di Cola A *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**: 14726
- [29] Smith DC *et al.* *J Immunol*, 2002, **169**: 99
- [30] Beaumelle B *et al.* *J Biol Chem*, 1997, **272**: 22097
- [31] Marsden CJ *et al.* *Eur J Biochem*, 2004, **271**: 153
- [32] Marsden CJ *et al.* *Vaccine*, 2004, **22**: 2800
- [33] Day PJ *et al.* *Biochemistry*, 2002, **41**: 2836
- [34] Vashist S *et al.* *J Cell Biol*, 2004, **165**: 41
- [35] Simpson JC *et al.* *FEBS Lett*, 1999, **459**: 80
- [36] Di Cola A *et al.* *Plant Physiol*, 2005, **137**: 287
- [37] Lord JM *et al.* *Curr Top Microbiol Immunol*, 2005, **300**: 149
- [38] Teter K *et al.* *Traffic*, 2003, **4**: 232
- [39] Rodighiero C *et al.* *EMBO Rep*, 2002, **3**: 1222
- [40] Argent RH *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 9263

The Retrograde Transport of Ricin around / in Endoplasmic Reticulum

Qiong Liu, Jin-Biao Zhan^{1*}

(*Institute of Biochemistry and Cell Biology, Ningbo University Medical School, Ningbo 315211, China; ¹Department of Biochemistry and Genetics, Zhejiang University Medical School, Hangzhou 310058, China*)

Abstract Ricin is a plant-derived ribosome inactivating protein. To target ribosomes in the mammalian cytosol, ricin must firstly retrograde transport to the endomembrane system of the cell to reach the endoplasmic reticulum. Here, the toxin is reduced and the catalytic A chain is recognised by endoplasmic reticulum components that facilitate its membrane translocation to the cytosol. This review summarises current understanding of these events.

Key words ricin; endoplasmic reticulum; retrograde transport; translocation

Received: December 25, 2006 Accepted: February 28, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30270294 and No.30070166) and the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No.301057)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-571-88208273, E-mail: jzhan2k@cmm.zju.edu.cn