

红细胞膜带 4.2 蛋白的结构与功能

彭激雁 王翔* 高玮 江川 谢家馨 李遥金

(重庆大学生物工程学院, 重庆 400030)

摘要 带 4.2 蛋白是一种重要的红细胞膜蛋白, 与红细胞的形态、可变形性及携氧功能有至关重要的联系。它通过与带 3 蛋白(阴离子通道蛋白)、锚蛋白结合, 稳定的连接在细胞膜的内表面, 连接着膜骨架网架结构与细胞膜, 是膜骨架与脂质双分子层连接的重要纽带。带 4.2 蛋白的缺失会引起球形或椭圆形红细胞增多症及不同程度的溶血性贫血, 严重的情况需要摘除脾脏来进行治疗。近年来研究认为, 带 4.2 蛋白在维持细胞膜骨架的完整性和稳定性方面扮演了重要角色。现对带 4.2 蛋白结构及功能的研究状况进行综述。

关键词 带 4.2 蛋白; 膜蛋白; 膜骨架; 功能

红细胞膜骨架是由膜蛋白和纤维蛋白等组成的网架结构(meshwork), 该网架结构位于细胞质膜下约 0.2 μm 厚的溶胶层(图 1)。红细胞膜骨架参与形成和维持质膜及整个细胞的形状, 并协助质膜完成多种生理功能^[1]。大多数哺乳动物成熟红细胞膜蛋白特殊的生物力学骨架结构使红细胞具有双凹圆盘形态, 并具有可变形性, 保证了氧分子在人体内的跨膜运输。成熟的红细胞因其没有细胞核、细胞器和内膜系统, 成为研究细胞膜骨架结构及功能最简单的模型系统^[2]。

带 4.2 蛋白是膜蛋白基本组成成分之一, 在维持细胞膜的完整性、稳定性以及携氧功能等方面扮演了重要角色。自红细胞膜蛋白中首次发现带 4.2 蛋白的存在以来, 在人非红系细胞与组织, 如血小板、大脑及肾脏的质膜以及牛、鸡晶状体纤维膜上都检测出带 4.2 蛋白的免疫原活性^[3,4]。在红细胞发育与分化过程中, 带 4.2 蛋白在成红细胞晚期表达^[5]。此外, 带 4.2 蛋白还是一种 N 末端十四烷基化的蛋白质^[6]。目前研究认为, 带 4.2 蛋白可以稳定带 3 蛋白和锚蛋白的连接, 并对红细胞膜骨架网架结构与细胞膜的连接有稳定作用。带 4.2 蛋白的缺失会导致细胞膜结构与功能的异常, 是引起遗传性球形红细胞增多症(HS)或椭圆形红细胞增多症(HE)的分子机制之一。遗传性球形红细胞增多症的主要症状为溶血性贫血, 严重的情况需要摘除脾脏来减缓症状^[7-12]。Iolascon 等^[13]研究发现, 带 4.2 蛋白的变异也与小鼠血小板储存池缺损有关, 是导致小鼠眼睛与皮肤色素沉着功能丧失的原因之一。

近年来, 红细胞膜领域的相关研究获得了长足发展, 在红细胞膜蛋白的结构及功能、膜蛋白的相互作用以及红细胞膜障碍等方面取得了新的突破。此外, 对膜结构中的几种主要蛋白质, 如带 3 蛋白、血影蛋白等也有了深入的了解。目前, 国内对带 4.2 蛋白的研究报道还未多见。本文主要对红细胞膜结构中带 4.2 蛋白的结构与功能研究进展进行回顾和总结。

1 带 4.2 蛋白的结构

带 4.2 蛋白是红细胞膜蛋白的组成成分之一, 是一种球状蛋白质。该蛋白质占红细胞膜蛋白总量的 5%, 分子量为 72 kDa, 拷贝数与血影蛋白、锚蛋白、带 4.1 蛋白基本相同^[14-17]。每个正常的红细胞包含大约 250 000 个带 4.2 蛋白分子^[16,18]。

Korsgren 等^[18]已经从人红细胞 cDNA 文库中一段长度为 2.35 kb 的 cDNA 核酸序列翻译得到带 4.2 蛋白完整的氨基酸序列, 这个 cDNA 文库是由 $\lambda\text{gt}11$ 表达载体构建的。在带 4.2 蛋白 cDNA 的 2348 个碱基对中, 2073 个碱基对位于编码区, 翻译出了含 691 个氨基酸、分子量为 76.9 kDa 的多肽链(SDS-PAGE 结果显示带 4.2 蛋白的分子量大小为 72 kDa)。对人红细胞总 RNA 进行的杂交试验显示, 带 4.2 蛋白的 mRNA 长度为 2.4 kb。对染色体组的 DNA 序列研究

收稿日期: 2007-03-27 接受日期: 2007-06-06
国家自然科学基金(No.10572159), 重庆市科委科技计划项目攻关项目(No.2006ba5010), 高等学校学科创新引智计划(No.B06023)资助
* 通讯作者。Tel: 023-65102507, E-mail: xwangchn@vip.sina.com

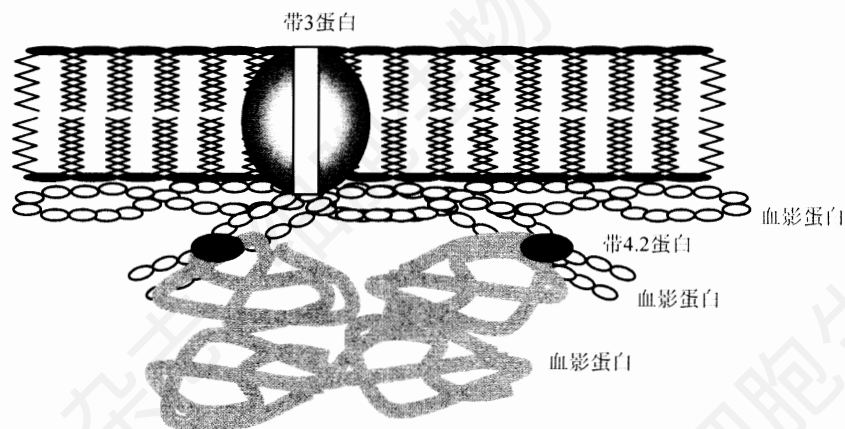


图1 红细胞膜蛋白结构示意图(部分摘录于文献^[1])

发现^[3,11], 对外显子(326 bp)3'端(90 bp)不同的剪切方式形成了氨基酸残基数为 691 和 721 的两种带 4.2 蛋白异构体 P4.2S 和 P4.2L, 其氨基酸序列差异仅仅为 30 个氨基酸残基。

带 4.2 蛋白的氨基酸序列与 Ca^{2+} 依赖的交联蛋白具有同源性, 如转谷氨酰胺酶家族^[5,16]。转谷氨酰胺酶(蛋白质-谷氨酸- γ -谷氨酰胺转移酶, EC2.3.2.13)可以催化蛋白质的交联。在转谷氨酰胺酶的帮助下, 通过催化谷氨酰胺酰基的转移反应, 蛋白质分子之间或之内形成了 ϵ -(γ -谷氨酰)赖氨酸键, 从而改善各种蛋白质的功能性质并对细胞内外结构的稳定有重要作用^[5]。Korsgren 等^[18]在对带 4.2 蛋白的同源性分析中发现, 带 4.2 蛋白有一段 49 个氨基酸长度的序列, 与豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶同一区域氨基酸序列有 69% 相同, 与人凝血因子亚基 XIII 氨基酸序列有 51% 相同。值得注意的是, 这个区域是转谷氨酰胺酶的活性位点, 5 个相邻的氨基酸残基序列为 Gly-Gln-Cys-Trp-Val, 而带 4.2 蛋白对应区域的半胱氨酸被丙氨酸取代。根据亲水图谱显示, 这个丙氨酸位于带 4.2 蛋白主疏水区与弱亲水区之间, 而对应的半胱氨酸位于豚鼠肝脏转谷氨酰胺酶和人凝血因子亚基 XIII 主要的疏水区起始位点。同源性分析显示, 带 4.2 蛋白也具有 Ca^{2+} 结合位点, 但没有证据显示 Ca^{2+} 与带 4.2 蛋白结合, 由此, 可以推测这个半胱氨酸被取代与带 4.2 蛋白缺乏转谷氨酰胺酶家族的活性有关。

带 4.2 蛋白是一种 N 末端十四烷基化的蛋白质, 而十四烷基酸是一种不常见的脂肪酸, 它通常共价结合于一些病毒和细胞的蛋白质中。十四烷基化的蛋白质与机体的生长调控和信号转导有关, 且本身具有较好的抗变形性, 因而成为了近年来研究的热点。

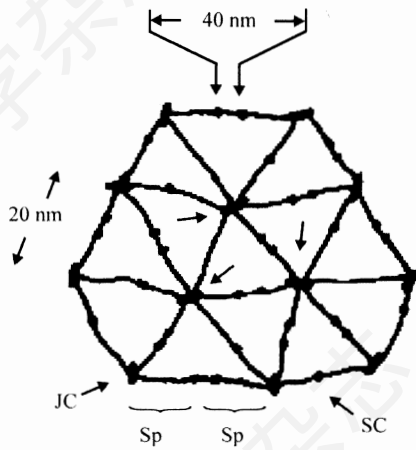
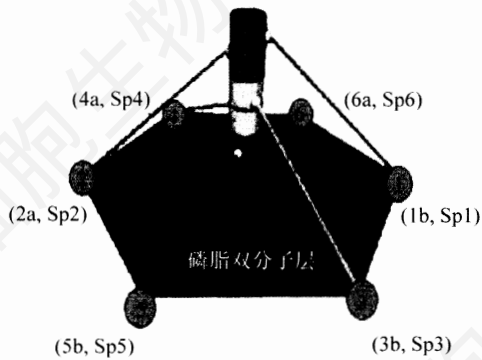
在很多情况下, 十四烷基化的蛋白质与细胞膜或其他蛋白质紧密连接, 对膜结构的稳定性具有积极的作用。人红细胞带 4.2 蛋白氨基酸序列的排列显示^[16], 带 4.2 蛋白基因在启动子甲硫氨酸后有一个 N 末端甘氨酸, 这也是十四烷基通常修饰的位点。Risinger 等^[6]对天然带 4.2 蛋白进行温和酸性水解, 发现 N 末端的十四烷基酸转化为一个吡内酯衍生物, 带 4.2 也相应的转化为吡内酯衍生物修饰的蛋白质。运用高效液相色谱对吡内酯衍生物进行检测, 证明带 4.2 蛋白是一种十四烷基化的蛋白质。虽然带 4.2 蛋白是一种外在膜蛋白, 但在低盐离子强度或高盐离子强度的条件下, 都能牢固的连接在膜结构上。这种不同寻常的亲和能力, 可能与十四烷基化有关。

2 带 4.2 蛋白的功能

2.1 带 4.2 蛋白与膜骨架

蛋白质与蛋白质之间和蛋白质与脂质之间的连接是维持红细胞膜结构的关键。Sung 等^[19]对红细胞膜骨架进行了深入的研究, 认为膜骨架是由六边型网架结构构成(图 2)。这个网架结构是一个由肌动蛋白纤维形成的连接复合物, 悬浮在脂质双分子层下面(图 3), 带 4.2 蛋白和带 3 蛋白等形成的锚定复合物将膜骨架稳固的连接起来。

带 4.2 蛋白通过与带 3 蛋白(阴离子通道蛋白)、锚蛋白结合, 稳定的连接在细胞膜的内表面^[19]。作为膜骨架与脂质双分子层连接的重要纽带, 带 4.2 蛋白还参与形成维持细胞特定形态的结构域和功能域^[3]。因此, 可以推测带 4.2 蛋白对于维持红细胞形态的稳定和调节其携氧功能有重要作用。但带 4.2 蛋白与带 3 蛋白, 锚蛋白以及其他蛋白质的具体连接

图 2 红细胞膜蛋白六边型网架结构概略图^[19]图 3 单个六边型网架结构三维立体图^[19]

方式还有待进一步探索^[21,22]。

2.2 带 4.2 蛋白与血液疾病

遗传性球形红细胞增多症是一种常染色体遗传性红细胞膜蛋白缺陷性疾病^[23]。以往认为,有缺陷的红细胞对钠离子的通透性增加,大量的钠离子被动地弥散进入细胞内,导致红细胞内渗透压增加,使大量水分进入,最终导致红细胞产生形变。近年来研究发现,正常红细胞的形态、结构的稳定性和变形能力是由细胞膜蛋白的特性所决定的。与红细胞上述功能有关的蛋白质是血影蛋白、锚蛋白、带 3 蛋白、带 4.2 蛋白、肌动蛋白和血型糖蛋白等,它们相互连接形成蛋白质支架(支架复合体),共同维持红细胞的结构和功能。患者红细胞的膜支架蛋白异常,主要表现为:(1)收缩蛋白数量减少,严重者收缩蛋白仅为正常浓度的 30%;(2)锚蛋白异常;(3)带 4.2 蛋白缺乏;(4)带 3 蛋白异常等。

在红细胞膜蛋白结构中,带 4.2 蛋白连接在带 3 蛋白阴离子交换区域,并与锚蛋白相互作用,可能还

与带 4.1 蛋白相连接^[19,20]。不同原因的带 4.2 蛋白突变会引起膜结构中带 4.2 蛋白的缺失。红细胞膜中带 4.2 蛋白的缺乏可能会造成膜骨架与细胞膜的分离,产生球形红细胞增多症或不同程度的溶血性贫血。红细胞变成球形,由于比表面积减少,变形能力减弱,而脆性随之增加,穿越脾脏毛细血管变得困难,容易被脾脏破坏。红细胞破坏增多,便导致溶血性贫血。从红细胞中裂解出的大量血红蛋白分解生成了胆红素,可引起皮肤、巩膜黄染,临床症状为“黄疸”。脾脏也由于红细胞在此破坏、刺激增生而越来越大,继发肝脏肿大^[23,24]。由于球形红细胞增多症的发病机制主要是由于脾脏对球形红细胞的破坏所致,因此手术切除脾脏是目前最好的治疗方法^[11,25]。

Rybicki 等^[11]对球形红细胞的膜蛋白进行 SDS-PAGE 分析,发现带 4.2 蛋白不至正常含量的 0.10%。带 4.2 蛋白缺失的红细胞,除了带 3 蛋白含量有轻微的减少,带 6 蛋白(G3PD)含量有少量的增加外,膜蛋白的总量没有变化。SDS-PAGE 及放射性免疫分析发现,血影蛋白的含量正常。对亲和纯化抗体进行免疫分析显示^[11],球形红细胞的带 4.2 蛋白由 74 kDa 和 72 kDa 的蛋白质成对组成,而正常红细胞带 4.2 蛋白是由 72 kDa 的单体蛋白质组成。用胰岛素,α-胰凝乳蛋白酶及木瓜蛋白酶对带 4.2 蛋白进行蛋白质水解消化分析,证明球形红细胞带 4.2 蛋白与正常红细胞带 4.2 蛋白相似但不相同。对蛋白质在细胞膜上的装配位点进行研究,发现带 4.2 蛋白缺失的膜蛋白的装配方式与正常膜蛋白相同。在带 4.2 蛋白缺失的情况下,将膜骨架蛋白中血影蛋白与肌动蛋白去除后,锚蛋白的含量减少 2/3;而正常红细胞中血影蛋白与肌动蛋白含量的减少不会引起锚蛋白含量的变化。因此,可以认为在血影蛋白与肌动蛋白量减少的情况下,带 4.2 蛋白能稳定锚蛋白的连接。结果显示,带 4.2 蛋白可以帮助锚蛋白固定在红细胞膜骨架上。

在带 4.2 蛋白缺失的红细胞中,CD59 和血型糖蛋白 C 的含量减少了约 20%,整个膜骨架结构的稳定性有明显降低。以往对血影蛋白-肌动蛋白骨架,以及其他连接蛋白进行研究时,普遍认为带 4.2 蛋白对膜结构的稳定性没有大的帮助。对血型糖蛋白 C 和 CD59 的分析结果显示,带 4.2 蛋白对膜骨架网状结构扩张有重要作用。这些可以帮助人们部分解释在带 4.2 蛋白缺失的情况下,膜结构形态的变化。

在红细胞膜结构上,带 4.2 蛋白是红细胞膜骨架上锚蛋白与带 3 蛋白的结合的促进剂^[18]。锚蛋白是

膜结构中血影蛋白与带3蛋白相连的纽带,而血影蛋白与肌动蛋白等复合形成二维网状结构。从这样的膜结构看,带4.2蛋白的缺失,至少减弱了肌动蛋白与带3蛋白的结合能力,进而影响到以肌动蛋白构成红细胞膜骨架蛋白为主的二维网状结构的功能,导致膜蛋白的转移与聚集。带4.2蛋白缺失引起的细胞膜形状及寿命的变化表明,带4.2蛋白在细胞膜骨架的功能上扮演了重要角色。

2.3 带4.2蛋白对CD47的影响

CD47又称整合素相关蛋白,是一个50 kDa的多次跨膜的糖蛋白,在机体的各种细胞及组织上均有表达^[26]。CD47参与基质支持的红细胞生成^[27]。CD47缺失的红细胞被视为“异物”,迅速在脾脏被巨噬细胞清除,从而发生溶血。巨噬细胞依靠CD47的存在或缺失来区别自身或异己^[26,28]。带4.2蛋白与CD47有一定的相互作用,它可以帮助CD47与红细胞膜骨架的连接。缺乏带4.2蛋白的红细胞中CD47表达量的减少表明,带4.2蛋白的功能和CD47、红细胞膜骨架之间的连接有关。Bruce等^[29]用荧光成像系统比较了正常红细胞和带4.2蛋白缺失的红细胞膜结构中CD47、RhAG糖蛋白、Rh蛋白和带3蛋白的阳性率。以带3蛋白作为基准,CD47在正常红细胞膜上的阳性率为55%,在带4.2蛋白缺失的情况下降低到25%至35%。在带4.2蛋白缺失的情况下,RhAG糖蛋白的表达没有显著变化,而阳性率从60%降低到40%;Rh和带3蛋白的表达也没有明显变化,但阳性率从75%降低到55%。结果显示,带4.2蛋白对CD47及红细胞膜骨架的装配都有强烈的影响。

Dahl等^[30]对正常红细胞与带4.2蛋白缺失的红细胞中,CD47、RhAG糖蛋白以及Rh蛋白进行定量分析,研究的结果显示,带4.2蛋白缺失的红细胞膜中,CD47的表达严重减少。他们最有意义的发现或许是带4.2蛋白的缺失导致游离CD47、RhAG糖蛋白以及Rh蛋白的增多。

3 小结与展望

红细胞在体内的主要功能是为肌体组织和器官运输O₂和CO₂,这一功能的正常发挥主要取决于两个因素:一是细胞内血红蛋白是否具有正常的构型并具有完善的携氧能力;二是细胞是否有合适的几何形态及变形能力。红细胞的双凹圆盘形态赋予红细胞更大的表面积,保证更多的氧分子跨膜传输。正是由于红细胞膜蛋白特殊的生物力学骨架结构使得红细

胞具有特殊的形态,并具有优良的可变形性。红细胞的生物力学性质与其生理生化功能有着密不可分的联系。

膜蛋白在细胞膜中的网络结构主要分为两大类:由血影蛋白、肌动蛋白等形成的类六边形平面拓扑学结构,以维持细胞膜的弹性;由锚蛋白、带3蛋白、带4.2蛋白等组成的驻点结构以实现细胞内外的运输通道,同时也起到网络平面的支点作用。在漫长的进化过程中,不同种属动物红细胞在形态和携氧调节方式上有着显著区别。对哺乳类动物和非哺乳类动物红细胞进行研究发现,非哺乳类动物红细胞大都有细胞核,红细胞的形态及功能的维系主要依靠细胞核完成,哺乳类动物红细胞双凹圆盘形主要由膜蛋白支撑并维持其功能。有核红细胞带4.2蛋白的含量明显降低或完全缺失,表明在进化的过程中,细胞结构的支撑由细胞核转移到了膜蛋白上,而带4.2蛋白的表达对膜蛋白结构的稳定及携氧功能的调节有重要意义。

带4.2蛋白的缺失会引起红细胞膜结构中其他蛋白含量变化。虽然这些变化不会显著的改变细胞骨架的连接性,但对网状骨架结构的稳定性和红细胞的功能却有重要影响。我们对剔除了带4.2蛋白基因的小鼠的红细胞进行研究发现(文章待发表),剔除了带4.2蛋白基因的小鼠的红细胞稳定性和携氧功能明显低于野生型小鼠,且剔除了带4.2蛋白基因小鼠的寿命远低于正常水平,由此也证明了带4.2蛋白在膜结构中的重要性。

目前已得到带4.2蛋白完整的氨基酸序列,带4.2蛋白在红细胞膜结构上的重要性正逐步突现。希望能通过对带4.2蛋白的研究来发现红细胞在进化上的变化。在今后的研究中,可以通过对不同种属动物的红细胞膜带4.2蛋白进行同源性分析,进而研究带4.2蛋白对红细胞形态、力学特性的影响及其在携氧功能方面的作用,还可以由此分析不同动物种属红细胞膜蛋白的分子结构基础;在研究分析带4.2蛋白结构同源性的基础上,进一步研究不同的动物为适应各自的生存环境在红细胞膜结构、力学特性和携氧功能上相应的演化,以及形成这种演化的膜蛋白机制;从生物进化、生物流变学和分子生物学等多学科交叉的新视角,探索动物红细胞的进化趋势。

参考文献(References)

- [1] 翟中和等. *细胞生物学*, 北京: 高等教育出版社, 2000

- [2] Bouhassira EE *et al. Blood*, 1992, **79**: 1846
[3] Friedrichs B *et al. Eur J Cell Biol*, 1989, **48**: 121
[4] Sung LA *et al. Curr Eye Res*, 1997, **16**: 1127
[5] Remus R *et al. Int J Hematol*, 2005, **82**: 422
[6] Risinger MA *et al. J Biol Chem*, 1992, **267**: 5680
[7] Bustos SP *et al. Biochemistry*, 2006, **45**: 1026
[8] Sanchez-Lopez JY *et al. Blood Cells Mol Dis*, 2003, **31**: 357
[9] Al Khairy KS *et al. Ann Saudi Med*, 2003, **23**: 152
[10] White RA *et al. Nat Genet*, 1992, **2**: 80
[11] Rybicki AC *et al. J Clin Invest*, 1988, **81**: 893
[12] Rybicki AC *et al. Blood*, 1993, **81**: 2155
[13] Iolascon A *et al. Rev Clin Exp Hematol*, 2003, **7**: 22
[14] Mandal D *et al. Biochem J*, 2002, **364**: 841
[15] Beauchamp-Nicoud A *et al. Haematologica*, 2000, **85**: 19
[16] Bhattacharyya R *et al. Biochem J*, 1999, **340**: 505
[17] Golan DE *et al. Biophys J*, 1996, **70**: 1534
[18] Korsgren C *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 613
[19] Sung LA *et al. Ann Biomed Eng*, 2003, **31**: 1314
[20] Korsgren C *et al. J Biol Chem*, 1988, **263**: 10212
[21] Su Y *et al. Mol Cell Biochem*, 2006, **289**: 159
[22] Su Y *et al. Blood Cells Mol Dis*, 2007, **38**: 221
[23] 万美玲等。临床血液学杂志, 1999, **12**: 194
[24] 张东生等。电子显微学报, 1999, **18**: 362
[25] Agre P *et al. Nature*, 1985, **314**: 380
[26] 康 颖等。中国实验血液学杂志, 2003, **11**: 347
[27] Furusawa T *et al. J Biochem (Tokyo)*, 1998, **123**: 101
[28] Oldenborg PA *et al. Blood*, 2002, **99**: 3500
[29] Bruce LJ *et al. Blood*, 2002, **100**: 1878
[30] Dahl KN *et al. Blood*, 2004, **103**: 1131

Construction and Function of Erythrocyte Membrane Protein Band 4.2

Wei-Yan Peng, Xiang Wang*, Wei Gao, Chuan Jiang, Jia-Xin Xie, Yao-Jin Li

(Bioengineering College of Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract Protein 4.2 is a major erythrocyte membrane skeletal protein which has been immunologically detected in a variety of cell types and is apparently essential for normal erythrocyte membrane function. It is a transglutaminase-like molecule with no enzymatic cross-linking activity. Protein 4.2 associates with the cytoplasmic domain of band 3 and interacts with ankyrin in the erythrocyte membrane. Protein 4.2 is N-myristylated. It is playing an important role in maintaining the integrity and stability of the membrane. Individuals with protein 4.2 deficiency in their erythrocyte membranes exhibit spherocytosis and experience various degrees of hemolytic anemia, which may necessitate a splenectomy. In humans, several point mutations and a frame shift mutation of protein 4.2 are associated with protein 4.2 deficiency in hemolytic anemia. Band 4.2 may serve as an accessory linking protein between the membrane skeleton and the overlying lipid bilayer. This article has reviewed the progress of the research on the construction and the function of protein 4.2.

Key words protein 4.2; membrane protein; membrane skeleton; function

Received: March 27, 2007 Accepted: June 6, 2007

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.10572159), the Chongqing Science & Technology Commission (No.2006ba5010) and the forest resources appraisal centerOne, the item content (No.B06023)

*Corresponding author. Tel: 86-23-65102507, E-mail: xwangchn@vip.sina.com