

跨膜受体核转位通路的研究进展

龚爱华* 张志坚* 邵根宝 肖德生 杨勇 陈永昌

(江苏大学医学院, 镇江 212013)

摘要 跨膜受体可从膜表面进入细胞核内直接调控细胞的生命活动,但其核转位的途径至今尚无定论。已有多种模型分析了跨膜受体的核转位过程,它们均强调受体必须从细胞膜或内吞泡“逃脱”到细胞质后,才能进入细胞核内。然而,内吞-分选-浓缩-膜泡融合-释放模型却诠释了一条不同的跨膜受体核转位通路,这将有利于进一步阐明跨膜受体核转位的模式及其分子机制,并为核靶向药物的开发、目的基因的导入、病毒感染的治疗等应用研究提供新的策略。

关键词 跨膜受体;核转位;信号转导;内体;融合

传统的细胞生物学理论认为细胞表面活化的受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTKs)可通过信号转导通路如 MAPK、ERK、PI3K、PLC γ 、PKC 等将一连串讯息(signalling cascades)从细胞表面传递到细胞内^[1],最终在细胞核内引发一系列生物学事件。然而,这一经典信号转导理论近来受到了挑战,已有研究证据表明 RTKs 受体的表达模式和亚细胞定位在一些恶性肿瘤组织和细胞系中发生了变化,如 ErbB-2 在乳腺癌组织和乳腺癌细胞系中高表达,且主要定位在核内^[2-4]。我们的前期研究也发现 TrkA 在脑胶质细胞系 U251 中高表达,且主要分布在间期细胞核内^[5-8]。因此,研究 RTKs 的核转位通路及受体核转位后的生物学功能对于阐明肿瘤的发生、发展、迁移的机制及其恶性程度具有十分重要的意义。目前研究主要聚焦在探讨受体核转位后的生物学功能^[9-13],但跨膜受体的核转位通路一直是一个令人费解、颇具争议的问题,关键在以下 3 个方面:(1)跨膜受体包括 RTKs 是经由什么通路到达细胞核内的?(2)膜受体是如何“逃离”膜脂质双分子层的?(3)跨膜受体如何经过核孔转位至细胞核内的?笔者对近年来的相关文献作了一个简要的回顾,并结合笔者已有的研究对上述问题作出了合理的推测。

1 当前跨膜受体的核转位通路模型

近年来,细胞膜表面跨膜受体被发现可转位至细胞核内,具有调控目的基因的功能,继而对细胞的生长、分化、增殖起调控作用^[9-14]。这一过程可能涉及到细胞表面跨膜受体可通过内吞(endocytosis)、分选(sorting)、转运(transport)和核转位(nuclear

translocation)等细胞内一系列连续的动态事件。跨膜受体核转位通路被认为是信号转导的“捷径”(signalling shortcuts)^[15]。目前跨膜受体核转位通路的实验证据主要来源于对表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)家族和成纤维生长因子受体(fibroblast growth factor receptor, FGFR)等跨膜受体核转位的研究。研究发现不仅全长膜受体,而且受体的可溶性片段也能进入细胞核内,基于上述现象以及可溶性蛋白在细胞质与核之间的穿梭机制,学者们提出了四种跨膜受体可能的核转位通路并对受体逃脱脂质双分子层膜的机制作出了推测^[15-19]。

1.1 全长受体从质膜或内体“逃脱”的假设

研究发现 EGFR 家族中全长 EGFR-1、ErbB-3 和 FGFR-1 能够定位于细胞核内^[20-22]。完整的跨膜受体一般具有 3 个区:胞外段(extracellular domain, ECD),跨膜区(transmembrane domain, TD),胞内段(intracellular domain, ICD)。跨膜受体从细胞表面转位到细胞核内,首先必须从膜脂质双分子层“逃脱”出来。然而,由于受体的跨膜区一般是由疏水氨基酸组成的 α 螺旋的结构,与膜脂质双分子层构成了相对稳定的结构,目前尚无法解释受体跨膜区是如何从质膜或内体膜上解离出来的,这也一直令人费解的原因。而 FGFR-1 却是一个例外,它的跨膜区出现了 β 折叠,不能与膜脂质双分子层 FGFR-1 形成稳定的结构,较容易从膜上解离出来,所以可见不同长度(包

收稿日期:2008-01-04 接受日期:2008-04-15

江苏省高校自然科学基金资助项目(No.07KJB310018)

* 通讯作者。Tel: 0511-88858996, E-mail: ahg5@ujs.edu.cn, zzzj@ujs.edu.cn

括全长)的 FGFR-1 出现在细胞质和细胞核中^[21](图 1a)。如果将 FGFR-1 的跨膜区置换为 FGFR-4 (含有典型 RTKs 的 α 螺旋的结构)的跨膜区,发现重组的 FGFR-1 主要分布于核周和细胞膜上^[21]。另外,全长 FGFR-1 可与核输入因子(importin)形成复合物,这有利于 FGFR-1 直接从细胞质膜上逃离到细胞质中,经过核孔进入细胞核内^[23](图 1c)。如果说 FGFR-1 的跨膜区的结构特点能够牵强地解释上述研究结果,那么含有 α 螺旋的跨膜区的 EGFR-1、ErbB-3 如何能从质膜上逃离到细胞质中的呢?

1.2 依赖 ERAD “逃脱”假设

Carpenter^[19]认为全长受体可能会依赖内质网降解系统(endoplasmic reticulum associated degradation, ERAD)从内质网转位到细胞质基质中,经核孔进入细胞核内,或者直接转位至核膜上。ERAD 是细胞内蛋白质合成的质量控制系统,可以检测在内质网中错误折叠的蛋白质,并把它们完整地送到细胞质中,接着这些蛋白质被泛素化,在蛋白酶体中被降解。因此,学者们推测受体在内吞后,由内体逆向运输到高尔基复合体,内体与高尔基复合体融合,再转运至内质网,然后通过 ERAD 系统将受体从膜上解离出来^[24]。病毒和几种毒素在内化后就是经由这个途径进入细胞质的^[25-27]。

在过去的 25 年里,尽管有大量的文献报道了生长因子如神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和成纤维生长因子(fibroblast growth factor, FGF)、激素(如 insulin)和 RTKs 能转位到细胞核内,并产生生物学效应,但这些工作仍然受到较多的质疑。首先,仅有少数文献报道了 3 个全长受体的核转位现象,且不能提供有说服力的证据说明全长受体的核转位通路机制及其在核的作用机制;其次,上述两种假设尚需大量的实验数据来证明其合理性。如,内质网降解系统通常是将错误折叠的蛋白质转运到细胞质中,经由泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin proteasome system, UPS)降解,该生理过程是由 Sec61 转运子所介导的。如果说内体膜上的 RTKs 可以经由 ERAD 系统转位到细胞质中,那么内体膜上有没有 Sec61, RTKs 如何到达内质网, Sec61 又是如何识别 RTKs 的?此外, Sec61 复合体通道通常是转运非折叠或错误折叠的蛋白质,而 EGFR 等多结构域的折叠蛋白是如何通过该通道呢?如果可以, RTKs 又是如何逃脱 UPS 的降解呢?

1.3 两步酶切假设

基于 RTKs 的可溶性片段定位于核内的证据,学者们又提出了跨膜受体经两步酶切释放可溶性片段的假设(图 2)。可以说跨膜受体通过酶切方式从膜进入细胞质是目前受体核转位通路最令人信服的解释。即在配体的刺激下,受体的胞外区首先可以在解整合素和基质金属蛋白酶-17 (a disintegrin and metalloprotease 17, ADAM-17)的作用下胞外段脱落(ectodomain shedding),紧接着在早老素(presenilin)依赖的 γ 分泌酶的作用下选择性地切除细胞质侧的跨膜区,受体的胞质片段则游离到细胞质中,在核输入因子的引导下通过核孔。目前已经发现的 γ 分泌酶的底物包括 Notch^[28]、淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein)^[29]、p75^[30,31]和 ErbB-4^[32,33],其中 ErbB-4 是经过 γ 分泌酶切后形成可溶性的胞内段后,再转位到细胞核内的。然而,核转位并非受体 ICD 的主要命运。研究发现集落刺激因子-1 (colony stimulating factor-1, CSF-1)的受体 ICD 在 CSF-1 的刺激下,经由上述两次酶切后,释放出 ICD,然后经蛋白酶体降解,仅有少量的 ICD 转位到细胞核内^[34]。目前, RTKs 类受体中发现 p75NTR、ErbB-4、VEGFR-1、IGFI-R 等是通过该途径核转位的,而其他 RTKs 在细胞核内也有相应的可溶性片段,它们是否同样可以通过两步酶切形成可溶性片段,或许依赖于其他尚未发现的酶的酶切尚需进一步探讨。

1.4 核靶向早期内体假设

Giri 等^[35]和 Lo 等^[36]提出了内化的受体可以直接从早期内体运送入细胞核的跨膜受体核转位假设(图 3)。该假设是基于:①跨膜受体 ErbB-2 在核转位通路中,与早期内体的抗原(EEA1)、核输入因子、包被蛋白(clathrin)在细胞核内共定位,且能被突变型的 dynamin (Lys44Ala)所阻断,表明内吞过程是 ErbB-2 必须的;②免疫共沉淀实验结果表明受体 ErbB-2 与上述几种分子形成复合物,并经过与核孔蛋白 Nup358 作用后进入细胞核内。因此,他们认为嵌在内体膜上的受体连同早期内体被直接运送至核孔处,而后受体复合物从内体膜上脱落下来,经核孔转运进核, ErbB-2 从内体膜上解离的机制尚不清楚。但是,值得关注的是 EEA1 通过与小 GTP 酶(Rab5)和磷脂酰肌醇-3-磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PI3P)相互作用被募集到内体上^[37],而核被膜上又聚集了许多合成 PI3P 所必需的脂酶以及 RanGTPase^[38-41]。因此,核被膜与其他细胞内膜性结构间极可能会存在膜

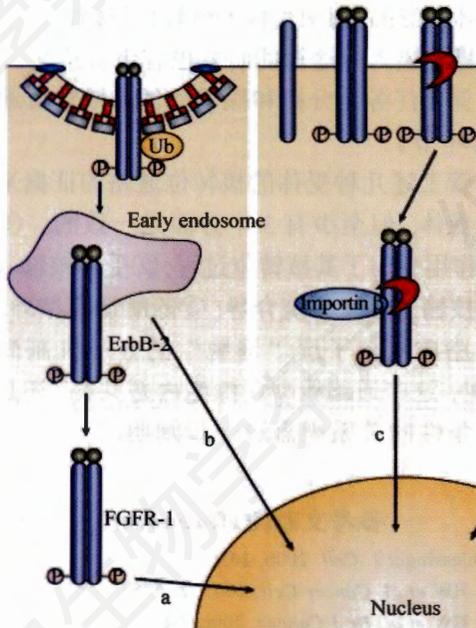


图 1 全长受体从质膜或内体“逃脱”的假设^[15]

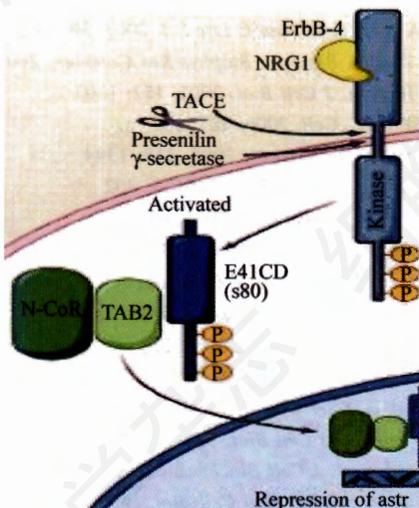


图 2 两步酶切假设模式图^[33]

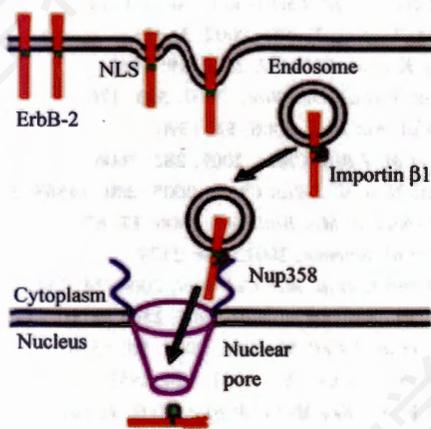


图 3 核靶向早期内体假设模式图^[35]

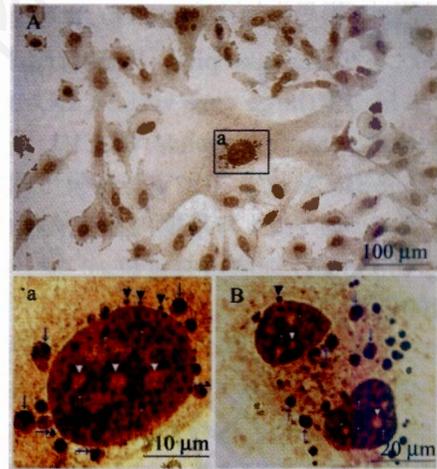


图 4 TrkA 在 U251 细胞中的核转位过程^[7]
含受体 pTrkA 的大核心泡(LCV, ↑)和小核心泡(SDCV, ▲)分布在 U251 细胞的核周, 并可见 LCV 出芽形成 SDCV (↑)及 SDCV 与核膜融合(a, B ▲)情况。

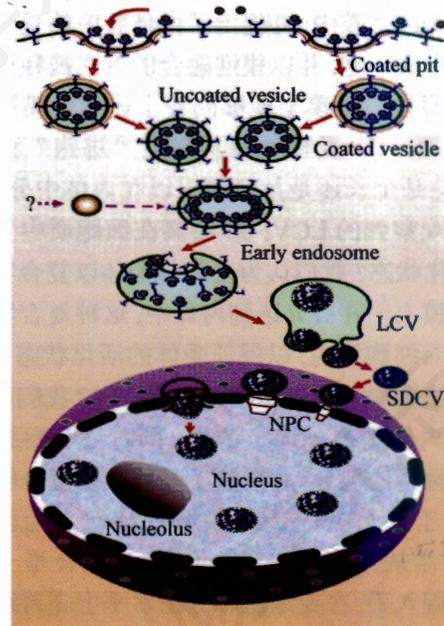


图 5 “内吞 - 分选 - 浓缩 - 膜泡融合 - 释放”模式图^[7]

泡融合的生物事件^[41]。

2 我们的假说: 内吞 - 分选 - 浓缩 - 膜泡融合 - 释放模型

2.1 近期的研究证据

通过免疫组织化学、免疫荧光双标及免疫印迹技术分析 TrkA 核转位过程, 我们发现^[5,7]: ① 活化的 TrkA (pTrkA)在脑胶质细胞系 U251、胃癌细胞系 (gastric carcinoma, SGC-7901) 等细胞中高表达, 且主要分布在间期细胞核内; ② 在光学显微镜下捕捉

到了一系列与跨膜受体 TrkA 核转位相关的膜性结构,包括杯状小凹(cup-like pit)、环状小泡(ring-like vesicle)、大核心泡(large core vesicle, LCV)、小致密核心泡(small densecore vesicle, SDCV);还发现了 LCV 出芽形成 SDCV 以及 SDCV 与核膜可能发生融合的现象(图 4);③ TrkA 与早期内体核抗原(EEA1)核孔蛋白(Nup358)在细胞内共定位。

2.2 我们的假说

基于以上证据,我们提出了一个包括“内吞-分选-浓缩-膜泡融合-释放”等连续过程的跨膜受体核转位通路模型(图 5)。该模型突破了以往跨膜受体直接从膜脂质双分子层逃脱到细胞质中的假设,认为嵌在内体膜上的受体可以通过类似“内吞”的方式,向内体腔中嵌套形成“洋葱”或“石榴”样的分选内体(sorting endosome)或多泡体(multivesicular body)^[42-44],膜上的受体在腔中可能在一些酶的作用下被解离到内体腔中;并提出了内体腔中的受体可能通过出芽形成小泡,并以膜泡融合的方式被释放到细胞核内的假设。该模型能够回答上述其他模型难以解释的问题。①受体如何从膜上“逃跑”到细胞质中?无论是全长还是片段都可以在内体中分选,形成我们所观察到的 LCV;②游离在细胞质中受体如何保持活化状态?我们认为受体与配体以复合物的形式从内体膜上一并被分选到内体中,这种复合物一直保持到进入细胞核内,以保证受体的活化状态;③受体如何在极短的时间内积聚到细胞核中?我们观察到了受体在内体中被分选、浓缩,同时还观察到转运泡与核膜融合的现象,并推测了受体将以复合物的形式以类似于“分娩”的方式通过核孔。当然,上述模型尚需从内化、分选、浓缩、融合等一系列生物学过程入手,在亚细胞和分子水平上完善这一通路。

鉴于 TrkA 在脑胶质瘤细胞核内参与了细胞周期的调控等生物学效应,我们认为可能有两个方面的因素将会影响以 TrkA 为靶标的肿瘤靶向治疗。一方面受体的核转位可能会导致药物的“脱靶”效应;另一方面受体在核内调控了细胞的增殖和促进细胞的迁移,可能会增强肿瘤细胞的耐药性。基于上述分析,我们推测干预 TrkA 的核转位途径,减少 TrkA 在核的生物学效应,有望成为肿瘤靶向治疗的策略之一。目前我们课题组已经开展了以 NGF (TrkA 的配体)为“载体”核靶向放疗药物(碘 125 粒子)及纳米粒子化化疗药物的应用研究。此外,病毒的感染是

经由受体介导的,阐明受体的核转位通路的分子机制对于病毒感染入核途径的研究也有借鉴意义。因此,当前的首要任务是分析和探明受体的核转位途径中的关键环节。

尽管上述几种受体的核转位通路的证据来源于不同的受体,但至少有 3 个方面是一致的。①受体的内吞作用参与了其核转位过程;②受体核输入途径大多由核输入因子系统介导;③除酶切模型外,受体如何从脂质双分子层“逃脱”的分子机制尚不清楚;此外,这些通路模型在细胞内是共存,还是代偿性或竞争性的关系尚需进一步阐明。

参考文献(References)

- [1] Schlessinger J. *Cell*, 2000, **103**: 211
- [2] Lo HW *et al. Cancer Cell*, 2005, **7**: 575
- [3] Lo HW *et al. Br J Cancer*, 2006, **94**: 184
- [4] Vidal GA *et al. Oncogene*, 2007, **26**: 462
- [5] 龚爱华等. *江苏大学学报医学版*, 2006, **16**: 473
- [6] 张志坚等. *神经解剖学杂志*, 2007, **23**: 577
- [7] Gong A *et al. Sci China C Life Sci*, 2007, **50**: 141
- [8] Zhang Z *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **337**: 68
- [9] Reilly JF *et al. J Cell Biol*, 2001, **152**: 1307
- [10] Sardi SP *et al. Cell*, 2006, **127**: 185
- [11] Mathew D *et al. Science*, 2005, **310**: 1344
- [12] Lin SY *et al. Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 802
- [13] Lo HW *et al. Cancer Res*, 2005, **65**: 338
- [14] Chen QQ *et al. Cell Res*, 2005, **15**: 504
- [15] Wells A *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**: 697
- [16] Massie C *et al. Nat Rev Cancer*, 2006, **6**: 403
- [17] Schlessinger J *et al. Cell*, 2006, **127**: 45
- [18] Bryant DM *et al. Traffic*, 2005, **6**: 947
- [19] Carpenter G. *Curr Opin Cell Biol*, 2003, **15**: 143
- [20] Lin SY *et al. Nat Cell Biol*, 2001, **3**: 802
- [21] Myers JM *et al. J Cell Biochem*, 2003, **88**: 1273
- [22] Tsai B *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**: 246
- [23] Reilly JF *et al. J Cell Biol*, 2001, **152**: 1307
- [24] Liao HJ *et al. Mol Biol Cell*, 2007, **18**: 1064
- [25] Rodighiero C *et al. EMBO Rep*, 2002, **3**: 1222
- [26] Pelkmans L *et al. Traffic*, 2002, **3**: 311
- [27] Sandvig K *et al. EMBO J*, 2000, **19**: 5943
- [28] Käsbauer T *et al. Dev Biol*, 2007, **303**: 376
- [29] Ni Y *et al. Nat Med*, 2006, **12**: 1390
- [30] Urra S *et al. J Biol Chem*, 2007, **282**: 7606
- [31] Zampieri N *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 14563
- [32] Määttä JA *et al. Mol Biol Cell*, 2006, **17**: 67
- [33] Ni CY *et al. Science*, 2001, **294**: 2179
- [34] Wilhelmson K *et al. Mol Cell Biol*, 2004, **24**: 454
- [35] Giri DK *et al. Mol Cell Biol*, 2005, **25**: 11005
- [36] Lo HW *et al. J Cell Biochem*, 2006, **98**: 1570
- [37] Mills IG *et al. J Cell Sci*, 2001, **114**: 1959
- [38] Irvine RF. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, **4**: 349
- [40] Byrne RD *et al. Biochem J*, 2005, **387**: 393

[41] Larijani B *et al. Biochem J*, 2001, **356**: 495

[42] Barona T *et al. J Biol Chem*, 2005, **280**: 41171

[43] Butowt R *et al. J Neurosci*, 2001, **21**: 8915

[44] Katzmann DJ *et al. Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, **3**: 893

Progress in Nuclear Translocation Pathway of Transmembrane Receptors

Ai-Hua Gong*, Zhi-Jian Zhang*, Gen-Bao Shao, De-Sheng Xiao, Yong Yang, Yong-Chang Chen

(School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract Although transmembrane receptors from cell surface to nucleus can generally regulate the cellular life activities, their pathways of nuclear translocation still remain to be elucidated. Several modes have been suggested to explain the pathways of nuclear translocation of transmembrane receptors, which all emphasize that transmembrane receptors could translocate into nucleus following 'escape' from cell membrane or endosomes into cytoplasm. Herein, a novel nuclear translocation pathway of transmembrane receptors is hypothesized as an endocytosis-sorting-concentration-fusion-translocation pathway model. It is helpful to understand the molecular mechanism of transmembrane receptors' nuclear translocation, and provide a promising research approach toward biomedicine and biotechnology, such as drugs target, gene therapy, gene engineering, and virus infection.

Key words transmembrane receptor; nuclear translocation; signal transduction; endosome; fusion

Received: January 4, 2008 Accepted: April 15, 2008

This work was supported by the Natural Science Fund for Colleges and Universities in Jiangsu Province

*Corresponding author. Tel: 86-511-88858996, E-mail: ahg5@ujs.edu.cn, zzj@ujs.edu.cn