

多功能的I型跨膜蛋白ESDN

李巍伟 聂磊 韩梅*

(河北医科大学基础医学院, 生物化学与分子生物学教研室, 河北省医学生物技术重点实验室,
神经与血管省部共建教育部重点实验室, 石家庄 050017)

摘要 内皮和平滑肌细胞来源的neuropilin样分子ESDN(endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like molecule)是在哺乳类动物中广泛存在的一类I型跨膜蛋白(type-I transmembrane protein)。ESDN由N-端长分泌信号序列、一个CUB(domain found in complement C1r/C1s、Uegf和Bmp1)结构域、一个LCCL(domain found in Limulus factor C、Coch和Lgl)结构域、一个凝血因子V/VIII同源结构域和一个长胞质尾部组成, 在生物进化过程中相对保守。该文综述了ESDN蛋白的发现与分布及其结构特征, 对ESDN参与血管再生调控的研究成果进行了较为详细的综述, 同时介绍了ESDN在肿瘤发生、转移及免疫等方面作用的研究进展。

关键词 ESDN; I型跨膜蛋白; 血管再生

ESDN Is A Multifunctional Type-I Transmembrane Protein

Li Weiwei, Nie Lei, Han Mei*

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medicine, Key Laboratory of Medical Biotechnology of Hebei Province, Key Laboratory of Neural and Vascular Biology of Ministry of Education, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like molecule (ESDN) is one of type-I transmembrane protein that is genetically conserved among various mammalian species. It consists of a N-terminal secretory signal sequence, a CUB structural domain, a LCCL structural domain, a coagulation factor V/VIII homology domain and a long cytoplasmic tail. It is relatively conservative in the process of biological evolution. This ESDN molecule confer diverse and sophisticated functions, thus to modulate vascular remodeling, influence tumor metastasis, immune regulation, etc. The structure, distribution, as well as the affected physiological functions are summarized in this review.

Keywords ESDN; type-I transmembrane protein; vascular remodeling

研究表明, 细胞质膜上的跨膜蛋白具有多种功能, 如运输、连接、催化、作为受体蛋白等, 这些功能参与介导多种细胞活动和某些病理生理过程, ESDN(endothelial and smooth muscle cell-derived neuropilin-like molecule)便是这样的一种I型跨膜蛋白。2001年, Kobuke等^[1]使用改良的信号序列捕获技术, 成功从原代培养的人冠状动脉细胞中克隆了

一种新的跨膜蛋白, 根据结构和来源的特点, 将其命名为ESDN。Northern印迹研究表明, ESDN在人与胎儿各组织广泛表达, 如骨骼肌、胎盘、心脏、结肠、卵巢和前列腺等组织表达丰富, 尤其以成人睾丸的表达量最高^[2]。另外, ESDN在成年大鼠迷走神经, 小鼠心脏、肺部、主动脉及胚胎的迷走神经和脑组织也存在高表达^[3]。它能够通过调节血小板源性生

收稿日期: 2015-04-08 接受日期: 2015-07-13

国家自然科学基金(批准号: 31271222、91439114)和河北省重点基础研究项目(批准号: 13967706D)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0311-86265563, E-mail: hanmei@hebm.edu.cn

Received: April 08, 2015 Accepted: July 13, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31271222, 91439114) and the Key Program for Basic Research of Hebei Province (Grant No.13967706D)

*Corresponding author. Tel: +86-311-86265563, E-mail: hanmei@hebm.edu.cn

网络出版时间: 2015-09-16 17:03:22 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150916.1703.004.html>

长因子-BB(platelet-derived growth factor-BB, PDGF-BB)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factors, VEGF)信号途径来参与血管再生调控,还与免疫、癌症发生与转移等多种重要的病理生理活动相关。本文综述了自ESDN发现以来十几年的研究进展,为了解及深入研究这一重要的跨膜蛋白提供参考。

1 ESDN结构特点

据报道,人类ESDN基因对应的染色体位置是3q12.1, GenBank中的登记编号为AB073146。使用BLAST分析ESDN基因结构,通过对比人ESDN cDNA序列与人基因组草图序列,发现ESDN基因包含十六个外显子,横跨至少104 Kb的基因组范围。编码由775个氨基酸组成的蛋白。ESDN在哺乳动物中高度保守,人类、大鼠和小鼠ESDN氨基酸序列同源性比对可见,人类与啮齿类动物间氨基酸序列一致性为84%~85%,小鼠与大鼠间氨基酸序列一致性为92%^[1]。

ESDN为I型跨膜蛋白, N-端为一个长分泌信号序列,人类为67个氨基酸残基,啮齿类为64个氨基酸残基。已有研究报道,病毒^[4]或细菌^[5]的分泌蛋白均有较长的信号肽^[6], ESDN的N-端信号肽则是迄今发现的真核生物最长的信号序列^[7]。ESDN分子还有一个长的胞质尾部,由二百多个氨基酸残基组成。

对ESDN分子结构域(图1)的研究表明, ESDN含有一个CUB结构域和一个凝血因子V/VIII同源结构域,与Neuropilins(Nrp)结构相似,这就是ESDN命名的由来。在ESDN的CUB结构域和凝血因子V/VIII同源结构域之间还插入一个LCCL结构域,这是一个疏水结构域,是一个非典型长分泌性信号序列和一个跨膜区域,序列同源性研究表明, LCCL结构域与Coch^[8]和Limulus factor C^[9]有很高的同源性。由于ESDN特殊的分子结构,因此也被命名为CLCP1(CUB、LCCL-homology和coagulation factor V/VIII-homology domains protein 1)或DCBLD2(discoidin、CUB和LCCL domain-containing protein 2 gene)。

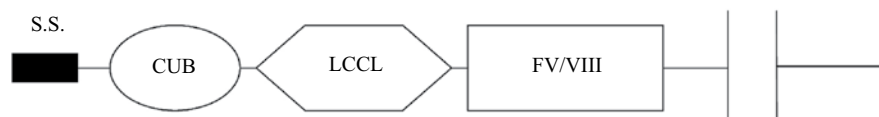


图1 ESDN分子结构域

Fig.1 The domain structure of ESDN

2 ESDN的功能

2.1 调节血管生成和血管重塑

2001年, Kobuke等^[1]发现,用PDGF-BB刺激培养的人冠状动脉平滑肌细胞, ESDN表达上调,并且与PDGF-BB呈计量依赖性;在球囊损伤的大鼠颈动脉内膜中, ESDN表达也升高。2007年, Sadeghi等^[10]将一段人的冠状动脉移植到严重免疫缺陷的小鼠,然后同种异体人外周血单核细胞免疫重建。没有免疫重建时,血管细胞没有增殖, ESDN在移植动脉中表达量很小;外周血单核细胞重建2周后,血管细胞增殖活性达到峰值, ESDN在移植动脉中的表达水平也大幅升高。与之相似的是,在 $apoE^{-/-}$ 小鼠损伤诱导的血管重构中, ESDN早期瞬时表达上调同时伴随细胞增殖。在离体培养的血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)中,处于增殖状态时ESDN表达显著高于生长抑制的细胞;而ESDN的过表达又可抑制VSMC生长,敲除ESDN则产生相反的效果。由此推测, ESDN对VSMC增殖活性可能具有双向调控作用。Nie等^[3]也发现, ESDN调节小鼠和斑马鱼胚胎的血管再生。上述研究表明, ESDN是血管重塑的一个新标志物,是VSMC增殖的调节因子。

2.1.1 调节血管平滑肌细胞PDGF信号转导 PDGF可由多种细胞合成分泌是诱导VSMC增殖的强效丝裂原^[11], PDGF受体 β (PDGF receptor β , PDGFR β)是PDGF-BB的主要受体,它的磷酸化介导了PDGF诱导的ERK1/2和Src磷酸化^[12]。Guo等^[13]发现,敲低ESDN可大大增强PDGF诱导的VSMC中DNA的合成,这与PDGFR β 、Src和ERK1/2磷酸化活化有关,并不影响PDGFR β 表达水平。ESDN表达下调一方面显著促进PDGF与受体的最大结合,进而增强PDGFR的磷酸化修饰;另一方面显著降低配体诱导的PDGFR β 泛素化,这与抑制胞质泛素连接酶c-Cbl表达有关,进而增强PDGFR β 信号活性。c-Cbl是PDGFR β 信号途径的负性调控因子^[14],在VSMC中, ESDN表达下调可降低c-Cbl的mRNA水平,抑制c-Cbl蛋白表达,但其作用机制尚不清楚。因此,

ESDN可能是下调PDGFR β 信号途径的一个新靶点。

2.1.2 调节血管内皮细胞VEGF信号途径 VEGF是血管内皮细胞高度特异的丝裂原,其家族成员主要包括VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D和VEGF-E及胎盘生长因子(placenta growth factor, PIGF)。VEGF家族成员主要与三种结构相关的受体酪氨酸激酶结合,分别命名为VEGFR-1、VEGFR-2和VEGFR-3^[15-16]。VEGF-A是调节血管发育的关键生长因子,主要通过高亲和力结合VEGFR-2(VEGF receptor-2, VEGFR-2),随后激活下游信号途径^[17-18]。Nie等^[3]通过系列实验研究发现,ESDN过表达显著促进VEGF介导的细胞生长和迁移,而ESDN下调作用效果则相反。在人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)中,敲低ESDN可降低VEGF诱导的MAPK p44/42和p38磷酸化水平。敲低ESDN还导致VEGF诱导的VEGFR-2 Tyr1054/1059、Tyr1175和Tyr1214磷酸化受抑。同样,在小鼠肺内皮细胞(murine lung endothelial cells, MLECs)也发现类似的变化,表明ESDN缺乏可损伤内皮细胞VEGF信号途径。在人和鼠内皮细胞中,ESDN下调并未影响VEGFR-1、VEGFR-2和Nrp1-1(neuropilin1-1, Nrp1-1)、Nrp1-2的表达活性,也未影响VEGFR-1、VEGFR-2在细胞膜表面的分布和数目,说明ESDN对内皮细胞VEGF信号的调节并非在VEGFR表达水平上。

VEGFR-2信号途径的调控可以通过其与若干关键调节蛋白的结合来实现,包括某些蛋白酪氨酸磷酸酶,如蛋白质酪氨酸磷酸酶-1B(protein tyrosine phosphatases-1B, PTP-1B)^[19-20]、T细胞蛋白酪氨酸磷酸酶(T cell protein tyrosine phosphatase, TCPTP)^[21]和血管内皮细胞蛋白酪氨酸磷酸酶(vascular endothelial protein tyrosine phosphatase, VE-PTP)^[22-23]等。对内皮细胞VEGF信号途径分析发现,ESDN调节VEGFR-2-蛋白酪氨酸磷酸酶和VEGFR-2-VE-钙黏蛋白复合体的形成。ESDN基因敲除后,VEGFR-2与蛋白酪氨酸磷酸酶和VE-钙黏蛋白的结合均增强,且ESDN基因敲除对PTP1B、TCPTP以及VE-钙黏蛋白的表达均无影响,结合作用导致游离VEGFR-2减少;另外,活化的VEGFR-2可以被蛋白酪氨酸磷酸酶去磷酸化,如PTP1B、TCPTP和VE-PTP^[20-23]。总之,ESDN基因敲除引起的游离VEGFR-2减少和VEGFR-2去磷酸化增强都

会减弱VEGF信号活性。

2.2 参与调节肿瘤细胞生长和转移

在胃癌组织中的研究表明,与邻近正常组织相比,ESDN表达量下调79%。焦磷酸测序分析显示,胃癌组织中ESDN启动子区域存在异常甲基化,而且这种甲基化明显与ESDN表达呈负相关。过表达ESDN可抑制胃癌细胞的贴壁依赖性和非贴壁依赖性集落形成,说明ESDN抑制胃癌细胞增殖。同时还发现,ESDN抑制胃癌细胞浸润穿透胶原蛋白基质,表明ESDN抑制胃癌细胞的转移^[24]。在ESDN与黑色素瘤的关系研究中发现,侵袭性的黑色素瘤ESDN表达下降,且ESDN表达量与瘤体厚度成反比^[25]。但在肺癌中,36%的原发病灶、58%淋巴结转移和33%的远处转移灶均有ESDN表达增高的现象,这表明,ESDN的高表达可能与肺癌的发生和转移能力有关^[2]。此外,ESDN还与乳腺癌的转移、结直肠癌和胰腺癌的发生相关^[26-28]。

Feng等^[29]发现,在神经胶质瘤和肺癌细胞中敲低ESDN,可明显减弱表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)诱导的细胞存活和增殖。研究证实,ESDN参与一些肿瘤发生过程中的EGF信号通路调控。EGFR活化后可磷酸化ESDN分子上的酪氨酸750(Y750),磷酸化的ESDN结合TNF受体相关因子6(TNF receptor-associated factor 6, TRAF6),后者激活TRAF6-E3泛素连接酶进而激活AKT信号通路,从而促进恶性胶质瘤、肺癌、头颈部肿瘤和黑色素瘤的发生。

2.3 ESDN参与抗病毒免疫

2003年,Warke等^[30]研究发现,登革热病毒感染离体培养的人脐静脉内皮细胞后,ESDN基因表达下调。推测ESDN可能在登革热病毒感染时介导细胞间的交互作用,但其如何参与细胞的抗病毒免疫还有待深入研究。

3 展望

十几年来,对ESDN的研究显示,该蛋白在血管生成、动脉重塑、肿瘤细胞迁移、抗病毒免疫等多个方面都具有重要的作用。目前,ESDN的功能报道多依赖于细胞中的过表达和敲除系统。虽然ESDN一级结构及其结构域的结构已经被解析,但ESDN在体内的功能还有待进一步鉴定,它在多个方面发挥作用的分子机制也还未知。此外,其CUB结构域、LCCL结构域以及凝血因子V/VIII同源结构域如何

协同作用还有待进一步研究。随着ESDN在多个新的功能被陆续发现,这一跨膜蛋白展现了一个更加广阔的研究领域,等待更多的研究者去探索。

参考文献 (References)

- 1 Kobuke K, Furukawa Y, Sugai M, Tanigaki K, Ohashi N, Matsumori A, *et al.* ESDN, a novel neuropilin-like membrane protein cloned from vascular cells with the longest secretory signal sequence among eukaryotes, is up-regulated after vascular injury. *J Biol Chem* 2001; 276(36): 34105-14.
- 2 Koshikawa K, Osada H, Kozaki K, Konishi H, Masuda A, Tatematsu Y, *et al.* Significant up-regulation of a novel gene, CLCP1, in a highly metastatic lung cancer subline as well as in lung cancers *in vivo*. *Oncogene* 2002; 21(18): 2822-8.
- 3 Nie L, Guo X, Esmailzadeh L, Zhang J, Asadi A, Collinge M, *et al.* Transmembrane protein ESDN promotes endothelial VEGF signaling and regulates angiogenesis. *J Clin Invest* 2013; 123(12): 5083-97.
- 4 Stephens EB, Butfiloski EJ, Monck E. Analysis of the amino terminal presequence of the feline immunodeficiency virus glycoprotein: Effect of deletions on the intracellular transport of gp95. *Virology* 1992; 190(2): 569-78.
- 5 Lambert-Buisine C, Willery E, Loch C, Jacob-Dubuisson F. N-terminal characterization of the Bordetella pertussis filamentous haemagglutinin. *Mol Microbiol* 1998; 28(6): 1283-93.
- 6 von Heijne G. The signal peptide. *J Membr Biol* 1990; 115(3): 195-201.
- 7 Ogata RT, Mathias P, Bradt BM, and Cooper NR. Murine C4b-binding protein: Mapping of the ligand binding site and the N-terminus of the pre-protein. *J Immunol* 1993; 150(6): 2273-80.
- 8 Robertson NG, Khetarpal U, Gutierrez-Espeleta GA, Bieber FR, and Morton CC. Isolation of novel and known genes from a human fetal cochlear cDNA library using subtractive hybridization and differential screening. *Genomics* 1994; 23(1): 42-50.
- 9 Muta T, Miyata T, Misumi Y, Tokunaga F, Nakamura T, Toh Y, *et al.* Limulus factor C. An endotoxin-sensitive serine protease zymogen with a mosaic structure of complement-like, epidermal growth factor-like, and lectin-like domains. *J Biol Chem* 1991; 266(10): 6554-61.
- 10 Sadeghi MM, Esmailzadeh L, Zhang J, Guo X, Asadi A, Krassilnikova S, *et al.* ESDN is a marker of vascular remodeling and regulator of cell proliferation in graft arteriosclerosis. *Am J Transplant* 2007; 7(9): 2098-105.
- 11 Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 2004; 84(3): 767-801.
- 12 Sambhi BS, Hains MD, Waters CM, Connell MC, Willard FS, Kimple AJ, *et al.* The effect of RGS12 on PDGFbeta receptor signalling to p42/p44 mitogen activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Signal* 2006; 18(7): 971-81.
- 13 Guo X, Nie L, Esmailzadeh L, Zhang J, Bender JR, Sadeghi MM. Endothelial and smooth muscle-derived platelet-derived growth factor signaling neuropilin-like protein regulates in human vascular smooth muscle cells by modulating receptor ubiquitination. *J Biol Chem* 2009; 284(43): 29376-82.
- 14 Joazeiro CA, Wing SS, Huang H, Levenson JD, Hunter T, Liu YC. The tyrosine kinase negative regulator c-Cbl as a RING-type, E2-dependent ubiquitin-protein ligase. *Science* 1999; 286(5438): 309-12.
- 15 Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13(1): 9-22.
- 16 Cross MJ, Dixelius J, Matsumoto T, Claesson-Welsh L. VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem Sci* 2003; 28(9): 488-94.
- 17 Koch S, Tugues S, Li X, Gualandi L, Claesson-Welsh L. Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem J* 2011; 437(2): 169-83.
- 18 Simons M. An inside view: VEGF receptor trafficking and signaling. *Physiology (Bethesda)* 2012; 27(4): 213-22.
- 19 Lanahan AA, Hermans K, Claes F, Kerley-Hamilton JS, Zhuang ZW, Giordano FJ *et al.* VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Dev Cell* 2010; 18(5): 713-24.
- 20 Nakamura Y, Patrushev N, Inomata H, Mehta D, Urao N, Kim HW, *et al.* Role of protein tyrosine phosphatase 1B in vascular endothelial growth factor signaling and cell-cell adhesions in endothelial cells. *Circ Res* 2008; 102(10): 1182-91.
- 21 Mattila E, Auvinen K, Salmi M, Ivaska J. The protein tyrosine phosphatase TCPTP controls VEGFR2 signalling. *J Cell Sci* 2008; 121(21): 3570-80.
- 22 Baumer S, Keller L, Holtmann A, Funke R, August B, Gamp A, *et al.* Vascular endothelial cell-specific phosphotyrosine phosphatase (VE-PTP) activity is required for blood vessel development. *Blood* 2006; 107(12): 4754-62.
- 23 Mellberg S, Dimberg A, Bahram F, Hayashi M, Rennel E, Ameer A, *et al.* Transcriptional profiling reveals a critical role for tyrosine phosphatase VE-PTP in regulation of VEGFR2 activity and endothelial cell morphogenesis. *FASEB J* 2009; 23(5): 1490-502.
- 24 Kim M, Lee KT, Jang HR, Kim JH, Noh SM, Song KS, *et al.* Epigenetic down-regulation and suppressive role of DCBLD2 in gastric cancer cell proliferation and invasion. *Mol Cancer Res* 2008; 6(2): 222-30.
- 25 Osella-Abate S, Novelli M, Quaglino P, Orso F, Ubezio B, Tomasini C, *et al.* Expression of AP-2a, AP-2g and ESDN in primary melanomas: Correlation with histopathological features and potential prognostic value. *J Dermatol Sci* 2012; 68(3): 202-4.
- 26 Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, *et al.* Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 2005; 436(7050): 518-24.
- 27 Upender MB, Habermann JK, McShane LM, Korn EL, Barret JC, Difilippantonio MJ, *et al.* Chromosome transfer induced aneuploidy results in complex dysregulation of the cellular transcriptome in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* 2004; 64(19): 6941-9.
- 28 Iacobuzio-Donahue CA, Ashfaq R, Maitra A, Adsay NV, Shen-Ong GL, Berg K, *et al.* Highly expressed genes in pancreatic ductal adenocarcinomas: A comprehensive characterization and comparison of the transcription profiles obtained from three major technologies. *Cancer Res* 2003; 63(24): 8614-22.
- 29 Feng H, Lopez GY, Kim CK, Alvarez A, Duncan CG, Nishikawa R, *et al.* EGFR phosphorylation of DCBLD2 recruits TRAF6 and stimulates AKT-promoted tumorigenesis. *J Clin Invest* 2014; 124(9): 3741-56.
- 30 Warke RV, Xhaja K, Martin KJ, Fournier MF, Shaw SK, Brizuela N, *et al.* Dengue virus induces novel changes in gene expression of human umbilical vein endothelial cells. *J Virol* 2003; 77(21): 11822-32.