

微囊蛋白基因及其与疾病关系研究进展

梁旭方²⁾ 黄 芬^{1)*}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

²⁾暨南大学生物工程学系, 广州 510632)

摘要 微囊蛋白 (caveolin) 基因家族已鉴定出 3 个成员: 微囊蛋白-1、微囊蛋白-2、微囊蛋白-3, 并被定位于抑癌基因位点区域。微囊蛋白-1 是细胞质膜微囊的标记蛋白, 其中间疏水区域在细胞膜内形成发夹结构, 并使其 N 端区域与 C 端区域在细胞膜内表面聚合形成支架结构。微囊蛋白-1 与微囊蛋白-2 以组成异源寡聚体的形式存在, 在脂肪细胞、内皮细胞和成纤维细胞中表达最丰富, 微囊蛋白-3 则特异表达于肌肉。离体与活体研究结果均表明微囊蛋白-1 可能具有抑癌功能, 并可能在细胞信号传导中起刹车作用。微囊蛋白-1 基因敲除小鼠心血管 NO 与 Ca^{2+} 信号途径受损、功能异常, 肺泡上皮细胞出现异常扩增, 脂质代谢失衡, 身体消瘦。微囊蛋白-2 基因敲除小鼠肺功能与耐力均严重受损, 与微囊蛋白-1 基因敲除小鼠的表型非常相似。微囊蛋白-3 为维持心脏正常功能所必需, 可能还与一些肌肉营养不良症有关。

关键词 微囊蛋白 (caveolin) 基因, 信号转导, 疾病

学科分类号 Q78

信息传递是细胞重要的生理功能之一, 这种信号转导过程主要在生物膜上进行。近年来, 细胞质膜微囊 (caveolae, 现认为是一种细胞器) 的研究已引起广泛关注, 为研究细胞膜上的信号转导提供了一个重要线索^[1]。本文着重介绍近年来细胞质膜微囊标记蛋白——微囊蛋白 (caveolin) 基因及其与人类疾病的关系。

1 微囊蛋白基因家族

通过分子克隆已鉴定出 3 种不同的微囊蛋白基因: 微囊蛋白-1、微囊蛋白-2、微囊蛋白-3, 由它们组成 1 个基因家族——微囊蛋白基因家族^[2]。微囊蛋白-1 基因定位于人类染色体 7q31.1, 处于 D7S522 与 D7S2460 位点之间^[3,4]。由于许多人类癌症患者在此区域存在片段缺失, 现在普遍认为在 D7S522 位点附近存在 1 个抑癌基因。微囊蛋白-2 基因定位于微囊蛋白-1 基因上游 17 kb 处。人类微囊蛋白基因位点与河鲀 (*Fugu rubripes*) 比较研究发现, 从鱼到人为高度保守^[3,4]。

微囊蛋白-1 基因包含 3 个外显子, 完整的开放阅读框由 537 bp 组成, 编码长 178 个氨基酸残基的蛋白质, 其中: 外显子 1 编码 10 个氨基酸残基, 外显子 2 编码 55 个氨基酸残基, 外显子 3 编码 113 个氨基酸残基。由于微囊蛋白-1 基因外显子 2 另外存在 1 个选择性翻译起始密码, 位于外显子 2 编码区 64~ 66 bp 处, 因此微囊蛋白-1 除了有

由 178 个氨基酸残基组成的完整形式外, 尚有由 147 个氨基酸残基组成的不完整形式。

微囊蛋白基因家族从线虫到人类在序列结构上均保守, 这与微囊蛋白在细胞信号转导过程中所起的关键作用相一致。微囊蛋白-1 具有奇特的拓扑结构, 中间疏水区域 (残基 102~ 134, 由外显子 3 编码) 被认为在膜内形成发夹结构, 因而其 N 端区域 (残基 1~ 101, 由 3 个外显子共同编码) 与 C 端区域 (残基 135~ 178, 由外显子 3 编码) 均面对细胞质 (朝向胞内)。由 41 个氨基酸残基组成的部分 N 端区域 (残基 61~ 101, 由外显子 2 和 3 编码) 诱导形成微囊蛋白同源寡聚体, 44 个氨基酸残基组成的部分 C 端区域起桥梁作用, 使这些同源寡聚体相互作用并形成一个富含微囊蛋白的支架结构^[2]。

2 微囊蛋白-1 和微囊蛋白-2 基因功能

微囊蛋白-1 和微囊蛋白-2 基因在脂肪细胞、内皮细胞和成纤维细胞中表达最丰富。共免疫沉淀与双标记研究直接揭示, 微囊蛋白-1 与微囊蛋白-2 形成稳定的异源寡聚体复合物, 并且是严格地定位在一起, 因而微囊蛋白-2 可能是作为一种与微囊

* 通讯联系人。

Tel: 010-62554880, E-mail: balss@263.net

收稿日期: 2002-12-18, 接受日期: 2003-01-28

蛋白-1 结合在一起的辅助蛋白来起作用。

微囊蛋白-1 与信号分子的直接接触, 导致这些信号分子失活, 由于许多信号分子在组成性激活表达 (constitutively activated expression) 时可诱导发生癌细胞转化, 因而有理由认为微囊蛋白-1 可能具有抑制癌转化的功能, 并可能在细胞信号传导中起刹车作用^[2]。与这种设想一致, 微囊蛋白-1 在分化完成的细胞 (脂肪细胞、内皮细胞和肌肉细胞) 中表达最丰富, 并且在激活癌基因诱导细胞转化过程中, 微囊蛋白-1 mRNA 和蛋白质表达停止或者降低^[5~7]。这也与微囊蛋白-1 和微囊蛋白-2 基因定位于抑癌基因位点区域相符合, 说明微囊蛋白基因可能就是所推测的抑癌基因。进一步研究发现微囊蛋白-1 基因表达停止或者水平降低, 是由于癌变细胞中微囊蛋白-1 基因启动区 CpG 岛的高度甲基化, 并认为微囊蛋白-1 基因启动区 CpG 岛的甲基化程度可作为细胞癌变的指标之一^[3,8]。

微囊蛋白-1 潜在的抑制癌转化功能, 也为癌变细胞中微囊蛋白-1 诱导表达后癌变特征消除而得到证实^[2,9,10], 例如 v-Abl 和 H-ras 转化的 NIH 3T3 细胞系中, 在诱导表达微囊蛋白-1 后, 这些细胞不依赖贴壁生长的特性消失, 并导致细胞质膜微囊 (现认为是一种细胞器) 的从头形成 (*de novo* formation)。因此, 微囊蛋白-1 表达水平的降低与细胞质膜微囊的减少可能为维持癌变细胞的转化表型所必需。这些发现说明微囊蛋白-1 可能与人类的癌症有关系, Sanger 及其合作者鉴定的微囊蛋白-1 基因, 是人类癌细胞系中表达水平下调的 26 种基因之一。

Drab 等^[11]首先用基因打靶的方法培育出完全消除微囊蛋白-1 基因的 *cav-1*^{-/-} 小鼠。微囊蛋白-1 基因的缺失, 导致 *cav-1*^{-/-} 小鼠肺内皮细胞和上皮细胞的细胞质膜微囊完全消失, 其他组织器官 (例如脂肪组织、隔膜、肾、心脏) 也均缺乏细胞质膜微囊, 而野生型小鼠的这些细胞中发现有丰富的细胞质膜微囊存在。因此, 微囊蛋白-1 基因对于形成细胞质膜微囊是必需的, 这与在细胞中异位表达微囊蛋白-1 基因足以诱导形成细胞质膜微囊的结果完全一致。虽然 *cav-1*^{-/-} 小鼠的微囊蛋白-2 基因转录正常, 但肺中未能检测到微囊蛋白-2, 与包括脂肪在内的其他组织检测结果相似 (通常情况下脂肪组织微囊蛋白-2 含量最丰富)。由于微囊蛋白-1 和微囊蛋白-2 以组成异源寡聚体的形式而存在, 这说明在微囊蛋白-1 不存在的情况下, 微囊

蛋白-2 可能被降解。与此不同的是, 肌肉中特异表达的微囊蛋白-3 在 *cav-1*^{-/-} 小鼠中表达完全正常。

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^[11]。进一步研究发现, *cav-1*^{-/-} 小鼠微循环系统表现高通透性, 其 NO 水平与 NO 合成酶活性存在组成性的升高, 这种症状可为 NO 合成酶抑制剂所消除, 证实微囊蛋白-1 是作为 NO 合成酶的持续性抑制剂而对细胞信号转导起抑制作用^[12,13]。

微囊蛋白-1 基因敲除小鼠可能由于内皮细胞无控制的增殖和纤维样变性, 产生肺泡隔膜增厚^[11], 这与离体研究微囊蛋白-1 基因可能具有抑癌功能完全一致。此外, *cav-1*^{-/-} 小鼠还存在肺门脉高压、膨胀性心肌病及间质纤维样变性^[13]。强制游泳结果表明, *cav-1*^{-/-} 小鼠由于心血管与肺功能异常, 其持续游泳时间仅为 15~20 min, 而对照野生型小鼠则为 1~1.5 h^[11]。与微囊蛋白-1 基因在脂肪细胞的高水平表达相一致, 微囊蛋白-1 基因的敲除导致小鼠脂质代谢异常, 身体消瘦, 但其致病机理仍不清楚^[14]。*cav-1*^{-/-} 小鼠仍能存活, 也许是因为在微囊蛋白-1 基因敲除后, 虽然细胞质膜微囊不能形成, 但其某些功能有可能被脂筏 (lipid raft) 所部分承担^[11]。

Razani 等^[15]通过基因打靶的方法培育出完全消除微囊蛋白-2 基因的 *cav-2*^{-/-} 小鼠。结果表明, *cav-2*^{-/-} 小鼠的微囊蛋白-1 基因表达基本正常, 但其肺功能与耐力均严重受损, 与 *cav-1*^{-/-} 小鼠的表型非常相似, 说明微囊蛋白-2 基因也为维持肺正常功能所必需。

3 微囊蛋白-3 基因功能

微囊蛋白-3 基因特异表达于肌肉, 在成体骨骼肌中仅局限于肌肉细胞膜中, 与另一种肌肉特异的细胞膜标记蛋白——肌营养不良蛋白 (dystrophin) 的分布一样。共免疫沉淀研究结果表明, 微囊蛋白-3 与肌营养不良蛋白是结合在一起的, 另有研究发现肌营养不良蛋白包含有非常多的微囊蛋白结合位点^[2]。果糖磷酸激酶-M (PFK-M) 是糖酵解中的一个关键酶。最近, 一系列共免疫沉淀研究结果表明, PFK-M 是一个重要的微囊蛋白-3 相关蛋白, 这种联系受胞内葡萄糖的紧密调控。由于微囊蛋白-3 是肌营养不良蛋白复合物的

组成部分, 并与肌营养代谢密切相关. 这些研究说明与肌营养不良蛋白一样, 微囊蛋白-3 可能也与 Duchenne's 氏及其他肌肉营养不良症有关^[2].

微囊蛋白-3 对横纹肌细胞 (骨骼肌、心肌) 细胞质膜微囊的形成具有决定作用, 微囊蛋白-3 基因敲除小鼠 (*cav-3^{-/-}*) 或微囊蛋白-3 基因与微囊蛋白-1 基因同时敲除小鼠 (*cav-1/3* dKO), 均存在严重的心肌异常现象, 说明微囊蛋白-3 基因也是维持心脏正常功能所必不可少的^[16,17].

4 微囊蛋白基因研究展望

微囊蛋白基因的研究现在只是刚刚开始, 特别是其作为抑癌基因前景十分诱人. 但微囊蛋白是一种膜内在蛋白, 其体外重组表达出活性正常的功能蛋白, 尚未能在技术上有效地解决, 因而现在不能直接用微囊蛋白研究其功能. 今后微囊蛋白基因功能的研究将不得不主要依赖于模式动物的转基因与基因打靶技术. 目前, 微囊蛋白基因的研究成果主要来自对培养细胞的离体研究, 虽然已很好地揭示出微囊蛋白基因抑制细胞癌变的功能, 但尚未提供微囊蛋白基因在维持机体正常信号转导中可能具有的重要作用. 通过 ES 细胞基因敲除建立 *cav-1^{-/-}* 小鼠的成功, 为微囊蛋白基因功能的系统研究及探讨其与人类疾病的关系带来了希望. 另外, 由于基因敲除小鼠中的脂筏在长时间适应后有可能部分承担细胞质膜微囊的某些功能^[11], 因而同时开展微囊蛋白基因瞬时性敲除 (knock down) 研究也很有必要. 特别是由于微囊蛋白基因从鱼到人高度保守, 利用斑马鱼在胚胎发育阶段进行微囊蛋白基因及其相关基因 knock down 操作, 有望成为今后探讨微囊蛋白基因功能的有效手段.

参 考 文 献

- 1 黄 芬. 细胞质膜微囊与信号转导. 生物化学与生物物理进展, 1997, **24** (3): 194~ 198
Huang F. Prog Biochem Biophys, 1997, **24** (3): 194~ 198
- 2 Okamoto T, Schlegel A, Scherer P E. Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. J Biol Chem, 1998, **273** (10): 5419~ 5422
- 3 Engelman J A, Zhang X L, Lisanti M P. Sequence and detailed organization of the human caveolin 1 and -2 genes located near the D7S522 locus (7q31.1). Methylation of a CpG island in the 5' promoter region of the caveolin 1 gene in human breast cancer cell lines. FEBS Lett, 1999, **448** (2~ 3): 221~ 230
- 4 Fra A M, Pasqualetto E, Mancini M, *et al.* Genomic organization and transcriptional analysis of the human genes coding for caveolin 1 and caveolin 2. Gene, 2000, **243** (1~ 2): 75~ 83
- 5 Razani B, Altschuler Y, Zhu L, *et al.* Caveolin 1 expression is down regulated in cells transformed by the human papilloma virus in a p53-dependent manner. Replacement of caveolin 1 expression suppresses HPV-mediated cell transformation. Biochemistry, 2000, **39** (45): 13916~ 13924
- 6 Bagnoli M, Tomassetti A, Figini M, *et al.* Downmodulation of caveolin 1 expression in human ovarian carcinoma is directly related to alpha folate receptor overexpression. Oncogene, 2000, **19** (41): 4754~ 4763
- 7 Racine C, Belanger M, Hirabayashi H, *et al.* Reduction of caveolin 1 gene expression in lung carcinoma cell lines. Biochem Biophys Res Commun, 1999, **255** (3): 580~ 586
- 8 Cui J, Rohr L R, Swanson G, *et al.* Hypermethylation of the caveolin 1 gene promoter in prostate cancer. Prostate, 2001, **46** (3): 249~ 256
- 9 Bender F C, Raymond M A, Bron C, *et al.* Caveolin 1 levels are down regulated in human colon tumors, and ectopic expression of caveolin 1 in colon carcinoma cell lines reduces cell tumorigenicity. Cancer Res, 2000, **60** (20): 5870~ 5878
- 10 Fiucci G, Ravid D, Reich R, *et al.* Caveolin 1 inhibits anchorage-independent growth, anoikis and invasiveness in MCF-7 human breast cancer cells. Oncogene, 2002, **21** (15): 2365~ 2375
- 11 Drab M, Verkade P, Elger M, *et al.* Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin 1 gene-disrupted mice. Science, 2001, **293** (5539): 2449~ 2452
- 12 Schubert W, Frank P G, Woodman S E, *et al.* Microvascular hyperpermeability in caveolin 1 (-/-) knock-out mice. Treatment with a specific nitric oxide synthase inhibitor, L-name, restores normal microvascular permeability in Cav-1 null mice. J Biol Chem, 2002, **277** (42): 40091~ 40098
- 13 Zhao Y Y, Liu Y, Stan R V, *et al.* Defects in caveolin 1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, **99** (17): 11375~ 11380
- 14 Razani B, Combs T P, Wang X B, *et al.* Caveolin 1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. J Biol Chem, 2002, **277** (10): 8635~ 8647
- 15 Razani B, Wang X B, Engelman J A, *et al.* Caveolin 2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. Mol Cell Biol, 2002, **22** (7): 2329~ 2344
- 16 Park D S, Woodman S E, Schubert W, *et al.* Caveolin 1/3 double knockout mice are viable, but lack both muscle and non-muscle caveolae, and develop a severe cardiomyopathic phenotype. Am J Pathol, 2002, **160** (6): 2207~ 2217
- 17 Woodman S E, Park D S, Cohen A W, *et al.* Caveolin 3 knock-out mice develop a progressive cardiomyopathy and show hyperactivation of the p42/44 MAPK cascade. J Biol Chem, 2002, **277** (41): 38988~ 38997

Caveolin Gene and Its Relationship With Human Disease

LIANG Xu-Fang²⁾, HUANG Fen^{1)*}

¹⁾ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ Department of Biotechnology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract Molecular cloning has identified three distinct caveolin genes: caveolin-1, caveolin-2, and caveolin-3. Caveolin-1 and caveolin-2 have been mapped to a common locus in chromosome 7q31.1, that is a possible candidate for a tumor suppressor gene postulated in this region. Caveolin-1 assumes an unusual topology. A central hydrophobic domain is thought to form a hairpin-like structure within the membrane. As a consequence, both the N-terminal domain and the C-terminal domain face the cytoplasm, thereby forming a caveolin-rich scaffold. Caveolin-1 and caveolin-2 proteins interact with themselves to form homo- and hetero-oligomers and are thought to be the driving force for caveolae formation. They are most abundantly expressed in adipocytes, endothelial cells and fibroblastic cell types, whereas caveolin-3 is muscle-specific. Both *in vitro* and *in vivo* experiments show the transformation suppressor activity of caveolin-1, indicating that caveolin-1 may provide a necessary brake in signal transduction. The targeted disruption of caveolin-1 in mice results in impaired nitric oxide and calcium signaling in the cardiovascular system, and displays thickening of alveolar septa caused by uncontrolled endothelial cell proliferation. Caveolin-1-deficient mice are lean, resistant to diet-induced obesity, and show hypertriglyceridemia with adipocyte abnormalities. Caveolin-2-null phenotypes are identical to the ones that have been reported for caveolin-1-null mice in lung function. Caveolin-3 is a component of the dystrophin complex, and might be relevant to Duchenne's and other muscular dystrophies. The loss of caveolin-3 expression in mice is sufficient to induce a molecular program leading to cardiac myocyte hypertrophy and cardiomyopathy.

Key words caveolin gene, signal transduction, disease

* Corresponding author. Tel: 86-10-62554880, E-mail: balss@263.net

Received: December 18, 2002 Accepted: January 28, 2003