

(*Shanghai Institute of Cell Biology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*); XIA Zong-xiang (*Shanghai Institute of Organic Chemistry, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China*).

**Abstract** A brief introduction is given about the application of X-ray diffraction to the study of the dynamic process of the protein. Firstly, it gives some description about using traditional and Laue X-ray diffraction to study the dynamic process of a protein in a reaction taking place in a

few minutes. Secondly, it is about reaction synchronization used to study the dynamic process of a protein in a few seconds. By choosing unmatchable substrate and unsuitable pH value, by choosing temperature and pH value jumping and by choosing metal ion and photochemical induction, enzyme reaction can be activated instantaneously.

**Key words** protein, dynamic process, X-ray diffraction, reaction synchronization

# 肌腱蛋白 R (Tenascin-R) 研究进展

肖华胜 陈镔复

(第四军医大学全军神经科学研究所, 西安 710032)

**摘要** 肌腱蛋白 R (tenascin-R, TN-R) 是一种重要的细胞外基质糖蛋白 (extracellular matrix, ECM). 分布于中枢神经系统, 主要在髓鞘形成早期的少突胶质细胞中表达, 成熟的胶质细胞及某些神经元 (如脊髓, 视网膜, 小脑和海马的中间神经元) 也有表达. TN-R 具有复杂的结构, 由三种不同的结构域组成, 从氨基端到羧基端依次为: 类似于表皮生长因子的重复片段, 类似于 III 型纤连蛋白重复片段, 类似 (血) 纤维蛋白原片段组成. TN-R 具有多种复杂的功能, 对神经元具有排斥作用, 促进或抑制神经元突起的生长, 诱导神经元形态的极化, 并和髓鞘的形成有关, TN-R 结构的复杂性和功能的多样性提示, TN-R 有多个受体存在, 已经发现的受体有 F3/F11, MAG, XL1, Xprocan 等.

**关键词** 肌腱蛋白 R, 结构, 功能, 受体

**学科分类号** Q513.2

肌腱蛋白 R (tenascin-R, TN-R) 是一种重要的细胞外基质糖蛋白, 1985 年 Kruse 用 J1 抗体研究 Tenascin-C 时发现, 在星形胶质细胞和少突胶质细胞中存在两种蛋白质, 分子质量为 160 ku 和 180 ku, 同 J1 有特异性反应<sup>[1]</sup>. 当时命名为 J1 160/180, 后又命名为 Janusin (在啮齿动物中), restrictin (鸡), 最近 Bristow 等<sup>[2]</sup>又重新命名为 tenascin-R. TN-R 分布于中枢神经系统, 具有复杂的结构和多样生物学功能, 它通过作用于靶细胞上的受体而发挥其功能, TN-R 在神经系统的发育、再生中起着非常重要的作用. 本文就 TN-R 的分

布, 生物学功能和信号转导作一简要综述.

## 1 TN-R 的分布和结构特征

### 1.1 TN-R 的分布

原位杂交和免疫组织化学结果表明 TN-R 分布于中枢神经系统, 主要由髓鞘形成早期的少突胶质细胞分泌, 富集于郎飞氏节, 在髓鞘形成后期的少突胶质细胞中也有表达. 除少突胶质细胞外 TN-R 也分布于脊髓、视网膜、小脑海马的一些神经元和中间神经元. TN-R 在

收稿日期: 1996-12-10, 修回日期: 1997-03-27

脊髓的发育期高表达, 2~3 周龄大鼠的 TN-R 表达达到高峰, TN-R 的分布具有细胞特异性和时间顺序性<sup>[3,4]</sup>.

## 1.2 TN-R 的结构特征

1989 年, Peshva 首次用抗体亲和层析法分离得到了 TN-R 的 160 ku 和 180 ku 两种异构体. 1991 年, Fuss 从大鼠脊髓少突胶质细胞表达文库中克隆了 TN-R 的 cDNA. TN-R 由单基因编码, mRNA 有两种方式的选择性剪接, TN-R 的两种异构体还不知道是否由编码 TN-R 的 mRNA 选择性剪接的结果. 编码 TN-R 全长 cDNA 为 6 455 个碱基, 推测的蛋白质由 1 356 个氨基酸残基组成, 分子质量为 149 ku, 不同种属的 TN-R 具有同源性, 存在于大鼠的 TN-R 同鸡中的 restrictin 在氨基酸水平具有 85% 的同源性<sup>[5]</sup>.

TN-R 同细胞外基质的其他分子一样, 具有复杂的结构, 由多个不同功能的结构域组成. TN-R 由单体通过氨基端的富含半胱氨酸部分连接为双体或三体结构, 这种多聚化结构依赖于二价阳离子<sup>[5]</sup>. 180 ku 的异构体通过氨基端的富含半胱氨酸部分连接成三体结构, 160 ku 只连接成双体. TN-R 的单体包括富含氨基端部分, 一个类似于表皮生长因子的重复片段 (epidermal growth factor like repeats, EGF-L). 接下来是类似于 III 型纤连蛋白重复片段 (fibronectin type III homologous repeats, FN III). 羧基端为一个类似 (血) 纤维蛋白原 (fibrinogen, FG) 的片段<sup>[6]</sup> (图 1).

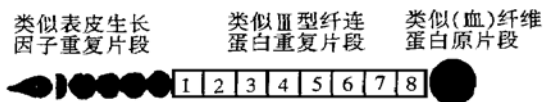


图 1 Tenascin R 结构模式图

## 2 TN-R 的生物学功能

TN-R 复杂的分子结构提示, TN-R 的功能具有多样性, 对于神经系统的发育、再生起着重要的作用. 已有的研究表明, TN-R

具有排斥功能, 促进或抑制神经元突起的生长, 诱导神经元形态的极化, 并和髓鞘的形成有关.

### 2.1 TN-R 对神经元的排斥作用

TN-R 第一次是作为神经元粘附的分子而被发现的<sup>[3]</sup>, TN-R 的这种排斥作用在 TN-R 的两种异构体 180 ku 和 160 ku 之间有着明显不同. 在作为基质之前, 两种异构体加入一定浓度的二价阳离子如  $\text{Ca}^{2+}$  预处理, 结果表明, 160 ku 的这种排斥作用不被抑制, 而 180 ku 的这种排斥作用被中和<sup>[7,8]</sup>.

TN-R 作为基质时, 对突起和生长锥也具有排斥作用, 当种植不同的神经元如背根神经节, 视网膜神经节和小脑神经元, 这些神经元的突起避开 TN-R 生长. TN-R 同不同的细胞外基质分子一起作为基质, 对神经元的排斥作用也不同. TN-R 对神经元的排斥作用并不一定要作为基质, 当与其他细胞外基质如 laminin 作为可溶性培养基时, 也具有排斥作用<sup>[7]</sup>.

### 2.2 促进或抑制突起的生长

在体外培养细胞结果表明 TN-R 与 TN-C 一样, 具有促进神经元突起生长的活性, 当 TN-R 作为可溶性基质时, 具有明显的促进某些神经元突起生长的活性<sup>[7]</sup>. 例如: 如当 TN-R 和 laminin 一起作为可溶性基质时, 背根神经节的生长明显地比缺少 TN-R, 仅有 laminin 的快. 但当 TN-R 作为基质时, 则抑制依赖于 fibronectin 的突起生长活性. 某些神经元如视网膜神经节以 TN-R 作为基质, 突起的生长则被完全抑制. 这些结果提示: TN-R 可以通过细胞表面的分子或其他细胞外基质分子相互作用对神经元突起的生长产生不同的生物效应. 我们实验室获得了重组的大鼠 TN-R 的不同结构域多肽片段的融合蛋白: EGFL、EGFS、FN1~2, FN6~8, FG, 以纯化的融合蛋白作为可溶性基质, 以 GST 和 poly-L-lysine 作为对照, 观察了 TN-R 不同功能片段对小鼠胚胎脊髓神经元突起生长的影响, 结果表明, EGF-L 和 FN6-8 明显促进突起的生长, FN1~2, FG

片段的作用不明显。

### 2.3 诱导神经元形态的极化

这一功能并不是对所有的神经元, 可能对某一类特殊的神经元作用最强。当 TN-R 和多聚鸟氨酸一起作为基质时, 可促进突起的生长, 但是树突数目减少, 引起神经元形态的极化<sup>[9]</sup>。有趣的是, TN-R 同其他的一些细胞外基质分子如 tenascin, laminin 和 fibronectin 一起也诱导神经元的极化, 但是当 TN-R 同 L1 或伴刀豆球蛋白 A 等促进轴突和树突分子作为基质, 则观察不到神经元形态的极化发生。TN-R 在神经系统发育早期的某些神经元表达, 提示 TN-R 在神经元形态的发生中起着重要的作用。

### 2.4 TN-R 促进髓鞘的形成

原位杂交和免疫组织化学结果表明, TN-R 在髓鞘形成时期表达量最大, 且分布于髓鞘形成时期的少突胶质细胞, 推测 TN-R 同髓鞘的形成有关。

### 2.5 TN-R 不同功能的定位

TN-R 具有多样复杂的功能, 推测是由其结构上相对独立的不同的结构域共同体现出来的。为了确定结构和功能上的对应关系 Xiao 等构建了融合至谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-S-transferase, GST) 羧基端的, 包含编码 TN-R 全长的连续而不重叠的各功能片段基因的表达式, 在大肠杆菌中表达, 并分离纯化了融合蛋白, 在体外进行细胞培养, 结果为: FG、FN1~2、FN6~8 促进小脑神经元的粘附, FG、FN1~2、FN3~5 对神经元的胞体有排斥作用。以 EGFL、FN1~2、FN3~5 和 FG 作为基质, 对突起和生长锥有很强的排斥作用。FG 同海马神经元形态的极化有关<sup>[6]</sup>。这些结果表明, TN-R 不同的功能片段具有明显的相互交叉功能, 提示 TN-R 可能存在着多个受体, 与 TN-R 的不同结构域作用, 发挥不同的生物效应。

## 3 TN-R 的信号转导

TN-R 具有复杂的结构和多样的功能提示

TN-R 存在多个受体分子。已有的证据表明, TN-R 与不同的神经元相互作用发挥不同的生物效应, 不同的功能片段和同一神经元相互作用也会发挥不同的生物效应。在众多的受体中, 最先被确认的受体是 F3/F11 免疫球蛋白 (glycosylphosphatidylinositol anchored member of immunology)。F3/F11 是在用抗体分离 TN-R 时, 连同 TN-R 一起被分离、纯化。F3/F11 同 TN-R 的结合区域定位于 EGF-L 片段上。调节 TN-R 对神经元的抗粘附和抑制突起生长的活性, 用 F3/F11 的抗体可抑制这一活性<sup>[6, 10]</sup>。

Xiao 等以大肠杆菌表达的 EGF-L 片段作为配基, 偶联至 Sepharose-4B 上, 制备成亲和层析柱, 寻找 EGF-L 片段的结合蛋白。制备 2~3 周龄大鼠脑膜蛋白, 经亲和层析, 得到了两种同 EGF-L 有结合活性的蛋白, 一种是分子质量为 190 ku 的蛋白质, 暂命名为 XL1, XL1 可被 L1 的多克隆抗体识别, 但不被 L1 的单克隆抗体识别。XL1 对神经元突起的生长有非常强的促进作用, 当作为基质时, 神经元突起的长度加长, 每个神经元的数目增多 (Xiao 等, 私人通讯)。另一种是分子质量为 500~600 ku 的与 phosphacan 相关的酪氨酸磷酸化酶  $\delta/\beta$ , 暂命名为 Xpocan。具有 HNK-1 的抗原决定簇。Xpocan 同 TN-R 结合具有  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性。Xpocan 抑制海马神经元突起的生长, 并可中和由 TN-R 引起的生长锥的排斥反应 (Xiao 等, 私人通讯)。

髓鞘相关蛋白 (myelin-associated glycoprotein, MAG) 是免疫球蛋白超家族中的一员, MAG 和 TN-R 共同存在于郎飞氏节, 它同 TN-R 之间有相互作用, 也被认为是 TN-R 的一种受体, MAG 同 TN-R 的作用位点定位于 FG 和 EGF-L 片段。MAG 同 TN-R 的相互作用可被 MAG 的抗体中和 (Xiao 等, 私人通讯)。

目前, 有关 TN-R 受体的深入研究还在进一步进行之中。

## 4 展 望

TN-R 是一种重要的细胞外基质分子, 随着研究的深入, 必将全面阐明 TN-R 的多种功能, 尤其是对 TN-R 受体的深入研究, 为阐明 TN-R 发挥其功能的分子机制和细胞内的信号转导奠定基础. 今后的研究方向将集中在 TN-R 受体的分离, 纯化和功能研究, 克隆 TN-R 受体基因, 并研究受体基因的表达调控. 为研究 ECM 和靶细胞之间的相互作用提供依据, 这对于神经系统的发育, 再生具有重要的理论意义和潜在的临床应用价值.

**致谢** 本文承蒙鞠躬教授审阅, 特此致谢.

## 参 考 文 献

- Kruse J, Keilhauer G, Faissner A *et al.* The J1 glycoprotein a novel nervous system cell adhesion molecule of the L2/HNK-1 family. *Nature*, 1985, **316** (6024): 146~ 148
- Schachner M, Taylor J, Bantsch U *et al.* The perplexing multifunctionality of Janusin, a tenascin-related molecule. *Perspect Dev Neurobiol*, 1994, **2** (1): 33~ 41
- Pesheva P, Spiess E, Schachner M. J1-160 and J1-180 oligodendrocyte secreted nonpermissive substrates for cell adhesion. *J Cell Biol*, 1989, **109** (4): 1765~ 1778
- Wintergerst E S, Fuss B, Bantsch U. Localization of Janusin mRNA in the central nervous system of the developing and adult mouse. *Eur J Neurosci*, 1993, **5** (4): 299~ 310
- Fuss B, Wintergerst E S, Bantsch U *et al.* Molecular characterization and *in situ* mRNA localization of the neuronal recognition molecule J1-160/180: a modular structure similar to Tenascin. *J Cell Biol*, 1993, **120** (5): 1237~ 1249
- Xiao Z C, Taylor J, Montag D *et al.* Distinct effects of recombinant tenascin-R domains in neuronal cell functions identification of domain interacting with the neuronal recognition molecular F3/F11. *Eur J Neurosci*, 1996, **8** (4): 766 ~ 782
- Taylor J, Pesheva P, Schachner M *et al.* Influence of janusin and tenascin on growth cone behaviour *in vitro*. *J Neurosci Res*, 1993, **35** (4): 347~ 352
- Pesheva P, Probstmeier R, Skubitz A P N *et al.* Tenascin-R (J1-160/180) inhibits fibronectin-mediated cell adhesion functional relatedness to tenascin-C. *J Cell Sci*, 1994, **107** (8): 2323~ 2333
- Lochler A, Vaughan L, Kapiony A *et al.* J1/tenascin in substratum-bound and soluble form displays contrary effects on neurite outgrowth. *J Cell Biol*, 1991, **113** (5): 1159~ 1165
- Pesheva P, Gennarini G, Goridis C *et al.* The F3/F11 cell adhesion molecule mediated the repulsion of neurons by the extracellular matrix glycoprotein J1-160/180. *Neuron*, 1993, **10** (1): 69~ 82

**Progresses on the Study of Extracellular Matrix Tenascin-R.** XIAO Hua-sheng, CHEN Bin-fu (*Institute of Neurosciences, The Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*).

**Abstract** Tenascin-R (TN-R) is an important extracellular matrix glycoprotein. Tenascin-R is restricted to the central nervous system and mainly express in the early developing of oligodendrocytes. It also expresses in mature oligodendrocytes and some neural cell types (Such as spin cord, optic nerve, inter neuron of cerebellum and hippocampus). Tenascin-R has a modular structure with a cysteine-rich amino-terminal region followed by epidermal growth factor (EGF) -like repeats (EGF-L), fibronectin type III homologous repeats (FN III) and a fibrinogen like domain at the carboxy-terminal end. Tenascin-R has perplexing multifunctionality. Tenascin-R acts as a repellent molecule for neuron, promotes or inhibites the outgrowth of neurite, induces a polarity morphology of neurons and relates to myelinating processes. Tenascin-R has multiple receptors. F3/F11, XL1, Xprocan and MAG which have been isolated and characterized.

**Key words** tenascin-R, structure, function, receptor