

# 编码内质网膜蛋白的新基因家族 *RTN* 的研究进展

黄晓玮\* 阴 彬 袁建刚 强伯勤

中国医学科学院基础医学研究所 医学分子生物国家重点实验室, 北京 100005;  
中国协和医科大学基础医学院  
国家人类基因组北方研究中心, 北京 100073)

**摘要** 蛋白质的分泌渠道是近几年生命科学研究焦点之一. *RTN* (reticulon) 是定位于内质网膜上的一个基因家族, 现已发现 *RTN1*、*RTN2*、*RTN3*、*RTN4* 等多个家族成员. 其中, 这些基因在蛋白质分泌加工过程中的具体作用, 以及 *RTN1* (即 *NSP*) 作为神经内分泌特异性的标志或与神经元分化的关系都在进一步探讨之中.

**关键词** 内质网膜蛋白, 蛋白质分泌, 神经内分泌特异蛋白

**学科分类号** Q75

各种生物的生命活动中都贯穿着蛋白质的作用, 于是, 研究蛋白质分泌渠道也理所当然地成为近几年来生命科学研究的焦点之一. 而蛋白质的分泌过程包含一系列复杂而精密的步骤, 包括许多细胞内外膜结构的参与. 简而言之, 新的蛋白质在核糖体合成以后, 需要通过加工和运输等, 在此过程中, 有诸如内质网、高尔基体、溶酶体、分泌泡等多种亚细胞结构的参与, 其中, 内质网膜是此过程的重要环节之一. 而本文将集中阐述近 10 年来, 编码内质网膜蛋白的一个新基因家族——*RTN* (reticulon) 的研究进展.

## 1 *RTN* 基因家族

1991 年, Wiczorek 等<sup>[1]</sup> 在成年小鼠脑的 cDNA 文库中找到一个新的 cDNA 克隆, 命名为 *CI-13*. 此基因的组织表达谱分析发现 *CI-13* 主要在中枢神经系统的非胶质细胞中高度表达, 此外, 在周围神经系统中也有较低水平的信号. 并且在时间调控上, *CI-13* 基因的表达在胚胎时期就可检测到, 出生时达到高峰, 成年后保持相对稳定. 随后, 在成人脑 cDNA 文库中克隆出一类与鼠 *CI-13* 同源性很高的基因, 共有三个转录本. 因为这些基因主要在具有神经内分泌性质的细胞中高度表达, 于是分别被命名为 *NSP-A*、*NSP-B*、*NSP-C* (neuroendocrine specific protein, *NSP*). 这三种不同的转录本具有一些共性, 如它们核酸序列的 3' 端一致性很高, 它们所编码的蛋白质羧基端高度同源, 并且在此区域内均有两个大的疏水区, 而这些共性也恰恰与小鼠的 *CI-13* 基因相同. 但

随着新的与 *NSP* 家族同源的基因被克隆, 对其进行组织表达谱分析时发现, 它们不全部是神经内分泌组织特异表达, 在骨骼肌、外周血的白细胞、小肠、结肠等组织中也有一定的表达量. 于是, 再使用 *NSP* 命名就显得牵强了. 而免疫组化发现这些基因所编码的蛋白质均为内质网蛋白, 所以就分别易名为 *RTN-1* (*NSP-A*、*B*、*C*)、*RTN-2*、*RTN-3*、*RTN-4* ... ..

## 2 人的 *RTN* 基因家族成员及不同的转录本

目前已发现人的 *RTN* 基因家族有 *RTN-1*、*RTN-2*、*RTN-3*、*RTN-4* 四大类<sup>[2]</sup>, 但是, 涉及 *RTN-3*、*RTN-4* 基因的文献很少, 这里无法详述, 因此以下内容主要涉及的是人的 *RTN-1* 与 *RTN-2* 两类基因.

*RTN-1* 基因 (即 *NSP-A*、*B*、*C*) 主要是分布于人的神经内分泌组织及细胞中, 如 CNS、外周神经系统、胰岛、肾上腺髓质、小细胞肺癌等<sup>[3]</sup>. 人的 *NSP* 有三个成员, 分别为 *NSP-A*、*NSP-B*、*NSP-C*. 这三个不同的转录本的核苷酸长度分别为 3.4 kb、2.3 kb、1.8 kb<sup>[3,4]</sup>. 在结构上其核酸序列的 3' 是一致的, 即 *NSP-A* 中的 1 134 ~ 3 214 与 *NSP-B* 中的 142 ~ 2 122 一致, *NSP-C* 从 89 ~ 1 416 与 *NSP-A* 的 1 887 ~ 3 214 一致. 所编码的蛋白质分别是: *NSP-A* 编码 776 个氨基酸, 分子质量为 135 ku; *NSP-B* 编码 356 个氨基酸,

\* 通讯联系人.

Tel: 010-65296411, E-mail: yuanjg@mail.east.net.cn

收稿日期: 2000-01-07, 接受日期: 2000-02-29

蛋白分子质量为 35~45 ku, 目前的研究表明, NSP-B 蛋白的表达仅发现于在具有神经内分泌性的肺癌细胞株 NCI-H82, 因此, 有人推断, NSP-B 实际上只是 NSP 家族中非正常剪接的一种产物; NSP-C 编码 208 个氨基酸, 分子质量为 23 ku.

人的 RTN-2 基因 (NSP-like gene I) 亦具有三个不同的转录本<sup>[5]</sup>. 前两种转录本长度均为 2.3 kb, 分别编码二种蛋白质, 所含氨基酸数目为 545、472 个. 而第三种转录本长度为 1.3 kb, 编码具有 205 个氨基酸残基的蛋白质 RTN2-C. RTN-2 基因表达不仅局限于神经内分泌性的组织和细胞中, 其组织表达谱更为广泛. 以 RTN2-C 为例, RNA 印迹分析显示, 它在骨骼肌中高表达. 这三种转录本的核酸序列同样在 3' 端具有高度一致性.

### 3 RTN 家族的基因组结构

利用 NSP 相互重叠的基因克隆作探针, 对分裂中期核进行荧光原位杂交显示, NSP 基因在染色体中的位置为 14q21~q22<sup>[2]</sup>, 长度大约在 250 kb 的 DNA 范围. RTN1 基因包括有 10 个外显子. 而 RTN2 基因位于染色体 19q13.3, 大小为 106 kb. 具有 11 个外显子, 外显子约为 12 kb<sup>[3]</sup>. 这两个基因的后 6 个外显子, 无论在大小或序列方面, 均有很强的同源性. 而 RTN1、RTN2 基因 5' 外显子却无同源性可寻. 因此, 有人推断, RTN1、RTN2 基因 3' 外显子的同源性反映它们可能是源于共同的祖先, 在生命进化的过程中因基因的复制和分离, 产生了编码内质网蛋白的不同基因家族<sup>[3]</sup>. 因为序列的同源性仅限于 RTN1、RTN2 的 3' 端的外显子, 那么基因的保守区也就应当在 3' 端. 而反映到蛋白质结构上, 就是 RTN1、RTN2 蛋白质家族间具有同源的羧基端. 这是否也就预示着, RTN 蛋白质家族共有保守的羧基端在蛋白质行使内质网膜蛋白功能方面有重要作用呢? 况且事实上, 小蛋白 RTN1-C 与 RTN2-C 除具备这共同的羧基端以外, 只含有几个特异的氨基酸. 因此, 尽管现在此家族的蛋白质功能还不十分清楚, 这些结构上的特征也可为我们进一步深入探讨其功能做出一些重要提示.

### 4 RTN 蛋白的结构特点

RTN1 基因三个转录本编码的蛋白质 NSP-A、NSP-B、NSP-C 分别具有 776、356、208 个氨基

酸, 而 RTN2 基因也编码 RTN2-A、RTN2-B、RTN2-C 蛋白, 分别含有 545、472 及 205 个氨基酸残基. 免疫组化发现这些蛋白质均是位于内质网上的膜蛋白. 从结构上分析, 这几种蛋白质具有许多共同的特征. 因为 RTN1 基因与 RTN2 基因的保守区位于 3' 端, 即其 3' 的外显子具有很高的同源性, 故编码蛋白的羧基端亦具有较高的同源性. 而对于每一种 RTN 蛋白成员而言 (即 RTN1-A、B、C 或 RTN2-A、B、C 蛋白之间), 其羧基端则是相互一致的<sup>[3,5]</sup>. 以 RTN2-A、RTN2-B、RTN2-C 为例, 它们具有一个大小约 201 个氨基酸的共同的羧基端. 而在这个共同区域内, 无论是 RTN1 或 RTN2 类蛋白, 均具有二个大的疏水区. 且通过这个区域的突变分析, 初步证明这些疏水区与 RTN 蛋白结合到内质网膜上的机制有关. 但是, RTN 蛋白的氨基端的氨基酸是特异的, 它们相互之间不具有很高同源性. NSP-C 蛋白与 NSP-A、NSP-B 相比, 氨基端只有独特的 20 个氨基酸残基. 然而, 在这个特异的区域中, 各种 RTN 蛋白常常富含一些带负电荷的氨基酸, 如丝氨酸、脯氨酸, 这些氨基酸都是潜在的磷酸化位点, 这一特征与其他许多神经内分泌蛋白相似. 已有实验证明, 这些磷酸化位点在不同状态下处于不同的磷酸化水平<sup>[3]</sup>.

### 5 RTN 蛋白的功能

RTN 基因家族及蛋白质是近 10 年才相继发现的, 对 RTN 蛋白功能的认识还十分有限. 因为 RTN 编码内质网上的膜蛋白, 而内质网又与蛋白质的分泌途径密切相关, 所以有人推测, RTN 蛋白的功能应该与蛋白质的分泌加工相关. 但是, RTN 蛋白具体的功能机制与蛋白质分泌的证据现在还并不是十分明确, 而以下只是探讨一些与 RTN 蛋白功能有关的线索和初步研究进展.

首先, 正如我们前面所提到的, RTN1 (NSP-A、NSP-B、NSP-C) 蛋白主要在神经内分泌性的组织细胞中特异表达. 而小细胞肺癌 (SCLC) 作为一种具有神经内分泌性质的肿瘤, NSP-A 和 NSP-C 可以在 SCLC 中检测到其表达; 在其他的一些具有神经内分泌分化性质的非小细胞肺癌中 (non-SCLC), 也可检测到一定量的 NSP-A、NSP-C 表达. 而 NSP-B 的表达仅限于小细胞肺癌的细胞株 NCI-HQ2. 因此, 这里所要讨论的主要是利用 NSP-A 和 NSP-C 作为肺癌诊断标志. 在研究了

88例支气管肺癌手术标本过程中,利用免疫组化的方法发现,在一般的小细胞肺癌病例中,NSP-A与NSP-C的表达是一致的,但是,对于具备神经内分泌分化性质的非小细胞肺癌(non-SCLC)的病例来说,NSP-A的表达量变化较NSP-C频率高.因此可以认为,NSP-A比NSP-C作为检测肺癌的标志更为有效.同时,将NSP-A与其他的一些神经内分泌标志(如the neural cell adhesion molecule, NCAM、synnapphosin)在SCLC或non-SCLC中的表达水平进行比较,发现NSP-A无论在SCLC或non-SCLC中,与NCAM表达变化基本一致.然而,NCAM的神经内分泌特异性仍在争议中,即NCAM的阳性并非意味着必定具备神经内分泌性质,因此,NCAM的诊断还需要另一种更具特异性的神经内分泌标志来证实,而NSP-A就可以充当这种有价值的补充<sup>[6]</sup>.当然,NSP-A蛋白也可以作为其他神经内分泌性质肿瘤具备神经内分泌分化的标志<sup>[6]</sup>.并且现有的一些研究表明,肿瘤具备神经内分泌分化性质与其浸润生长的生物学行为有关,此类肿瘤对化疗也更敏感.因此,检测NSP蛋白的表达在临床诊断与治疗方法的选择上具有一定作用.

其次,NSP-C蛋白的表达与神经元的分化有关.实验显示,利用五种不同分化程度的神经母细胞瘤的细胞系可以发现,NSP-C蛋白随神经元分化程度增高,其表达量会增加.而另一些实验则表明,神经母细胞瘤细胞株(SK-N-SH)的自动分化或用 $\beta$ NGF处理后诱导神经元分化,NSP-C蛋白的表达量均会随之而增加<sup>[7]</sup>.但是,神经元的分化和NSP蛋白表达量的改变是否是一种直接的必然联系,仍然不是很清楚.据推测,因为NSP蛋白集中分布于神经元的生长锥区,所以其功能可能与调节生长锥区域细胞的活性有关.而有一些科学家则认为,内质网膜结构可能是通过作为一种钙离子的蓄积库起作用的,因为另一种被认为与神经元分化有关的神经内分泌特异蛋白synnapphosin可能是一种钙离子感受器,通过此机制影响神经元轴突的生长.但是,NSP-C蛋白是否在这一过程中起作用仍有待于进一步证实.

Schafer等<sup>[8]</sup>通过将小鼠暴露于酒精蒸气中,

分析了慢性酒精中毒与NSP表达的相互关系.就目前的认识而言,慢性酒精中毒所导致的行为改变可以归结为基因表达的改变.当对酒精敏感的小鼠在突然撤除酒精的情况下,小鼠中与NSP同源的基因3.0 kb、1.4 kb的转录本表达量会增加.但是,慢性酒精中毒后的症状如痉挛与NSP基因表达量的改变之间的因果关系尚无定论.

至于RTN家族在蛋白质分泌过程中的具体作用机制,特别是在各个组织中具有表达差异的RTN蛋白,它们是否会参与具有组织特异性的某些蛋白质的修饰与运输,并且如何起作用,都在进一步研究中.

### 参 考 文 献

- 1 Wiczorek D F, Hughes S R. Developmentally regulated cDNA expressed exclusively in neural tissue. *Brain Res Mol Brain Res*, 1991, **10** (1): 33~ 41
- 2 Roebroea A J, Contreras B, Pauli I G, *et al.* cDNA cloning, genomic organization, and expression of the human *RTN2* gene, a member of a gene family encoding reticulons. *Genomics*, 1998, **51** (1): 98~ 106
- 3 Helgi J K, van de Velde, Roebroek A J M. NSP-encoded reticulons, neuroendocrine proteins of a novel gene family associated with membranes of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*, 1994, **107** (9): 2403~ 2416
- 4 Robroek A J M, Helgi J K, van de Velde, *et al.* Cloning and expression of alternative transcripts of a novel neuroendocrine-specific gene and identification of its 135-kDa translational product. *J Biol Chem*, 1993, **268** (18): 13439-13447
- 5 Roebroea A J, Contreras B, Pauli I G, *et al.* cDNA cloning, genomic organization, and expression of the human *RTN2* gene, a member of a gene family encoding reticulons. *Genomics*, 1998, **51** (1): 98~ 106
- 6 Nicole H M, Erika D J, Adriaan de Bruine. A comparison of NSP-reticulons with conventional neuroendocrine markers in immunophenotyping of lung cancers. *J Pathol*, 1997, **182** (1): 13~ 21
- 7 Hens J, Nutdens R, Geerts H. Neuronal differentiation is accompanied by *NSP-C* expression. *Cell Tissue Res*, 1998, **292** (2): 229~ 237
- 8 Schafer G L, Crabbe J C, Wiren K M. Identification of neuroendocrine specific protein as an ethanol regulated gene with mRNA differential display. *Mamm Genome*, 1998, **9** (12): 979 ~ 982

## The Progress in the Study of *RTN* Gene Family Encoding Membrane Protein of Endoplasmic Reticulum

HUANG Xiao-Wei\*, YIN Bin, YUAN Jian-Gang, QIANG Bo-Qin

(Institute of Basic Medical Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, National Laboratory of Medical Molecular Biology, Beijing 100005, National Center of Human Genome Research, Beijing 100073, China)

**Abstract** Great efforts have been done to reveal the secretory pathway of protein in the recent years. And *RTN* (reticulon) is a gene family localized on the membrane of endoplasmic reticulum. Up to now *RTN1*, *RTN2*, *RTN3*, *RTN4* in this family have been found. While further studies to dissect the concrete function of these genes in the protein secretory pathway and to identify the *RTN1* as a marker of specificity of neuroendocrine secretion and its relation to the differentiation of neurons have been doing.

**Key words** reticulon, secretion of protein, neuroendocrine specific protein

\* Corresponding author. Tel: 86-10-65296411, E-mail: yuanjg@mail.east.net.cn

Received: January 7, 2000 Accepted: February 29, 2000

### 更正启事

本刊2000年第6期(27卷第6期)569~575页上发表的文章(题目:生物膜膜蛋白三维结构研究的现状与展望)中图5,因排版有误,其中“Na<sup>+</sup>经过钾通道”部分有文字错误,将“O”误印为“H<sub>2</sub>O”。现将图5重印进行更正(正确图5如下所示),并向杨福愉院士等作者和广大读者表示歉意。

《生物化学与生物物理进展》编辑部

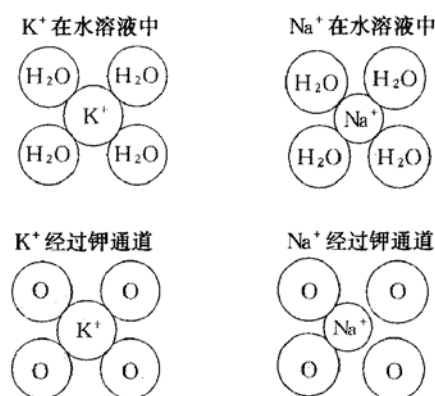


图5 K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>在进入钾通道过滤器前后的比较