

人类红细胞膜带 3 蛋白 C 端域 Lys892~ Phe895 在 Cl⁻ 转运过程中作用的研究*

刘利梅 傅国辉** 王天英 姜晓妹 郭卓维 史从宁

(哈尔滨医科大学病理生理教研室, 哈尔滨 150086)

摘要 采用酵母表面展示系统, 表达带 3 蛋白膜段结构域 (Gln404~ Val911) 至酵母细胞膜, 功能研究表明, 表达后的膜段结构域具有离子转运的活性, 同时, 带 3 蛋白抑制剂 4, 4'-二异硫氰-2, 2'-二黄酸芪 (DIDS) 能够抑制其离子转运的功能. 利用 PCR 方法, 以 pFAST-Bac-mdb3 为模板扩增出带 3 蛋白膜段结构域的 4 种截断突变体, 分别去除带 3 蛋白 C 端域后 4 个 (Ala908~ Val911)、16 个 (Asp896~ Val911)、20 个 (Lys892~ Val911)、32 个 (Asn880~ Val911) 氨基酸序列, 测序后将其克隆至表达载体 pYD1 上, 构建酵母表达质粒 pYD1-Trunc4、pYD1-Trunc16、pYD1-Trunc20 和 pYD1-Trunc32, 诱导 4 组突变体的蛋白质表达, 然后测定 Cl⁻ 的转运活性, 结果发现去除后 20 个 (Lys892~ Val911) 氨基酸残基后, 离子转运活性明显下降, 而去除后 32 个 (Asn880~ Val911) 后, 离子转运没有进一步下降, 说明 Lys892~ Phe895 4 个氨基酸残基在带 3 蛋白的离子转运过程中发挥重要作用.

关键词 带 3 蛋白, 截断突变体, 酵母表面展示系统

学科分类号 Q735

带 3 蛋白 (band3) 是存在于红细胞膜上的主要内在性蛋白质, 又称阴离子交换蛋白 1 (anion exchanger 1, AE1), 由 911 个氨基酸残基组成, 14 次贯穿红细胞膜, 约占红细胞膜蛋白质总量的 25%^[1]. 在结构上带 3 蛋白可分为三个结构域: N 端胞质域、跨膜域和酸性 C 端域, 后二者又被合称为膜段结构域^[2]. 跨膜域是 Cl⁻/HCO₃⁻ 离子交换的活性场所, 在没有 N 端胞质域存在的情况下, 仍能独立完成离子转运功能. 关于带 3 蛋白结构域间的相互关系多年来一直存在争议, 有证据显示只结合于带 3 蛋白 N 端胞质结构域的分子对膜结构域的活性和构象没有影响^[3], 但也有研究表明, Zn²⁺ 或 Se 与胞质域结合后, 通过这两个结构域间的通讯, 改变带 3 蛋白跨膜域的构象, 影响跨膜域的离子转运活性, 从而抑制或提高带 3 蛋白阴离子转运活性^[4]. 酸性 C 端域由 32 个氨基酸残基组成, 其中含有大量携带负电荷的酸性氨基酸, 其在红细胞生理状态下的结构与功能尚未完全阐明, 近期研究结果表明, 酸性 C 端域具有复杂的生物学功能, 具有蛋白酶的活性^[5], 还有肿瘤相关蛋白 p16 的结合位点^[6]. 本实验利用酵母表面展示系统表达了阴离子交换蛋白 1 的膜段结构域和 4 种截断突变体, 通过 Cl⁻ 的荧光指示剂 SPQ (6 甲基-3 磺丙基-1-噻啉-1-水化合物) 荧光强度的变化, 测定它们对 Cl⁻ 的转运活性的异同, 从而探寻带 3 蛋白 C 端域不同氨基酸残基对 Cl⁻ 转运活性的影响, 进

一步研究和探讨带 3 蛋白 C 端域的结构和功能.

1 材料和方法

1.1 材料

酵母表面展示系统试剂盒购自 Invitrogen 公司; 蛋白质印迹 (Western blotting) 试剂盒购自 Promega 公司; Taq 酶, T4 DNA 连接酶, 限制性内切酶 BamH I、EcoR I 均购自宝生物工程 (大连) 有限公司; PEG3350, YNB, Casamino acids 购自 Difco 公司; 带 3 蛋白单克隆抗体, 半乳糖, SPQ 购自 Sigma 公司; Tris 购自 BIO-RAD 公司; Hepes 购自上海博奥生物科技有限公司; DNA 纯化试剂盒购自上海博采生物有限公司; 其他为国产分析纯.

1.2 方法

1.2.1 带 3 蛋白膜段结构域截断突变体的设计: 为研究带 3 蛋白酸性 C 端域是否影响离子的转运过程, 以及哪些氨基酸残基发挥关键作用, 我们在基因水平上分别截断带 3 蛋白 C 端域的不同氨基酸残基, 设计 4 组带 3 蛋白膜段结构域截断突变体, 诱导膜段结构域截断突变体蛋白质表达后, 通

* 国家自然科学基金重点项目 (30230160), 面上项目 (39970291, 30170348) 资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0451-6669470, Fax: 0451-6669470, E-mail: fugu@263.net

收稿日期: 2002-10-08, 接受日期: 2002-11-25

过功能的测定来研究带3蛋白C端域不同氨基酸残基对Cl⁻转运活性的影响。

1.2.2 带3蛋白膜段结构域截断突变体酵母表达载体的构建: 根据已发表的带3蛋白膜段结构域的基因序列, 分别设计4对引物构建带3蛋白膜段结构域截断突变体酵母表达质粒。参照GenBank数据库中检索到的序列设计引物并合成(表1)。以质粒pFAST-Bac-mdb3(由本室前期构建^[7])为模板, 分别做100 μl的PCR。反应条件: 95℃预变性5 min, 94℃ 1 min、55℃ 1 min、72℃ 1 min共35个循环, 72℃延伸7 min, 4℃ 12 h。4种PCR产物分别经电泳后在紫外灯下观察片段大小。上述PCR产物电泳后经试剂盒纯化, 直接连接至

pMD18-T载体上, 连接产物转化*E. coli* DH5α, 挑取单菌落分别提取质粒pMD18-T-Trunc4、pMD18-T-Trunc16、pMD18-T-Trunc20和pMD18-T-Trunc32, 用BamHI和EcoRI双酶切4种质粒, 分别获得约1500 bp产物, 电泳后经试剂盒纯化, 分别加入经相同酶切的酵母表达载体pYD1, 14℃连接过夜, 连接产物转化*E. coli* DH5α。在含氨苄青霉素LB平板上筛选阳性重组子pYD1-Trunc4、pYD1-Trunc16、pYD1-Trunc20和pYD1-Trunc32, 然后小量提取质粒, 再次用BamHI、EcoRI酶切鉴定。将经过阳性选择的重组质粒纯化、测序。

Table 1 Primers for mutagenesis of band 3 C terminal domain

Primer	Type	Sequence
Trunc4	Sense	5'-GGCGGGGATCCTGTACCCCTATT-3'
	Anti-sense	5'-GGCGGAATTCTCACACTTCGTCGTATTCAT-3'
Trunc16	Sense	5'-GGCGGGGATCCTGTACCCCTATT-3'
	Anti-sense	5'-GGCGGAATTCTCAAAAGGTTGCCCTTGGCAT-3'
Trunc20	Sense	5'-GGCGGGGATCCTGTACCCCTATT-3'
	Anti-sense	5'-GGCGGAATTCTCAGGCATCATCAGCATCCA-3'
Trunc32	Sense	5'-GGCGGGGATCCTGTACCCCTATT-3'
	Anti-sense	5'-GGCAGAATTCTCAGAAGATGAGCGG-3'

1.2.3 酵母菌的培养: 在YNB(*Trp*、*Leu*)平板(0.67%无氨基酸的酵母氮源培养基, 2%葡萄糖, 1.5%琼脂粉, 0.01%胰蛋白胨, 0.01%亮氨酸)上用三步划线法培养酵母细胞EBY100, 30℃培养, 1~2天出现单菌落。因为在表达质粒pYD1中存在*TRP1*基因, 可用于在酵母EBY100中进行筛选, 即将表达质粒转化酵母EBY100后涂筛选板YNB(*Leu*), 只有转入质粒的酵母细胞EBY100才能在筛选板上生长。

1.2.4 酵母表达质粒的转化: 按Invitrogen操作流程进行。挑取EBY100单菌落接种于10 ml YPD培养液中, 将过夜培养的菌液转移至含有50 ml YPD培养液的锥形瓶中, 使A₆₀₀ = 0.4, 然后230 r/min振荡培养3 h。2500 r/min离心5 min后弃上清, 用40 ml无菌TE重悬细胞。2500 r/min离心5 min后弃上清, 再加入2 ml的无菌0.5 × TE/1 × LiAc, 室温放置10 min制备感受态细胞。分别在5个Eppendorf管中加入100 μl感受态细胞、10 μl Herring Testes Carrier DNA(运载DNA)

和0.1 μg pYD1-mdb3/Trunc4/Trunc16/Trunc20/Trunc32混匀, 在每管中分别加入700 μl 1 × LiAc/40% PEG/1 × TE, 振荡10 s。30℃振荡培养30 min后加88 μl二甲亚砜(DMSO), 42℃水浴7 min, 冰浴1~2 min。室温14000 g离心5 s, 弃上清。用0.5 ml无菌1 × TE重悬细胞。分别用100 μl铺YNB(*Leu*)营养缺陷性平板, 30℃培养2~4天直至出现克隆。

1.2.5 带3蛋白膜段结构域各种截断突变体(含C端域)在酵母细胞膜表面的诱导表达: 分别将5个筛选板上挑取单克隆移入5个含有10 ml无氨基酵母氮源——酪蛋白氨基酸(YNB-CAA含有2%葡萄糖)液体培养基的试管中, 30℃, 230 r/min振荡培养过夜。用分光光度计监测光密度A₆₀₀, 使所有菌液的A₆₀₀在2~5之间, 于室温3000 r/min离心5 min, 用YNB-CAA(含有2%半乳糖)液体培养基重悬酵母细胞, 使所有菌液的A₆₀₀在0.5~1之间, 冰浴10 min, 此时为0点。然后20℃振荡培养诱导蛋白的表达, 根据以往的经验确定在24 h

时蛋白质表达在最佳时期^[5], 于是在此时分别移出 1 ml 表达产物以进行下一步的实验.

1.2.6 蛋白质印迹鉴定表达的蛋白质: 表达的蛋白质用聚丙烯酰胺凝胶电泳和蛋白质印迹进行检测. 菌体经冰浴研磨破碎后上清经 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 后, 转移到硝酸纤维素膜上, 用含 10% BSA 的 TBST 封闭 30 min 后, 用 TBST (含 0.02% Tween 20 的 Tris 缓冲盐溶液) 洗膜 3 次, 每次 10 min. 一抗为抗人类带 3 蛋白的单克隆抗体, 二抗为碱性磷酸酶标记抗鼠的 IgG-AP. 分别加入一抗和二抗反应, 然后用底物溶液显色 15 min, 待蛋白质颜色变紫, 用去离子水终止显色.

1.2.7 离子转运活性的测定及 DIDS 对阴离子转运活性的抑制作用: 将表达带 3 蛋白膜段结构域的酵母细胞 EBY100 于 30 °C 在 Solution I (100 mmol/L 蔗糖、100 mmol/L KCl、50 mmol/L Hepes-Tris, pH 7.0)、1 mmol/L SPQ 中在暗处保温 30 min, 终体积为 100 μ l, 同时在另一个反应体系中加入 DIDS (4, 4'-二异硫氰-2, 2'-二黄酸芪), 终浓度为 1 μ mol/L. (一式三份) 然后加入 Solution II (100 mmol/L 蔗糖、66 mmol/L K₂SO₄、50 mmol/L Hepes-Tris pH 7.0) 至终体积为 3 ml 后, 以激发波长 320 nm、发射波长 445 nm, 在荧光分光光度计中进行荧光强度变化的测定.

1.2.8 不同带 3 蛋白膜段结构域截断体阴离子转运活性的鉴定: 分别将 EBY100/pYD1-Trunc4/Trunc16/Trunc20/Trunc32 于 30 °C 在 Solution I (100 mmol/L 蔗糖、100 mmol/L KCl、50 mmol/L Hepes-Tris, pH 7.0)、1 mmol/L SPQ 中在暗处保温 30 min, 终体积为 100 μ l. (一式三份) 然后加入 Solution II (100 mmol/L 蔗糖、66 mmol/L K₂SO₄、50 mmol/L Hepes-Tris, pH 7.0) 至终体积为 3 ml 后, 以激发波长 320 nm、发射波长 445 nm, 在荧光分光光度计中进行荧光强度变化的测定. 同时以 EBY100/pYD1-mdb3 为对照.

1.2.9 统计学分析: 每组使用 3 个样本, 重复实验 3 次, 9 组数据, 使用方差分析的统计学方法.

2 结 果

2.1 带 3 蛋白膜段结构域的突变位点

带 3 蛋白 C 端域由 32 个氨基酸残基组成, 根据其氨基酸组成的特点, 设计了 4 组突变体. 图 1 为带 3 蛋白膜段结构域的结构及突变序列示意图.

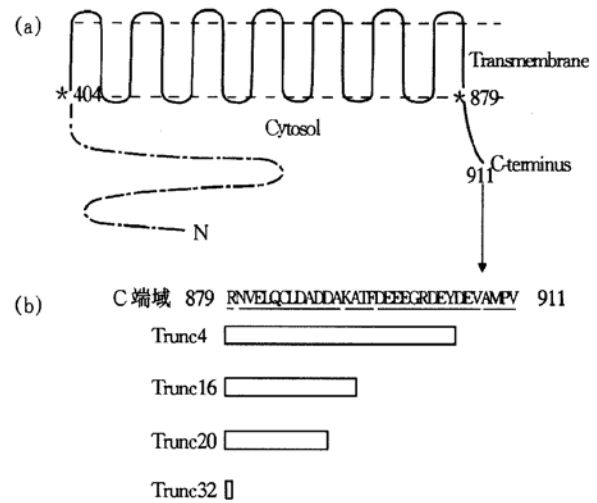


Fig 1 The structure of band 3 membrane domain (a) and truncation mutants of band 3 membrane domain were constructed by inserting stop codons into the pYD1 sequence (b)

2.2 4 个截断突变体阳性重组质粒酶切鉴定结果

以质粒 pFAST-Bac-mdb3 为模板, 分别做 100 μ l 的 PCR. PCR 产物经电泳后在紫外灯下观察片段大小. 上述 PCR 产物纯化后, 直接连接至 pMD18-T 载体上. 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双酶切 pMD18-T-Trunc4、pMD18-T-Trunc16、pMD18-T-Trunc20 和 pMD18-T-Trunc32, 分别获得约 1 500 bp 产物, 经电泳纯化后, 分别加入经相同酶切的载体 pYD1, 14 °C 连接过夜, 连接产物转化 *E. coli* DH5 α . 在含氨苄青霉素 LB 平板上筛选阳性

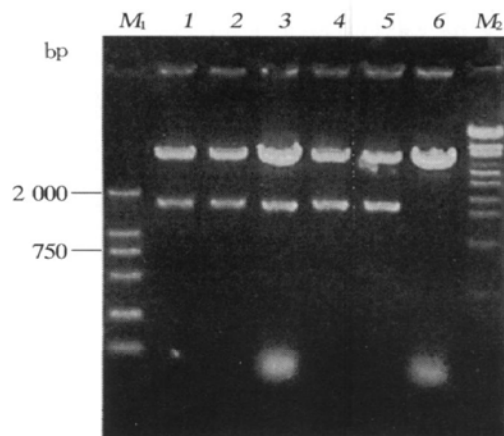


Fig 2 Agarose gel electrophoresis of restriction endonuclease digestion of pYD1-Trunc4/Trunc16/Trunc20/Trunc32 recombinant plasmids

*M*₁: marker DL2000; 1: pYD1-mdb3 (positive control); 2: pYD1-Trunc4; 3: pYD1-Trunc16; 4: pYD1-Trunc20; 5: pYD1-Trunc32; 6: linearized pYD1 plasmid (negative control) (*Eco*R I / *Bam*H I). *M*₂: marker λ EcoT14I.

重组子 pYDI-Trunc4/Trunc16/Trunc20/Trunc32, 然后小量提取质粒, 再次用 *Bam*H I、*Eco*R I 酶切鉴定. 酶切鉴定结果如图 2 所示.

2.3 蛋白质印迹鉴定结果

根据以往的经验, 明确诱导蛋白质表达的第 24 小时, 光密度值为最高, 故我们选用此时相的表达产物进行下一步的实验. 表达的蛋白质进行蛋白质印迹检测. 本文仅选用表达带 3 蛋白膜段结构域的蛋白质印迹图片. 结果表明在 68 ku 左右有一条明显的条带 (图 3).

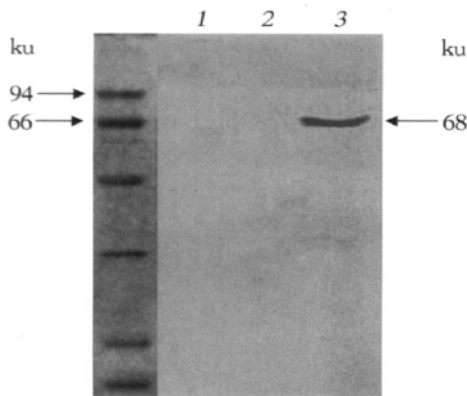


Fig. 3 Western blot of expressing products

1: EBY100 (negative control); 2: EBY100 transformed with pYDI (24 h, positive control); 3: EBY100 expressed band 3 membrane domain.

2.4 阴离子转运活性的鉴定和 DIDS 的抑制作用

在荧光分光光度计中进行荧光强度变化的测定 (图 4). SPQ 为 Cl^- 的荧光探针, Cl^- 对 SPQ 的荧光强度有淬灭作用, 荧光强度下降说明 Cl^- 由细胞内向细胞外转运; DIDS 为带 3 蛋白离子转运抑制

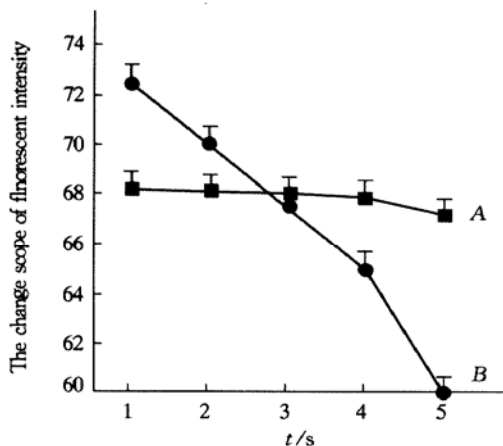


Fig. 4 Fluorescent intensity changing curve before and after treatment with DIDS

A: treatment with DIDS; B: normal.

剂, A 为使用了 DIDS 的带 3 蛋白离子转运荧光强度变化曲线, B 为正常的带 3 蛋白离子转运荧光强度变化曲线, 由此可以看出 DIDS 发挥了离子转运的抑制作用, 抑制了 Cl^- 由细胞内向细胞外的转运, SPQ 淬灭程度减小.

2.5 4 组带 3 蛋白的截断突变体阴离子转运活性的变化

应用 Cl^- 的荧光指示剂 SPQ 间接地反映 Cl^- 的转运情况, 实验步骤如前所述. 结果发现 2 和 3 的荧光强度下降幅度明显, 和 1 (对照组) 下降幅度相同, 表明大量的 Cl^- 从细胞内向胞外转运, 从而淬灭 SPQ 的荧光强度, 说明后 16 个 (Asp896~Val911) 氨基酸对离子转运没有影响; 而 4 的荧光强度下降幅度较小, 说明 Cl^- 由胞内向胞外的转运活性下降, 从而推断出带 3 蛋白 C 端域的 Lys892~Phe895 4 个氨基酸残基对离子转运发挥了重要的作用; 而在 5 中荧光强度的下降幅度同 4, 没有进一步减小, 说明 Asn880~Ala891 对离子转运活性没有影响, 从而进一步证明 Lys892~Phe895 4 个氨基酸残基对离子转运的重要作用 (图 5).

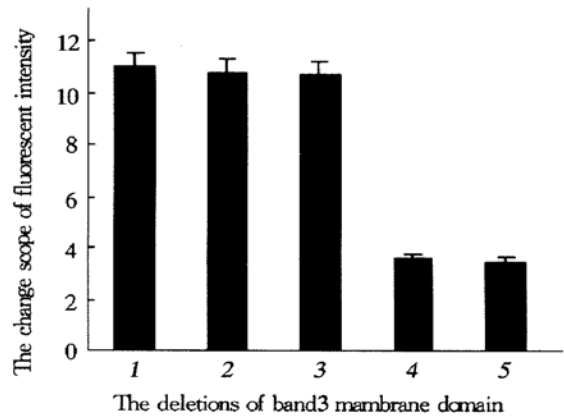


Fig. 5 The fluorescent intensity changing of five yeast cells

1: EBY100 transformed with pYDI-mdb3 (control); 2: EBY100 transformed with pYDI-Trunc4; 3: EBY100 transformed with pYDI-Trunc16; 4: EBY100 transformed with pYDI-Trunc20; 5: EBY100 transformed with pYDI-Trunc32.

3 讨论

酵母表面展示系统蛋白质折叠和分泌机制与哺乳动物细胞非常相似, 对人的蛋白质表达和展示更有优越性, 因而比原核细胞更有可能正确表达和展示人的蛋白质^[8]. 带 3 蛋白跨膜结构域保守性较强, 同源性的 65% 左右, 是 Cl^-/HCO_3^- 离子交换

的活性场所。有关带3蛋白C端域的结构与功能研究报告甚少,尚未完全阐明。我们课题组的前期结果显示带3蛋白C端域后19个氨基酸残基构成的肽链(C1肽链)具有蛋白酶的活性,其特异的底物是血型糖蛋白A Leu118~Ser119肽链^[9]。C1肽链中D(896)EEE(899)是连续的4个酸性氨基酸残基序列,我们认为可能具有特殊意义,因此,在本实验中,设计了敲除后16个氨基酸残基(Asp896~Val911)的突变体,结果表明,这16个氨基酸残基的缺失并未影响带3蛋白的离子转运活性,当继续删除与D(896)EEE(899)N端相邻的4个氨基酸残基(Trunc20)时,离子转运功能明显下降,说明这4个氨基酸残基K(892)ATF(895)是C1肽链的重要功能序列,其中有1个带正电荷的碱性氨基酸。虽然我们目前尚不能确定这4个氨基酸残基是通过何种方式影响带3蛋白的离子转运过程,K(892)ATF(895)的氨基酸序列是否具有特殊意义也不得而知。但已有研究报道带3蛋白D(887)ADD序列是碳酸酐酶的结合位点^[10],位于KATF附近,同时发现DASD等短的氨基酸序列在带3蛋白3个家族成员中普遍存在^[11],并且在蛋白质的相互作用过程中发挥重要作用,我们将对KATF序列的功能进行深入研究和探讨。

参 考 文 献

- Casey J R, Ding Y, Kopito R R, *et al.* The role of cysteine residues in the erythrocyte plasma membrane anion exchange protein, AE1. *J Biol Chem*, 1995, **270** (15): 8521~8527
- 杜洪清,傅国辉,姜晓姝,等.带3蛋白C端和血型糖蛋白A相互作用及其抗原相关性的研究.生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (2): 240~246
- Du H Q, Fu G H, Jiang X S, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (2): 240~246
- Bicknese S, Zimet D, Park J, *et al.* Detection of water proximity to tryptophan residues in proteins by single photon radioluminescence. *J Biol Chem*, 1995, **54** (3): 279~290
- 杨福愉,屠亚平,冯昶.人红细胞带3蛋白结构域间的通讯.科学通报, 1995, **40** (19): 1821~1822
- Yang F Y, Tu Y P, Feng C. *Chinese Science Bulletin*, 1995, **40** (19): 1821~1822
- Fu G H, Jiang X S. Study of C-terminal properties of human erythrocyte membrane protein band 3. *Journal of Harbin Medical University*, 1998, **32** (1): 8~11
- 傅国辉,姜晓姝.哈尔滨医科大学学报, 1998, **32** (1): 8~11
- 张振宇,龙晓宇,杜洪清,等.载体pGBKT7-AE1cdb3及带3蛋白C末端的cDNA文库筛选.哈尔滨医科大学学报, 2001, **35** (6): 144~146
- Zhang Z Y, Long X Y, Du H Q, *et al.* *Journal of Harbin Medical University*, 2001, **35** (6): 144~146
- 傅国辉,李宏涛,秦勇,等.表达血型糖蛋白A和带3蛋白膜段基因的杆状病毒转移载体的构建.自然科学进展, 2001, **11** (8): 882~885
- Fu G H, Li H T, Qin Y, *et al.* *Progress in Natural Science*, 2001, **11** (8): 882~885
- 郭波,谢佩蓉,邹强,等.酵母表面展示系统研究进展.生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (1): 19~22
- Guo B, Xie P R, Zou Q, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2002, **29** (1): 19~22
- 傅国辉,姜晓姝,王孝铭,等.红细胞带3蛋白C1肽链的纯化及其功能的初步研究.中国病理生理杂志, 1999, **15** (3): 271~273
- Fu G H, Jiang X S, Wang X M, *et al.* *Chinese Journal of pathophysiology*, 1999, **15** (3): 271~273
- Vince J W, Reithmeier R A. Identification of the carbonic anhydrase II binding site in the Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger AE1. *Biochemistry*, 2000, **39** (18): 5527~5533
- Holthofer H, Siegel G J, Tarkkanen A, *et al.* Immunocytochemical localization of carbonic anhydrase, NaK-ATPase and the bicarbonate chloride exchanger in the anterior segment of the human eye. *Acta Ophthalmol (Copenh)*, 1991, **69** (2): 149~154

The Effect of Lys892~Phe895 of C-terminal Domain on The Anion Transport of Band 3 Transmembrane Domain*

LIU Li-Mei, FU Guo-Hui**, WANG Tian-Ying, JIANG Xiao-Shu, GUO Zhuo-Wei, SHI Cong-Ning
(Department of Pathophysiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract Band 3 membrane domain were expressed on yeast membrane surface by pYD1 yeast display system. The expressed membrane domain showed anion transport activity and DIDS could inhibit this function of membrane domain. About 1 500 bp cDNA fragment of truncation mutagenesis of band 3 membrane domain were amplified by PCR, which knockout Ala908~Val911, Asp896~Val911, Lys892~Val911 and Asn880~Val911 of band 3 respectively. After being sequenced, the four gene fragments cloned into *EcoR*I~*Bam*H I sites of pYD1. The recombinant plasmids pYD1-Trunc4/Trunc16/Trunc20/Trunc32 were transformed into yeast EBY100. As control, pYD1-mdb3 was also transformed. After four groups fusion protein were expressed

after adding galactose, the Cl^- transport activity was measured by using a fluorescent probe SPQ. The result demonstrated that the transport activity of band 3 was decreased when knockout Lys892~ Val911 of AE1-C-terminal domain, but the transport activity didn't decrease further when knockout Asn880~ Val911 of AE1-C-terminal domain. These results showed that Lys892~ Phe895 amino acids influenced the anion transport of band 3 transmembrane domain.

Key words Band 3, truncation mutant, pYD1 yeast display system

* This work was supported by grants from The Key Program of National Natural Science Foundation of China (30230160, 39970291, 30170348).

** Corresponding author. Tel: 86-451-6669470, Fax: 86-451-6669470, E-mail: fuguhu@263.net

Received: October 8, 2002 Accepted: November 25, 2002

知识与动态

EphA2 的研究进展

孔令洪 李瑶琛 王一理 司履生

(西安交通大学生命科学与技术学院癌症研究所, 西安 710061)

在细胞增生、分化以及胚胎发育过程中, 受体酪氨酸激酶 (PTKs) 起着重要的作用. Eph (erythropoietin producing hepatoma cell line) 受体家族是 PTKs 家族成员之一. EphA2 是 EphA 亚家族受体 8 个成员中的第 2 个. EphA2 广泛表达于人的多种组织或细胞系中. 人类 *ephA2* 基因定位于染色体 1p36.1, 含有 17 个外显子, 此区在人体的多种肿瘤中常有缺失.

EphA2 有对细胞增生的调节作用. EphA2 对细胞增生的调节主要体现在: EphA2 的过表达具有转化正常细胞的能力; EphA2 与配体 ephrinA1 结合后, 削弱了一些生长因子 (如 PDGF 等) 诱导的细胞生长, 因而, 抑制了细胞的生长. EphA2 主要是通过破坏细胞的灶状黏附、抑制 Ras/ MAPK 对细胞黏附和增生进行负调节. 因此, 当 EphA2 正常表达时可抑制细胞增生, 异常表达时又可以促进细胞的转化.

EphA2 在细胞间、细胞与基质间黏附及细胞迁移中有一定的作用. 细胞迁移是胚胎发育、血管形成、肿瘤侵袭和转移的重要环节, 细胞与细胞外基质的黏附与解离是其必要的步骤. Eph 受体和配体的相互作用促进了细胞与细胞间的黏附和连接. EphA2 受体是经过黏附分子 cadherin 家族来调节细胞间连接的. E-cadherin 的缺失导致了细胞的解离和内源性 EphA2 表达减低, 而 E-cadherin 过表达则恢复了 EphA2 的表达. 同时, EphA2 正确地定位于细胞连接处也有赖于 E-cadherin 的作用, 在缺乏 E-cadherin 功能的乳腺癌细胞中, EphA2 的定位明显地变为细胞核周边区. EphA2 也通过灶状黏附激酶 (FAK) 的去磷酸化而直接抑制整合素受体的功能.

EphA2 能诱导细胞凋亡. EphA2 受体的启动子含有 p53 反应元件. 寡聚核苷酸芯片技术分析证实, *ephA2* 是 p53 及其家族成员的靶基因, 当 p53 家族成员稳定表达时,

上调了 *ephA2* 的转录或表达. EphA2 受体的激活, 招募蛋白酪氨酸磷酸酶 SHP2, 使 FAK 去磷酸化并失活, FAK 信号传导受到抑制, 故而引起细胞凋亡.

EphA2 受体活性除了受上述 E-cadherin 和 p53 及其家族成员调节外, 近来又发现 Kuzbanian 金属蛋白酶可以从胞膜处裂解配体 ephrinA1, 使受体的信号传导能力降低, 并使受体很快内化, 经泛素介导途径降解. Cbl 蛋白通过其泛素连接酶活性, 选择性地对 EphA2 进行负调节, Cbl 蛋白的 TKB 区和环指区是进行负调节的基本单位. 无活性的 EphA2 突变体不受 Cbl 的负调节. 此外, 雌激素受体 (ER) 和 c-Myc 也是 EphA2 负调节因子.

EphA2 受体在肿瘤形成中的作用极其复杂, 它的突变、过表达、异常定位或/和异常活化与大量实体瘤的生长、恶性程度及转移有关. EphA2 受体可呈现不依赖于配体的激酶活性, 仅当与配体结合后, 才能发挥对肿瘤细胞生长和迁移的负调节作用. 在恶性细胞中, EphA2 受体过表达, 但由于其分布异常、与配体的亲和力下降, 不能正常地发挥作用, 同时, 过表达的 EphA2 对配体刺激的敏感程度也降低, 因而丧失了对肿瘤细胞生长和迁移的负调节作用. 另外, 最新的研究表明, EphA2 与乳腺癌的进展及浸润过程密切相关, 它可能是雌激素和 Myc 的下游靶分子.

EphA2 在肿瘤形成、诱导细胞凋亡及脉管系统中功能的研究性工作刚刚起步. EphA2 受体诱导细胞凋亡的机制是什么? EphA2 受体在肿瘤形成中扮演何种角色? 作为 p53 下游的靶分子, p53 的突变会影响其功能, 那么, 在没有 p53 基因突变的人类肿瘤中 EphA2 受体的功能如何? *ephA2* 基因的自身突变在肿瘤形成中又起到了何种作用等等, 这些问题都有待研究. 这些问题的阐释对全面了解 EphA2 受体功能及其在肿瘤形成中的作用, 都将具有重要意义.