

## 四跨膜蛋白超家族 tetraspanins 的免疫功能研究进展\*

桂朗 王兵 李富花 相建海\*\*

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

**摘要** Tetraspanins 属于四跨膜蛋白超家族(transmembrane 4 superfamily, TM4SF), 能跨膜连接蛋白, 促进细胞间及细胞内信号转导, 参与某些病毒的细胞识别和侵染. Tetraspanins 成员之间相互关联, 并与其他蛋白质形成一个巨大的 tetraspanins 网络, 在免疫反应中发挥着重要作用. 作为一大类进化上保守的细胞膜蛋白, 它们在无脊椎动物中也行使复杂多样的功能. 将重点阐述在 tetraspanins 的结构、识别病毒的机制、在免疫系统中的作用研究方面取得的进展, 并对无脊椎动物 tetraspanins 在先天性免疫系统中的重要意义进行讨论.

**关键词** Tetraspanins, 免疫, 病毒, 四跨膜蛋白超家族(TM4SF), 无脊椎动物  
**学科分类号** Q291

Tetraspanins 系四跨膜蛋白超家族(transmembrane 4 superfamily, TM4SF)的重要成员, 是一大类进化保守的细胞膜蛋白, 广泛表达于不同物种中, 至少包括哺乳动物的 32 个不同的家族成员<sup>[1]</sup>和果蝇的 37 个家族成员<sup>[2]</sup>. 在海绵、真菌(不包括酵母)、昆虫、斑马鱼上均有发现<sup>[1,3,4]</sup>. 它属于细胞膜糖蛋白的特殊家族, 具有 4 个高度疏水的跨膜结构域(TM1~TM4)和两侧处于胞浆区的 N 端和 C 端. 在 4 个跨膜结构域之间有 2 个细胞外环(SEL 和 LEL)和 1 个细胞内环(IL). 目前对于 TM4SF 是否属于 tetraspanins 家族成员的定义方面还有一定争议, 但普遍认为 tetraspanins 具备一些被称为 tetraspanins 标签的保守氨基酸残基, 包括 LEL 中高度保守的 4~6 个半胱氨酸残基及定位于 TM2/IL/TM3 间的一段特殊氨基酸残基<sup>[5,6]</sup>.

Maecker<sup>[7]</sup>于 1997 年首次提出“分子促进子”(molecular facilitators)的概念, 解释 tetraspanins 特殊的四次跨膜结构能联系膜内、跨膜和膜外蛋白, 起到连接膜内外信号的通道功能, 并促进 tetraspanins 信号网络中结合蛋白质的相互作用. Tetraspanins 参与了包括与细胞生长、迁移、信号转导和黏附效应等多种生命活动. 在高等脊椎动物中, 发现其参与了病原体的识别与进入、癌细胞

的迁移以及免疫系统中细胞与细胞间的相互作用等重要生物免疫反应过程<sup>[1,8,9]</sup>. 在某些传染病, 例如丙肝病毒、艾滋病毒等许多病毒感染过程中 tetraspanins 也发挥着重要的作用<sup>[10]</sup>. 通过大规模基因组测序, 人们也在无脊椎动物中发现了大量四跨膜蛋白家族成员, 但研究范围局限于果蝇和线虫等模式生物, 目前对其结构、功能的认识还很不充分.

### 1 Tetraspanins 的结构

Tetraspanins 为一组低分子质量的糖蛋白, 分子质量范围为  $21 \times 10^3 \sim 28 \times 10^3$ . 两个外环分别含有 20~28 个氨基酸残基和 76~131 个氨基酸残基<sup>[11,12]</sup>, 具有糖基化位点. 大环 LEL 区虽然存在保守的 CCG 序列, 但 LEL 的大小和氨基酸残基的位置变化很大. LEL 决定了 tetraspanins 的特异性<sup>[13]</sup>. 目前, 对 LEL 研究最深入的是哺乳动物 CD81 分子

\* 国家基础研究发展计划(973)(2006CB101804)和国家自然科学基金(30771639)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 0532-82898568, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

收稿日期: 2008-05-14, 接受日期: 2008-06-16

(图 1), 其 LEL 由 5 个  $\alpha$  螺旋组成, 依次命名为 a、b、c、d 和 e 螺旋. 位于 b 螺旋 C 端的 Cys156 与位于 e 螺旋 N 端的 Cys190 形成一个二硫键, 位于 b、c 螺旋之间的 Cys157 与 c、d 螺旋之间的 Cys175 形成另一个二硫键, 4 个半胱氨酸之间形成的两个二硫键使 LEL 区折叠, 形成具有“茎部”和“头部”两个次级环的蘑菇状结构. “茎部”将 CD81 定位在膜上, “头部”结合其他配基, 比较 CD81、CD53 及 Q9V3R4 的 LEL 空间结构, 其均由二硫键介导折叠成两个次级环, “茎部”构型保守, “头部”构型特异, 形成空间结构多样的 LEL 区, 相应形成不同构型的 tetraspanins<sup>[6]</sup>.

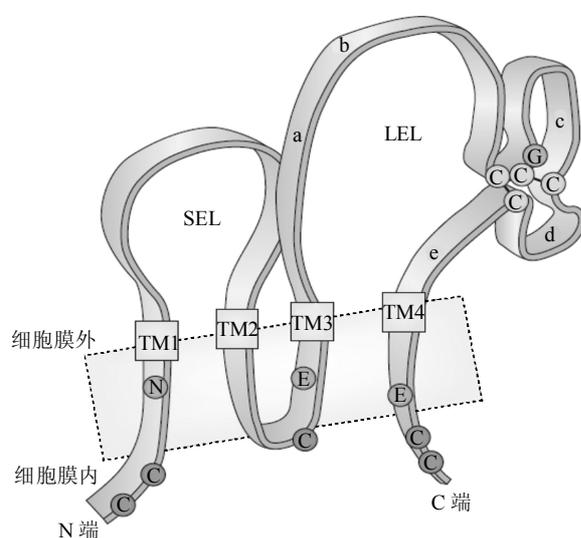


Fig. 1 The structure of tetraspanins<sup>[8]</sup>

图 1 Tetraspanins 的结构<sup>[8]</sup>

典型的 tetraspanins 结构是 CD81 的分子结构. CD81 具有 4 个高度疏水的跨膜结构域(TM1~TM4)和两侧处于胞浆区的 N 端和 C 端. 在 4 个跨膜结构域之间有 2 个细胞外环(SEL 和 LEL)和 1 个细胞内环(IL). CD81 的 TM 中含有保守的极性残基(例如图中 TM 区的Ⓝ与Ⓞ), 其 LEL 由 5 个  $\alpha$  螺旋组成, 依次命名为 a、b、c、d 和 e 螺旋, 由保守 CCG 残基(例如图中 LEL 区的Ⓢ与Ⓣ)形成的二硫键折叠成“茎部”和“头部”两个次级环的蘑菇状结构. CD81 胞内结构上的 C 残基(例如图中胞内区的Ⓤ)是潜在棕榈酰化位点.

Tetraspanins 的胞外结构(主要是 LEL)结合胞外蛋白和少数配体, 胞内结构联系细胞骨架和胞内信号分子, 4 个跨膜的 TM 结构锚定 tetraspanins 同时促进 tetraspanins 与其他蛋白质的结合, 并在多种层次水平下控制信号传递的方式, 这些元件共同构成 tetraspanins 网络. Tetraspanins 网络结构可以由简单到复杂划分出初级、次级和三级共 3 个层次, 划分标准根据蛋白质之间结合强度的不同来界定<sup>[10]</sup>. 初级结合通常由 LEL, 特别是其上的次级环

主导. 这种细胞外直接结合通过化学键稳定连结 tetraspanins 与蛋白质, 在 tetraspanins 网络中最为紧密, 结合处在强去污剂(Triton X-100)处理下仍保持稳定. 次级结合需要 TM 或同时有细胞内结构参与, 其间接结合初级结构从而促进 tetraspanins 与蛋白质间的信号传递. 例如 CD9 和 CD81 与 EWI2 和 EWI-F 的结合, 在较温和的去污剂(Brij-96, Brij-97)中可维持稳定. Tetraspanins 网络构建初级和次级结构的同时, 其功能也更加重要. 不同 tetraspanins 经表达后修饰或排列机制(sorting mechanisms)相互接近, 可在内质网中形成 tetraspanins 异型二聚体, 集结在高尔基体中形成同型 tetraspanins 二聚体, 进一步结合多种 tetraspanins 和结合蛋白复合体, 成为 tetraspanins 网络中心. 三级结合被认为是连接 tetraspanins 网络中心之间的桥梁, 使复杂的信号传递通路在各个 tetraspanins 网络中心之间相互关联, 同时还可以在结构上形成 tetraspanins 富集区, 在功能上提升了 tetraspanins 对信号的敏感程度和应答力度<sup>[11]</sup>. 三级结构的弱结合力导致其很容易解离, 例如 CD63 形成的多蛋白网络结构能被 Triton X-100 破坏, 而在弱去污剂(CHAPS, Brij-99)中保持稳定<sup>[14]</sup>. 由于三级结构弱稳定性和其广泛的分布, 其定义和研究工作比前两级复杂. Tetraspanins 有时还会出现在去污剂无法解离的含脂微体(detergent insoluble lipid-containing microdomains)中, 使 tetraspanins 网络的研究更加复杂化了.

## 2 高等脊椎动物 tetraspanins 在免疫系统中的作用

在已知的 28 种人类 tetraspanins 中有 20 种可以在白细胞表面表达<sup>[15]</sup>, 白细胞的免疫功能使得这些 tetraspanins 的作用与免疫应答过程密不可分. 目前研究最多的是高等脊椎动物中的 CD9、CD53、CD63、CD81、CD82 和 CD151<sup>[8]</sup>. 这些 tetraspanins 对机体免疫功能的调节可能是由于 tetraspanins 能结合复杂多样的蛋白质, 包括识别 B 细胞或 T 细胞、结合整合素蛋白、调节 MHC-II 分子重新分布的功能, 并与其他分子结合形成大的寡聚复合物, 影响细胞表面分子的分布和功能. 而 tetraspanins 与病毒之间的关系异常复杂(表 1), 在很多传染病, 例如白喉、疟疾以及许多病毒感染中发挥着重要的作用<sup>[10]</sup>. 但是大多病毒相关的 tetraspanins 被认为仅在病毒感染阶段发挥作用. 普遍的结论是特异的

tetraspanins 家族成员选择性地结合特异病毒, 影响宿主细胞形成多核体(syncytium)到最后病毒粒子释放的各个阶段. 下面将分述不同的 tetraspanins 在免疫系统中的作用.

Table 1 Tetraspanins participate in the pathologic reactions cause by virus

表 1 Tetraspanins 参与病毒引起的病理反应

Tetraspanins 名称	与相关病毒的关系	组织分布	参考文献
CD81	HCV 受体	广泛表达于淋巴与非淋巴系统, 胸腺细胞、嗜曙红细胞、单核细胞、上皮细胞	16~20
CD82	参与 HTLV-1 感染	B 细胞、T 细胞、NT 细胞、单核细胞、粒性白细胞、血小板和许多非造血组织细胞	21, 22
CD63	与 HIV-1 感染相关	广泛表达于淋巴与非淋巴系统, 包括血小板、粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、枝状树细胞, 巨核细胞、上皮细胞、纤维原细胞、肺、肾、肝、胰、肌肉、外周神经.	23
CD9	与 FIV、CDV 感染有关	血小板、早期 B 细胞、活化的分化 B 细胞、活化的 T 细胞、红细胞、巨核细胞、上皮细胞、枝状树细胞、纤维原细胞、心脏、肺、肾、肝、胰、肌肉、外周神经、角化细胞	24
CD151	HTLV-1 感染时下调	表达广泛, 包括上皮细胞、肌肉细胞、内皮细胞、血小板、巨核细胞及一些未成熟造血细胞	10, 25

涉及病毒名称: 丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)、人类 T 细胞白血病病毒 1 型(human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1, HTLV-1)、人免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)、猫免疫缺陷病毒(feline immunodeficiency virus, FIV)、犬瘟热病毒(canine distemper virus, CDV).

## 2.1 CD81

为制备单克隆抗体, Oren 等<sup>[26]</sup>以人 T 淋巴瘤细胞系免疫正常小鼠, 发现人 T 淋巴瘤细胞系的增殖反应被一株单克隆抗体显著抑制. 利用细胞转染和 cDNA 文库的功能筛选方法, 表达这种人 T 淋巴瘤细胞膜上靶抗原的基因, 蛋白质被命名为 CD81. 人 CD81 的 cDNA 大小为 1.5 kb, 构成该蛋白质的氨基酸残基有 236 个, 分子质量为 25.8 ku. 其起始密码子含有保守序列 Kozach 结构, 符合真核细胞基因翻译起始区的特点. 人 CD81 基因的启动子序列, 符合管家基因(house keeping gene)特点, 含有转录因子 SP1 识别与结合的特异核苷酸序列, 以及 HTF 岛(HTF island)结构位点. 分析 CD81 蛋白的结构, 未找到潜在的 N-糖基化与 O-糖基化位点结构, 但在 CD81 分子的 N 端有一个潜在的豆蔻酯酰化位点.

作为 B 细胞上的抗增殖抗体, CD81 在免疫方面的作用也受到越来越多的关注, 研究表明其分布广泛并参与生物体大量的生理应答反应. CD81 在不同的细胞中参与不同的分子复合物, 并将信号转导给靶细胞. 当今人们对 CD81 的结合成员以及功能的了解已经比较系统, 研究分支包括, CD81 与 B 细胞中的 CD19 和 MHC-II 分子, CD81 与 T 细胞中的 CD4, CD81 与 B 细胞和 T 细胞中的整联蛋

白<sup>[8]</sup>. CD81 还能结合 HLA-DR 以及  $\alpha 3\beta 1$  整合素分子等, 它们形成不同的蛋白质复合物, 对于其生物学活性具有重要的调节作用. CD81 构成 B 淋巴细胞表面受体复合物 CD19/CD21/CD81/Leu13, 其借助抗原特异性识别和 CD21 介导的补体识别降低 B 细胞的活化阈值, 介导脂筏(lipid raft)与 B 细胞受体(BCR)的结合从而传递信号<sup>[27]</sup>. 敲除 CD81 基因的小鼠免疫系统发育不受影响, 可能的解释是当 CD81 分子缺失时, 其他 tetraspanins 分子如 CD82 等起到代偿作用. 进一步研究还发现, 与正常小鼠相比, CD81 缺陷型小鼠 B 细胞表达 CD19 的水平不仅降低, 而且表现出折叠错误和结合功能减弱的现象, 同时 IL-4 产生减少, 对蛋白质抗原诱发的机体 Th2 型免疫反应减弱, 这提示 CD81 对于维持正常免疫应答反应是必不可少的. 在小鼠, 只有激活的 T 细胞才表达 CD81, 而在人类, 休眠中的 T 细胞也存在 CD81. 作为 T 细胞上的辅助刺激分子, 人类 CD81 功能与小鼠的一样, 其与一些分子如 CD2、CD5、CD24、CD28、CD49 以及 TSA-1 结合, 虽不能形成类似于 B 细胞表面的分子复合物, 但可以在 TCR 周围聚集成微聚体以利于 TCR 发挥作用. 与 B 细胞不同, 抗 CD81 的单抗对大多数 T 细胞不具有抗增殖作用, 但能阻断 T 细胞成熟, 而转染 CD81 基因后可促进 T 细胞成熟, 这表

明 CD81 分子对于 T 细胞成熟是必需的. 由于 CD81 在 T、B 细胞表面以及细胞间接触区域均存在, 目前精确研究 CD81 在免疫信号传递通路中的角色仍很困难.

CD81 介导丙肝病毒(hepatitis C virus, HCV)的感染是 tetraspanins 与病毒感染有关最有力的证据. HCV 属黄病毒科的单正链 RNA 病毒, 全长约 9.6 kb, 仅含一个开放读码框 (ORF), 编码一个长约 3 000 个氨基酸的多聚蛋白前体. 在 HCV 丝氨酸蛋白酶和宿主细胞信号肽酶的联合作用下, 裂解为结构蛋白(包括核心蛋白 C、包膜蛋白 E1 和 E2)及非结构蛋白. 包膜蛋白 E1 和 E2 在病毒结合和侵入宿主细胞过程中起着重要作用. E2 和 CD81 分子结合作用首次报道于 1998 年, Pileri 等<sup>[7]</sup>从人 T 细胞淋巴瘤细胞 A2R 中克隆出能与 E2 特异结合的 CD81 蛋白质的 cDNA. 研究表明, CD81 是 HCV E2 的受体蛋白, CD81LEL 区与 HCV E2 有高度亲和力<sup>[6]</sup>. CD81 的 164~201 位氨基酸是其与 E2 结合必需的, 该段若被抗体封闭则 CD81 与 E2 的结合失效<sup>[8]</sup>. 比较人、黑猩猩、非洲绿猴, 人和黑猩猩对 HCV 易感, 而非洲绿猴对 HCV 不易感. 分析其 CD81 蛋白质一级结构, 显示人和黑猩猩 CD81 的 LEL 高度保守, 而非洲绿猴仅 LEL 中有 4 个氨基酸残基不同(第 163、186、188 和 196 位氨基酸). 分别突变人和非洲绿猴 CD81 分子, 显示 Phe186 是决定 CD81 是否与 E2 结合的关键位点. Phe186 的作用在南美绢毛猴(Tamarin monkey)中得到充分证明, 其 CD81 甚至比人 CD81 更有效结合 E2, 但是突变绢毛猴 Phe186 将抑制其 CD81 与 E2 的结合<sup>[9]</sup>. 对 CD81 分子的突变分析还找出 Len162、Ile182 和 Asn184 共同组成 E2 结合疏水区, 与 E2 的识别相关<sup>[9]</sup>.

## 2.2 CD82

人 CD82 蛋白由 267 个氨基酸残基组成, 分子质量为 29.61 ku, 其细胞外大环 LEL 有 3 个潜在的糖基结合位点. CD82 基因启动子长 735 bp, 未发现 TATA 盒和 CAAT 盒, 但存在与多种转录因子相结合的位点. 9 个 SP1 结合位点表明转录因子 SP1 在调控 CD82 基因的表达中发挥作用. AP2 特异调控上皮细胞的基因表达, 该启动子富含 AP2 结合位点, 说明 CD82 蛋白主要表达在上皮而非基质细胞. 其次, 启动子区域还有 TCF1、MyB 与 MEP1 等的结合位点, 提示该基因表达受多种机制的调节. CD82 基因启动子区的另一个显著特点是

富含 CpG 岛, 其甲基化可能导致 CD82 低表达<sup>[20]</sup>. 人 CD82 分布极其广泛, 机体大多数组织均有表达, 其中, 在前列腺、肺、肝、膀胱、骨髓、胎盘等组织丰度较高, 乳腺、胰腺、骨骼肌和胸腺丰度中等, 在脑、心脏、卵巢、胃肠道组织中表达较少<sup>[21]</sup>.

CD82 基因属于肿瘤转移抑制基因. 通过对前列腺癌、肺癌、食管癌、乳腺癌等的研究, 发现 CD82 的表达和肿瘤的转移有关. 大多数肿瘤细胞中 CD82 表达下降时肿瘤转移的几率增加. 通过基因转染的方法将 CD82 基因转给肿瘤细胞, 虽对原发肿瘤的生长没有影响, 但 CD82 的重新表达使肿瘤细胞的侵袭力和转移能力均下降. 除此之外, CD82 与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)结合对 EGFR 引发的致敏反应非常重要, CD82 能调节 EPG 传递信号, 当 CD82 在上皮细胞中异常表达时将抑制 EPG 引发肌动蛋白(lamellipodial)扩展和细胞迁移<sup>[29]</sup>. T 细胞受体识别结合各种共刺激分子, 引发 T 细胞的活化, CD82 作为跨膜蛋白介导 T 细胞受体与 T 细胞骨架上的肌动蛋白之间的联系, 实现活化 T 细胞的信号传递通路<sup>[30]</sup>. 人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)能保护自体细胞免受自然杀伤细胞(naturekiller cell, NK)介导的细胞毒作用, CD82 能与 HLA-I 重链结合, 其可能在 NK 细胞介导的细胞毒效应中起调节功能. 作为细胞间黏附分子, CD82 可引起酪氨酸磷酸化, 调节细胞活化、黏附、生长、支持、迁移、增殖、细胞融合等功能. Shibagaki 等<sup>[31]</sup>观察到 CD82 与一种黏合素 LFA-1 结合, 通过 LFA-1/ICAM-1 介导引起 Jurkat 细胞系之间聚集.

人类 T 细胞白血病病毒 1 型(human T-cell leukemia/lymphoma virus type 1, HTLV-1)属 C 型逆转录病毒, 能感染 T 细胞并致使成人 T 细胞白血病. HTLV-1 能导致细胞形成多核体, 而 CD82 就是作为抗原被抗 HTLV-1 形成多核体的抗体识别的. 将 CD82 蛋白和 HTLV-1 包膜糖蛋白共表达于 COS-1 细胞系, 多核体的形成受到抑制<sup>[22]</sup>. 而 CD82 蛋白对 HIV-1(人免疫缺陷 1 型病毒)形成的多核胞体无影响. 免疫共沉淀实验表明, 在胞内和胞外, CD82 均可与 HTLV-1 包膜糖蛋白结合. 在细胞和病毒之间似乎还存在一种相互影响的机制, 在细胞内的 HTLV-1 糖蛋白因 CD82 分子的存在而延时缺乏, 细胞内的 CD82 也因 HTLV-1 的副产物

蛋白而延时修饰<sup>[21]</sup>. 不同于 HTLV-1 的一些细胞受体促进病毒包涵体形成和细胞间病毒的传播, CD82 抑制 HTLV-1 形成包涵体和细胞间 HTLV-1 传播. CD82 是否是 HTLV-1 的细胞关键受体仍不能确定, 但 CD82 与 HTLV-1 包膜糖蛋白能相互识别.

### 2.3 CD63

1988 年, CD63 最初是作为活化血小板表面的抗体被认知. CD63 在很多细胞器上表达, 包括 T 细胞行使细胞毒作用时的溶酶体颗粒、动脉血管内皮细胞中的 Weibel-Palade 小体、嗜碱和嗜中性粒细胞中的分泌颗粒、巨核细胞以及血小板等. 这些细胞器大都处于蛋白水解酶环境, CD63 的功能很可能是伴膜蛋白防止其降解. CD63 的膜内羧基端含有定位于溶酶体的信号肽序列 GYEVN, 可于溶酶体膜表面表达, 若突变信号肽序列, 将改变 CD63 的定位<sup>[22]</sup>. CD63 的糖基化增高能调节主要组织相容性复合体 MHC-II 分子的重新分布, 与树突状细胞(DCs)的成熟过程相关<sup>[23, 24]</sup>. 同时, CD63 介导 DCs 的抗体进入细胞, 将抗体快速定位至细胞内吞路径<sup>[25]</sup>. CD63 能介导血小板、内皮细胞与肿瘤细胞之间相互作用, 与肿瘤转移的器官选择性有关, 参与晚期肿瘤凝血异常的形成<sup>[26]</sup>. 研究发现, CD63 基因组 DNA 转染 CD63 阴性的人黑色素瘤细胞, 其在裸鼠体内生长率降低, 因而 CD63 可能有抑制黑色素瘤的浸润和转移的作用<sup>[27]</sup>. 现今, CD63 研究热点主要集中在其与肿瘤细胞侵袭转移的相关性.

人类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)属逆转录病毒科, 慢病毒亚科成员之一, 能导致免疫缺陷疾病艾滋病(AIDS). CD63 可能与 HIV-1 感染相关, CD63 在 HIV-1 感染的细胞分泌小泡中上调表达, 它选择性地聚集在病毒出芽区域并参与合成新病毒颗粒. 受 HIV-1 感染的巨噬细胞中细胞器高表达 CD63 和 MHC-II, 而 MHC-II 与病毒最终的成熟有关. 最近的研究还表明, CD63 的抗体可以阻碍 HIV-1 进入巨噬细胞, 而病毒感染不能被 CD9 和 CD81 的抗体阻碍<sup>[28]</sup>. 因此推测, CD63 可能参与 HIV-1 病毒间相互识别并促进病毒与细胞小泡结合以利于融合和释放.

### 2.4 CD9

CD9 基因大小约 1.4 kb, 核心蛋白由约 227 个氨基酸残基组成, 在 SEL 有一个 N 端连接的糖基

化位点, 而其他 tetraspanins 成员在 LEL 上. 某些物种(猫、鸡、蛙、七鳃鳗)的 CD9 甚至没有 N 端连接的糖基化位点, 这可能因为 CD9 的糖基化对其一般功能并不重要<sup>[29]</sup>. CD9 能介导受精过程中精子和卵子的融合, 敲除基因的 CD<sup>-/-</sup>小鼠精卵结合削弱明显. CD9 同时还与卵母细胞分化发育有关. CD9 与其他免疫分子的结合, 例如 CD5、CD28、MHC-II 分子, 已经被证实. CD9 能辅助刺激树突状细胞(DCs)表面的 T 淋巴细胞, 控制 MHC-II 分子的集合和随后 T 细胞受体(TCRs)的募集以表达抗原. 在神经系统中, CD9 还充当髓磷脂蛋白, 构成帕拉节连接点(paranodal junctions), 敲除 CD9 基因的老鼠使连接点上的联系中断并改变帕拉节结合蛋白的成分<sup>[30]</sup>. CD9 还可以与转移生长因子(TGF- $\alpha$ )膜外结构相结合, 调节表皮生长因子受体(EGFR)的活性和细胞的增殖<sup>[40]</sup>. CD9 也与病毒相关, 其能调节猫免疫缺陷病毒(feline immunodeficiency virus, FIV)以及犬瘟热病毒(canine distemper virus, CDV)的感染. 没有证据显示 CDV 和 CD9 是直接结合的, 而抗 CD9 的抗体更倾向抑制病毒的释放而不是病毒的感染<sup>[24]</sup>, CD9 是否是病毒的关键受体并不清楚.

### 2.5 CD151

CD151 在不同细胞中广泛表达, 包括上皮细胞、肌肉细胞、内皮细胞、血小板、巨核细胞及一些未成熟造血细胞, 参与细胞支持、迁移和集合<sup>[29]</sup>. CD151 在 HTLV-1 感染的细胞中也显示出表达量的上调, 其表现为感染细胞对胞外基质的黏附性增强. 推测 CD151 与 CD82 在 HTLV-1 感染过程中有着相似的功能<sup>[10]</sup>.

CD151 是整合素信号转导的跨膜连接器, 在体外血管形成中发挥着重要的作用<sup>[41]</sup>. 大多研究表明, CD151 启动内皮细胞黏附、迁移和血管形成的信号从细胞外向细胞内传递是通过整合素-tetraspanins-蛋白激酶 C(PKC)复合体这一模式来完成的, 可能与其“跨膜连接器”的作用有关, 通过形成 PKC-TM4SF-整合素复合体, 激活黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK), 进而激活与促血管新生有关的信号通路. 敲除 CD151 基因的小鼠在多种组织表现出反常现象<sup>[42]</sup>, 而在阴性表达 CD151 的 NIH 3T3 细胞中转染 CD151 后, 细胞的定向迁移能力增强, 同时细胞在细胞外基质中培养后易形成条索状结构<sup>[43]</sup>. CD151 可与多种整合素亚型结合形成复合体, 利用造血细胞系进行免疫共沉

证实, CD151 能与整合素  $\beta_1$ 、 $\alpha_3$ 、 $\alpha_6$ 、 $\alpha_7$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_8\beta_1$  结合<sup>[42~47]</sup>. 生化研究表明, CD151 与整合素  $\alpha_3$  和  $\alpha_6$  的相互作用需要 CD151 LEL 的一段整合素结合位点, 氨基酸序列为从 194 到 206 位的 QRDHASNIYKVE, 而 CD151 与整合素  $\alpha_3\beta_1$  的结合需要 CD151 膜外大环 LEL 上 Leu149 与 Glu213 之间的序列<sup>[42]</sup>. 这些位点的突变将导致整合素脱离并破坏整合素依赖性细胞(integrin-dependent cell)的分布.

### 3 无脊椎动物 tetraspanins

在生物体中, 几乎所有的细胞和组织都表达大量不同的 tetraspanins, 多达 30 000~100 000 个拷贝每细胞<sup>[1]</sup>. 人们在无脊椎动物中也发现了许多功能独特的 tetraspanins. 例如表达于果蝇运动神经元的 lbm(late bloomer)系 tetraspanins 蛋白, 胚胎在缺失 lbm 基因的情况下无法将信号传递到前突触末端(presynaptic terminals)<sup>[48]</sup>, 腐蚀植物的真菌(如 *Botrytis cinerea* & *Magnaporthe grisea*)为进入宿主组织, 需要 tetraspanins 在植物体表形成穿透小孔<sup>[49]</sup>. Todres 等<sup>[2]</sup>对比不同无脊椎动物的 tetraspanins, 包括 4 种蛀虫(*Manduca sexta*)、4 种蜜蜂(*Apis mellifera*)、37 种果蝇(*Drosophila*)、20 种线虫(*Caenorhabditis*)的系统发生树, 显示至少有 15 种 tetraspanins 进化保守, 在无脊椎动物中的功能不可替代.

对已知的 37 种果蝇 tetraspanins 基因分别敲除, 结果显示, 至少 9 种 tetraspanins 对果蝇是非必须的, 这可能是剩余的 tetraspanins 之间的补偿机制使某些分子的突变并不能导致显性性状<sup>[48]</sup>. 而在这 37 种 tetraspanins 基因中, 仅有两种 tetraspanins 同哺乳动物是跨物种直系同源的(transphylum orthologs)<sup>[2]</sup>. 人们推测相当可观的 tetraspanins 在无脊椎动物中是独立进化的, 这可能与其在非脊椎动物中行使的特殊功能有关<sup>[1]</sup>. 因此, 在基因水平上无脊椎动物 tetraspanins 很难直接通过同源克隆的方法获得. 人们通常只能通过大规模基因组测序后进行生物信息学分析, 并结合同源序列比对来提出新的 tetraspanins 基因, 许多果蝇和线虫的 tetraspanins 基因就是这样被发现的.

迄今为止, 人们对无脊椎动物 tetraspanins 的研究还不充分, 特别是 tetraspanins 在无脊椎动物先天性免疫系统中作用的研究更少. 某些与免疫相关的 tetraspanins 分子例如 CD9, 在进化过程中发

生功能上的变化. 无颚(jawless)脊椎动物七鳃鳗(lamprey)的 CD9 分子仅参与基本的细胞信号传递过程, 而伴随着从无颚到有颚的进化, CD9 在原始的有颚脊椎动物黄貂鱼(*Dasyatis akajei*)白细胞中, 特别是 B 细胞前体(pre-B cells)、T 细胞、巨噬细胞、嗜酸和嗜碱性粒细胞中有着特别作用, 这表明 CD9 新的功能与免疫系统息息相关<sup>[38]</sup>.

烟草天蛾(*Manduca sexta*)的先天免疫系统同哺乳动物一样, 具有体液免疫和细胞免疫. 研究表明<sup>[50]</sup>, 烟草天蛾红细胞有两种膜蛋白, tetraspanins D76 和某整合素蛋白在其细胞免疫反应中发挥重要作用. 受病原体刺激的红细胞通过细胞接触传递信号, 将休眠无黏附性的血细胞迅速转变为有活性的黏附吞噬细胞. 抗体封闭实验表明, 细胞间的信号传递是通过一个细胞表面的 tetraspaninsD76 的 LEL 结构与另一个细胞表面的整联蛋白特异结合实现的.

tetraspanins 在血吸虫(*Schistosoma mansoni*)的体表大量表达. 人们将两种重组表达的 tetraspanins (TSP-1 和 TSP-2)刺激小鼠, 已成功获得抗体<sup>[51]</sup>. 同理, 检验接触过血吸虫的人体内是否存在相应抗体可以为诊断提供依据<sup>[52]</sup>. 如果能利用 tetraspanins 使人群得到获得性免疫, 人类将远离血吸虫病.

### 4 展 望

Tetraspanins 参与调节细胞生长、迁移、信号转导和黏附效应. Tetraspanins 作为细胞膜上信号传递的码头, 结集膜蛋白和胞内信号蛋白, 使 tetraspanins 能从复杂多变的外部环境中获得应有的信号并作出应答. 目前, 高等脊椎哺乳动物 tetraspanins 家族的研究热点主要集中在免疫反应过程中 tetraspanins 胞外受体识别、tetraspanins 胞内信号传导通路以及 tetraspanins 与其他细胞因子的关系. 而特异的病毒感染需要特别的 tetraspanins 以被识别并进入细胞的特点<sup>[10]</sup>, 使得 tetraspanins 可作为药物作用的靶点, 为预防或治疗相应疾病提供新途径. 而 tetraspanins 在无脊椎动物中相关的研究相对缺乏, 本实验室在进行对虾 EST 比对时, 搜索出 3 种 tetraspanins 类似基因, 并已证实其基因表达在对虾白斑病毒(white shrimp spot virus, WSSV)感染过程中发生强烈变化. 因此, 无脊椎动物 tetraspanins 在先天性免疫系统中的作用值得我们进行深入探讨, 而其在病毒病防治方面的应用前景也非常广阔.

## 参 考 文 献

- 1 Hemler M E. Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2003, **19**: 397~422
- 2 Todres E, Nardi J B, Robertson H M. The tetraspanins superfamily in insects. *Insect Mol Biol*, 2000, **9**(6): 581~590
- 3 Boucheix C, Rubinstein E. Tetraspanins. *Cell Mol Life Sci*, 2001, **58**(9): 1189~1205
- 4 Adell T, Gamulin V, Perović-Ottstadt S, *et al.* Evolution of metazoan cell junction proteins: the scaffold protein MAGI and the transmembrane receptor tetraspanins in the demosponge *Suberites domuncula*. *J Mol Evol*, 2004, **59**(1): 41~50
- 5 Kazarov A R, Yang X, Stipp C S, *et al.* An extracellular site on tetraspanins CD151 determines  $\alpha_3$  and  $\alpha_6$  integrin-dependent cellular morphology. *J Cell Biol*, 2002, **158**(7): 1299~1309
- 6 Seigneuret M, Delaguillaumie A, Gesbert C L, *et al.* Structure of the tetraspanins main extracellular domain. *J Biol Chem*, 2001, **276** (43): 40055~40064
- 7 Maecker H, Todd S C, Levy S. The tetraspanins superfamily: molecular facilitators. *J FASEB*, 1997, **11**(6): 428~442
- 8 Levy S, Shoham T. The tetraspanins web modulates immune-signalling complexes. *Nature*, 2005, **5**(2): 136~148
- 9 Evans J P. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. *Hum Reprod Update*, 2002, **8**(4): 297~311
- 10 Martin F, Roth D M, Jans D A, *et al.* Tetraspanins in viral infections: a fundamental role in viral biology. *J Virol*, 2005, **79** (17): 10839~10851
- 11 Wright M D, Tomlinson M G. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today*, 1994, **15** (12): 588~594
- 12 Maecker H T, Todd S C, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J*, 1997, **11**(6): 428~442
- 13 Stipp C S, Kolesnikova T V, Hemler M E. Functional domains in tetraspanins proteins. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**(2): 106~122
- 14 Claas C, Stipp C S, Hemler M E. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J Biol Chem*, 2001, **276**(11): 7974~7984
- 15 Tarrant J M, Robb L, Spriel A B, *et al.* Tetraspanin: molecular organisers of the leukocyte surface. *Trends Immunol*, 2003, **24**(11): 610~616
- 16 Kitadokoro K, Bordo D, Galli G, *et al.* CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J*, 2001, **20**(1~2): 12~18
- 17 Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, *et al.* Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 1998, **282**(5390): 938~940
- 18 Higginbottom A, Quinn E R, Kuo C C, *et al.* Identification of amino acid residues in CD81 critical for interaction with hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol*, 2000, **74**(8): 3642~3649
- 19 Drummer H E, Wilson K A, Pombourios P. Identification of the hepatitis C virus E2 glycoprotein binding site on the large extracellular loop of CD81. *J Virol*, 2002, **76**(21): 11143~11147
- 20 Meola A, Sbardellati A, Bruni E B, *et al.* Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. *J Virol*, 2000, **74**(13): 5933~5938
- 21 余晓燕. KAI1/CD82 的肿瘤转移抑制作用. *重庆医科大学学报*, 2007, **32**(2): 214~217
- 22 Yu X Y. *J Chongqing Medical University*, 2007, **32**(2): 214~217
- 23 Pique C, Gesbert C L, Delamarre L, *et al.* Interaction of CD82 tetraspanins proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology*, 2000, **276** (2): 455~465
- 23 Ho S H, Martin F, Higginbottom A, *et al.* Recombinant extracellular domains of tetraspanins proteins are potent inhibitors of the infection of macrophages by human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 2006, **80**(13): 6487~6496
- 24 Parseval A D, Lerner D L, Borrow P, *et al.* Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. *J Virol*, 1997, **71**(8): 5742~5749
- 25 Kohno M, Hasegawa H, Miyake M, *et al.* CD151 enhances cell motility and metastasis of cancer cells in the presence of focal adhesion kinase. *Int J Cancer*, 2002, **97**(3): 336~343
- 26 Oren R, Takahashi S, Doss C, *et al.* The target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol*, 1990, **10**(8): 4007~4015
- 27 Cherukuri A, Shoham T, Sohn H W, *et al.* The tetraspanins CD81 is necessary for partitioning of coligated CD19/CD21-B cell antigen receptor complexes into signaling-active lipid rafts. *J Immunol*, 2004, **172**(1): 370~389
- 28 Dong J T, Suzuki H, Pin S S, *et al.* Down-regulation of the KAI1 metastasis suppressor gene during the progression of human prostatic cancer in frequently involves gene mutation or allelic loss. *Cancer Res*, 1996, **56**(19): 4387~4390
- 29 Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F. Attenuation of EGF receptor signaling by a metastasis suppressor, the tetraspanin CD82/KAI-1. *Curr Biol*, 2000, **10**(16): 1009~1012
- 30 Delaguillaumie A, Harriague J, Kohanna S, *et al.* Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to co-stimulation. *J Cell Sci*, 2004, **117**(Pt22): 5269~5282
- 31 Shibagaki N, Hanada K, Yamashita H, *et al.* Overexpression of CD82 on human T cells enhances LFA-1/ICAM-1-mediated cell-cell adhesion: functional association between CD82 and LFA-1 in T cell activation. *Eur J Immunol*, 1999, **29**(12): 4081~4091
- 32 Rous B A, Reaves B J, Ihrke G, *et al.* Role of adaptor complex AP-3 in targeting wild-type and mutated CD63 to lysosomes. *Mol Biol Cell*, 2002, **13**(3): 1071~1082
- 33 Ebgering A, Pieters J. Association of distinct tetraspanins with MHC class II molecules at different subcellular locations in human immature dendritic cells. *Int Immunol*, 2001, **13**(2): 127~137
- 34 Engering A, Kuhn L, Fluitsma D, *et al.* Differential post-translational modification of CD63 molecules during maturation of human dendritic cells. *Eur J Biochem*, 2003, **270**(11): 2412~2420
- 35 Mantegazza A R, Barrio M M, Moutel S, *et al.* CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human

- immature dendritic cells. *Blood*, 2004, **104**(4): 1183~1190
- 36 Lee J H, Seo Y W, Park S R, *et al.* Expression of a splice variant of KAI1, a tumor metastasis suppressor gene, influences tumor invasion and progression. *Cancer Res*, 2003, **63**(21): 7247~7255
- 37 Wu Q, Ji Y, Zhang M Q, *et al.* Role of tumor metastasis suppressor gene KAI1 in digestive tract carcinomas and cancer cells. *Cell Tissue Res*, 2003, **314**(2): 237~249
- 38 Zhu J, Yan K, Lu L, *et al.* Molecular cloning and characterization of CD9 cDNA from cartilaginous fish, red stingray. *Mol Immunol*, 2006, **43**(10): 1534~1540
- 39 Ishibashi T, Ding L, Kenaka K, *et al.* Tetraspanin protein CD9 is a novel paranodal component regulating paranodal junctional formation. *J Neurosci*, 2004, **24**(1): 96~102
- 40 Shi W, Fan H, Shum L, *et al.* The tetraspanin CD9 associates with transmembrane TGF $\alpha$  and regulates TGF $\alpha$ -induced EGF receptor activation and cell proliferation. *J Cell Biol*, 2000, **148**(3): 591~601
- 41 Wright M D, Geary S M. Characterization of mice lacking the tetraspanins superfamily member CD151. *Mol Cell Biol*, 2004, **24**(13): 5978~5988
- 42 Berditchevski F, Gilbert E, Griffiths M R, *et al.* Analysis of the CD151 $\alpha_6\beta_1$  integrin and CD151-tetraspanins interactions by mutagenesis. *J Biochem*, 2001, **276**(44): 41165~41174
- 43 Zhang X A, Kazarov A R, Yang X, *et al.* Function of the tetraspanins CD151- $\alpha_6\beta_1$  integrin complex during cellular morphogenesis. *Mol Biol Cell*, 2002, **13**(1): 1~11
- 44 Fitter S, Sincock P M, Jolliffe C N, *et al.* Transmembrane 4 superfamily protein CD151 (PETA-3) associates with  $\beta_1$  and  $\alpha_{IIb}\beta_3$  integrins in haemopoietic cell lines and modulates cell-cell adhesion. *J Biochem*, 1999, **338**(Pt1): 61~70
- 45 Ashman L K. CD151. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2002, **16**(3): 223~226
- 46 Lau L M, Wee J L, Wright M D, *et al.* The tetraspanins superfamily member CD151 regulates outside-in integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$  signaling and platelet function. *Blood*, 2004, **104**(8): 2368~2375
- 47 Lammerding J, Kazarov A R, Huang H, *et al.* Tetraspanins CD151 regulates  $\alpha_6\beta_1$  integrin adhesion strengthening. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(13): 7616~7621
- 48 Fradkin L G, Kamphorst J T, DiAntonio A, *et al.* Genomewide analysis of the drosophila tetraspanins reveals a subset with similar function in the formation of the embryonic synapse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(21): 13663~13668
- 49 Sexton A C, Howlett B J. Parallels in fungal pathogenesis on plant and animal hosts. *Eukaryot Cell*, 2006, **5**(12): 1941~1949
- 50 Zhuang S, Kelo L, Nardi J B, *et al.* An integrin-tetraspanin interaction required for cellular innate immune responses of an insect, *Manduca sexta*. *J Biol Chem*, 2007, **282**(31): 22563~22572
- 51 Tran M H, Pearson M S, Bethony J M, *et al.* Tetraspanins on the surface of schistosoma mansoni are protective antigens against schistosomiasis. *Nat Med*, 2006, **12**(7): 835~840
- 52 Loukas A, Tran M, Pearson M S. Schistosome membrane proteins as vaccines. *Int J Parasitol*, 2007, **37**(3~4): 257~263

## Reviews on The Immunological Function of Tetraspanins\*

GUI Lang, WANG Bing, LI Fu-Hua, XIANG Jian-Hai\*\*

(Institute of Oceanology, The Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract** Tetraspanins belongs to the transmembrane 4 superfamily(TM4SF). They can be as a bridge to connect the proteins outside or inside the cell membrane. A tetraspanins web is formed by the tetraspanins-proteins complex, and the web is believed to involve in fundamental functions of immunity system, and consequently, signaling between cells and inside cells, regulating cell activation and adhesion, participating in the identification and infection of some virus. As a family of conservative transmembrane proteins, tetraspanins play multiplex roles in invertebrate. It was described how tetraspanin microdomains might have functions in the immune system, and how they contact with virus. In addition, the important role of tetraspanins in the innate immune system of invertebrate were discussed.

**Key words** tetraspanins, immunity, virus, transmembrane 4 superfamily, invertebrate

\*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2006CB101804) and The National Natural Science Foundation of China (30771639).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-532-82898568, E-mail: jhxiang@ms.qdio.ac.cn

Received: May 14, 2008 Accepted: June 16, 2008