

膜联蛋白 I 的结构和功能*

张立勇 赵晓航** 吴 旻

(中国医学科学院 肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)
(中国协和医科大学)

摘要 膜联蛋白 I (annexin I) 是 annexins 蛋白超家族中的一员, 是结构相关钙离子依赖的磷脂结合蛋白。具有 annexins 超家族所共有的中心结构域和承担各自独特功能的 N 端结构域。通过调控细胞内磷脂囊泡的聚集、炎症反应和磷脂酶 A2 的活性而参与细胞信号传导、细胞分化和细胞凋亡等细胞重要的生命过程。

关键词 膜联蛋白 I, 钙/磷脂结合, 膜聚集, 信号传导, 炎症反应, 细胞分化

学科分类号 Q57

膜联蛋白 (annexins) 是一类结构相关钙依赖的磷脂结合蛋白超家族, 约占细胞总蛋白的 2%。在细胞中参与膜转运及膜表面一系列依赖于钙调蛋白的活动, 包括囊泡运输、胞吐作用中的膜融合、信号传导和钙离子通道的形成、调控炎症反应、细胞分化和细胞骨架蛋白间的相互作用等。可以分为 I、II、III……等多种类型。Annexins 超家族在结构上具有由 70 个氨基酸残基组成的重复序列的保守结构, 称为中心结构域 (core domain), 以钙离子依赖的方式可逆地和细胞膜磷脂结合。不同的 annexin 具有独特的 N 端序列、独特的基因表达方式和组织特异性, 这表明每种 annexin 蛋白在机体的不同组织和部位执行着不同的生物学功能。但是, 每种 annexin 确切的生理功能尚不十分清楚。

目前 annexins 超家族已有近 20 个成员, 其中 annexin I (annexin A1), 又称为 lipocortin I、calpactin II、磷脂酶 A2 抑制蛋白 (phospholipase A2 inhibitory protein) 和 p35, 是 annexins 超家族中的一员, 其分子质量为 38 ku, 具有 annexin 超家族所共有的中心结构域和承担独特功能的 N 端结构域。近年来的研究表明, annexin I 参与了磷脂囊泡聚集的调控, 炎症反应, 磷脂酶 A2 (phospholipase A2, PLA2) 活性的抑制, 细胞信号传导, DNA 修复, 细胞转化, 离子通道形成和细胞凋亡等多种细胞生理过程。

1 Annexin I 的结构

Annexin I 基因定位于人染色体 9q12~ q21.2, 有 13 个外显子和 12 个内含子组成, 其 cDNA 中 1 041 bp 的开放阅读框 (open reading frame, ORF)

编码由 346 个氨基酸残基组成的 annexin I 蛋白。这种蛋白质具有所有 annexins 超家族成员所共有的保守的中心结构域和承担各自独特功能的 N 端结构域。其中心结构域由 4 个同源的重复序列 (repeat I、II、III、IV) 组成, 每个重复序列含有 5 个 α 螺旋。这些重复序列排列成弯曲的盘状, 具有钙离子结合位点, 可以与磷脂亲水性的头部相互作用。不同 annexin 蛋白的中心结构域大约有 50% 的氨基酸序列同源。Annexin 超家族的每个成员都含有一个 N 端结构域, 其长度和序列明显不同。Annexin III、IV、V、VI、X、XII、XIII 的 N 端尾较短, 有 11~ 19 个氨基酸残基; annexin I 和 II 的 N 端有 32~ 42 个氨基酸残基; 而 annexin VII 和 XI 的 N 端则有 100 多个氨基酸残基。它们都含有钙结合蛋白 S100 蛋白家族共有的钙结合位点和磷酸化位点。S100 蛋白是一类能通过钙离子结合而在体内发挥重要生物学作用的蛋白质。因其可溶于 100% 饱和的硫酸铵溶液, 故称为 S100^[1]。最近的研究表明, annexin I N 端结构域的 2~ 12 位氨基酸可以和 S100C 蛋白相互作用。不同 annexin 的 N 端结构并不相关, 可能与其承担不同的功能有关^[2]。Annexin 超家族不同成员 N 端结构的比较见图 1。

* 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G19980512)、国家高技术 (863) 研究发展计划资助项目 (2001AA227091 和 2001AA233061)、国家自然科学基金资助项目 (39990570 和 30171049) 和教育部留学回国人员科研启动基金资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 010-67709015 (O), 010-67778360 (L)

E-mail: zhaoxh@pubem.cicams.ac.cn

收稿日期: 2002-01-07, 接受日期: 2002-03-04

Anx I : MAMVSEFLKQAWFIENEEQEYVQTVKSSKGGPGSAVSPYPTF (1~ 42)
 Anx II: MSTVHEILCKLSLEGDHS-----TPPSAYG-----SVKAYTNF (1~ 33)
 Anx III: -----MASIWVGHGRGTVRDYPDF (1~ 18)
 Anx IV: -----MAMATK---GGTVKAASGF (1~ 16)
 Anx V: -----MAQVLR-----GTVTDFPGF (1~ 15)
 Anx VI: -----MAKPAQGAQYR-----GSIHDFPGF (1~ 20)
 Anx VII: LPGGFPGQMPSQYPGGQPTYPSPATVTQVTQGTIRPAANF (122~ 163)
 Anx VIII: -----MAWWKSWIEQEG-----VTVKSSSHF (1~ 21)
 Anx XI: PGQQQPVPSPYPGYPGSGTVPVPPTQFGS-----RGTITDAPGF (161~ 180)
 Anx XIII: -----MGNRHAKASSPQ-----GF (1~ 14)
 Anx XV: -----MFCGDYVQGTIFPAPNF (1~ 17)
 Anx XXXI: -----MAPSLTQEILSHLGLASKTAAWGTLGLRTLRLNLF (1~ 34)

Fig. 1 Comparison of N-terminal domains of representative members of annexins superfamily

图 1 Annexins 超家族几个代表性成员的 N 端结构域比较

2 Annexin I 与膜聚集

某些 annexins, 包括 annexin I、II、IV 和 VII 能够促进质膜的聚集. Annexin I 的中心结构域和 N 端结构域都参与了膜的聚集. Bitto 等^[3]利用 N 端缺失了不同片段的 annexin I 突变体来识别参与 annexin I 介导膜聚集的区域, 结果表明, annexin I N 端的 26~ 29 位氨基酸参与了膜聚集. 由 annexin I 的 24~ 35 位氨基酸和 annexin V 的中心组成的嵌合体蛋白的膜聚集活性明显比 annexin V 高, 却比 annexin I 低, 这就进一步证实了上述观点. annexin I 的 N 端特异性突变实验表明, Lys26 和 Lys29 对于膜聚集是必不可少的. Annexin I 有 2 个独立的相互作用位点分别参与了膜的结合和聚集. Annexin I 首先以单体的形式与膜结合, 这主要是靠 Ca^{2+} 介导的静电相互作用, 进而诱导产生的第二个相互作用位点和膜结合, 这个作用与膜聚集活动直接相关. 这种结合主要是由疏水性相互作用驱动的. 由此推断 annexin I 介导的膜聚集假设模型, 即 annexin I 单体侧向聚集, 通过其诱导产生的疏水性相互作用位点与膜第二次相互作用^[4]. Rosengarth 等^[1]研究了全长 annexin I 的 X 射线结构及其在膜聚集中的作用, 发现 annexin I 具有 α 螺旋结构的 N 端结构域通过柔性连接片段与中心结构域相连. 当 Ca^{2+} 不存在时, annexin I 处于无活性形式, 由 41 个氨基酸残基组成的 N 端结构域中的两个 α 螺旋与中心结构域密切相互作用, 且 N 端结构域中由 2~ 12 位氨基酸残基组成的双亲性螺旋插入到中心结构域重复序列 III 中代替了螺旋 D. 螺旋 D 就解旋成帽状, 部分掩盖了 N 端螺旋, 这样就破坏了重复序列 III 中的 II 型 Ca^{2+} 结合位点.

在 Ca^{2+} 介导的膜结合过程中, D 帽子折叠成合适的螺旋构象, 形成了 II 型 Ca^{2+} 结合位点. N 端结构域的 2 个 α 螺旋通过柔性片段自由活动, 与其他分子相互作用, 这就揭示了 Ca^{2+} /膜激活的 annexin I 通过其 N 端结构域在膜聚集中起作用.

3 Annexin I 与细胞信号传导

3.1 参与调控 MAPK/ERK 介导的信号传导

Annexin I 蛋白具有多个磷酸化位点, 是蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 和酪氨酸蛋白激酶的底物, 其 N 端第 21 位的 Tyr 残基和第 27 位的 Ser 残基可分别被 EGFR 的酪氨酸蛋白激酶和 PKC 磷酸化^[5]. 此外, Muimo 等^[6]发现支气管上皮中 annexin I 蛋白 C 端片段中的 His 残基被磷酸化, 并且其磷酸化水平受 cAMP 和 AMP 而不是 cGMP 调控. 同时, annexin I 蛋白的 C 端结构域具有结合 Ca^{2+} 和磷脂的功能, 而 N 端具有与 SH2 识别结构域序列相似的区域. 因此, annexin I 可能与那些含有 SH2 结构域的蛋白质形成蛋白复合体, 参与细胞内信号传递.

Annexin I 可以与生长因子结合蛋白 2 (growth factor binding protein 2, Grb2) 结合. 而且, 其 Tyr 残基可以被磷酸化, 这都提示 annexin I 参与 ERK 信号级联反应. Alldridge 等^[5]为了研究 annexin I 在细菌脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 介导的信号传导途径中的作用, 他们首先建立了 annexin I 高和低表达的稳定转化巨噬细胞系. 当 annexin I 高表达的 RAW 246.7 细胞被 LPS 激活后, 发现 MAPK/ERK 信号通路许多蛋白质被磷酸化, 包括 p38, ERK1 和 ERK2 以及 JNK (c-Jun N-terminal kinase) 等, 出现组成性活化 (constitutive activation)

现象. 而当 LPS 刺激未转化的细胞后, MAPK/ERK 通路中的激酶活性通常被下调. 相反, 在 annexin I 蛋白表达下调的 RAW 246.7 巨噬细胞系中, 当受到来自胞外的信号 LPS 刺激后, ERK 活性延长. 实验证明, annexin I 可以通过与不同生长因子结合蛋白结合, 在 MAPK/ERK 信号通路上游影响蛋白复合物的形成和活性.

3.2 参与调控 cPLA2 介导的信号传导

胞质磷脂酶 A2 (cytosolic phospholipase A2, cPLA2) 在细胞内广泛分布, 其分子质量为 85~100 ku, 在炎症反应、细胞毒性和有丝分裂发生的信号传导中起重要作用. 它的激活受生长因子和促炎因子的严谨调控, 对磷脂底物具有很强的选择性. 由于 cPLA2 N 端的 C2 结构域介导 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合和 cPLA2 从胞质到膜的转位, 所以它对底物的有效水解需要微摩尔级的 Ca^{2+} 浓度存在. 研究发现, annexin I 可以在体外抑制 cPLA2 的活性, 也能有效地抑制培养细胞中 cPLA2 的活性. 可能作为 cPLA2 的内源性负调节剂, annexin I 通过调控 cPLA2 的活性来调节细胞内重要生物学过程^[7].

目前, 关于 annexin I 抑制 cPLA2 活性的机制还不十分清楚. 研究表明, 当细胞受到某些刺激被激活时, 细胞内的 Ca^{2+} 浓度从 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 迅速提升到 1 $\mu\text{mol/L}$, cPLA2 被磷酸化, 并从胞质转位到膜上. 与此同时, annexin I 也发生转位, 调控细胞内钙离子释放等过程. 由于 Ca^{2+} 浓度在 0.1~1 $\mu\text{mol/L}$ 时, annexin I 对 cPLA2 的调控程度相近. 因此 Ca^{2+} 浓度的升高可能不是 cPLA2 活性的唯一调节机制. 研究表明, annexin I 抑制 cPLA2 的活性是通过特异性相互作用模型 (specific interaction model) 而不是底物耗尽模型 (substrate depletion model) 实现的. cPLA2 的 C2 结构域总是以疏水性的头部基团与磷脂结合, 其疏水性氨基酸残基所在的结构域在膜结合中起重要作用. Annexin I 的 C 端结构域是通过疏水作用结合到 cPLA2 的磷脂结合位点上, 从而干扰了 cPLA2 与膜的结合, 抑制了 cPLA2 的活性^[5,7,8]. Miyachi 等^[9]也发现在培养的鼠皮质星形细胞中, IL-1 β 诱导 annexin I mRNA 的表达是通过 MAPK 和 PLA2 途径实现. 可见, annexin I 在 cPLA2 介导的信号传导与调控中扮演着重要的角色.

4 Annexin I 与免疫炎症反应

在免疫反应过程中, 细胞之间的相互作用需要

许多因子的参与, 从而对免疫炎症反应起调节作用. 在糖皮质激素介导的抗炎反应中, annexin I 是糖皮质激素信号传导通路的重要组分, 能够在多个试验动物模型中抑制中性粒细胞的动员^[10]. Podgorski 等^[11]在 1992 年发现, 风湿性关节炎等自身免疫性疾病中, 当病人口服糖皮质激素后能够产生抗 annexin I 的抗体. 即 annexin I 可以作为一种疾病状态下的自身性抗原存在于体内. Brichory 等^[12]用蛋白质组学方法识别肺癌中诱导产生体液免疫反应的蛋白质, 并研究与自身性抗体发展相关的生物学过程, 发现 annexin I 和 annexin II 抗体阳性病人血清中的 IL-6 水平明显比正常对照和抗体阴性病人高. 这表明在肿瘤病人血清中可以出现 annexin I / II 自身性抗体和高水平的炎症细胞因子.

5 Annexin I 与肿瘤细胞分化

肿瘤是一类多基因变化导致细胞周期紊乱的疾病. 细胞周期的失控通常使肿瘤细胞过度增生和分化受阻. Solito 等^[13]用编码全长 annexin I 的重组表达载体转染单核细胞白血病 U937 细胞, 发现被 annexin I 转染的细胞具有很高的 caspase-3 活性和 PLA2 活性, 促进白血病细胞凋亡. 然而用空载体或用带有 annexin I cDNA 反义链的质粒转染细胞, 并不能改变细胞的凋亡进程. 这表明, annexin I 具有对细胞凋亡的调控作用. Sakamoto 等^[14]研究发现, annexin I 可以促进鼠胸腺细胞免于 H_2O_2 引起的细胞坏死, 而促进 H_2O_2 诱导的细胞凋亡. 同时, 抗 annexin I 的抗体可增强 H_2O_2 引起的坏死, 阻抑 H_2O_2 诱导的凋亡. Wu 等^[15]发现在 U937 细胞系中, annexin I 上调抑制 TNF 诱导的人白血病细胞凋亡. 这可能是因为地塞米松虽然对细胞内 PLA2 的表达水平没有直接影响, 却促进了细胞内 PLA2 的降解, 而且促进了内源性 cPLA2 抑制剂 annexin I 的合成. Annexin I 的反义寡核苷酸可完全去除 TNF 刺激细胞时地塞米松诱导的这种反应. 另外, annexin I 具有诱导细胞分化和调节细胞增殖的功能, 直接在培养基中加入重组成人胎盘 annexin I 能够促进人鳞癌细胞系 SqCC/Y1 的分化与成熟^[16]. 在人肺腺癌细胞系 A549 细胞系中, annexin I 介导了糖皮质激素引起的细胞增殖, 抑制了佛波酯 (phorbol esters) 诱导的细胞分化等^[17,18]. 可见, annexin I 在肿瘤细胞的增殖与分化、甚至细胞凋亡等生理过程中起重要作用.

参 考 文 献

- 1 Rosengarth A, Gerke V, Lueche H. X-ray structure of full-length annexin I and implications for membrane aggregation. *J Mol Biol*, 2001, **306** (3): 489~ 498
- 2 Maillard W S, Haigler H T, Schlaepfer D D. Calcium-dependent binding of S100C to the N-terminal domain of annexin I. *J Biol Chem*, 1996, **271** (2): 719~ 725
- 3 Bitto E, Cho W. Structural determination on the vesicle aggregation activity of annexin I. *Biochemistry*, 1999, **38** (42): 14094~ 14100
- 4 Bitto E, Li M, Tikhonov A M, *et al.* Mechanism of annexin I-mediated membranes aggregation. *Biochemistry*, 2000, **39** (44): 13469~ 13477
- 5 Alldridge L C, Harris H J, Plevin R, *et al.* The annexin protein lipocortin I regulates the MAPK/ERK pathway. *J Biol Chem*, 1999, **274** (53): 37620~ 37628
- 6 Muimo R, Hornickova Z, Riemen C E, *et al.* Histidine phosphorylation of annexin I in airway epithelia. *J Biol Chem*, 2000, **275** (17): 36632~ 36636
- 7 Kim S W, Rhee H J, Ko J, *et al.* Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I: specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem*, 2001, **276** (19): 15712~ 15719
- 8 Jiyounga O, Rhee J, Kim S W, *et al.* Annexin I inhibits PMA-induced c-fos SRE activation by suppressing cytosolic phospholipase A2 signal. *FEBS Letters*, 2000, **476** (3): 296~ 30009
- 9 Miyachi T, Asai K, Tsuiki H, *et al.* Interleukin-1 beta induces the expression of lipocortin I mRNA in cultured rat cortical astrocytes. *Neuro Sci Res*, 2001, **40** (1): 53~ 60
- 10 Buckingham J C, Flower R J. Lipocortin I: a second messenger of glucocorticoid action in the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Mol Med Today*, 1997, **3** (7): 296~ 302
- 11 Podgorski M R, Goulding N J, Hall N D, *et al.* Autoantibodies to lipocortin I are associated with impaired glucocorticoid responsiveness in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 1992, **19** (11): 1668~ 1671
- 12 Brichory F M, Misk D E, Yim A M, *et al.* An immune response manifested by the common occurrence of annexin I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (17): 9824~ 9829
- 13 Solito E, de Coupade C, Canaider S, *et al.* Transfection of annexin I in monocytic cells produces a high degree of spontaneous and stimulated apoptosis associated with caspase-3 activation. *Br J Pharmacol*, 2001, **133** (2): 217~ 228
- 14 Sakamoto T, Repasky W T, Uchida K, *et al.* Modulation of cell death pathways to apoptosis and necrosis of H₂O₂-treated rat thymocytes by lipocortin I. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **220** (3): 643~ 647
- 15 Wu Y L, Jiang X K, Lillington D M, *et al.* Upregulation of lipocortin I inhibits tumor necrosis factor-induced apoptosis in human leukaemic cells: a possible mechanism of resistance to immune surveillance. *Br J Haematol*, 2000, **111** (3): 807~ 816
- 16 Violette S M, King I, Browning J L, *et al.* Role of lipocortin I in the glucocorticoid induction of the terminal differentiation of a human squamous carcinoma. *J Cell Phys*, 1990, **142** (1): 70~ 77
- 17 Croxtall J D, Flower R J. Lipocortin I mediates dexamethasone-induced growth arrest of A549 lung adenocarcinoma cell line. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (8): 3572~ 3575
- 18 Solito E, de Coupade C, Parente L, *et al.* Human annexin I is highly expressed during the differentiation of the epithelial cell line A549: involvement of nuclear factor interleukin 6 in phorbol ester induction of annexin I. *Cell Growth Differ*, 1998, **9** (4): 327~ 336

The Structural and Functional Characteristics of Annexin I *

ZHANG Li-Yong, ZHAO Xiao-Hang**, WU Min

(National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

Abstract Annexin I belongs to the annexins protein superfamily that comprises a multigene family of Ca²⁺ and phospholipid binding proteins. Annexins consist of a conserved C-terminal or core domain that confers Ca²⁺-dependent phospholipid binding and an N-terminal domain that is variable in sequences and length and responsible for the specific properties of each annexin. Annexin I is one of the structurally related, calcium-dependent, phospholipid-binding proteins that have been implicated in diverse cellular roles, including anti-inflammatory, signal transduction, cell differentiation, membrane aggregation, inhibiting the activity of cytosolic phospholipase A2, calcium channels and interaction with cytoskeletal proteins.

Key words annexin I, calcium/phospholipid-binding, membrane aggregation, signal transduction, anti-inflammatory, cell differentiation

* This work was supported by grants from The Special Funds for Major State Basic Research of China (G19980512), The State "863" High Technology R & D Project of China (2001AA227091 and 2001AA233061), The National Natural Science Foundation of China (39990570 and 30171049) and The Start Funds of The Ministry of Education for The Chinese Oversea Scholars.

** Corresponding author. Tel: 86-10-67709015 (O), 86-10-67778360 (L), E-mail: zhaoxh@pubem.cicams.ac.cn

Received: January 7, 2002 Accepted: March 4, 2002