维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1993年第18卷第3期

神经系统，蛋白，中间丝蛋白

(26)
246-249

三种新的神经特异性中间丝蛋白

病理生理教研室 周 兰 综述 范维珂 审校

Q71

中图分类号 Q71

中间丝家族的成员较多且在不断增加。从分子生物学角度可分为五类：Ⅰ类是酸性角蛋白（Acidic keratins, K1），Ⅱ类是碱性角蛋白（Basic keratins, K2），Ⅲ类包括结蛋白（Desmin, Des）、胶质纤维酸性蛋白（Glial fibrillary acidic protein, GFAP）、波形蛋白（Vimentin, Vim），Ⅳ类是神经微丝（Neurofilaments, NFs），Ⅴ类是核板蛋白（Nuclear lamins, Lam）。仅管类别不同，但都具有一个共同的结构模式：位于中央的α-螺旋杆状区及该区两端的头片（N末端区）和尾片（C末端区）。杆状区约由311～314个氨基酸组成，并以七肽重复即(abcdefg)n为基本结构，最后形成高度保守的二级结构（卷曲螺旋）。该区由两个非螺旋性的连接段分为三个亚区：Ia、Ib和II区，其中Ia区的第8～20位残基和Ⅱ区最后的30个残基是高度保守的。整个杆状区的保守性是所有中间丝共性的结构基础。两个末端在大小和化学特性上都是可变的，是中间丝个性的来源[1~5]。迄今中间丝蛋白的结构已较清楚，其具体的功能以及表达规律等还在进一步探索中。近年来，中间丝家族还不断有新的成员被发现。本文就新近发现的三种神经特异性中间丝蛋白在结构、表达规律及意义等方面的特征作一扼要综述。这三种蛋白是：α-相连蛋白（α-Internexin, α-Int）、外周蛋白（Peripherin, Per）和神经上皮干细胞蛋白（Nestin, Nes）[5~7]。

1. α-Int

用1%Triton X-100和0.1MNaCl从鼠视神经或脊髓轴突中提取NFs时，可同时得到α-Int，再经离子交换层析可将两者分开。SDS和IEF法测得该蛋白分子量为66KD，pI 7.8；它可被中间丝共同抗原的抗体所识别，但在NFs和GFAP能聚合成中间丝的条件下，它并不聚合成中间丝。因此被归为中间丝相关蛋白[8]，因其在原位和体外都能结合其它中间丝而得名[8]。1989年Fliegner等分离到编码该蛋白的cDNA，其有1500bp的可译框架，编码完整的300个氨基酸组成的α-Int多肽，而该蛋白的mRNA上还含有一个比可译框架更大（即2000bp）的3'端不译区，该区可能存在调节mRNA稳定性的序列。α-Int的DNA由三个外显子和两个内含子组成，结构上与Ⅳ型中间丝的DNA相一致[8,9]。从DNA序列估计该蛋白的分子量是55KD，pI5.9，与实际所测值有差异。但这种差异也见于NFs，如估计的NF-M分子量仅为实测值的65%[8]；将其预计的氨基酸序列与鼠的NF-M、NF-L、Per和仓鼠的Vim相比（见表1），可见它有典型的中间丝结构，其杆状区与其它中间丝的同源程度高，尤其I、和Ⅱ区，而头、尾片系高变区，同源性差[8]。因此作者认为它应该属于中间丝家族，其失败于重聚成丝可能是在提取过程中发生了不可逆的变性和/或降解；再对其序列作进一步比较后发现，仅

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 α-Int与其它中间丝蛋白的同源性（%）

	头片	杆状区	Ia	Ib	Ⅱ	尾片	总体
NF-M	33	54	69	44	65	18	44
NF-L	12	58	71	41	65	11	43
Per	24	56	60	51	64	14	46
Vim	22	57	62	49	65	13	47

管头、尾片总的说来与其它中间丝的同源性差，但其与NF$_a$则具有明显的相似性：头片中有一段由11个残基组成，其中10个与NF-M相应段相同；尾片富含谷、赖、丝和苏氨酸，其中一段与NF-M的同源性达68%，同时其尾片缺乏一种Ⅱ类中间丝蛋白所特有的丝球（Skein）残基，因此作者认为它不属于Ⅱ类，而是Ⅳ类中间丝蛋白[6]。

该蛋白是大脑特异的，成年的心、肺、肾、肌肉、胎盘、唾液腺和脾中均未检出。它的表达是否与Per有互补关系尚有待探索。用Northern印迹法检测鼠大脑总RNA发现，α-Int的表达高峰是在胚胎期。胚胎13天的鼠大脑总RNA中即可检出其mRNA，胚胎16天达高峰，以后渐降低至成年水平[6,8]。

2. Per

1982年，Portier等[7]首先报导了一种存在于培养的神经细胞中、并在分化良的神经母细胞瘤中更为丰富的蛋白质，分子量57KD；后来发现该蛋白只存在于外周神经细胞，而在许多非神经细胞以及大脑匀浆中不存在，因而认为它可能是外周神经细胞的特异标志，故名。1984年[7]又有报道该蛋白在PC-12（嗜铬细胞瘤）细胞、培养的交感神经细胞、神经母细胞瘤和外周神经节中存在，但非神经组织和大脑中不存在，并证明它是中间丝蛋白：它不溶于Triton、能被其特异抗体染成丝网状、为中间丝共同抗原的抗体所识别等，而SDS-PAGE、IEF和多肽图谱却显示了它与其它已知中间丝的区别。1988年Leonard等[10]发现该蛋白的mRNA在交感神经节中极丰富，在大脑中相对较少，而在非神经组织中检测不到；其相应的cDNA序列表明它编码的蛋白具有中间丝的结构特征，与其它中间丝的同源程度见表2[7]。表中反映出该蛋白不是与Ⅳ类而是与Ⅱ类中间丝最相似。最近Thompson和Ziff[7]克隆了鼠编码该蛋白的基因，发现其内含子类型也与Ⅱ类中间丝相似，而与Ⅳ类NFs相差甚远。这表明该蛋白属于Ⅱ类中间丝。它的头片中68%是丝和苏氨酸，从而构成了磷酸化的潜在位点。在神经生长因子和蛋白激酶A、C的激活物作用下，其磷酸化程度大增。这种翻译后修饰的存在对由环境信号调节Per的功能特性提供了可能性。

表2 Per与其它中间丝的同源性（%）

	头片	Ia	Ib	Ⅱ	尾片	总体
Des	35	79	58	77	44	61
Vim	22	76	55	79	41	55
NF-M	25	55	44	53	13	37
K2	24	52	27	38	5	27
Lam	5	15	24	38	0	20

迄今，通过原位杂交等方法发现的可表达Per的神经细胞有：交感及副交感神经细胞、后根神经节细胞、肠神经细胞、前角运动神经细胞、颅神经Ⅲ～Ⅷ、Ⅹ和Ⅻ的运动核、齿状核、红核、内外侧前庭复合体、古登氏盖核、嗅觉上皮和视网膜神经节细胞[7]。关于其表达规律有下面几种观点：1. Per的表达与细胞的胚胎起源和功能无关，而取决于细胞环境，尤其是纤维母细胞的存在；2. 表达Per的细胞的共性在于它们的轴突都延伸到脑与髓轴以外；3. Per与Vim的表达一样，与神经原的生长发育有关。在神经细胞分化期，Vim在NFs表达前呈一过性表达，而Per则与NFs三联蛋白共存于成熟的外周神经细胞和一些中枢神经系统的神经核中。外周神经变性期间，Per增加而NF-L减少[7,10~12]。至于它的功能尚不清楚。据报道[7]，因其结构尤其是尾片与NFs不同，因

维普资讯 http://www.cqvip.com

而功能也可能不同，它可能与胞浆膜间有互相作用。

3. Nes

Lendahl等[5]在研究鼠的Nes后发现，该蛋白的基因除多聚(A)尾片外有594 bp。在+127和+160位各有一潜在的始动密码子。如果第一个甲硫氨酸是始动密码子，则其可编码的序列是5415bp。这个数目与Nes被估计的200KD的分子量相符合（由SDS-PAGE实测的分子量是210KD)。该基因上有三个内含子，分别在第912、1058和1111位，它所编码的产物Nes完全符合中间丝的结构模式[3~5]：杆状区由307个氨基酸组成（7～314位），并以七肽重复为基本结构。该区与其它中间丝蛋白相应区的同源程度见表，即在16～29%之间。这与不同类的中间丝之间的同源程度是一致的，如NF-H与Vim在杆状区的同源性为37%，但又不及同类中间丝之间的同源程度，如Vim与Des在该区的同源性达77%。因此作者认为它不属于已有类别的中间丝，而是新的一类即Ⅵ类中间丝蛋白[3,5]。其头片由11个氨基酸组成，较其它中间丝短，如Vim是74个氨基酸[4,5]；尾片较长，有高密度的电荷，富含谷、赖氨酸，基本结构是以11个氨基酸的重复即（S/P-L-L-E/K-E-X-Q-L-S/L-L-R)n，其中划线位置的氨基酸是高度保守的，该区约有35个这样的重复(512～1050)，这与NFs的该区是相似的[5,12]。

表3 Nes杆状区与其它中间丝相应区的同源性(%)

	K1	K2	GFAP	NF-H	Lam
Nes	21	30	29	24	16

Nes在成年的鼠大脑中是不存在的，其主要表达在胚胎期多潜能的神经干细胞中，此乃大脑中许多细胞的祖先。但随着分化末期的到来，Nes渐减少，终至完全消失，同时分化定型的细胞则表达其特异的Ⅲ、Ⅳ类中间丝。另外，放射状的胶质细胞（以后分化为星形胶质细胞）中也有Nes，表明它可能也是神经细胞的祖先[5]。Takashi等[14]用凝胶电泳、免疫印迹以及免疫组化方法研究了Nes在人胚胎的神经上皮细胞和人神经上皮肿瘤细胞中的表达后认为：人的Nes与鼠的Nes在生化特性和免疫化学特性上是相似的，唯分子量略低于240KD的鼠Nes；在表达特异性上也与鼠Nes基本相同即表达在胚胎早期的神经上皮干细胞中，而分化成熟的神经细胞中不存在，如在6周龄的人胚胎脊髓中的多能干细胞和放射状胶质纤维表达Nes，而神经母细胞中不含Nes；17周龄时，Nes表达明显减少；20周龄时，除血管细胞阳性外，其余细胞中的Nes全部消失。可见Nes在正常发育的人、鼠中枢神经系统细胞中的表达是特异而短暂的。仅管这种表达的机制尚不明了，但我们可以Nes为标志区别神经管中的干细胞和已进一步分化的细胞，从而探索大脑中许多不同类型细胞的产生机制[5,12]。至于血管细胞一直到发育成熟都表达Nes这点，以前未见报道，作者认为可能是因为用70%乙醇代替常规的甲醛来固定组织标本的缘故[15]。另外，发育中的骨骼肌也在低水平上表达Nes。据报道，发育中的神经组织和骨骼肌可能有一种出人意料的亲缘关系：鼠胚胎癌细胞株P19在视黄酸的诱导下可分化为神经细胞或骨骼肌细胞，这仅取决于视黄酸的浓度；在髓母细胞瘤中有兼具神经、肌肉特征的细胞。因此，Nes阳性细胞在肌肉发育过程中的存在也是可理解的。其它成年组织中未发现Nes[5,14]。

相对于在正常神经上皮干细胞中的严格特异的分布，Nes在中枢神经系统的大多数肿瘤中则普遍存在，如大多数的原始神经内胚层肿瘤（PNETs)、胶质瘤尤其是形态学上最幼稚、行为上恶性度最高的胶质瘤含量更丰富。Nes在中枢神经系统肿瘤中的表达情况见表1、3。Nes的这一特征类似Vim，

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 4　大脑肿瘤细胞株的免疫荧光检测

	Nes	Vim	GFAP	NF-L	NF-M	NF-H
PNETs 细胞株						
Daoy	−	+	−	−	−	−
D283 Med	+	+	−	+	+	+
D341 Med	+	+	−	−	+	+
D384 Med	+	+	−	+	+	+
D425 Med	+	+	−	+	+	+
D458 Med	+	+	−	+	+	+
CHP 707m	+	+	−	+	−	−
胶质瘤细胞株						
U251 MG	+	+	+	−	−	−
U373 MG	+	+	+	−	−	−

表5　大脑肿瘤的免疫酶染色

	总例数	阳性例数	阳性程度
PNETs	15	12	+～++
星形胶质细胞瘤	7	5	++～+
室管膜瘤	6	6	+～++
神经节神经胶质瘤	2	2	++
脑膜瘤	2	2	+～++
脉络膜丛乳头状瘤	2	0	/

其意义尚不明了[13]。

Nes在胞内的分布与Vim相似：纤维柔曲似波浪，以核为中心呈放射状延伸。两者在一些部位可共存；主要区别在于Vim向外延伸的程度大于Nes，Nes 对秋水仙素的反应也类似Vim 和 NFs 即在核周的分布更明显[4,6]。

至于其功能，尚未彻底明了。但它出现在中枢神经系统发育的早期，而此时正值细胞运动和细胞形态形成的高潮和关键时期，因而推测其可能与适应这些特殊的结构变化有关，如神经板的卷曲等[5]。

综上可见，目前对这三种中间丝蛋白已有一定认识，但基本上都限于其结构、表达的时间及部位等方面，而对调节其表达的机制以及它的功能、病理意义等所知甚少，有待进一步探索。

参 考 文 献

[1] Steinert P.M. and Liem R.K.H. Cell 1990; 60:521

[2] Steinert P.M. et al. Cell 1985; 42:411

[3] Geisler N. and Weber K. Cell and Molecular Biology of Cytoskeleton. Edited by Jerry W.S. 1986; pp41

[4] 周兰，范维珂. 免疫学杂志 1990; 6:57

[5] Lendahl U., etal. Cell 1990; 60:585

[6] Fliegner K.H., et al. EMBO J. 1990; 9:749

[7] Lloyd A.G. Trends Neurosci 1989; 12:228

[8] Joel S.P. and Ronald K.H.L. J.Cell Biol. 1985; 101:1316

[9] Ching G.Y. and Liem R.K. J.Cell Biol. 1991; 115:397a(2302)

[10] Leonard D.G.B., et al J.Cell Biol. 1988; 106:181

[11] Escurat M., et al. J.Cell Biol. 1991; 115:396a(2296)

[12] Hall C.M. and Schechter N. Neurosci. 1991; 41:695

[13] Takashi T., et al. Lab. Invest. 1992 66:303

[14] Jones-Villeneuve E.M.V., et al. J.Cell Biol. 1982; 94:253

(收稿日期 1992-10-22)