

文章编号: 1004-0374(2010)03-0267-05

凝溶胶蛋白及其生物医学作用

李明娟, 闵锐*

(第二军医大学海军医学系放射医学教研室, 上海 200433)

摘要: gelsolin(凝溶胶蛋白)有胞浆和血清二型, 分别存在于哺乳动物各类细胞和血清中。该蛋白的基本生物功能是以钙依赖的方式通过切断、封端肌动蛋白丝, 或使肌动蛋白聚集成核等方式控制肌动蛋白的结构。大量动物实验和临床研究均表明, gelsolin 的结构、功能及调节与烧伤和急性挫伤的诊断与治疗, 以及某些炎症、肿瘤和淀粉样变等多种疾病的病理过程密切相关。作为一种急症治疗药, 该蛋白的工程化产品已在美国进行 II 期临床实验。最近发现正常细胞经电离辐射后, gelsolin 的表达水平发生显著改变, 其在辐射效应中的作用和意义值得关注。

关键词: gelsolin; 结构; 功能; 辐射损伤

中图分类号: Q51; Q518.1 **文献标识码:** A

Gelsolin and its biomedical functions

LI Ming-juan, MIN Rui*

(Division of Radiation Medicine, Department of Naval Medicine,
Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Gelsolin exists as a cytoplasmic and a plasma isoform, distributing in many mammal cells and plasma respectively. The gelsolin controls actin organization by severing filaments, capping filament ends and nucleating actin assembly. Lots of animal experiments and clinical studies have shown that gelsolin is linked to many pathological conditions such as acute trumma and infection, inflammation, cancer and amyloidosis due to its structure and functions. As an engineering product in acute syndrome treatment, II stage clinical trail of gelsolin is going now in USA. It has been recently reported that marked alteration in expression-levels of gelsolin in cells occurs after exposed to radiation, and its role and significance are worthy of further study.

Key words: gelsolin; structure; biological functions; radiation injury

1 Gelsolin的结构和调节

Gelsolin是一进化保守的蛋白质超家族, 普遍存在于各类细胞和血液中, 共有7种蛋白组分, 分别为凝溶胶蛋白(gelsolin)、绒毛蛋白(villin)、微丝切割蛋白(adseverin)、G帽蛋白(capG)、绒毛蛋白样蛋白(advillin)、超绒毛蛋白(supervillin)和flightless-I。哺乳动物体内编码gelsolin蛋白的基因定位于9q33, 长约70 kb, 含有至少14个外显子^[1], 所编码的7种蛋白中都含有3个或6个称为gelsolin-like(G)结构域的同源重复序列。Gelsolin蛋白由6个同源的结构相似的片段(S1~S6)组成, 其结构见图1。其中S3与S4之

间有1个长的链状连接, 与细胞凋亡相关的Caspase-3可以从此处将其切断, 一分为二。S1和S4可以结合actin(肌动蛋白)单体, S2只能结合actin微丝, 但具有磷脂酰肌醇二磷酸(polyphosphoinositide 4, 5-bisphosphate, PIP₂)的结合位点^[2]。Ca²⁺的结合位点分别存在于S1、S4和S6片段。Gelsolin的C端片段(G4~6)与gelsolin的钙依赖性相关, 在一定浓度钙离子存在的条件下会诱发C端片段结构的重排, 以便对actin进行切割与封端^[3]。

收稿日期: 2009-08-25; 修回日期: 2009-10-14

*通讯作者 E-mail: minrui021@hotmail.com

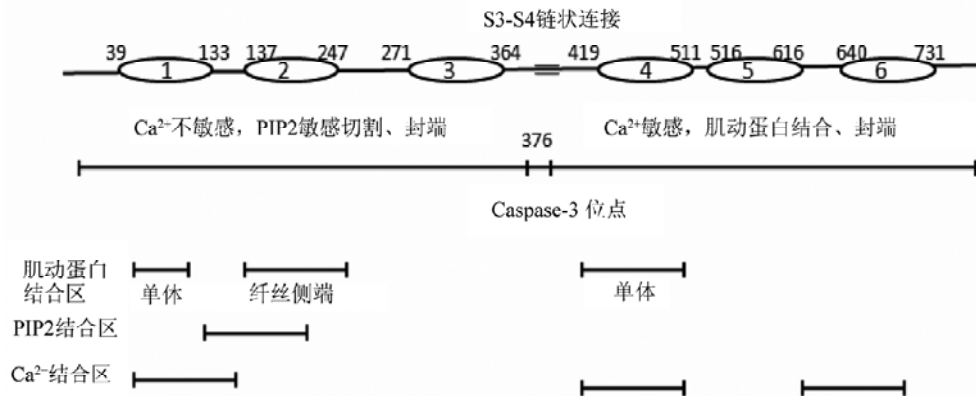


图1 Gelsolin的结构功能结构域 Actin、 PIP_2 、 Ca^{2+} 的结合区域

在动物组织内gelsolin至少以两种不同形态存在：胞浆gelsolin (cytoplasmic gelsolin, cGSN) 和血浆gelsolin (plasma gelsolin, pGSN)。两种蛋白都由9号染色体上的同一基因编码，通过不同的转录起始位点产生两种不同编码的mRNA，最终导致胞浆gelsolin和血浆gelsolin的功能差异^[4]。Gelsolin蛋白具有5个半胱氨酸残基，在cGSN中5个半胱氨酸都以自由巯基的形式存在，而在pGSN中只有三个半胱氨酸以自由巯基的形式存在，另二个半胱氨酸残基在结构域的188与201位氨基酸之间以二硫键连接。cGSN是一种胞内的肌动蛋白结合蛋白，正常状况下的循环量为190~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。血中pGSN的循环量一般在200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 左右，但相对于胞浆cGSN，血中pGSN的病理作用更加重要^[5]。

目前认为体内存在有两种调控gelsolin的机制。钙离子可以活化gelsolin，继而使gelsolin发挥对actin纤维的切断、封端作用；而细胞膜上的 PIP_2 反过来却可以让gelsolin失去活性。 PIP_2 的水解作用可使gelsolin释放到胞浆内，并激活钙的调节^[6]。蛋白质晶体学方法分析不同结构域上钙离子的结合位点表明，1个gelsolin可以与6个钙离子结合。不同的结

构域上gelsolin结合actin的性能也是不同的。在钙离子不存在时，gelsolin以一种折叠的结构存在，此时因为S4、S6片段被折叠，且延伸的 β 转角有阻碍作用，使得gelsolin不能与actin结合。当钙离子存在时，gelsolin的构象发生改变，使得结合actin的位点暴露出来。研究证明，能引起gelsolin发生构象改变的钙离子浓度约在 $3 \times 10^{-7} \sim 10^{-6}$ mol/L范围^[7]。

2 Gelsolin的主要生物功能

2.1 与肌动蛋白的作用和对细胞运动的调节

Gelsolin与肌动蛋白相互作用可以对肌动蛋白丝产生聚合、解聚和剪切等生物效应。当摩尔浓度的钙离子存在时，gelsolin可以切断肌动蛋白纤维并对纤维封端，进而阻止单体肌动蛋白添加到纤维的倒刺末端。如图2所示。沉降分析发现，将F-actin与表达C端片段(G4~6)的大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*) 4°C下混合8 h，离心上清液中的actin含量显著高于不表达C端片段(G4~6)的对照组，说明C端片段(G4~6)与actin的降解有关^[8]。

由于gelsolin能够介导肌动蛋白丝的重组，因而可参与多种与细胞骨架重排相关的细胞进程。有

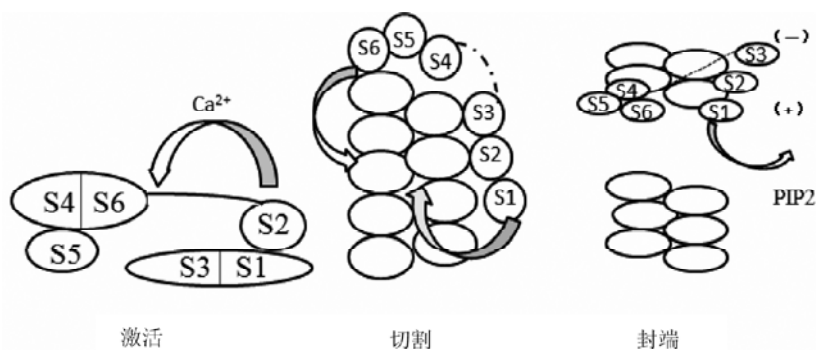


图2 Gelsolin 激活、切割和封端肌动蛋白纤维模型

证据显示, gelsolin及相关蛋白在调控血小板形成和活化过程中起重要作用^[9]。近期研究还发现, gelsolin促进的滑膜纤维原细胞骨架的重排可能是风湿性关节炎的新的病理决定因子^[10]。Gelsolin基因敲除小鼠, 破骨细胞运动性会显著降低, 从而阻碍破骨细胞形成细胞黏附结构, 表明gelsolin与细胞的运动性相关^[11]。Gelsolin对造血干细胞和支气管上皮细胞运动性的调节实验均进一步证实gelsolin对细胞运动性的调节作用^[12]。可见, gelsolin在维持细胞活力和actin的动力学过程中发挥着重要作用。

2.2 Gelsolin与细胞凋亡

有关gelsolin对细胞凋亡的调节作用仍存在争议。有实验发现, 在细胞凋亡过程中发挥核心效应的caspase-3蛋白酶是gelsolin的靶蛋白之一。Gelsolin可以通过不同的机制抑制效应caspase的活性及其激活过程 (1) 细胞过表达gelsolin可以阻止caspase-3的激活; (2) 用无细胞体系研究细胞凋亡的过程表明gelsolin与PIP₂、caspase-3形成的复合物可以抑制caspase-3的活性, 同时体内gelsolin和PIP₂所形成的复合物与细胞凋亡的延迟发生有关联 (3) gelsolin过表达可以阻断受凋亡因子刺激的Jurkat 细胞线粒体膜电位的丢失和细胞色素C的释放, 阻断caspase激活的信号转导途径, 使效应蛋白caspase无法激活。因此, 认为gelsolin可能会通过抑制效应酶caspase的活性来抑制细胞的凋亡。也有研究发现gelsolin的N端片段具有促进细胞凋亡的潜能。缺失gelsolin的细胞能够延迟细胞凋亡的发生, 而且瞬间过量表达gelsolin N端片段则能够诱发细胞凋亡。此外, gelsolin N端片段也能介导干扰素- α 诱发的细胞凋亡^[13]。鉴于程序细胞死亡可由细胞内外因素诱导, 内源性诱导可由内源性活性内切酶的激活使DNA断裂而致, 而内切酶介导DNA断裂有酶依赖和非酶依赖两种方式, 酶依赖途径包括三步级联反应: 首先, 来自于细胞内或外的死亡信号诱发内质网应激, 继而激活caspase-12; 其次, 死亡信号诱发线粒体应激, 刺激细胞色素c的释放, 然后激活caspase-9; 最后, caspase-8激活。这三步级联反应都会激活caspase-3, 继而使下游的一些靶蛋白裂解。值得注意的是gelsolin也是caspase-3下游的靶蛋白之一, caspase-3可从Asp352与Gly353之间裂解gelsolin^[14]。另一方面, DNaseI是细胞凋亡时一种重要的DNA降解酶, 完整的gelsolin会与actin、DNaseI非竞争性的结合成为gelsolin/actin/

DNase I三元复合物。这种复合物以完整形式存在时会抑制核的易位及DNaseI酶的活性。然而gelsolin被caspase-3从S3、S4部位裂解后, 其N端片段能够打断actin与DNase I间的连接, 竞争性地与actin结合, 释放出DNaseI酶, 因而在一定程度促进了DNA断裂, 最终导致细胞凋亡。Li等^[15]详尽阐述了gelsolin在心梗后血管重塑中的作用, 并通过gelsolin基因缺失小鼠和野生型分别通过左前降冠状动脉结扎而制作的对照模型, 证实了gelsolin能够刺激细胞凋亡。肿瘤坏死因子(TNF)在很多细胞, 包括MCF-7细胞中都可以引起细胞凋亡, 研究者证实, 在抗TNF并敲除掉gelsolin基因的MCF-7细胞系中, 加入外源性的gelsolin可以恢复TNF诱导细胞死亡的活性, 表明TNF诱导的凋亡需要gelsolin的参与^[16]。作为caspase-3、-7和-9等的底物, gelsolin的表达水平在很多癌症患者血浆中都是下降的, 这可能因为癌症是以逃避细胞凋亡为特征的。或许在应激条件下, 抑制gelsolin的活性可以保护细胞的活力, 而在增殖状态下应该选择性地激活gelsolin的活性。

2.3 肿瘤细胞中gelsolin的表达

一般认为, gelsolin在肿瘤发生过程中起到负调节的作用, gelsolin与肌动蛋白切割蛋白的过表达能消除肿瘤的发生。有实验证明, 敲除gelsolin基因能够促使人乳腺上皮细胞转变为间叶细胞, 从而导致人乳腺癌的发生^[17]。在多种肿瘤细胞中(肠癌细胞、膀胱癌细胞、乳腺癌细胞、肺癌细胞及前列腺癌细胞)均已发现gelsolin的表达量呈下降趋势^[18]。但也有部分研究表明, gelsolin在肿瘤发生过程中起到正调节的作用。Gelsolin水平的下调能够减弱癌细胞的侵袭能力^[19]。从口腔鳞状细胞癌的发展过程的不同阶段分别检测gelsolin的表达水平, 结果表明, 在癌前阶段会伴随着gelsolin水平的下降, 但是当癌症继续发展到初级及转移癌时, gelsolin的水平又会明显上调。局部侵袭能力的增强、肿瘤的大小都与gelsolin的高表达相关联^[20]。

癌细胞的局部侵袭与远端转移是临床癌症治疗的最大挑战, 而侵袭与转移都与细胞的移动能力相关, 影响细胞移动能力的最重要因素就是细胞骨架的重组。Gelsolin是一种细胞骨架的调控蛋白, 参与肌动蛋白(actin)的切割或组装, 完成细胞骨架重新排列的功能。而且gelsolin也参与调控细胞的型能维持、分化, 以及凋亡、抑制细胞的增生等作用。

然而, gelsolin也许还会以更多未知的角色发挥对细胞的影响, 其在肿瘤发生过程中的确切作用及机制尚需进一步研究阐明。

2.4 急性损伤中gelsolin水平的变化

现已发现 pGSN 在急性肺损伤, 如急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)、细菌性肺炎、疟疾感染引起的多脏器衰竭以及急性肝损伤(如急性肝炎)中的表达明显降低。血浆中gelsolin可作为严重创伤后早期预后的标志物。严重创伤后, 血浆gelsolin浓度明显降低者易发生急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[21]。造血干细胞移植后血浆gelsolin浓度降到100 mg/L以下时, 发生致死性自发性肺炎综合征的危险性大大高于血浆gelsolin浓度维持在适度水平的患者^[22]。在研究干细胞移植后gelsolin表达水平下调所具有的预后诊断意义时, gelsolin表达水平之所以下调可能是因为死亡细胞中释放出的胞浆肌动蛋白会对肺内皮细胞产生直接的毒害作用, 阻碍肺的微循环。凝溶胶蛋白和Gc-球蛋白是血浆肌动蛋白的结合蛋白, 与actin结合后形成的复合物会很快从循环中清除掉, 因此具有改善微循环的作用。体外实验证明, 哮喘患者的支气管肺泡灌洗液中gelsolin和IL-4的浓度均升高, 表明gelsolin可能会通过分解炎症过程中由濒死细胞释放的大量F-actin来提高哮喘患者气道表面黏液的流动性, 在辅助黏液层维持自然免疫等方面起某种作用^[23]。虽然肌动蛋白清除蛋白能在减弱细胞外肌动蛋白导致的病理损伤方面能起到一定作用, 但严重组织损伤导致的大量肌动蛋白释放可严重削弱这种系统防御能力。

3 Gelsolin 与辐射损伤

电离辐射通过射线的直接作用和自由基的间接作用导致分子和细胞发生改变进而产生不同的效应。DNA、蛋白质和细胞的膜和网状结构都是细胞的重要辐射敏感靶。辐射对上述靶物质的直接和间接作用都可能使细胞丧失功能直至死亡。Gelsolin作为细胞中大量存在并与细胞结构功能相关的重要蛋白, 在辐射效应中的作用应值得关注。研究表明, 将CBA/CaJ小鼠置于0或3 Gy¹³⁷Cs γ 射线照射, 用二维电泳和质谱分析法进行蛋白表达谱的分析对比, 发现照射组中gelsolin是表达水平发生显著变化的蛋白之一^[24]。Rithidech等^[25]发现, 在辐射诱发的急性白血病CBA/CaJ小鼠模型中, 其血清

gelsolin表达水平较对照组明显下降, 说明血浆中的gelsolin与辐射损伤存在一定的关联, 推测gelsolin具有作为监测辐射诱导的急性白血病的蛋白标记的潜能。其他方面也有实验证明, 在活性氧应激引起的急性肺损伤中, 小鼠体内的血浆gelsolin水平会有很大的下降^[26]。

另外, 从gelsolin的结构看, cGSN和pGSN中分别有五个和三个半胱氨酸是自由巯基, 巯基本身具有清除自由基和抗氧化的性能。Gelsolin结构中的自由巯基残基也很容易被氧化, 能够导致瞬态分子二硫键的形成。氧化应激条件下gelsolin的表达水平增加说明它可能是具有抗氧化的功能^[27]。

电离辐射还可通过破坏细胞膜骨架而影响细胞的功能。微丝是细胞骨架结构中最细的结构, 参与维持细胞形态、细胞间紧密连接, 且与细胞外基质附着有关, 主要由肌动蛋白组成, 以游离球状肌动蛋白(G-actin)或纤维状(F-actin)形式存在。体外试验表明, 电离辐射可破坏细胞微丝网络, 直接破坏融合的内皮细胞的屏障^[28]。人呼吸道上皮细胞株alu3和16HBE140经2~10 Gy照射后, F-actin含量明显减少, 细胞内肌动蛋白不全晶体(actin paracrystals)增多, F-actin解聚增加。细胞骨架组成的这种变化影响了细胞间连接, 导致细胞间间隙形成, 通透性增加^[29]。Kantak等^[30]在研究电离辐射对肺微血管内皮细胞的影响中发现, 低辐射剂量下, 血管内皮细胞F-actin的解聚随着剂量的增加而增加, 并且这种解聚呈剂量依赖性。Gelsolin在细胞凋亡、抗感染和各种急性损伤中表现出的抗氧化和改善微循环的生物功能和作用表明, 其在辐射损伤中的作用值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Silacci P, Mazzolai L, Gauci C, et al. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell Mol Life Sci*, 2004, (61): 2614-23
- [2] Ashish, Paine MS, Perryman PB, et al. Global structure changes associated with Ca²⁺ activation of full-length human plasma gelsolin. *J Biol Chem*, 2007, 282(35): 25884-92
- [3] dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, et al. Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev*, 2003, 83(2): 433-73
- [4] Lee PS, Waxman AB, Cotich KL, et al. Plasma gelsolin is a marker and therapeutic agent in animal sepsis. *Crit Care Med*, 2007, 35(3): 849-55
- [5] Yin HL, Kwiatkowski DJ, Mole JE, et al. Structure and biosynthesis of cytoplasmic and secreted variants of gelsolin.

- J Biol Chem, 1984, 259(8): 5371-6
- [6] McGough AM, Staiger CJ, Min JK, et al. The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures, versatile functions. FEBS Lett, 2003, 552(2-3): 75-81
- [7] Khaitlina GS, Hinssen H. Ca-dependent binding of actin to gelsolin. FEBS Lett, 2002, 521: 14-8
- [8] Pope B, Maciver S, Weeds A. Localization of the calcium-sensitive actin monomer binding site in gelsolin to segment 4 and identification of calcium binding sites. Biochemistry, 1995, 34(5): 1583-8
- [9] Barkalow KL, Falet H, Italiano JE Jr, et al. Role phosphoinositide 3-kinase in Fc γ RIIA-induced platelet shape change. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 85(4): C797-805
- [10] Aidinis V, Carninci P, Armaka M, et al. Cytoskeletal rearrangements in synovial fibroblasts as a novel pathophysiological determinant of modeled rheumatoid arthritis. PLoS Genet, 2005, 1(4): e48
- [11] Chellaiah M, Kizer N, Silva M, et al. Gelsolin deficiency blocks podosome assembly and produces increased bone mass and strength. J Cell Biol, 2000, 148(4): 665-78
- [12] Lader AS, Lee JJ, Cicchetti G, et al. Mechanisms of gelsolin-dependent and -independent EGF-stimulated cell motility in a human lung epithelial cell line. Exp Cell Res, 2005, 307(1): 153-63
- [13] Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science, 1997, 278: 294-8
- [14] Kothakota S, Azuma T, Reinhard C, et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. Science, 1997, 278(5336): 294-8
- [15] Li GH, Shi Y, Chen Y, et al. Gelsolin regulates cardiac remodeling after myocardial infarction through DNase I-mediated apoptosis. Circ Res, 2009, 104(7): 896-904
- [16] Li Q, Ye Z, Wen J, et al. Gelsolin, but not its cleavage, is required for TNF-induced ROS generation and apoptosis in MCF-7 cells. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(2): 284-9
- [17] Tanaka H, Shirkoobi R, Nakagawa K, et al. siRNA gelsolin knockdown induces epithelial-mesenchymal transition with a cadherin switch in human mammary epithelial cells. Int J Cancer, 2006, 118(7): 1680-91
- [18] Noske A, Denkert C, Schober H, et al. Loss of gelsolin expression in human ovarian carcinomas. Eur J Cancer, 2005, 41(3): 461-9
- [19] Van den Abbeele A, De Corte V, Van Impe K, et al. Downregulation of gelsolin family proteins counteracts cancer cell invasion *in vitro*. Cancer Lett, 2007, (225): 57-70
- [20] Shieh DB, Chen IW, Wei TY, et al. Tissue expression of gelsolin in oral carcinogenesis progression and its clinicopathological implications. Oral Oncol, 2006, 42(6): 599-606
- [21] Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, et al. Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(51): 1673-8
- [22] DiNubile MJ, Stossel TP, Ljunghusen OC, et al. Prognostic implications of declining plasma gelsolin levels after allogeneic stem cell transplantation. Blood, 2002, 100(13): 436
- [23] Candiano G, Bruschi M, Pedemonte N, et al. Gelsolin secretion in interleukin-4-treated bronchial epithelia and in asthmatic airways. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172: 1090-109
- [24] Rithidech KN, Honikel L, Rieger R, et al. Protein-expression profiles in mouse blood-plasma following acute whole-body exposure to (137)Cs γ rays. Int J Radiat Biol, 2009, 85(5): 432-47
- [25] Rithidech KN, Honikel L, Simon SR. Radiation leukemogenesis: a proteomic approach. Exp Hematol, 2007, 35(4 Suppl 1): 117-24
- [26] Lina Ji, Chauhan A, Muthaiyah B, et al. Gelsolin levels are increased in the brain as a function of age during normal development in children that are further increased in down syndrome. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2009, 23(4): 319-22
- [27] Christofidou-Solomidou M, Scherpereel A, Solomides CC, et al. Changes in plasma gelsolin concentration during acute oxidant lung injury in mice. Lung, 2002, 180(2): 91-104
- [28] Kantak SS, Diglio CA. Radiation induced endothelial cell retraction *in vitro*: correlation with acute pulmonary edema. Pathol Oncol Res, 1999, 5(1): 49-55
- [29] Savla U, Waters CM. Barrier function of airway epithelium: effects of radiation and protection by keratinocyte growth factor. Radiat Res, 1998, 150(2): 195-203
- [30] Kantak SS, Diglio CA, Onoda JM. Low dose radiation-induced endothelial cell retraction. Int J Radiat Biol, 1993, 64: 319-28