

· 综 述 ·

RTN3 与细胞凋亡

项 荣^{1,2}, 谭志平^{2*}, 林云婷¹, 江 琛¹

(1. 中南大学 生物科学与技术学院 细胞生物学系, 中国湖南 长沙 410013 ;
2. 中南大学 湘雅二医院, 中国湖南 长沙 410011)

摘 要: RTN3 是 RTN 家族的成员之一, 因其主要定位于内质网, 所以用 reticulon 来命名. RTN3 与 RTN4B 是 RTN 家族中目前已知的、唯一一对具有凋亡诱发功能的基因. 过表达的 RTN3 介导了真核细胞的三大凋亡信号转导通路: 死亡受体途径、线粒体途径、内质网途径, 并使之交联形成凋亡调控网络; RTN3 可与 RTN4B 相互作用, 形成同源或异源二聚来调控细胞凋亡. 另外, 过表达 RTN3 还参与了细菌的类凋亡作用. RTN3 广泛表达于多种组织, 其过表达诱发凋亡的机制的总结将让人们更好的了解 RTN3 及其家族, 完善细胞凋亡的信号转导研究.

关键词: RTN3; 凋亡; 信号转导

中图分类号: Q291

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2010)01-0080-05

Apoptosis Induced by RTN3

XIANG Rong^{1,2}, TAN Zhi-ping^{2*}, LIN Yun-ting¹, JIANG Chen¹

(1. Department of Cell Biology, School of Biological Science and Technology, Central South University, Changsha 410013, Hunan, China; 2. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, Hunan, China)

Abstract: RTN3, a protein located in endoplasmic reticulum which could induce cell apoptosis, is a member of RTN family. RTN3 and RTN4B are known as the only pair having apoptosis-inducing function in RTN family in present. Over-expressed RTN3 takes part in death receptor-mediated pathway, mitochondrial pathway, endoplasmic reticulum pathway, and regulates the network of these three pathways. The apoptosis-inducing activity of RTN3 and RTN4B in normal cell line is regulated by their homodimerization or heterodimerization. At the same time, RTN3 induced cell death of bacteria. For the widespread expression of RTN3, the current state of knowledge about RTN3 and its mechanism on apoptosis are introduced. The study on RTN3 and its family will be beneficial to the understanding on the cell signal transduction of apoptosis.

Key words: RTN3; apoptosis; cell signal transduction

(Life Science Research, 2010, 14(1): 080~084)

细胞凋亡(cell apoptosis)是一种由基因控制的, 自发、主动、有序的细胞死亡过程, 其中涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用. 细胞凋亡是生物体进化、维持内环境稳定、多细胞生物生长和发育所必须的生理过程. 很多研究表明内质网定位的 Reticulon3(RTN3)作为 Reticulon

(RTN)家族中的一位成员, 能够诱导细胞凋亡, 现就近年来 RTN3 及其凋亡诱发机制的研究进展综述如下.

1 RTN3 与 RTN 家族

Wieczorek 等 1991 年从成年小鼠脑的 cDNA

收稿日期: 2009-05-05; 修回日期: 2009-06-27

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30800476); 教育部博士点基金新教师项目(422201027)

作者简介: 项荣(1977-), 女, 湖南长沙人, 中南大学讲师, 博士, 博士后, 主要从事细胞信号转导研究, Tel: 0731-82650418, E-mail: shirlesmile@yahoo.com.cn; * 通讯作者: 谭志平(1976-), 男, 湖南茶陵人, 中南大学湘雅二医院助理研究员, 博士, Tel: 0731-85292178, E-mail: tanzhiping@yahoo.com.cn

©mail 1007-7847@lscn.cn Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

文库中找到一个新的 cDNA 克隆,命名为 Cl-13^[1]. 随后,在成人脑 cDNA 文库中克隆出 3 个与鼠 Cl-13 同源性很高的转录本. 鉴于这些基因主要在具有神经内分泌性质的细胞中高度表达,它们分别被命名为 NSP-A、NSP-B、NSP-C (neuroendocrine specific protein, NSP),起初被作为神经内分泌特异性蛋白和神经内分泌分化的标记. 然而,随着新的与 NSP 家族同源的基因被克隆,分析其组织表达谱发现:它们不局限在神经内分泌组织中特异表达,在骨骼肌、外周血的白细胞、小肠、结肠等组织中都有一定的表达,特别是 RTN3 和 RTN4 广泛表达于各种组织,显然 NSP 这个名字不再适用,而免疫组化发现这些基因所编码的蛋白质均为内质网定位蛋白,所以易名为 Reticulon (RTN). 目前已发现的人 RTN 基因家族有 RTN1 (NSP-A、B、C)、RTN2 (RTN2-A、B、C)、RTN3 / HAP、RTN4 (Nogo-A、B、C) 四大类^[2],该家族蛋白陆续被证明承担着很多重要的生理功能,如膜转运、蛋白分泌、血管重建等^[3-6].

1999 年,Moreira^[7]等首先从视网膜黄斑和外周组织克隆出了 RTN3,这种 RTN 家族成员在视网膜黄斑中的 mRNA 水平大约 3 倍于外周视网膜. 2003 年,齐兵^[8]等通过酵母双杂交的方法从人胚肺细胞系 (WI-38)cDNA 文库中筛选 ASY/Nogo-B 相互作用蛋白时克隆到了 RTN3,当时称为 HAP(homologue of asy protein),随后对 RTN3 / HAP 凋亡诱发作用及机制等进行了深入研究. 与 RTN 家族的其他成员一样,RTN3 也具有两个高度同源的 C 端疏水区和内质网定位信号^[9],广泛表达于人体的各种组织,在脑组织中表达水平最高.

RTN3 的功能研究表明,RTN3 参与膜转运、蛋白分泌^[3,5,10]等方面的过程,有研究预测 RTN3 / HAP 蛋白可能与本身或其他蛋白(如 RTN4B / ASY 蛋白)形成多聚体而行使钙通道的功能,可能是内质网上潜在的钙离子通道或其组分^[11]. 而目前较多的研究小组侧重于关注 RTN3 与细胞凋亡的关系.

2 RTN3 与细菌的程序性死亡

细菌作为单细胞生物体,国际上对其死亡已经进行了广泛的研究. 传统观点认为细菌不存在凋亡,但近年在大肠杆菌基因组中发现了凋亡系

统,而且其他细菌个体的细胞或细胞群体在其生活周期中也可能和真核生物一样存在着程序性死亡现象,最终为种群的其他细胞的存活和整个种群的延续提供条件^[12]. 在某些较高等的原核生物如粘细菌的生活史中,细胞的分化发育行为是多细胞性的,小群体内有目的的凋亡更接近于多细胞真核生物的程序性细胞死亡^[13].

真核生物和细菌的细胞程序性死亡过程中都包含活性氧,如过氧化物等产生的氧化代谢产物,并引发部分细胞发生凋亡. 多细胞真核生物可以通过产生抗氧化剂如 Bcl-2 蛋白来抑制细胞凋亡^[14],原核细胞的诱发和抑制凋亡机制还有待进一步探讨.

在纯化 RTN3 的原核蛋白时,意外发现了 RTN3 在大肠杆菌中的过量表达会引起宿主细菌的死亡^[15]. Bax 和哺乳动物凋亡诱发蛋白 FADD 死亡效应区的表达能诱导细菌细胞的死亡,使 ROS (reactive oxygen species, 活性氧物质)水平增加;而 RTN3 的表达也能达到同样的效果;RTN3 对细菌的破坏由于氧的排除而解除,证明了 RTN3 引起的 ROS 的增加是细菌凋亡的可能原因;而且,在真核生物中已经证实 RTN3 可以与 FADD 及 Bcl-2 直接结合,那么 RTN3 与细菌凋亡关系的研究非常值得期待.

3 RTN3 与真核细胞凋亡

到目前为止,哺乳动物细胞中已确定了 3 条凋亡的信号转导通路:死亡受体介导的信号通路 (death receptor-mediated pathway)、线粒体通路 (mitochondrial pathway)、内质网通路 (endoplasmic reticulum pathway). 而凋亡信号转导后,将引起半胱氨酸基-天冬氨酸基-特异性蛋白酶 (cysteine containing aspartate specific protease, Caspase) 家族的激活,从而引起一系列的蛋白酶水解, DNA 裂解因子 (DNA fragmentation factor, DFF) 的激活,再形成核酸内切酶,分解 DNA 成小片段,出现凋亡的标志性变化.

1) RTN3 参与死亡受体介导的凋亡信号通路
死亡受体 (death receptor) 为位于细胞膜表面的蛋白质,能与携带凋亡信号的专一性配体结合并迅速将凋亡信号转导到细胞内而诱导细胞凋亡,属于肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 受体基因超家族成员. 这些受体均具有一个约 80-90 个氨基酸的被称为死亡结构域 (death

domain, DD) 的同源性序列. 死亡受体的信号转导主要是在死亡受体与其相应配体结合导致受体寡聚化后, 通过死亡受体 DD 间相互作用, 将细胞内的接头蛋白招募到细胞膜, 诱导细胞凋亡^[16-19]. 目前已证实的死亡受体有 20 余种, 主要的死亡受体/配体有 Fas/FasL、TNFR1/TNF α 、DR4/TRAIL 和 DR5/TRAIL.

1991 年, Itoh 等从大量表达 Fas 的 KT-3 淋巴瘤细胞的 cDNA 文库中分离了 Fas cDNA. 人的 Fas 基因定位于 10q33, 含有 8 个内含子和 9 个外显子, cDNA 可编码 325 个氨基酸, 相对分子质量为 45 kDa, 属 I 型膜蛋白的 Fas 分子, N 端有信号肽^[20]. FasL 相对分子质量约 40 kDa, 属细胞表面 I 型膜蛋白, C 端在细胞外, 中间部分为疏水的跨膜区, N 端无信号序列^[21]. Fas 死亡域相关蛋白 (Fas-associated with death domain protein, FADD), 又名 Mort1, 能与 Fas 胞浆区特异性结合^[22], 它是一种胞浆蛋白, 死亡受体配体或激动抗体与细胞表面死亡受体结合后, 募集 FADD, 构成信号复合体, 转导凋亡信号. FasL 与 Fas 结合成寡聚体后, Fas 发出死亡指令直接传递给含有死亡结构域的 FADD, 激活 Caspase 蛋白酶, 启动凋亡.

研究转染过表达的 RTN3 及衣霉素刺激下内源性 RTN3 的实验表明, 过表达的 RTN3 能改变外源性过表达或内源性 FADD 在细胞中的定位, 招募它们集中分布到内质网上, 然后 RTN3 的 C 端 45 个氨基酸与 FADD 的死亡区即 DD 区结合, 诱发 FADD 依赖型的 caspase-8 下游级联事件及部分 FADD 依赖性的 caspase-9 下游级联事件, 从而引起细胞凋亡^[23]. 不仅如此, 过表达的 RTN3 还可能通过增加细胞表面的 DR5 受体, 激活下游 caspase, 参与 TRAIL 介导的细胞凋亡^[24].

2) RTN3 参与凋亡的线粒体通路

线粒体介导的细胞凋亡又称为内在(intrinsic)的细胞凋亡途径. 当细胞受到病理或生理刺激时, 线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放, 导致线粒体跨膜电位下降, 引起线粒体基质膨胀, 外膜破裂, 膜间隙中的大分子物质如细胞色素 c (CytC)、凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 与胱冬肽酶原 (pro-Caspase) 被释放至胞质中. 释放出的细胞色素 c 与胞浆中的凋亡蛋白酶活化因子 1 (apoptotic protease activating factor-1

Apaf-1) 结合, 招募、激活 pro-caspase-9 形成活化的 caspase-9, 激活下游级联反应^[25], 最终导致线粒体功能发生致命性变化而启动细胞凋亡.

bcl-2 是一种原癌基因, 是 *bcl-2* 基因家族的成员, 能抑制凋亡. 而其转录翻译产生的 Bcl-2 是一个主要在线粒体上起作用的重要的凋亡抑制蛋白, 能与 Bcl-2 家族的多种蛋白相互作用调控细胞凋亡, 可延长细胞存活期, 抑制各种因素, 包括物理、化学、生物因素等对细胞凋亡的诱导.

研究表明, RTN3 能和 Bcl-2 共定位于内质网, 外源性过表达的 Bcl-2 可以抑制由过表达 RTN3 所诱导的细胞凋亡, 二者表达量的消长调控着细胞的凋亡. 而在 Bcl-2 稳定表达的细胞中, 过表达 RTN3 仍将导致细胞凋亡, 但衣霉素刺激下, 内源性 RTN3 在内质网上的表达增加, 促进了 Bcl-2 在线粒体上的富聚, 增强了 Bcl-2 的凋亡抑制活性, 从而调控细胞凋亡^[26,27].

3) RTN3 参与凋亡的内质网通路

内质网应激 (ER stress) 是细胞抵抗不良外界刺激的重要机制, 也是应激损伤细胞的重要机制. 一定程度的内质网应激能激活保护机制如分子伴侣表达, 但应激过度时, 可独立地导致细胞凋亡^[28]. 目前已知 Ca^{2+} 稳态失调、未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 和内质网超载反应 (ER overload response, EOR), ROS (reactive oxygen species) 及其引起的过氧化反应、NO 和一些稀有金属中毒等都可诱发内质网应激反应导致细胞凋亡. 内质网应激诱导 caspase-12 表达, 同时也导致胞质的 caspase-7 转移到内质网表面. Caspase-7 激活 caspase-12, 激活的 caspase-12 可进一步剪切 caspase-3 而引发细胞凋亡^[29-31].

内质网定位蛋白 RTN3 与凋亡的内质网信号通路密切相关, 研究表明 RTN3 过表达能引发内质网钙库中 Ca^{2+} 的排空, 诱发内质网超载反应, 从而引起细胞凋亡^[32,33]; RTN3 有可能与本身或其他蛋白 (如 RTN4B 蛋白) 形成多聚体而行使钙通道的功能, 而介导细胞凋亡^[11], 随着对 RTN3 结构的深入研究, 其参与凋亡的机制也将越来越清楚.

4 讨论

细胞是一个和谐的系统, 各种因素相互协调、作用, 维护统一整体的稳态, 而细胞凋亡这

个过程亦是如此。细胞凋亡不是一个孤立的事件,它不仅与细胞内其它的代谢事件密切相关,同时细胞凋亡的信号传导途径也是相互交叉联结,形成一个精细调节的网络^[34]。

在真核生物中,研究发现过表达的 RTN3 能改变 FADD 在细胞中的定位,招募它们集中分布到内质网上,然后 RTN3 与 FADD 的死亡区结合,诱发了 FADD 下游级联事件,包括随后 caspase-8 的激活,以及线粒体 Cyt C 的释放,从而引起细胞凋亡;过表达 RTN3 还能诱导内质网超载反应,通过内质网钙离子释放和耗竭,激活内质网和线粒体凋亡信号通路的凋亡信号。总之,RTN3 实现了凋亡的 3 条经典途径的两两对话和紧密相连,形成了对凋亡的网络调控。

在真核生物的细胞凋亡中起作用的 ROS,在细菌的程序性细胞死亡中同样有着重要的意义,直接导致细菌细胞的死亡^[35]。RTN3 的过表达引起的 ROS 的增加,也可能是导致细菌凋亡通路之一。

然而,RTN3 与 FADD 的相互作用,RTN3 与 Bcl-2 的相互作用等实验均是在 RTN3 过表达等情况下完成的,并不是在正常生理情况下进行的。而且,基于 RTN3 广泛表达于人体的各种组织,正常生理情况下它一定还承担着其他重要的细胞功能,而不仅仅是诱发细胞凋亡的功能。事实上,RTN3 与管家基因一样,稳定的表达于各种细胞和组织中,尤其在睾丸、肌肉、白细胞、脑组织以及一些内分泌器官如甲状腺等中有较高的表达,这些都表明 RTN3 可能具有一些与管家基因类似的基本功能,但具体承担怎样的功能还不是很清楚,值得进一步研究。正常生理情况下 RTN3 的高表达是不会诱发凋亡,可能是因为 RTN3 高表达激活了细胞的内质网应激反应,细胞产生相应的适应性反应,从而保护细胞免受损伤,只有在 RTN3 的表达量超出细胞的承受能力时细胞才会进入凋亡,而当细胞丧失 RTN3 的生理性高表达,则可能会因为缺失某些功能而不能存活,RTN3 可能通过调节自身表达量的高低来维持细胞生与死的平衡。

参考文献 (References):

[1] WIECZOREK D F, HUGHES S R. Developmentally regulated cDNA expressed exclusively in neural tissue[J]. Brain Res Mol Brain Res, 1991, 10(1): 33-41.

[2] ROEBROFACAJA, CONTRERAS J, PAULI J G. cDNA

cloning, genomic organization, and expression of the human RTN2 gene, a member of a gene family encoding reticulons[J]. Genomics, 1998, 51(1): 98-106.

[3] ANDERSON D J, HETZER M W. Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation[J]. J Cell Biol, 2008, 182(5): 911-924.

[4] ACEVEDO L, YU J, ERDJUMENT-BROMAGE H, *et al.* A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling[J]. Nat Med, 2004, 10(4): 382-388.

[5] HE W, LU Y, QAHWASH I, *et al.* Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation[J]. Nat Med, 2004, 10(9): 959-965.

[6] LAURÉN J, HU F, CHIN J, *et al.* Characterization of myelin ligand complexes with neuronal Nogo-66 receptor family members[J]. J Biol Chem, 2007, 282(8): 5715-5725.

[7] MOREIRA E F, JAWORSKI C J, RODRIGUEZ I R. Cloning of a novel member of the reticulon gene family (RTN3): gene structure and chromosomal localization to 11q13[J]. Genomics, 1999, 8(9): 73-81.

[8] 齐兵, 齐义鹏, MASUO Y, 等. 用酵母双杂交系统分离一个新的人类细胞凋亡诱导基因[J]. 中国科学 C 辑 (QI Bing, QI Yi-peng, MASUO Y, *et al.* Isolation and characterization of a human apoptosis-inducing gene with yeast two-hybrid system[J]. Science in China (Series C)), 2000, 30(2): 310-320.

[9] OERTLE T, SCHWAB M E. Nogo and its paRTNers[J]. Trends Cell Biol, 2003, 13(4): 187-194.

[10] HE W, SHI Q, HU X, *et al.* The membrane topology of RTN3 and its effect on binding of RTN3 to BACE1[J]. J Biol Chem, 2007, 282(40): 29144-29151.

[11] 李其岚, 刘鑫, 项荣, 等. HAP 的凋亡诱发功能对其内质网定位的依赖性[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (LI Qilan, LIU Xin, XIANG Rong, *et al.* The apoptosis-inducing function of HAP depends on its ER localization[J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology), 2004, 20(4): 528-533.

[12] HU W, LI Y, ZHANG Y, *et al.* Programmed cell death in bacteria[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2002, 42(2): 255-258.

[13] SHUMKETS L J. Intercellular signaling during fruiting-body development of myxococcus xanthus[J]. Annu Rev Microbiol, 1999, 53: 525-549.

[14] LI D C, UETA E, KIMURA T, *et al.* Reactive oxygen species (ROS) control the expression of Bcl-2 family proteins by regulating their phosphorylation and ubiquitination[J]. Cancer Science, 2005, 95: 644-650.

[15] GAN M, QI Y, WAN Q, *et al.* Mammalian apoptosis-inducing protein, HAP, induces bacterial cell death[J]. Molecular Biology Reports, 2004, 31(3): 159-164.

[16] KUMAR S, COLUSSI P. Prodomains adaptors oligomerization: the pursuit of caspase activation in apoptosis[J]. Trends Biochem Sci, 1999, 24(1): 1-4.

[17] SALVESEN G, RENATUS M. Apoptosome: the seven-spoked death machine[J]. Dev Cell, 2002, 2(3): 256-257.

[18] GUPTA S. Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis[J]. Life Sci, 2001, 69(25): 2957-2964.

[19] ARTORIUS U, SCHMITZ I, KRAMMER P. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis[J]. Chembiochem, 2001, 2(1): 20-29.

- [20] KRAMMER P H. The CD95 (APO-1/Fas)/CD95L system[J]. *Toxicol Lett* , 1998 , 102(3) : 131-137.
- [21] NAGATA S. Fas ligand-induced apoptosis[J]. *Annu Rev Genet* , 1999 , 33 : 29-55.
- [22] CHINNAIYAN A M , O'ROURKE K , TEWARI M , *et al.* FADD , a novel death domain-containing protein , interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis[J]. *Cell* , 1995 , 81(4) : 505-512.
- [23] XIANG R , LIU Y , ZHU L , *et al.* Adaptor FADD is recruited by RTN3/HAP in ER-bound signaling complexes[J]. *Apoptosis* , 2006 , 11(11) : 1923-1932.
- [24] LEE J T , LEE T J , KIM C H , *et al.* Over-expression of Reticulon 3 (RTN3) enhances TRAIL-mediated apoptosis via up-regulation of death receptor 5 (DR5) and down-regulation of c-FLIP[J]. *Cancer Lett* , 2009 , 8(2) : 185-192.
- [25] THORNBERRY N A , LAZEBNIK Y. Caspases : enemy within[J]. *Science* , 1998 , 281 : 1312-1316.
- [26] ZHU L , XIANG R , DONG W , *et al.* Anti-apoptotic activity of Bcl-2 is enhanced by its interaction with RTN3[J]. *Cell Biol Int* , 2007 , 31(8) : 825-830.
- [27] WAN Q , KUANG E , DONG W , *et al.* Reticulon 3 mediates Bcl-2 accumulation in mitochondria in response to endoplasmic reticulum stress[J]. *Apoptosis* , 2007 , 12(2) : 319-328.
- [28] BRECKENRIDGE D , STOJANOVIC M , MARCELLUS R , *et al.* Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals , enhancing cytochrome c release to the cytosol[J]. *J Cell Biol* , 2003 , 160 : 1115-1127.
- [29] RAO R V , HERMEL E , CASTRO-OBREGON S. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation[J]. *J Biol Chem* , 2001 , 276(36) : 33869-33874.
- [30] GROENENDYK J , LYNCH J , MICHALAK M. Calreticulin , Ca²⁺ and calcineurin-signaling from the endoplasmic reticulum [J]. *Mol Cells* , 2004 , 7(3) : 383-389.
- [31] LAMB H K , MEE C , XU W , *et al.* The affinity of a major Ca²⁺ binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP[J]. *J Biol Chem* , 2006 , 281(13) : 8796-8805.
- [32] QU X , QI Y , LAN P , *et al.* The novel endoplasmic reticulum (ER)-targeted protein HAP induces cell apoptosis by the depletion of the ER Ca²⁺ stores[J]. *FEBS Lett* , 2002 , 529(2-3) : 325-331.
- [33] KUANG E , WAN Q , LI X , *et al.* ER Ca²⁺ depletion triggers apoptotic signals for endoplasmic reticulum (ER) overload response induced by overexpressed reticulon 3 (RTN3/HAP) [J]. *J Cellular Physiology* , 2005 , 204(2) : 549-559.
- [34] ROY S , NICHOLSON D. Cross-talk in cell death signaling[J]. *J Exp Med* , 2000 , 192(1) : 21-25.
- [35] RICE K C , BAYLES K W. Molecular control of bacterial death and lysis[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 2008 , 72(1) : 85-109.