

海葵溶细胞素的研究进展

Review of sea anemones cytolytins (actinoporins)

刘伟, 王娟, 姜孝玉, 杨文利, 徐安龙

(中山大学 生命科学学院, 国家高技术计划海洋生物功能基因组开放实验室, 广东 广州 510275)

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2005)04-0056-07

海葵(Anthopleura)属于腔肠动物门(Soelenterala)、珊瑚纲(Anthozoa), 它的触手及身体富含多肽类毒素和蛋白毒素, 在受到机械或化学刺激时, 便会释放毒素用于抵御敌害及捕捉食物^[1]。根据海葵毒素的生理作用将其分为3类: 海葵神经毒素(Sea Anemone Neurotoxin, SAN)、海葵溶细胞素(Sea Anemone Cytolysin, SAC)和海葵钾离子通道抑制剂(Sea Anemone Potassium Channel inhibitor)^[2]。海葵溶细胞素是其中一类重要的毒素, 具有多种生物学活性, 如: 溶血性、细胞毒性、心脏刺激活性、使膜去极化、阻断钾离子通道等^[3]。海葵溶细胞素可作为真核生物 pore-forming 毒素与细胞膜相互作用的研究模型, 它在抗菌和抗肿瘤细胞方面也具有应用价值。作者主要介绍海葵溶细胞素的结构、功能及其药理特征方面的研究进展。

1 海葵溶细胞素的种类

目前, 已经在多种海葵中发现了海葵溶细胞素, 归纳如表1。Kem^[4]建议将这类毒素命名为 Actinoporins, 最近被 IUBMB 系统定义为跨膜运输蛋白(Transmembrane Solute Transporter), 属于 pore-forming equinatoxin 家族 1.C.38^[5]。该类毒素序列同源性高, 没有半胱氨酸, 能插入细胞膜并以三聚体或四聚体形成离子选择性膜孔; 生理活性相近, 在溶液中以可溶性单体存在; 分子质量在 20 k u 左右, PI 值多在 9.0 以上, 组成一个蛋白质家族。最近本实验室从玫瑰红绿海葵(*Sagartia rosea*)的触手中提取总 RNA, 建立 cDNA 文库, 通过测序分析, 发现了一种新的海葵溶细胞素基因, 编码一种酸性海葵溶细胞素, 分子质量为 19.6 k u, PI 值为 4.8^[6]。这是首次报道的酸性海葵溶细胞素, 对它的结构、生理活性和作用机理正在做进一步研究, 这对于 Actinoporin 的研究有重要意义。

2 海葵溶细胞素的结构特征

海葵溶细胞素是一类分泌蛋白, 其前体蛋白包括信号肽、一段称为 propart 的结构和成熟蛋白^[18](图1)。Propart 一般含有 9~17 个氨基酸残基, 主要由极性和带电荷氨基酸组成, 在海葵神经毒素、钾离子通道抑制剂以及海葵刺丝囊的胶原纤维中也发现有 propart 结构, magainin、dermaseptin 细菌家族的抗菌肽前体也有此类似结构。Anderluh 等^[18]推测 propart 与蛋白的受调控分泌途径(Regulated Secretory Pathway, RSP)有关, 使海葵毒素能够定位到刺丝囊。

圆二色光谱, 傅立叶变换红外光谱以及电镜分析表明海葵溶细胞素的二级结构以 β 结构为主。Caaveiro 等^[20]报道了溶液中的 Eqt II 含有 37% α 螺旋、44% β 折叠、17% β 转角, Athanasiadis 等^[21]得到的 Eqt II 晶体的结构数据为: 10% 的 α 螺旋, 44.7% β 折叠, 45.3% 随机卷曲。天然的 St I 和 St II 含有 44%~50% β 折叠、18%~20% β 转角、12%~15% α 螺旋和 19%~22% 随机卷曲^[22], 与 Eqt II 的二级结构相似。

Athanasiadis 等^[21]研究了天然 Eqt II 毒素的二级结构(图2)及其晶体结构(图3)。Eq t II 单体蛋白以 12 个 β 折叠为主要结构, 10 个紧紧相邻的 β 折叠嵌在 α 螺旋 A 和 α 螺旋 B 之间, 中心包埋的是一个疏水核

收稿日期: 2003-04-30; 修回日期: 2004-01-10

基金项目: 国家高新技术海洋领域 863 项目(2001AA62-6010)

作者简介: 刘伟(1979-), 男, 硕士, 研究方向: 海洋生物功能基因, E-mail: liuweizsu@hotmail.com; 徐安龙, 通讯作者, E-mail: ls36@zsu.edu.cn

表 1 已知的 Actinoporins 种类

毒素名称 (abbr.)	来源	分子质量 (ku)	等电点	文献出处
Eqt II	<i>Actinia equina</i>	20	10.0	Anderluh <i>et al.</i> [7]
Eqt IV	<i>Actinia equina</i>	20	10.6	Anderluh <i>et al.</i> [8]
Eqt V	<i>Actinia equina</i>	20	9.9	Pungercar <i>et al.</i> [9]
Tenebroin - C	<i>Actinia tenebrosa</i>	20	10.3	Simpson <i>et al.</i> [10]
St I	<i>Stichodactyla helianthus</i>	19	9.8	Lanio <i>et al.</i> [11]
St II	<i>Stichodactyla helianthus</i>	19	9.8	Lanio <i>et al.</i> [11]
RTX - A	<i>Radianthus macrodactylus</i>	20	9.8	Monastyrnaia <i>et al.</i> [12]
RTX - S	<i>Radianthus macrodactylus</i>	20	9.8	Monastyrnaia <i>et al.</i> [12]
RTX - G	<i>Radianthus macrodactylus</i>	20	10.0	Monastyrnaia <i>et al.</i> [12]
Parasitoxin	<i>Parasicyonis actinostoloides</i>	19	7.9	Shiomi <i>et al.</i> [13]
Hmg I	<i>Heteractis magnifica</i>	19	9.4	Khoo <i>et al.</i> [14]
Hmg II	<i>Heteractis magnifica</i>	19	10.0	Khoo <i>et al.</i> [14]
Hmg III	<i>Heteractis magnifica</i>	19	9.1	Wang <i>et al.</i> [15]
Sk I	<i>Stichodactyla kenti</i>	18	碱性	Bernheimer <i>et al.</i> [16]
Ac I	<i>Actinia cari</i>	20 ~ 25	10.7	Macek <i>et al.</i> [17]
Ac II	<i>Actinia cari</i>	20 ~ 25	碱性	Macek <i>et al.</i> [17]
Ac III	<i>Actinia cari</i>	20 ~ 25	碱性	Macek <i>et al.</i> [17]
Src I	<i>Sagartia rosea</i>	19	4.8	Jiang <i>et al.</i> [6]

注:包括了从 NCBI - PubMed and NCBI - Protein 获得的所有已知的 actinoporins 种类



图 1 Eqt II 的 cDNA 的结构组成 [19]

A. Eqt II 的 cDNA 的结构组成。N 末端部分包含了一个由 19 个氨基酸组成的典型的信号肽(signal peptide)(黑色部分所示)和由 16 个氨基酸组成的典型的 propeptide (灰色阴影所示)。成熟的 Eqt II 蛋白一共有 179 个氨基酸。B. 根据拓扑研究作出的 Eqt II 成熟肽的功能组成示意图。灰色部分为与膜相互作用的区域; 条纹部分为 RGD (Arg - Gly - Asp, 即精氨酸 - 甘氨酸 - 天门冬氨酸序列) 结构域; 已被研究过的, 以膜结合的形式与膜相互作用的半胱氨酸突变体用数字标出; 其他突变体的位置用点的形式标出; 与膜相互作用的 Trp 残基(W)被涂成黑色, 而其余的 Trp 则为白色; ;Trp112 用一空心星号标出; 涉及到毒素单体间聚合的第 77 位的赖氨酸 Lys77 的位置则用黑色竖纹标出。

心, 整体结构如同一个三明治。α 螺旋 A 在 β1 和 β2 之间, 只有一端与核心的 β 折叠结构共价相连; α 螺旋 B 与 β8 和 β9 相连, 位于蛋白分子的疏水核心的另一侧, 并两端都与 β 折叠结构共价相连。4 个短的 β

发夹回折和 2 个长的回折结构以及分子的 C 末端组成一个较为平坦的顶部; 相对而言, 由长短不一的 6 个回折组成的底部则显得凸凹不平。正电荷主要分布在 Eqt II 单体蛋白结构的顶端和底部的回折部位, 而负电荷主要位于其中部。

Eqt II 的 N 末端 30 多个氨基酸残基可以形成多种构象而不改变分子的核心结构, Menestrina 等 [22] 认为 N 末端氨基酸参与膜孔的形成。Huerta 等 [23] 还发现 St I 和 St II 的非保守性替代主要发生在 N 端 (Glu2/Ala1, Asp9/Ala8, Gly23/Glu22), 这也是海葵溶细胞毒素序列中变化最多的部位, 可能是导致其活性差异的主要原因。海葵溶细胞毒素第 105~120 位的疏水区含有保守的色氨酸残基, 推测在毒素与膜的结合中起重要作用 (图 1) [24]。海葵溶细胞毒素都含有一个 RGD (Arg - Gly - Asp, 即精氨酸 - 甘氨酸 - 天门冬氨酸序列) 结构 (图 3), 有人发现这一序列可以通过膜受体与肿瘤细胞粘附 [25]。

Martin - Benito 等 [26] 通过 Fourier - based 的方法, 通过透射电镜观察单层膜上的 St II, 获得 St II 的三级结构 (图 4), 其形状如同一个扁平而扭曲的三叶草, 或一个扭曲的 Y 形。最长的一臂为 5.1nm, 臂上有一个凹口, A、B 两臂之间最宽处达 4nm, 该结构的具体生物学意义尚需进一步研究。

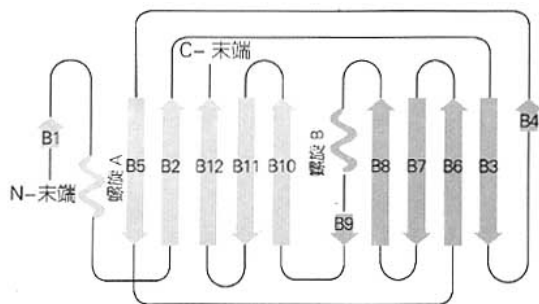


图2 Eqt II 结构的拓扑示意图^[21]

β 链按照从N端到C端的顺序进行标记。 α 螺旋按照它们所属的部分进行标记。每个二级结构单元进行了顺序标记。

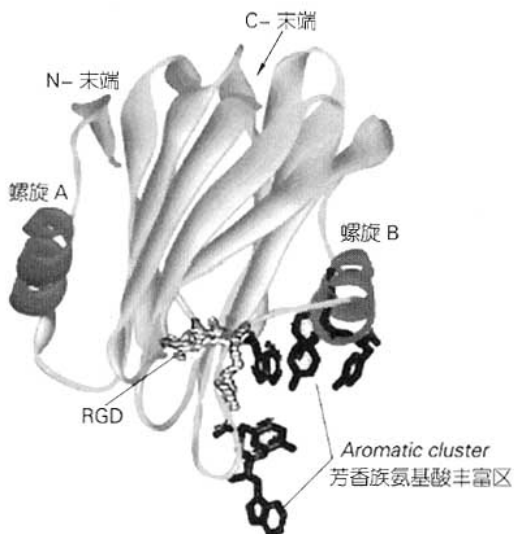


图3 Eqt II 的3-D结构^[21]

Eqt II 结构的带状示意图。 α 螺旋A和B处于 β 折叠核心两侧；有条纹部分为RGD结构域；第112和116位Trp残基以及第113, 133, 137和138位的Tyr残基，它们形成了分子表面的芳香族氨基酸丰富区(Aromatic Cluster)，这一区域被认为是与膜脂头部基团区域结合的部位。

3 海葵溶细胞素与脂膜的相互作用及影响因素

目前，毒素诱导形成膜孔的机制主要建立在对细菌蛋白的研究上，海葵溶细胞素为真核生物 pore-forming 毒素，能够与血细胞、肿瘤细胞、血小板、纤维原细胞及人工脂膜相结合，在膜上形成直径为1.0~2.0nm左右的离子选择性通道^[27]。海葵溶细胞素一般

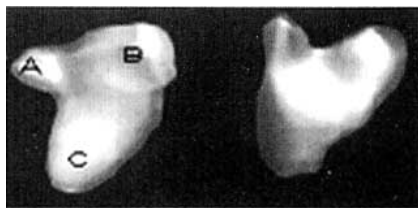


图4 St II 的3D结构模型表面的两个不同的侧面观^[26]

从St II的3D结构模型表面的2个不同的侧面观可以看出各自凹凸的表面。为了表示分子相对的定位，三叶草的三叶分别标为A, B, C, 其中较小的A指向纸面, B和C则指向纸背。比例尺代表1.2nm。

以可溶形式存在，资源丰富，是一种理想的研究真核生物毒素与膜作用的模式蛋白。

3.1 海葵溶细胞素与膜的相互作用

海葵溶细胞素是水溶性蛋白，通过静电引力和疏水作用与脂膜靠近、结合^[28]，膜孔的形成过程如下：毒素的正电荷与磷脂双分子层表面的负电荷相互吸引而靠近；112~116位的色氨酸丰富区与膜的初步结合，其中Trp112与膜结合不如Trp116牢固，该过程不导致阳离子通道的形成，为可逆过程；最后，可变换构象的N端双亲性螺旋区插入膜内，一定浓度的毒素蛋白聚合形成三或四聚体形成阳离子通道，该过程为不可逆过程^[29]。

海葵溶细胞素不含有半胱氨酸，Anderluh等^[24]利用半胱氨酸突变扫描和修饰实验研究Eq II与膜结合时的表型，认为Eq II的双亲 α 螺旋、色氨酸丰富区、RGD结构域以及第144位的Arg、第160位的Ser及其附近的氨基酸在Eq II与膜的作用中具有重要作用。而且至少有2个区域：N末端第13~20位的 α 螺旋区和第105~120位的色氨酸丰富区，可以嵌入磷脂膜。

Anderluh等^[30]将Eq II的N端分别切除5个(rEq II-5)、10个(rEq II-10)、33个(rEq II-33)氨基酸，研究这些重组表达产物的活性变化。结果表明随着去除氨基酸数目的增加，蛋白的溶解性和溶血能力均降低，rEq II-33则以不溶形式存在。尽管rEq II-5、rEq II-10的溶血能力降低，但对鞘磷脂和血红细胞的结合能力却增强，这表明海葵溶细胞素保守的N端与蛋白的溶解性、膜孔的形成有关，但并不是与膜结合所必须的。

Malowrh等^[31]对Eq II第45、116、117、149位的Trp残基进行突变，研究突变体的结构和溶血活性的变化。发现第116、117位的Trp残基突变后明显改变

了毒素的性质,结构上有较大的随机卷曲出现,可能有部分变性;而第45和149位的Trp残基突变对二级结构和溶血活性影响不大。

Anderluh等^[32]对Eq_t II进行点突变实验,认为处在Lys₇₇附近的Arg₃₁、Lys₃₀、Lys₃₂通过静电引力与膜吸附,为N端螺旋插入膜内提供条件。Anderluh等^[32]也发现第77位的赖氨酸对于Eq_t II的寡聚过程非常重要,第77位赖氨酸突变后(Eq_t II K₇₇/C),突变体的构象及与膜结合的能力没有大的变化,但溶血活性却降低,突变体的溶血活性只有天然Eq_t II的1/100,突变体与脂质体结合后引起其内含物的泄漏也明显减低,说明第77位的赖氨酸可能影响毒素的寡聚过程。在

获得了Eq_t II的晶体结构以后,结合其结构特点,Athanasiadis^[21]认为Lys₇₇能稳定Eq_t II的回折结构。

2002年,Hong Q等人对第112、116位的Trp残基进行突变以后发现,当第112和116位Trp残基双双被突变以后,Eq_t II几乎不能与膜结合,用空间屏蔽物屏蔽第112、116位的Trp残基可以达到同样的效果;而在Eq_t II的N末端增加一段融合蛋白,或者用Cys突变(Eq_t II V8C/K69C)形成二硫键固定N末端,使其不能自由改变构象,Eq_t II的溶血活性就会接近于零。由此Hong^[29]提出了Eq_t II与膜结合分两步走的模式:第一步是包含第112和116位Trp残基的芳香族氨基酸丰富区介导了Eq_t II与膜的初始可逆结合;

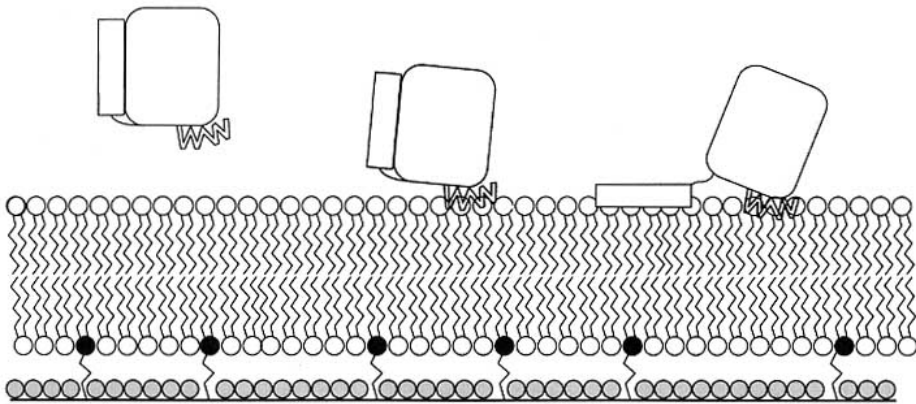


图5 Eq_t II与膜结合的模式图^[29]

在Eq_t II与膜的结合模式中已经确认了两个过程。第一步是可逆的粘附,第二步是不可逆的结合,其中不可逆的结合很可能是由N端双亲性螺旋区的构象变化所促进的。暴露于分子表面并且与膜结合相关的Trp残基(W)在模式图中被标示出来,但是N端的双亲性螺旋区在膜上最终的精确定位仍然是不明确的。

第二步是在铆定的基础上,Eq_t II可变换构象的N端双亲性螺旋区插入膜内,达到一定浓度后毒素蛋白不可逆聚合形成3或4聚体形成阳离子通道(图5)。

3.2 海葵溶细胞素与膜作用时构象的改变

在插入膜时海葵溶细胞素的构象会发生转变,转成部分折叠的熔球状态,使其可以插入脂质双分子层。Mancheno等人通过圆二色光谱和荧光波谱法研究了St II的构象^[34],发现在温度低于35℃时,pH 1.5~11.0,离子强度小于0.5 mol/L时,St II都维持一种以β结构为主的构象;在pH 1.5~3.5,离子强度≥0.1 mol/L时,温度的升高会使St II转变为一种部分折叠的熔球状态,特征如下:a)与天然蛋白的二级结构组成相似;b)大部分三级结构被破坏,Trp残基部分暴露;c)可以与疏水探针2-苯胺-6-磺胺基萘酸

(ANS)相连。在pH 4.0~10.5,温度的升高不仅使St II转变为一种部分折叠的熔球状态,还可引起St II的寡聚体的形成。推测St II与细胞膜作用时可能有以上类似的过程发生。St II在处于半折叠的熔球状态时,二级结构不会有大的改变,但Belmonte等^[23]报道Eq_t II与SUVs (small unilamellar vesicles)的膜作用时,α螺旋组成增加;Caaveiro等人却发现Eq_t II与LUVs (large unilamellar vesicles)的膜作用时β结构增加,α螺旋减少^[20]。这种差异可能是由于SUVs和LUVs的理化性质不同造成的。

通过远紫外圆二色光谱和自荧光放射波谱分析,Poklar等^[35]研究了Eq_t II与带负电荷的脂质体(DPPG)结合时的情形,结果表明,当Eq_t II与DPPG结合时发生了两次构象的改变,第一次改变发生在膜的相变温度时,当DPPG处于凝胶相/液晶相转换时

导致 Eqt II 构象改变, 构象的改变使 Eqt II 能插入膜脂层; 第二次构象的改变是 Eqt II 插入膜后, Eqt II 之间 α 螺旋相互作用时, 构象的改变有利寡聚体的形成。其它一些膜蛋白或多肽, 如 *Escherichia coli* 中的 SecA 蛋白、细胞色素 C 等, 也会随膜的凝胶相/液晶相的转变而发生构象改变^[27]。Poklar 等人推测可能是因为膜的物理状态和密度发生变化而诱导毒素构象的改变, 从而发生一系列作用。

3.3 膜脂组成对海葵溶细胞素作用的影响

海葵溶细胞素可以作用多种细胞, 目前, 人们认为该类毒素主要是与膜上的磷脂相互作用。Valcarcel 等人研究了 St I 和 St II 与不同组成的脂膜的结合能力, 认为 St I、St II 对鞘磷脂 (SM) —— 一种普遍存在于细胞膜上的磷脂有偏好性, 这 2 种毒素容易插入含有 SM 的膜或等分子质量的 SM/PC 的膜; 他们还发现带负电荷的磷脂酸 (PA) 是毒素活性的促进剂, 将少量的 PA 加入到 PC/SM(1:1) 组成的 LUVs 中, 即可大大促进毒素形成膜孔的能力, 其他磷脂如 phosphatidylserine (PS), phosphatidylglycerol (PG), phosphatidylinositol (PI), cardiolipin (CL) 也能促进毒素形成膜孔, 但这些带相等电荷的磷脂的促进作用并不相同 (CL = PA \gg PG = PI = PS), 这说明毒素与膜的靠近不仅仅依靠静电引力^[27]。Belmonte 等^[36]研究了 Eqt II 和 St I 对不同组成的人工脂质体的结合情况, 也发现当在脂质体中加入鞘磷脂 (SM) 会明显加强 Eqt II 和 St I 的作用。Caaveiro 等^[20]发现当脂膜只是单一组分时, Eqt II 与 SM 脂膜和 PC 脂膜的结合能力是相当的, 且结合力不高, 也不会引起毒素构象的改变; Eqt II 与 SM/PC(1:1) 单层膜的结合力最高, 当毒素与其结合后会引起构象的变化, 他们认为虽然 SM 并不是 Eqt II 与膜结合的必要条件, 但 SM 与 PC 的相互作用, 为毒素的不可逆性插入膜提供了条件, 导致毒素蛋白构象发生改变和膜孔的形成。此外, Michaels 等人发现海葵溶细胞素可以作用于许多并不含 SM 的脂膜, 其他因素, 例如小泡的曲率半径、SM 和 PC 的相互作用、PC 和胆固醇的相互作用、膜的流动性等, 也能影响毒素的作用行为和毒素的活性^[33]。

4 海葵溶细胞素的药理作用

海葵溶细胞素表现出广泛的生理活性, 包括心肌毒性、血小板聚集、细胞毒、抗菌、抗肿瘤等。Bunc 等人研究了 Eqt II 对离体大鼠心脏的作用, 发现 0.1 nmol/L 的 Eqt II 即可对大鼠心脏产生直接的心脏毒性。对给药组的大鼠心脏灌注 10 nmol/L 的 Eqt II, 其左静脉血压降低至对照组的 $14\% \pm 11\%$, 而冠状动

脉流量则降低至对照组的 $9\% \pm 3\%$, 并继发心律不齐、心搏停止和呼吸衰竭^[37]。但 Drevensek 等人发现, 降低细胞外 Ca^{2+} 浓度或加入 L-型钙离子通道阻剂 nicardipine, 可以抑制 Eqt II 引起的冠状动脉血流量降低^[38]。

Suput 等人报道, 通过静脉注射高剂量的 Eqt III 和 Eqt II 后, 小鼠细胞质内钾离子和葡萄糖的浓度均提高, K^+ 浓度增高诱发冠状动脉平滑肌收缩达 $289\% \pm 29\%$ (Eq II)^[39]。尽管 Eqt III 的溶血能力高于 Eqt II, 但后者的毒性更剧烈, 这说明溶血并不是致毒的根本原因, 其诱发的冠状动脉收缩才是真正原因。

海葵溶细胞素细胞毒性强, 可以导致许多细胞和细胞器裂解。Batista 等人发现, 即使 Eqt II 浓度小于 0.1 nmol/L 也可以引起中国苍鼠肺纤维瘤细胞 V-79-379A 超微结构的改变, 细胞变得扁平, 失去微绒毛, 表面囊泡化; 同时, 线粒体膨胀, 高尔基体囊泡亦增多; 但预先用牛血清处理的 Eqt II 则不会发生上述变化^[40]。Jiang 等人发现 Src I 浓度小于 0.5 nmol/L 也可导致体外培养的人分化胃癌细胞 BGC-823、人肝癌细胞 BEL-7402、人非小细胞肺癌细胞 NSCIC 崩解破裂, 预先经过牛血清处理可降低 Src I 的毒性, 但不会导致其活性的丧失。

海葵溶细胞素也可影响突触对神经介质的吸收和释放。Khoo 等^[41]报道 Eqt II 和 magnificalyisin 会影响伽玛氨基丁酸和 coline 的吸收; Miguez 等^[42]发现从海葵 *Bunodosoa caissarum* 的毒汁中分离的溶血物质 Bc2 可诱导突触体释放谷氨酸盐-2-谷氨酸酯。

Tejuca 等人研究了 St I、St II 和 Eqt II 对人体寄生虫 *Giardia lamblia* 的抑制作用, 实验表明 3 种毒素对 *Giardia lamblia* 是很有效的, CS_{50} 分别为 0.5、1.6、0.8 nmol/L。他们还利用 Eqt II 突变体与抗体的结合物研究如何提高毒素作用的特异性。先加入一级小鼠单克隆抗体或多克隆抗体, 再加入与生物素结合的二级抗鼠-IgG 单抗, 使寄生虫细胞致敏, 接着加入与抗生物素结合的 Eqt II 突变体, 无论是分步加入还是以结合体的形式加入, 都大大提高了 Eqt II 突变体对 *Giardia lamblia* 的杀伤力, 并降低其非特异性结合能力^[43]。

Pederzoli 等^[44]利用 Eqt II 的细胞毒性进行了抗肿瘤细胞研究, 他们将 Eqt II 与转铁蛋白相连, 研究这种结合体对携有转铁蛋白受体的细胞的作用, 结果表明这种结合体可以有效地杀伤肿瘤细胞, 但仍具有很高的非特异溶细胞性, 这可能是因为 Eqt II 还部分保持有与细胞膜结合的原始能力, 用 SM 预处理可以大大降低这种非特异性结合。

5 展望

海葵溶细胞素具有多种生物活性,也具有开发为抗菌、抗癌、治疗心衰等药物的潜力,对其进行开发还需进一步弄清其作用机制。海葵溶细胞素只是与细胞膜上的磷脂结合呢?还是需要通过受体或是通过其他作用机制来完成尚不清楚。例如红细胞和心肌细胞对皮摩尔浓度的 Eqt II 就非常敏感,而在此浓度下,模式细胞膜与 Eqt II 是基本不结合的^[3]。海葵溶细胞素引发细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,导致细胞发生多种变化,但毒素的使用剂量不同,引起的细胞反应也不同,可影响到细胞的增殖、引起细胞坏死或细胞凋亡^[45]。毒素在低剂量时表现出的药理活性可能与细胞膜上的特定受体有关,与受体的作用影响到相应的信号传导途径。值得注意的是已发现的海葵溶细胞素都具有保守的 RGD 结构^[19],RGD 可与某些肿瘤细胞的受体结合,但其确切作用还需进一步研究。对毒素晶体结构的研究无疑有助于对其作用机制的进一步了解,也是成功建立免疫和肿瘤疫苗的重要前提。

弄清海葵溶细胞素与膜的作用机制,对于建立真核生物 pore-forming 毒素与细胞膜互相作用的模型也有着重要意义,海葵溶细胞素结构中含有的随机卷曲部位其实有很大作用,正负电荷分布、Trp 丰富区以及使构型稳定的氨基酸都分布在随机卷曲的部位。因此提出这样一种假想:规则排布、构型固定的疏水核心是否只是起着一个结构支撑的作用,而随机卷曲的柔性部位才是反应的中心?这对于探索蛋白质结构与功能的关系来说是一个启示。随着对海洋资源的日益关注,新发现的海葵溶细胞素会不断增多,对海葵溶细胞素的结构和功能研究也将不断深入。

参考文献:

- [1] 宋杰军,毛庆武. 海洋生物毒素学[M]. 北京:北京科学技术出版社,1996. 445-450.
- [2] 刘文华,王义良,卫剑文,等. 海葵神经毒素基因的克隆和序列分析[J]. 中国生物化学与分子生物学,2001,17(5): 617-620.
- [3] Macek P. Polypeptide cytolytic toxins from sea anemones (Actiniaria)[J]. *FEMS Microbiol Immunol*,1992,5(1-3): 121-129.
- [4] Kern W R. Sea anemone toxins: structure and action[A]. Hessinger D A, Lenhoff H M. The biology of Nematocysts [C]. San Diego: Academic Press, 1988. 375-405.
- [5] Saier Jr M H. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(2), 354-411.
- [6] Jiang X Y, Yang W L, Chen H P, et al. Cloning and characterization of an acidic cytolytic cDNA from sea anemone *Sagartia rosea*[J]. *Toxicon*,2002, 40(11), 1563-1569.
- [7] Anderluh G, Pungercar J, Strukelj B, et al. Cloning, sequencing, and expression of equinatoxin II[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 220(2): 437-442.
- [8] Anderluh G, Krizaj I, Strukelj B, et al. Equinatoxins, pore-forming proteins from the sea anemone *Actinia equina*, belong to a multigene family[J]. *Toxicon*, 1999, 37(10): 1391-1401.
- [9] Pungercar J, Anderluh G, Macek P, et al. Sequence analysis of the cDNA encoding the precursor of equinatoxin V, a newly discovered hemolysin from the sea anemone *Actinia equina*[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1997, 1341(2): 105-107.
- [10] Simpson R J, Reid G E, Moritz R L, et al. Complete amino acid sequence of tenebrosin-C, a cardiac stimulatory and haemolytic protein from the sea anemone *Actinia tenebrosa*[J]. *Eur J Biochem*, 1990, 190(2): 319-328.
- [11] Lanio M E, Morera V, Alvarez C, et al. Purification and characterization of two hemolysins from *Stichodactyla helianthus*[J]. *Toxicon*, 2001, 39(2-3): 187-194.
- [12] Monastyraia M M, Zykova T A, Kozlovskaja E P. Isolation and characteristics of high molecular weight cytolytic toxins from the sea anemone *Radianthus macrodactylus*[J]. *Bioorg Khim*, 1999, 25(10): 733-741.
- [13] Shiomi K, Tanaka E, Yamanaka H, et al. Isolation and characterization of a lethal hemolysin in the sea anemone *Parasicyonis actinostoloides*[J]. *Toxicon*, 1985, 23(5): 865-874.
- [14] Khoo K S, Kam W K, Khoo H E, et al. Purification and partial characterization of two cytolytic toxins from a tropical sea anemone, *Heteractis magnifica*[J]. *Toxicon*, 1993, 31(12): 1567-1579.
- [15] Wang Y, Chua K L, Khoo H E. A new cytolytic toxin from the sea anemone, *Heteractis magnifica*: isolation, cDNA cloning and functional expression[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1478(1): 9-18.
- [16] Bernheimer A W, Lai C Y. Properties of a cytolytic toxin from the sea anemone, *Stoichactis kentii*[J]. *Toxicon*, 1985, 23(5): 791-799.
- [17] Macek P, Sencic L, Lebez D. Isolation and partial characterization of three lethal and hemolytic toxins from the sea anemone *Actinia cari*[J]. *Toxicon*, 1982, 20(1): 181-185.
- [18] Anderluh G, Podlesek Z, Macek P. A common motif in parts of Cnidarian toxins and nematocyst collagens and its putative role[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1476(2): 372-376.
- [19] Anderluh G, Macek P. Cytolytic peptide and protein toxins from sea anemones (Anthozoa: Actiniaria) [J]. *Toxicon*, 2002, 40(2): 111-124.
- [20] Caaveiro J M, Echabe I, Gutierrez-Aguirre I, et al. Differential interaction of equinatoxin II with model mem-

- branes in response to lipid composition[J]. **Biophys J**, 2001, **80** (3): 1 343 - 1 353.
- [21] Athanasiadis A, Anderlueh G, Macek P, *et al.* Crystal structure of the soluble form of equinatoxin II, a pore-forming toxin from the sea anemone *Actinia equina*[J]. **Structure**, 2001, **9** (4): 341 - 346.
- [22] Menestrina G, Cabiaux V, Tejuca M, *et al.* Secondary structure of sea anemone cytolytins in soluble and membrane bound form by infrared spectroscopy[J]. **Biochem Biophys**, 1999, **254** (1): 174 - 180.
- [23] Huerta V, Morera V, Guanche Y, *et al.* Primary structure of two cytolytin isoforms from *Stichodactyla helianthus* differing in their hemolytic activity[J]. **Toxicon**, 2001, **39** (8): 1 253 - 1 256.
- [24] Anderlueh G, Barlic A, Podlesek Z, *et al.* Cysteine-scanning mutagenesis of an eukaryotic pore-forming toxin from sea anemone: topology in lipid membranes[J]. **Eur J Biochem**, 1999, **263** (1): 128 - 136.
- [25] 赵铁华, 杨鹤松, 高巍, 等. RGD 和 YIGSR 衍生生物的抗肿瘤侵袭、转移活性[J]. **肿瘤**, 2001, **21** (3): 176 - 179.
- [26] Martin-Benito J, Gavilanes F, de Los Rios V, *et al.* Two-dimensional crystallization on lipid monolayers and three-dimensional structure of sticholysin II, a cytolytin from the sea anemone *Stichodactyla helianthus*[J]. **Biophys J**, 2000, **78** (6): 3 186 - 3 194.
- [27] Valcarcel C A, Dalla Serra M, Potrich C, *et al.* Effects of lipid composition on membrane permeabilization by sticholysin I and II, two cytolytins of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*[J]. **Biophys J**, 2001, **80** (6): 2 761 - 2 774.
- [28] Tejuca M, Serra M D, Ferreras M, *et al.* Mechanism of membrane permeabilization by sticholysin I, a cytolytin isolated from the venom of the sea anemone *Stichodactyla helianthus*[J]. **Biochemistry**, 1996, **35** (47): 14 947 - 14 957.
- [29] Hong Q, Gutierrez-Aguirre I, *et al.* Two-step Membrane Binding by Equinatoxin II, a Pore-forming Toxin from the Sea Anemone, Involves an Exposed Aromatic Cluster and a Flexible Helix[J]. **J Biol Chem**, 2002, **277**(44): 41 916 - 41 924.
- [30] Anderlueh G, Pungercar J, Krizaj I, *et al.* N-terminal truncation mutagenesis of equinatoxin II, a pore-forming protein from the sea anemone *Actinia equina*[J]. **Protein Eng**, 1997, **10** (7): 751 - 755.
- [31] Malovrh P, Barlic A, Podlesek Z, *et al.* Structure-function studies of tryptophan mutants of equinatoxin II, a sea anemone pore-forming protein[J]. **Biochem J**, 2000, **15** (346 Pt 1): 223 - 232.
- [32] Anderlueh G, Barlic A, Krizaj I, *et al.* Avidin-FITC topological studies with three cysteine mutants of equinatoxin II, a sea anemone pore-forming protein[J]. **Biochem Biophys Res Commun**, 1998, **242** (1): 187 - 190.
- [33] Anderlueh G, Barlic A, Potrich C, *et al.* Lysine 77 is a key residue in aggregation of equinatoxin II, a pore-forming toxin from sea anemone *Actinia equina*[J]. **J Membr Biol**, 2000, **173** (1): 47 - 55.
- [34] Mancheno J M, De Los Rios V, Martinez Del Pozo A, *et al.* Partially folded states of the cytolytic protein sticholysin II[J]. **Biochim Biophys Acta**, 2001, **1545** (1-2): 122 - 131.
- [35] Poklar N, Fritz J, Macek P, *et al.* Interaction of the pore-forming protein equinatoxin II with model lipid membranes: A calorimetric and spectroscopic study[J]. **Biochemistry**, 1999, **38** (45): 14 999 - 15 008.
- [36] Belmonte G, Pederzoli C, Macek P, *et al.* Pore formation by the sea anemone cytolytin equinatoxin II in red blood cells and model lipid membranes[J]. **J Membr Biol**, 1993, **131** (1): 11 - 22.
- [37] Bunc M, Drevensek G, Budihna M, *et al.* Effects of equinatoxin II from *Actinia equina* (L.) on isolated rat heart: the role of direct cardiotoxic effects in equinatoxin II lethality[J]. **Toxicon**, 1999, **37** (1): 109 - 123.
- [38] Drevensek G, Budihna M V, Suput D, *et al.* Nicardipine dose-dependently reduces the effect of equinatoxin II on coronary flow in isolated porcine heart[J]. **Pflugers Arch**, 2000, **440** (5 Suppl): R145 - 146.
- [39] Suput D, Frangez R, Bunc M. Cardiovascular effects of equinatoxin III from the sea anemone *Actinia equina* (L.) [J]. **Toxicon**, 2001, **39** (9): 1 421 - 1 427.
- [40] Batista U, Jezernik K. Morphological changes of V-79 cells after equinatoxin II treatment[J]. **Cell Biol**, 1992, **16** (2): 115 - 123.
- [41] Khoo H E, Lim J P, Tan C H. Effects of sea anemone (*Heteractis magnifica* and *Actinia equina*) cytolytins on synaptosomal uptake of GABA and choline[J]. **Toxicon**, 1995, **33** (10): 1 365 - 1 371.
- [42] Miguez P V, Leal R B, Mantovani M, *et al.* Synaptosomal glutamate release induced by the fraction Bc2 from the venom of the sea anemone *Bunodosoma caissarum*[J]. **Neuroreport**, 1999, **10** (1): 67 - 70.
- [43] Tejuca M, Anderlueh G, Macek P, *et al.* Antiparasite activity of sea-anemone cytolytins on *Giardia duodenalis* and specific targeting with anti-*Giardia* antibodies[J]. **Int J Parasitol**, 1999, **29** (3): 489 - 498.
- [44] Pederzoli C, Belmonte G, Dalla Serra M, *et al.* Biochemical and cytotoxic properties of conjugates of transferrin with equinatoxin II, a cytolytin from a sea anemone[J]. **Bioconjug Chem**, 1995, **6** (2): 166 - 173.
- [45] Zorec R, Tester M, Macek P, *et al.* Cytotoxicity of equinatoxin II from the sea anemone *Actinia equina* involves ion channel formation and an increase in intracellular calcium activity[J]. **J Membr Biol**, 1990, **118** (3): 243 - 249. (本文编辑:张培新)