

富含半胱氨酸肠蛋白的研究进展

陈燕^{1,2}, 孙晨^{1,2}

(1. 中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003; 2. 中国海洋大学 海洋生物多样性与进化研究所, 山东 青岛 266003)

摘要: 富含半胱氨酸肠蛋白是一种含双锌指结构的小分子蛋白, 其在锌离子转运、个体发育、免疫防御以及肿瘤发生等多种生理过程中发挥重要作用。作者主要对富含半胱氨酸肠蛋白的结构特点及其在发育和免疫方面的研究进展进行系统概述, 并指出其相关作用机制尚待深入研究。

关键词: 富含半胱氨酸肠蛋白; LIM 结构域; 机体发育; 免疫防御

中图分类号: Q51 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2020)06-0148-04

DOI: 10.11759/hyxx20200306003

富含半胱氨酸肠蛋白(Cysteine-rich intestinal protein, CRIP)是富含半胱氨酸蛋白(Cysteine-rich protein, CRP)家族的重要成员之一。近年来, 大量研究表明 CRIP 参与锌离子转运、机体发育以及免疫防御等生理过程^[1-4]。同时, 还发现 CRIP 可以作为早期癌症检测的新标志。作者就其在发育和免疫方面的研究进展, 作简要概述。

1 富含半胱氨酸蛋白和富含半胱氨酸肠蛋白

CRP 隶属于含有 LIM 结构域的 LIM 蛋白质家族。LIM 结构域是一种双锌指结构, 最初发现于秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)*mec-3* 基因编码的蛋白中^[5], 与之后发现的含 LIM 结构域的秀丽隐杆线虫的 *Lin-11* 以及大鼠(*Rattus norvegicus*)的 *Isl-1* 共同命名(*Lin11*、*Isl-1* 和 *Mec-3*)而来^[7]。LIM 结构域由大约 55 个氨基酸组成, $CX_2CX_{16-23}HX_2CX_2CX_2CX_{16-21}CX_2(C/H/D)$, 其中 X 表示其他氨基酸。LIM 结构域中的 7 个半胱氨酸和 1 个组氨酸构成两个锌指结构, 是 Zn^{2+} 结合的位点^[8]。两个锌指结构分别由两个反平行结构组成 β 折叠, 其间通过一个急转头相连接, 在整个结构的 C 末端, 还含有一小段 α 螺旋(图 1)^[9-10]。

CRIP 是 CRP 家族的重要成员之一^[11]。CRIP 最初是在断奶期大鼠的小肠中发现的^[12], 因其在小肠中含量较高以及含有 7 个半胱氨酸残基的结构特点, 故命名为富含半胱氨酸肠蛋白。CRIP 是 LIM 蛋白家族中分子量最小的成员, 在脊椎动物中 *CRIP* 基因含

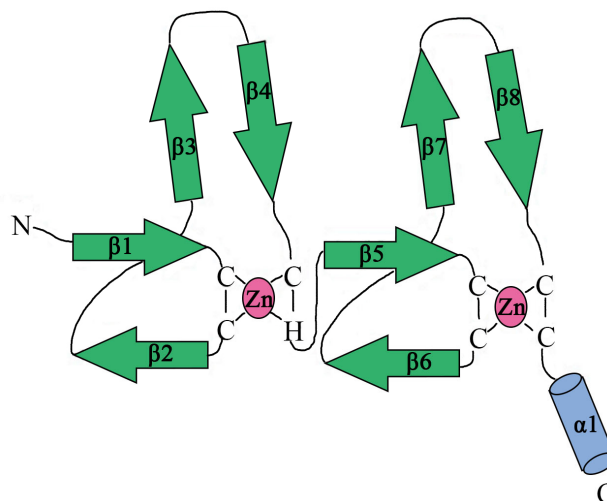


图 1 LIM 结构域拓扑结构^[10]

Fig. 1 Topology of the LIM domain^[10]

图中绿色箭头代表 β 折叠, 蓝色圆柱代表短 α 螺旋; 图中标注的氨基酸残基为锌离子结合位点

The green arrows in the figure represent β -sheets, and the blue cylinders represent short α -helices. The marked amino acid residues in the figure are zinc ion binding sites

有 3 个拷贝, 分别编码 CRIP1、CRIP2 以及 CRIP3 蛋白^[13]。其中, CRIP1 只含有 1 个 LIM 结构域, 而 CRIP2 和 CRIP3 均含有两个 LIM 结构域。CRIP 在机体各组织中广泛分布, 其作用除去参与 Zn^{2+} 转运

收稿日期: 2020-03-06; 修回日期: 2020-03-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31402030)

[Foundation: National Natural Science Fund, No.31402030]

作者简介: 陈燕(1994-), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 主要从事细胞生物学研究, 电话: 17860711769, E-mail: chenyan_917@163.com; 孙晨, 通信作者, E-mail: sunchen@ouc.edu.cn

之外,主要参与个体发育、免疫以及肿瘤发生等生物过程。

2 CRIP 与发育

已有研究发现,CRIP 蛋白参与机体的发育过程。Hempel^[14]等研究了非洲爪蛙 (*Xenopus laevis*) 中 *crip1*、*crip2* 和 *crip3* 3 个基因的时空表达模式,发现这 3 个基因均在前肾、鳃弓以及眼中表达(图 2);此外,*crip1* 在发育中的脑神经节和神经管中表达,*crip2* 在心血管系统、大脑和神经管中表达,*crip3* 在颅神经节和心脏中表达。虽然 *crip1*、*crip2* 和 *crip3* 表达部位存在些许差异,但它们在胚胎发育过程中都发挥一定作用。Tong^[15]等对人类 *CRIP* 基因在秀丽隐杆线虫中的同源基因 *exc9* 进行突变,结果导致排泄管腔长度变短

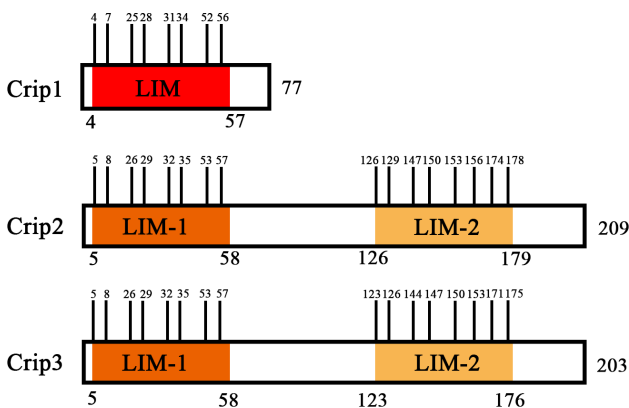


图 2 非洲爪蛙的 Crip1、Crip2 和 Crip3 蛋白结构示意图^[14]
Fig. 2 Schematic representation of *X. tropicalis* Crip1, Crip2 and Crip3 protein domains^[14]

Crip1 包含 1 个 LIM 域,而 Crip2 和 Crip3 每个都有两个 LIM 结构域(LIM-1 和 LIM-2);红色表示 LIM 结构域,而两个橙色方框分别表示 LIM1 和 LIM2 两个结构域,黑线表示锌离子结合位点
Crip1 contains one LIM domain, while Crip2 and Crip3 have two (LIM-1 and LIM-2) each. The red box indicates the LIM domain, while the two orange boxes indicate the LIM1 and LIM2 domains, and the black line indicates the zinc ion binding site

且内径变宽,管腔内存在不同程度的囊肿现象。大量研究显示,*CRIP* 基因在多种动物的某些特定发育阶段呈现不同程度的高表达。如在方形网纹蚤 (*Ceriodaphnia quadrangula*) 中,*CRIP* 基因表达量高的个体往往是能抵御恶劣环境的雄性个体以及能产生休眠卵的雌性个体,而在孤雌生殖的雌性个体中该基因表达量较低,提示 *CRIP* 基因的表达可能影响雌雄个体的性别分化以及后代产生休眠卵的数量^[16]。同样,*CRIP* 基因的表达也影响文蛤(*Meretrix*

meretrix) 的早期发育过程。在文蛤的 D 型幼虫发育到壳顶幼虫这一阶段,其 *CRIP* 基因的转录水平增加了 3.5 倍,而在 D 型幼虫和担轮幼虫阶段该基因表达量较低,推测其可能参与从 D 型幼虫到壳顶幼虫发育过程的调节。Chen^[3]等采用 RNAi 技术对文蛤的 *MmCRIP* 基因进行沉默处理后,文蛤 D 型幼虫存活率显著降低,推测 CRIP 蛋白在蛤类早期发育中发挥作用。在环节动物水蛭 (*Hirudo medicinalis*) 中,*HmCRIP* 基因在切除轴突后的 6 h~24 h 内表达量显著上升,推测其可能与中枢神经系统和血清素激活神经元的再生密切相关^[17]。除此之外,CRIP 蛋白还参与细胞骨架构建以及心脏发育过程。Kim^[18]等发现,斑马鱼 (*Danio rerio*) *crip2* 基因可以下调心内膜垫的细胞外基质中相关基因的表达,而心内膜垫中细胞外基质的沉淀和心内膜间质转化又作为房室瓣膜发育的第一阶段,因此推测 *crip2* 基因在心脏的房室瓣膜的发育中发挥一定调节作用。Sun^[19]等也报道 *crip2* 基因作为心脏神经嵴细胞的标志,其在迁移前神经嵴细胞中的表达会影响心脏发育过程。Cheung^[20]等认为,CRIP2 蛋白作为促血管生成细胞因子表达的转录阻遏物,可能通过 CRIP2 蛋白与 NF- κ B/p65 相互作用的方式来抑制血管形成过程。由上述可见,CRIP 蛋白在动物性别、早期幼虫发育、心血管形成以及神经再生过程中,都发挥重要作用,但有关机制尚待深入研究。

3 CRIP 与免疫

越来越多的研究表明,CRIP 蛋白可能参与宿主的免疫防御过程。对 CRIP 蛋白在大鼠肠道中的分布进行定位,发现其主要分布于潘氏细胞中。同时,在小鼠单核巨噬细胞系中也明显检测到 CRIP 蛋白的存在,揭示其可能参与细胞宿主防御或组织分化^[21]。Hallquist^[22]等发现,当大鼠受到脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 刺激后,其腹膜巨噬细胞、外周血单核细胞以及脾脏、肠中 *CRIP* 基因的转录水平显著提高,而在胸腺和肝脏中表达量几乎不变。外周血单核细胞中 *CRIP* 基因的表达量呈现先降低后升高的特点,血浆中 CRIP 蛋白的含量在刺激后显著降低,揭示其可能在免疫细胞激活或分化过程中发挥作用。Cousins^[23-24]等构建了过表达 *CRIP* 的转基因小鼠 (*Mus musculus*),并对其给予 LPS 刺激。结果发现过表达 *CRIP* 基因的小鼠相较于野生型个体,其血清中细胞因子和免疫细胞的数目发生了较大程度

的改变,具体表现为白介素 6(IL-6)和白介素 10(IL-10)的浓度明显上升,肿瘤坏死因子(TNF- α)以及干扰素- γ (IFN- γ)的浓度显著降低;白细胞数量总体减少,而T淋巴细胞中的CD4⁺以及CD8⁺细胞数目有所增加,这与脾细胞中的表达呈现一定相似性。这些结果表明,CRIP 蛋白可能影响辅助性 T 细胞 1/辅助性 T 细胞 2 (T helper type (Th1)/Th2)两类细胞因子间的平衡。研究还发现,当使用流感病毒免疫刺激小鼠时,过表达 CRIP 基因的小鼠的体质量在实验观察期显著低于非过表达 CRIP 的小鼠,且其对肺部病毒的清除能力明显较对照组弱。这些对病毒刺激所表现出的较弱的免疫响应进一步说明过表达 CRIP 基因可能改变宿主的免疫防御反应^[25]。

对不同物种进行细菌刺激后,发现 CRIP 蛋白也参与细菌免疫过程。用嗜水汽单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)刺激文蛤时,其血细胞、鳃和肝胰腺中的 MmCRIP 基因转录水平明显上调,表明 CRIP 蛋白参与了文蛤的先天免疫过程^[3]。用粪肠球菌(*Enterococcus faecalis* FA2-2)刺激猪 IPEC-J2 细胞系,能够提高猪(*Sus scrofa*)的 poCRIP1 基因 mRNA 表达水平^[4]。在牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)胚胎细胞系中过表达牙鲆 PoCRIP1 基因,可以增强 p65 驱动的 IL-6 启动子在细胞中的活性,而用迟钝爱德华菌(*Edwardsiella tarda*)刺激牙鲆后,其小肠、鳃、肾脏和脾脏中 PoCRIP1 基因表达量显著升高^[26],这些结果表明 CRIP 蛋白可能通过改变细胞因子表达的方式来发挥抗菌作用。新近,我们利用所建立的 *crip1* 基因缺失的斑马鱼纯合突变品系 *crip1*^{-/-},发现 Crip1 蛋白可能作为一个负调控因子参与宿主的抗菌免疫防御反应,并在宿主维持肠道内稳态中发挥一定的作用(待发表数据)。

4 小结与展望

CRIP 蛋白作为 LIM 蛋白家族的重要成员之一,既在动物发育中发挥调控作用,又在机体免疫过程中发挥重要作用。好像是在生命早期过程中,CRIP 蛋白主要参与发育调控,而在成体阶段,CRIP 蛋白主要参与免疫防御。LIM 结构域作为一种介导蛋白质-蛋白质相互作用的结构域,必然在 CRIP 蛋白参与动物发育或免疫防御等生理过程中发挥着重要的作用。根据现有的研究及我们的实验发现可以推测 CRIP 蛋白可能通过与发育或免疫相关通路的重要蛋白质相互作用,调控相关信号通路,参与机体的发

育及免疫反应。鉴定与之发生相互作用的蛋白分子并明确其介导的信号通路,将有助于深入了解 CRIP 蛋白的功能,揭示其发挥作用的分子机制。

参考文献:

- [1] O'Dell, B L. Cysteine-rich intestinal protein (CRIP): A new intestinal zinc transport protein[J]. Nutrition Reviews, 1992, 50(8): 232-233.
- [2] Khoo C, Cousins R J. Purification and properties of rat cysteine-rich intestinal protein[J]. Biochemical Journal, 1994, 299(2): 445-450.
- [3] Chen H, Yang X, Tang T, et al. The involvement of cysteine-rich intestinal protein in early development and innate immunity of Asiatic hard clam, *Meretrix meretrix*[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2014, 40(2): 435-440.
- [4] Cai H, Chen J, Liu J, et al. CRIP1, a novel immune-related protein, activated by *Enterococcus faecalis* in porcine gastrointestinal epithelial cells[J]. Gene, 2017, 598: 84-96.
- [5] Way J C, Chalfie M. *mec-3*, a homeobox-containing gene that specifies differentiation of the touch receptor neurons in *C. elegans*[J]. Cell, 1988, 54: 5-16.
- [6] Freyd G, Kim S K, Horvitz H R. Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-II*[J]. Nature, 1990, 344: 876-879.
- [7] Karlsson O, Thor S, Norberg T, et al. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain[J]. Nature, 1990, 344: 879-882.
- [8] Kadmas J L, Beckerle M C. The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004, 5(11): 920-931.
- [9] Dawid I B, Breen J J, Toyama R. LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions[J]. Trends Genet, 1998, 14: 156-162.
- [10] He C, Pillai S S, Tagliani F, et al. Structural analysis of Stc1 provides insights into the coupling of RNAi and chromatin modification[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2013, 110(21): E1879-E1888.
- [11] 郑斌, 温进坤, 韩梅. LIM 蛋白家族的研究进展[J]. 生理科学进展, 2002, 33(4): 305-308.
Zheng Bin, Wen Jinkun, Han Mei. Research progress of LIM protein family[J]. Advances in Physiological Sciences, 2002, 33(4): 305-308.
- [12] Birkenmeier E H, Gordon J I. Developmental regulation of a gene that encodes a cysteine-rich intestinal protein and maps near the murine immunoglobulin heavy chain locus[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(8): 2516-2520.
- [13] Khoo C, Blanchard R K, Sullivan V K, et al. Human

- cysteine-rich intestinal protein: cDNA cloning and expression of recombinant protein and identification in human peripheral blood mononuclear cells[J]. *Protein Expression & Purification*, 1997, 9(3): 379-387.
- [14] Hempel A, Kühl S J. Comparative expression analysis of cysteine-rich intestinal protein family members *crip1*, 2 and 3 during *Xenopus laevis* embryogenesis[J]. *The International Journal of Developmental Biology*, 2014, 58(10-12): 841-849.
- [15] Tong X, Buechner M. CRIP homologues maintain apical cytoskeleton to regulate tubule size in *C. elegans*[J]. *Developmental Biology*, 2008, 317(1): 225-233.
- [16] 陈宏健. CRIP 在文蛤与方形网纹溞发育过程中的功能[D]. 保定: 河北大学, 2013.
Chen Hongjian. The function of CRIP in development of *Meretrix meretrix* and *Ceriodaphnia quadrangula*[D]. Baoding: Hebei University, 2013.
- [17] Emesa R D, Wangb W Z, Lanaryb K, et al. HmCRIP, a cysteine-rich intestinal protein, is expressed by an identified regenerating nerve cell[J]. *Febs Letters*, 2003, 533(1-3): 124-128.
- [18] Kim J D, Kim H J, Koun S, et al. Zebrafish *Crip2* plays a critical role in atrioventricular valve development by downregulating the expression of *ECM* genes in the endocardial cushion[J]. *Molecules and Cells*, 2014, 37(5): 406-411.
- [19] Sun X, Zhang R, Lin X, et al. *Wnt3a* regulates the development of cardiac neural crest cells by modulating expression of cysteine-rich intestinal protein 2 in rhombomere 6[J]. *Circulation Research*, 2008, 102(7): 831-839.
- [20] Cheung A K, Ko J M, Lung H L, et al. Cysteine-rich intestinal protein 2 (CRIP2) acts as a repressor of NF- κ B-mediated proangiogenic cytokine transcription to suppress tumorigenesis and angiogenesis[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2011, 108(20): 8390-8395.
- [21] Fernandes P R, Samuelson D A, Clark W R, et al. Immunohistochemical localization of cysteine-rich intestinal protein in rat small intestine[J]. *American Journal of Physiology*, 1997, 272(1): 751-759.
- [22] Hallquist N A, Khoo C, Cousins R J. Lipopolysaccharide regulates cysteine-rich intestinal protein, a zinc-finger protein, in immune cells and plasma[J]. *Journal of Leukocyte Biology*, 1996, 59(2): 172-177.
- [23] Cousins R, Lanningham-Foster L. Regulation of cysteine-rich intestinal protein, a zinc finger protein, by mediators of the immune response[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 182(s1): S81-S84.
- [24] Davis B A, Blanchard R K, Lanningham-Foster L, et al. Structural characterization of the rat cysteine-rich intestinal protein *dene* and overexpression of this LIM-Only protein in transgenic mice[J]. *DNA and Cell Biology*, 1998, 17(12): 1057-1064.
- [25] Lanningham-Foster L, Green C L, Langkamp-Henken B, et al. Overexpression of *CRIP* in transgenic mice alters cytokine patterns and the immune response[J]. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2002, 282(6): E1197-E1203.
- [26] Kong H J, Moon J H, Han Y H, et al. PoCRIP1, *Paralichthys olivaceus*, cysteine-rich intestinal protein 1: Molecular characterization, expression analysis upon *Edwardsiella tarda*, challenge and a possible role in the immune regulation[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2011, 30: 917-922.

Research progress of cysteine-rich intestinal protein

CHEN Yan^{1, 2}, SUN Chen^{1, 2}

(1. Department of Marine Biology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Institute of Evolution and Marine Biodiversity, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: Mar. 6, 2020

Key words: cysteine-rich intestinal protein; LIM domain; development; immune defense

Abstract: Cysteine-rich intestinal protein (CRIP) is a small molecule protein containing a double zinc finger structure. CRIP has been proven to play an important role in zinc ion transport, development, immune defense and tumorigenesis. This min-review primarily focuses on the research progress on development and immune response of CRIP. It also suggests a further study on the mode of CRIP action in development and immunity.

(本文编辑: 谭雪静)