

DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-3142. 2013. 05. 022

钱学磊, 韩志颖, 刘瑞齐, 等. 膜联蛋白: 植物生长过程中的多功能复合物 [J]. 广西植物, 2013, 33 (5): 703-709

Qian XL, Han ZY, Liu RQ, et al. Annexins: multi-functional complex in the process of plant growth [J]. *Guihaia*, 2013, 33 (5): 703-709

膜联蛋白: 植物生长过程中的多功能复合物

钱学磊, 韩志颖, 刘瑞齐, 于昌龙, 闫海芳*, 李玉花

(东北林业大学 生命科学院, 哈尔滨 150040)

摘要: 该文介绍了植物膜联蛋白 (annexins) 以及在生长过程中不同生理活动所扮演的角色, 如钙离子通道的形成、膜融合、囊泡运输、信号转导和细胞骨架蛋白间的相互作用, 以及可以结合 F-肌动蛋白, 具有过氧化物酶、离子通道, 使 ATP 和 GTP 水解的功能。

关键词: 膜联蛋白; Ca^{2+} ; 肌动蛋白; ATP 酶; 胁迫力

中图分类号: Q945. 31 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142 (2013) 05-0703-07

Annexins: multi-functional complex in the process of plant growth

QIAN Xue-Lei, HAN Zhi-Ying, LIU Riu-Qi, YU Chang-Long, YAN Hai-Fang*, LI Yu-Hua

(College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract: Annexins is a set of calcium dependent phospholipids binding proteins with multi-functions which are widely distributed in the entire life cycle of animals and plants. This article reviews the functions of annexins in different physiological processes such as Ca^{2+} channel, membrane fusion, vacuole transport, signal transduction and interactions between cell skeleton proteins. At the same time, some members of this multigene family can be combined with F-actin protein, and have the functions of peroxidase, ion channels, ATP and GTP hydrolysis.

Key words: annexins; Ca^{2+} ; actin protein; ATP; stress force

膜联蛋白 (annexins) 是 20 世纪 70 年代未发现的一类新的膜结合蛋白, 是一种普遍存在的可溶性蛋白, 普遍存在于动物、植物及菌类多种生物体内, 几乎所有这些物种器官中均有表达。是进化上保守并依赖 Ca^{2+} 与磷脂、膜可逆结合的蛋白家族, 这些多功能蛋白广泛分布于植物体。

1 植物界膜联蛋白的概述

膜联蛋白是一个多基因、分布广泛、种类繁多的可溶性多功能蛋白家族。在植物、真菌、原生生

物、高等脊椎动物和一个近代原核生物的 65 种以上物种中, 现已发现并报道有超过 200 个膜联蛋白序列 (Morgan *et al.*, 2006)。膜联蛋白分布广泛, 其家族成员有 500 多种, 共分为五类, 脊椎动物膜联蛋白属于 A 类, 已被命名的有膜联蛋白 A1~A13; 无脊椎动物膜联蛋白被归为 B 类; 真菌和一些单细胞真核生物属于 C 类; 植物膜联蛋白属于 D 类; 原核生物被归入 E 类。植物中膜联蛋白除主要定位于细胞质, 还可导致脂质体和分泌囊泡聚集, 表明它们存在于膜组织上 (Blackbourn & Battey, 1993), 还位于各种外膜系统 (Mortimer

收稿日期: 2012-11-17 修回日期: 2013-02-28

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项 (DL12CA10; DL09BA09); 国家自然科学基金重点项目 (30730078)

作者简介: 钱学磊 (1986-), 女, 黑龙江哈尔滨人, 硕士研究生, 主要从事植物基因研究, (E-mail) ivycanwin@126.com。

* 通讯作者: 闫海芳, 博士, 副教授, 主要从事植物育种研究, (E-mail) icyhf@yahoo.com。

et al., 2008), 如离散地分布于 ER 上 (Lee *et al.*, 2004), 游离的植物膜联蛋白可与各种膜 (包括分泌囊泡、细胞膜) 和内膜系统、ATP/GTP 以及肌动蛋白结合。植物膜联蛋白还可定位在植物液泡膜 (Carter *et al.*, 2004)、高尔基体和衍生的囊泡上等。在拟南芥叶绿体中还发现 AnxAt1。我们所知道的大部分膜联蛋白研究来自于哺乳动物, 而植物膜联蛋白的研究相对较少。在单子叶和双子叶植物中发现了膜联蛋白 (Hofmann, 2004), 包括模式植物拟南芥和豆科苜蓿等 (Clark *et al.*, 2001), 其中拟南芥的 7 个膜联蛋白基因和水稻的 9 个膜联蛋白基因的基因组测序已完成 (Cantero *et al.*, 2006)。植物膜联蛋白中这种小分子 (32~43 kD) 蛋白含量在植物细胞总蛋白含量中的比例为 0.5%~2% (Mortimer *et al.*, 2008)。在细胞中主要是参与膜转运及膜表面依赖于钙调蛋白等一系列活动, 如囊泡运输、胞吐作用中的膜融合、DNA 复制、信号传导、细胞增殖、凋亡以及离子通道的形成。膜联蛋白的表达几乎存在于整个植物生长过程中, 在胚芽、种子、根、块茎、茎、下胚轴、胚芽鞘、子叶、叶片、花序、果实、维管组织中都有发现 (Cantero *et al.*, 2006)。迄今为止, 植物膜联蛋白主要集中在结构和蛋白质功能的研究, 这些研究揭示了膜联蛋白的多功能性以及在体内可能的作用位点。

2 植物膜联蛋白与动物膜联蛋白的区别

植物细胞中的膜联蛋白分子量一般在 32~42 kDa 之间, 从氨基酸序列来说, 植物膜联蛋白与动物膜联蛋白具有较大的相似性 (Clark *et al.*, 2001)。在进化上属于高度保守的多基因家族。膜联蛋白各成员之间一级结构非常相似, 几乎所有膜联蛋白都具有两大基本特征。(一) 结构特征: C 端是保守的核心区域, 包含 4 个结构和序列高度相似的结构域, 称之为“Annexins repeat”; N 端为高度可变区域, 是区分不同家族的主要依据。(二) 生物学特征: 膜联蛋白最重要的生物学特征是 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合活性, 即膜联蛋白与磷脂的结合具有两个特点, 一是对 Ca^{2+} 的依赖性, 只有在 Ca^{2+} 存在的情况下才结合; 二是这种结合是可逆的, 去除 Ca^{2+} 后膜联蛋白与磷脂分开。每个植

物膜联蛋白包含 2 个主要区域, 即多样性的 N 端和保守的 C 端。N 端结构域也称尾区, 包括蛋白水解位点、磷酸化位点以及与其他蛋白结合位点, 是膜联蛋白分子的功能调节区; 保守的 C 末端一般具有 4 个膜联蛋白重复序列 (膜联蛋白 A6 含有 8 个), 每一重复序列由大约 70 个高度保守的氨基酸残基构成, 每一重复序列形成 5 个螺旋结构, 它们堆叠成致密的圆盘状, 含有保守的内联蛋白折叠区 (K-G-X-G-T- {38} -D/E), 能够可逆地结合 Ca^{2+} 。此结构域先与带负电荷的磷脂分子极性头部结合, 再与细胞质内其它蛋白质和分子相互作用 (Gerke & Moss, 2002)。

尽管植物膜联蛋白和动物膜联蛋白都是由同一种类进化而来并具有相似性, 但植物和动物膜联蛋白的结构还是有所不同。植物的膜联蛋白具有 4 个区域, 第一和第四个重叠区域具有特有的内联蛋白序列 (Hofmann *et al.*, 2003)。植物膜联蛋白的 N 端区域比较短, 约 10 个氨基酸序列。胡椒膜联蛋白的晶体结构显示, 这个较短的 N 端区域与中心区域相联系, 对膜联蛋白的功能具有调节作用 (Mortimer *et al.*, 2008)。例如辣椒的膜联蛋白 24 具有膜联蛋白家族共有的特征, 但其核心区与非植物膜联蛋白结构有所不同, 尤其在第一和第三重复区域其 N 端由大约 20 个氨基酸组成, 并且通过氢键与核心区相连, 这是在其它物种膜联蛋白结构中没有发现 (Hofmann *et al.*, 2000)。哺乳动物膜联蛋白功能与其结构也紧密相关, 其 N 端区域在序列和长度上具有多样性, 能够根据所结合的蛋白质不同改变结构, 来调节膜联蛋白与膜的结合, 这对于哺乳动物膜联蛋白起到调节功能多样性的作用 (Gerke & Moss, 2002), 还有一些次要修饰, 包括磷酸化、亚硝基化、谷胱甘肽化和 N-肉豆蔻酰化, 分别由不同的信号通路调控 (Gerke *et al.*, 2005)。由此可以看出, 植物和动物膜联蛋白在进化上相对保守, 但又因为物种本身对环境和生存的适应有所改变。

3 膜联蛋白参与生理活动

3.1 膜联蛋白介导的信号转导

膜联蛋白是 Ca^{2+} 信号转导途径中的重要组分, 与 Ca^{2+} 结合是膜联蛋白的一个重要特点, 哺乳动物 AnxA6 已被证明是作为 Ca^{2+} 传感器, AnxA6 通过控制单体 GTP 酶从而调控 GTP 蛋白酶激活 (GAP) 与膜结合 (Grewal *et al.*, 2005)。除了通

过调解酶的活性,三磷酸腺苷、鸟苷酸、环磷酸腺苷、过氧化氢和 pH 值等也是膜联蛋白调节通道活性的因素。植物膜联蛋白还可调节血浆内膜 Ca^{2+} 传导和放大通道信号的能力 (White *et al.*, 2002), 动物膜联蛋白本身还可形成 Ca^{2+} 通道来介导信号转导过程 (Gerke *et al.*, 2005), 许多膜联蛋白可以形成离子通道, 但其功能 (特别是选择性) 有所不同, 例如 AnxA2 参与氯离子通道的形成, 通过 N 端和 S100A10 蛋白结合, 把离子通道元件转运并定位到细胞膜上 (Zhang *et al.*, 2012), 膜联蛋白形成的通道对生长和信号传导有重要作用。动物膜联蛋白通道活性的机制已提出, 因为动物膜联蛋白太大以至于无法跨越膜形成的离子通道。在酸性 pH 值时, 单体端螺旋插入形成较长的螺旋, 使其可以跨越膜。通过冷冻断裂电镜观察发现膜蛋白 AnxB12 图像在 pH 为 4 时是完整的构象, 而在 pH 值大于 4 时其构象发生变化 (Hegde *et al.*, 2006)。已在无脊椎动物观察到 AnxB12 插入膜, 而导致膜构象变化的现象 (Isas *et al.*, 2000)。已经发现拟南芥形成双层膜的 K^{+} 渗透通道, 同时发现 AnxAt1 也是在低 pH 值情况下有利于通道的形成 (Gorecka *et al.*, 2007)。同时还发现人类 AnxA5 形成的通道区包含两个假定的盐桥 (Asp92-Arg117 与 Glu112-Arg271), 对电压、 Ca^{2+} 浓度和通道开放都起到调节作用 (Liemann *et al.*, 1996), 这两种盐桥在植物膜联蛋白也是很保守的序列, 玉米膜联蛋白 AnxZm33/35 也包含这种假定的盐桥, 并形成一个 Ca^{2+} 渗透脂质双层通道 (Nichols *et al.*, 2005), 作为 Ca^{2+} 在不利的 (极化) 膜电压时渗透细胞膜的通道, 调解 Ca^{2+} 进出细胞 (White *et al.*, 2002)。

综上所述, 膜联蛋白可以通过对 Ca^{2+} 、酶活性、电压等的调节从而介导信号转导的过程, 在发挥功能的过程中 pH 值、 Ca^{2+} 浓度以及本身构象等都起到至关重要的作用。例如, 膜联蛋白与 Ca^{2+} 的可逆结合使得带负电荷的磷脂分子结合也是可逆的, 并且这种结合在酸性环境中会被削弱。同时膜联蛋白与 Ca^{2+} 结合不仅参与了信号转导过程也在膜结合过程中起到了重要作用。

3. 2 Ca^{2+} 在膜联蛋白与膜结合的作用

无论是植物还是动物膜联蛋白都可与微摩尔形式的 Ca^{2+} 结合, 并负调控磷脂的活性使磷脂转化为磷脂酸 (Balasubramanian *et al.*, 2001), 此时增加 Ca^{2+} 螯合剂可使结合逆转。膜联蛋白可能是

依赖 [Ca^{2+}] cyt、pH 值、脂质组成的一种膜相关的插入蛋白 (Gerke & Moss, 2002)。

哺乳动物膜联蛋白序列揭示了与磷脂结合的位点, 而植物膜联蛋白的此序列是不完全保守的 (Hofmann *et al.* 2000), 虽然在氨基酸序列存在差异, 但都有对磷脂结合的活性。例如玉米、甜椒、棉花等一些植物膜联蛋白与磷脂结合区的序列不同但都具有同样的活性 (Dabitz *et al.*, 2005)。由此可见, 保守的序列似乎不是膜结合功能所必须的, 观察发现植物和动物膜联蛋白除了与磷脂外带负电荷的磷脂酰丝氨酸结合, 还与磷脂酰肌醇、磷脂酸和丙二醛偶联脂质等相结合 (Balasubramanian *et al.*, 2001), 同时发现疏水作用也参与了膜联蛋白与膜的结合, 例如 Anx-Ca32 复合体与膜结合涉及到多个氨基酸残基通过氢键与膜上磷脂分子头部以及甘油主键的相互作用 (Dabitz *et al.*, 2005)。膜联蛋白在中性 pH 值的环境下与膜结合需要 Ca^{2+} 参与, 但在酸性 pH 值 (pH 值 < 6.0) 的环境中某些膜联蛋白结合到细胞膜却不需要 Ca^{2+} (Golczak *et al.*, 2004), 在中性 pH 值的条件下 20% 膜联蛋白 (AnxGh1 和 AnxCa32) 在 Ca^{2+} 不存在的情况下依然可以结合脂质囊泡, 加入去污剂后膜联蛋白被释放 (Dabitz *et al.* 2005), 这一现象并不是膜结合不需要 Ca^{2+} , 可能是整个群体中已有一定比例的膜联蛋白插入膜, 因此在加入去垢剂后蛋白质被释放出来。总而言之, 植物膜联蛋白在酸性 pH 值与膜结合时对 Ca^{2+} 的依赖性有所降低 (Blackbourn *et al.*, 1993)。植物膜联蛋白与膜结合不需要 Ca^{2+} 的机制目前还不完全清楚, 但已知有一对保守的色氨酸参与其中 (Dabitz *et al.*, 2005), 此外还有人解释与膜结合不需要 Ca^{2+} 是因为膜联蛋白与膜结合整体依赖 Ca^{2+} 的一个平台, 因为膜联蛋白依赖 Ca^{2+} 的结合与不依赖 Ca^{2+} 的结合之间存在着连续性和相互性, 所以与膜结合的这两种模式可能存在着紧密的联系。在耐寒型小麦中发现了 4 种膜联蛋白, 其中 2 种是可溶性蛋白, 分子量分别为 34 kDa 和 36 kDa, 它与以前在植物中发现的二聚体相似, 另外 2 种是从微粒体分离出来的, 分子量分别为 39 kDa (P39) 和 22.5 kDa (P22.5)。生化分析表明 P39 和 P22.5 都是胞内蛋白, 它与其他植物膜联蛋白不同的是, 这两种微粒与膜的解离不依赖于 Ca^{2+} , 这是首次报道植物体内有对 EGTA 有抗性的膜联蛋白。免疫印迹分析表明, 小麦低温

处理 1 d 后 P39 和 P22.5 含量达最高, 并聚集在质膜上, 这种快速而大量的积累表明它们可能与低温信号转导的早期事件有关 (Breton *et al.*, 2000)。其中大多数的植物膜联蛋白在细胞质中被发现, 但同时也结合或插入在质膜和内膜上。

可见膜联蛋白结合膜是顺应环境动态变化的, 这与他们参与信号传递和对环境的适应性是相互协调的。此外多种胁迫反应涉及膜联蛋白的表达量和定位的变化, 这意味着膜联蛋白可能是胁迫反应中的信号转导因子 (Lee *et al.*, 2004)。

3.3 膜联蛋白在非生物胁迫中发挥功能

膜联蛋白的表达还受到各种非生物胁迫调控, 这意味着某些膜联蛋白的表达调控与植物对非生物胁迫耐受是相关的, 膜联蛋白具有酶的功能, 它可能直接参与胁迫过程中信号转导的调控 (Konopka-Postupolska *et al.*, 2009)。关于膜联蛋白参与植物应对胁迫反应的第一例报道是对蒺藜苜蓿 (*Medicago sativa*) 渗透、ABA、干旱胁迫均能使膜联蛋白 (AnxMs2) 的表达上调 (Kovacs *et al.*, 1998)。小麦遭受冷害胁迫后, 膜联蛋白 P39 和膜联蛋白 P22.5 表达量增加并插入到质膜中, 调节信号传导中 Ca^{2+} 或细胞质中游离的 Ca^{2+} , 以应对非生物胁迫 (Breton *et al.*, 2000), 对火炬松 (*Pinus taeda*) 干旱胁迫, 膜联蛋白的表达量也上调 (Laohavisit *et al.*, 2009)。Cantero *et al.* (2006) 发现, 拟南芥中 8 个 Annexins 基因在干旱和盐胁迫等不同的胁迫诱导下都不同程度地发生变化, 盐和干旱胁迫拟南芥发现 AnnAt1 和 AnnAt4 在拟南芥种子萌发中起重要作用。AnnAt1 和 AnnAt4 有可能是在 ER 上形成离子通道, 或者与 ER 上的 Ca^{2+} 通道相互作用从而调控通道的开启, 介导 Ca^{2+} 释放到细胞质中达到信号转导的作用。AnnAt1 和 AnnAt4 依赖光和 Ca^{2+} , 是渗透胁迫和 ABA 信号转导中的重要组分 (Huh *et al.*, 2010)。其中 AnnAt1 是迄今为止研究最为充分的膜联蛋白, 这可能拟南芥中 AnnAt1 的含量丰富相关。AnnAt1 有两个保守的 II 型 Ca^{2+} 结合位点。拟南芥中 AnnAT1 的含量在氧化胁迫、ABA、干旱、冷害和盐胁迫下表达上调 (Cantero *et al.*, 2006)。AnnAt1 还可氧化修饰, 如谷胱甘肽化 (S-glutathionylation), 形成寡聚物, 导致 AnnAt1 对 Ca^{2+} 的亲合力降低, 氧化还原反应形成 AnnAt1 的聚合物可能会引起 AnnAt1 的失活 (Konopka-Postupolska *et al.*, 2009)。某

些膜联蛋白的蛋白甚至参与了植物应对胁迫的过程, 如 ABA 处理、渗透胁迫、干旱胁迫时膜联蛋白表达量上调, 通过转录组学的研究证实拟南芥在应对各种非生物胁迫中, 膜联蛋白的表达量发生了一定的变化 (Vandeputte *et al.*, 2007)。其中机械胁迫使细胞质中的 Ca^{2+} 浓度增加, 这可能与细胞膜中的膜联蛋白相关联, 从机械胁迫的结果看, 它们可能作为生长调节物质支配径向的膨胀, 从而进一步调节质膜的应激反应。寒冷胁迫下, 杨树叶的膜联蛋白表达量增加 (Renault *et al.*, 2006), 在病原体侵入时拟南芥 AnxAt4、番茄 AnxLe34 和烟草 AnxNt12 表达量都有所增加 (Truman *et al.*, 2007; Vandeputte *et al.*, 2007)。此外磷酸盐和过氧化氢等都会对相应植物产生非生物胁迫, 致使膜联蛋白的含量发生改变, 膜联蛋白的表达受到各种非生物胁迫调控, 这意味着某些膜联蛋白的表达调控与植物对非生物胁迫耐受是相关的, 并且膜联蛋白具有酶的功能很有可能直接参与胁迫下信号转导的调控, 但在具体过程中所发挥的功能还有待于进一步的研究, 膜联蛋白不仅在非生物胁迫过程中起到相关作用, 还与肌动蛋白相互作用。

3.4 膜联蛋白与肌动蛋白相互作用

丝状肌动蛋白对细胞的外形起到了支撑的作用, 尤其是在植物细胞某些组织的发育和信号传导中起重要作用 (Drobak *et al.*, 2004)。有少量的动物膜联蛋白可与肌动蛋白结合, 总体上来说肌动蛋白与膜联蛋白的相互作用几乎仅限于动物膜联蛋白 (Hayes *et al.*, 2004), 这种现象在植物膜联蛋白中很少见 (Konopka-Postupolska, 2007)。对于膜联蛋白与肌动蛋白结合作用机制还知之甚少, 但似乎与其 C-末端序列相关联。对植物膜联蛋白与肌动蛋白结合的证据说法各异。一些膜联蛋白, 如 A1、A2、A5 和 A6, 无论是在体内还是体外, 都能与微丝结合, 这种结合是 Ca^{2+} 依赖性的, 与微丝的结合受膜联蛋白蛋白翻译后修饰的影响, 比如磷酸化。膜联蛋白 A1 和 A2 在体外不仅能结合到微丝上, 还能促进微丝成束。除了结合微丝之外, 一些特异的膜联蛋白还能结合到一些与微丝相关的蛋白上, 间接地影响微丝的动态活动。其中番茄和含羞草的膜联蛋白在体外都可通过对 Ca^{2+} 依赖性与 F-肌动蛋白结合 (Hoshino *et al.*, 2004)。一系列在脊椎动物细胞的体内实验证实膜联蛋白与肌动蛋白的相互作用几乎都发生在膜表面, 膜联蛋白定位在膜的某些区域与肌动蛋白相连接, 类似于细

胞核与细胞膜之间的接触。从西葫芦衍生的 F-肌动蛋白，有两个与膜联蛋白相关的蛋白与细胞膜结合 (Hu *et al.*, 2000)。膜联蛋白还可以和细胞骨架相互作用，其中膜联蛋白 A1 和 profilin 蛋白结合有 b 调节肌动蛋白聚合的作用，磷酸化膜联蛋白 A1 能使肌动蛋白大量聚合从而抑制肾上腺皮脂激素分泌。膜联蛋白 A2 直接结合 F-肌动蛋白从而建立和稳定生物膜的结构和结构域 (黄逸群等, 2012)。棉花、甜椒、玉米的膜联蛋白都已广泛的研究，无论是否缺乏钙都有与肌动蛋白的亲合作用 (Hoshino *et al.*, 2004)。研究最多的两个物种拟南芥和苜蓿的膜联蛋白，其中拟南芥序列包含一个完整或部分保守的 F-肌动蛋白结合基序，但尚未对 F-肌动蛋白结合研究透彻。膜联蛋白与肌动蛋白相互作用的功能意义目前尚不清楚，但猜想膜联蛋白与肌动蛋白的相互作用参与了胞外分泌和信号传导 (Konopka-Postupolska, 2007)。

3.5 膜联蛋白在胞外分泌、生长和发育中的作用

植物和动物膜联蛋白在膜运输和信号转导过程中都起到重要的作用。动物膜联蛋白针对特定的蛋白质膜位点显示参与了分泌和内吞作用 (Gerke *et al.*, 2005)。植物膜联蛋白在细胞高分裂率的质膜中含量丰富，特别是在伸长细胞中的含量很高，如根毛发、花粉管、蕨类假根 (Blackbourn & Battey 1993)。在拟南芥和玉米的根伸长区检测到膜联蛋白的存在 (Bassani *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2005a, b)，膜联蛋白可能与根毛伸长初期生长有关，具体研究拟南芥膜联蛋白 (AnxAt2) 发现它参与了侧根的发展 (Clark *et al.*, 2005a)。最近在水霉的研究中发现膜联蛋白具有激发 (1-3)-BD-葡聚糖合成酶活性的能力，这意味着膜联蛋白在细胞壁合成过程中起到调节作用 (Bouzenenza *et al.*, 2006)。相对于棉花的膜联蛋白 (AnxGh1) 的抑制作用，说明不同膜联蛋白在不同物种具有不同的调节作用 (Andrawis *et al.*, 1993)。用氧化脂质诱导处理拟南芥，AnxAt7 表达上调对胼胝质的形成和对波浪状根、侧根的生成产生抑制作用 (Vellosillo *et al.*, 2007)。除了在胞吐和细胞壁合成的作用，个别膜联蛋白可以充当 Ca^{2+} 或 GTP 传感器来协调表达。例如 1998 年 Carroll 等的实验显示膜联蛋白可以影响分泌泡的融合。它们把从玉米胚芽中纯化出来的膜联蛋白 (P33, P35) 加入到玉米根冠外部，然后在根冠部位外加钙离子以活化膜联蛋白，使胞吐过程受到显著的促进；当 Ca^{2+} 为

40 mmol · L⁻¹ 时达到饱和，继续增加钙离子浓度则胞吐作用不再增强；外加灭活的膜联蛋白时，对于胞吐作用没有刺激作用；生化实验结果显示植物膜联蛋白能够引起囊泡的钙依赖性聚集。以上结果表明，植物膜联蛋白参与了胞吐过程。膜联蛋白的家族成员还参与生物体组织癌变的生理过程，例如 ANXA2 作为蛋白酶和细胞外基质蛋白的受体能够激活蛋白酶并启动蛋白水解级联反应，选择性降解细胞外基质蛋白和基底膜，从而导致肿瘤细胞的黏附、浸润和转移等 (张海健等, 2012)。

4 膜联蛋白的生物活性作用

4.1 膜联蛋白的过氧化物酶活性

植物体各种生理功能大多依赖于 ROS 以及 $[Ca^{2+}]_{cyt}$ 的调节。膜联蛋白是小分子 Ca^{2+} 依赖的膜结合蛋白，也能够插入到膜中，他们特有的结构域不仅具有过氧化物酶活性还能够作为 Ca^{2+} 的运输蛋白 (Laohavisit *et al.*, 2009)，因此膜联蛋白的过氧化物酶活性可能与信号转导有相应关系。活性氧生成量与植物 (热带) 的生长和发育有关，在一定情况下活性氧控制细胞质中的 Ca^{2+} 浓度 (Gapper & Dolan 2006)。膜联蛋白已被确定为 *M. truncatula* 质膜脂质筏上具有传递信号和氧化还原功能的一种蛋白质。在动物体内过氧化氢量增加 Annexins 与膜结合量增加，并诱导膜通道的形成 (Balasubramanian *et al.*, 2001)。有几种确定的植物细胞中活性氧可以激活植物膜联蛋白通道的形成 (Foreman *et al.*, 2003)，它们通常锚定在肌红蛋白的骨架上 (Konopka-Postupolska *et al.*, 2009)。另外与脂质筏相关的膜联蛋白可以作为过氧化物酶在局部活性氧信号“中心”起作用。作为过氧化物酶，膜联蛋白可以通过跨细胞的信使或氧化生成过氧化物传递/终止信号调节过氧化物，可知膜联蛋白具有保护作用，在应激条件下 (如病原体侵入、干旱、盐碱、寒冷、缺氧、营养匮乏) 导致活性氧的产生，同时膜联蛋白积累或迁移到膜。但目前还不清楚是否是活性氧升高改变细胞质的 Ca^{2+} 浓度而触发膜联蛋白一系列的反应。

4.2 ATP 酶和 GTP 酶的活性

与 ATP 和 GTP 结合是动物膜联蛋白的一个共性，核苷酸结合序列被认为是 FXXKYD/EKSL (Bandorowicz-Pikula *et al.*, 2003)，植物膜联蛋白不仅结合嘌呤核苷酸，而且能将它们水解 (Shin

& Brown, 1999)。相对植物而言,动物膜联蛋白结合和水解核苷酸可能取决于 Walker 的一个基序 (GXXXXGKT/S) 和一个 GTP 酶家族 GTP 结合的基序 (DXXG)。这些基序已在 AnxGh1f 第四重复区域中被发现, C-末端缺失和失去了第四重复区域导致 GTP 酶失活 (Shin & Brown, 1999)。在拟南芥 AnxAt2 和 AnxAt7 的第四重复区域有极大的相似性 (Clark *et al.*, 2001)。在番茄膜联蛋白与肌动蛋白结合后 GTPase 活性仍然起作用 (Calvert *et al.* 1996), 这表明膜联蛋白与细胞骨架的关联可能具体定位在细胞的 GTP 酶功能。棉花的膜联蛋白在 Ca^{2+} 存在时对 GTP 酶的活性具有抑制效果, 但对玉米膜联蛋白 (AnxZm33/35) ATP 酶和 GTP 酶的活性却没有抑制作用, 对棉花膜联蛋白 (AnxAt2) 和玉米膜联蛋白 (AnxZm33/35) 的主要序列比对, 发现 GTP 结合的序列与 Ca^{2+} 结合区域的第四内联蛋白基序重叠 (Shin & Brown, 1999), 这样 Ca^{2+} 和 GTP 可能竞争与其结合。现已证明番茄中, 膜联蛋白在 Ca^{2+} 介导的与磷脂结合过程中, 抑制了 GTPase 活性, 表明膜联蛋白与膜的结合阻止了 GTP 到达其催化位点 (calvert *et al.*, 1996)。总体而言, 膜联蛋白通过 Ca^{2+} 和膜结合调节酶的活性, 可能是在时间和空间上的共同作用效果, 尽管催化相同的反应, 番茄、玉米、棉花的膜联蛋白却有不同的作用, 这说明不同的植物膜联蛋白履行不同的角色。

5 展望

膜联蛋白参与许多重要的细胞活动, 膜联蛋白常与质膜、内膜、细胞骨架蛋白等相联系, 具有十分广泛而重要的生理功能, 比如参与细胞的胞吞和分泌、形成膜离子通道、囊泡运输、膜运输、质膜融合、膜重组、离子交换等。膜联蛋白还参与到细胞膜结构域的建立及稳定性的维持、离子跨膜的调节、具有过氧化物酶的活性、 Ca^{2+} 在细胞中的浓度、编程性细胞凋亡的调节等。但大多数植物膜联蛋白的生理功能仍尚未完全知道, 已引起人们的关注。目前对植物膜联蛋白的研究集中于传感相关作用、参与骨架调节、信号通道作用、过氧化物酶等方面, 可见植物膜联蛋白是体内潜在的多功能蛋白质。随着生物技术的不断发展, 更多膜联蛋白将会被研究, 同时运用功能基因组学、遗传、生化等方

法进一步证实新膜联蛋白功能, 将有利于进一步探讨或阐明植物应答各种逆境胁迫的生理 (或病理) 机制和生长机制等。

参考文献:

- Andrawis A, Solomon M, Delmer DP. 1993. Cotton fibre annexins: a potential role in the regulation of callose synthase [J]. *Plant J*, **3** (6): 763-772
- Balasubramanian K, Bevers EM, Willems GM, *et al.* 2001. Binding of annexin V to membrane products of lipid peroxidation [J]. *Biochemistry*, **40**: 8 672-8 676
- Bandorowicz-Pikula J, Kirilenko A, van Deursen R, *et al.* 2003. A putative consensus sequence for the nucleotide-binding site of annexin A6 [J]. *Biochemistry*, **42**: 9 137-9 146
- Bassani M, Neumann PM, Gepstein S. 2004. Differential expression profiles of growth-related genes in the elongation zone of maize primary roots [J]. *Plant Mol Biol*, **56**: 367-380
- Blackbourn HD, Battey NH. 1993. The control of exocytosis in plant cells [J]. *New Phytol*, **125**: 307-338
- Bouzenza J, Pelosi L, Briolay A, *et al.* 2006. Identification of the first Oomycete annexin as a (1/3) -b-Dglucan synthase activator [J]. *Mol Microbiol*, **62**: 552-565
- Breton G, Vazquez Tello A, Danyluk J, *et al.* 2000. Two novel intrinsic annexins accumulate in wheat membranes in response to low temperature [J]. *Plant Cell Physiol*, **41**: 177-184
- Calvert CM, Gant SJ, Bowles DJ. 1996. Tomato annexins p34 and p35 bind to F-actin and display nucleotide phosphodiesterase activity inhibited by phospholipid binding [J]. *Plant Cell*, **8**: 333-342
- Cantero A, Barthakur S, Bushart TJ, *et al.* 2006. Expression profiling of the Arabidopsis annexin gene family during germination, deetiolation and abiotic stress [J]. *Plant Physiol Biochem*. **44**: 13-24
- Carter C, Pan S, Zouhar J, *et al.* 2004. The vegetative vacuole proteome of Arabidopsis thaliana reveals predicted and unexpected proteins [J]. *Plant Cell*. **16**: 3 285-3 303
- Clark GB, Cantero-Garcia A, Butterfield T, *et al.* 2005b. Secretion as a key component of gravitropic growth; implications for annexin involvement in differential growth [J]. *Gravit Space Biol*, **18**: 113-114
- Clark GB, Lee DW, Dauwalder M, *et al.* 2005a. Immunolocalization and histochemical evidence for the association of two different Arabidopsis annexins with secretion during early seedling growth and development [J]. *Planta*, **220**: 621-631
- Clark GB, Rafati DS, Bolton RJ, *et al.* 2000. Redistribution of annexin in gravistimulated pea plumules [J]. *Plant Physiol Biochem*, **38**: 937-947
- Clark GB, Sessions A, Eastburn DJ, *et al.* 2001. Differential expression of members of the annexin multigene family in Arabidopsis [J]. *Plant Physiol*, **126**: 1 072-1 084
- Dabitz N, Hu NJ, Yusof A, *et al.* 2005. Structural determinants for plant annexin membrane interactions [J]. *Biochemistry*, **44**: 16 292-16 300
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, *et al.* 2003. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth [J]. *Nature*, **422**: 442-446
- Gapper C, Dolan D. 2006. Control of plant development by reac-

- tive oxygen species [J]. *Plant Physiol*, **141**: 341–345
- Gerke V, Creutz CE, Moss SE. 2005. Annexins; linking Ca^{2+} signalling to membrane dynamics [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **6**: 449–461
- Gerke V, Moss SE. 2002. Annexins: from structure to function [J]. *Physiol Rev*, **82**: 331–371
- Golczak M, Kirilenko A, Bandorowicz-Pikula J, et al. 2004. Structure of human annexin A6 at the air-water interface and in a membrane-bound state [J]. *Biophys J*, **87**: 1 215–1 226
- Gorecka KM, Thouverey C, Buchet R, et al. 2007. Potential role of AnnAt1 from *Arabidopsis thaliana* in pH mediated cellular response to environmental stimuli [J]. *Plant Cell Environ*, **48**: 792–803
- Grewal T, Evans R, Rentero C, et al. 2005. Annexin A6 stimulates the membrane recruitment of p120 GAP to modulate Ras and Raf1 activity [J]. *Oncogene*, **24**: 5 809–5 820
- Hayes MJ, Rescher U, Gerke V, et al. 2004. Annexin-actin interactions [J]. *Traffic*, **5**: 571–576
- Hegde BG, Isas JM, Zampighi G, et al. 2006. A novel calcium-independent peripheral membrane-bound form of annexin B12 [J]. *Biochemistry*, **24**: 934–942
- Hofmann A. 2004. Annexins in the plant kingdom [J]. *Persp Potent*, **1**: 51–61
- Hofmann A, Delmer DP, Wlodawer A. 2003. The crystal structure of annexin Gh1 from *Gossypium hirsutum* reveals an unusual S3 cluster-implications for cellulose synthase complex formation and oxidative stress response [J]. *Eur J Biochem*, **270**: 2 557–2 564
- Hofmann A, Proust J, Dorowski A, et al. 2000. Annexin 24 from *Capsicum annuum*-X-ray structure and biochemical characterization [J]. *J Biol Chem*, **275**: 8 072–8 082
- Hoshino D, Hayashi A, Temmei Y, et al. 2004. Biochemical and immunohistochemical characterization of *Mimosa* annexin [J]. *Planta*, **219**: 867–875
- Hu SQ, Brady SR, Kovar DR, et al. 2000. Identification of plant actin-binding proteins by F-actin affinity chromatography [J]. *Plant J*, **24**: 127–137
- Huang YQ (黄逸群), Zuo KJ (左开井). 2012. Advances in function and regulation of Annexin (膜联蛋白的功能与调控研究进展) [J]. *Curr Biotechnol (生物技术进展)*, **2** (3): 157–164
- Huh SM, Noh EK, Kim HG, et al. 2010. *Arabidopsis* Annexins AnnAt1 and AnnAt4 interact with each other and regulate drought and salt stress responses [J]. *Plant Cell Physiol*, **51** (9): 1 499–1 514
- Isas JM, Cartailier JP, Sokolov Y, et al. 2000. Annexins V and XII insert into bilayers at mildly acidic pH and form ion channels [J]. *Biochemistry*, **39**: 3 015–3 022
- Konopka-Postupolska D. 2007. Annexins; putative linkers in dynamic membrane-cytoskeletal interactions in plant cells [J]. *Protoplasma*, **230**: 203–215
- Konopka-Postupolska D, Clark G, Goch G, et al. 2009. The role of annexin 1 in drought stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, **150** (3): 1 394–1 410
- Kovacs I, Ayaydin F, Oberschall A, et al. 1998. Immunolocalization of a novel annexin-like protein encoded by a stress and abscisic acid responsive gene in alfalfa [J]. *Plant*, **15** (2): 185–197
- Laohavisit A, Mortimer JC, Demidchik V, et al. 2009. Zea mays annexins modulate cytosolic free Ca^{2+} and generate a Ca^{2+} -permeable conductance [J]. *Plant Cell*, **21** (2): 479–493
- Lee S, Lee EJ, Yang EJ, et al. 2004. Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, **16**: 1 378–1 391
- Liemann S, Benz J, Burger A, et al. 1996. Structural and functional characterisation of the voltage sensor in the ion channel human annexin V [J]. *J Mol Biol*, **258**: 555–561
- Morgan RO, Martin-Almedina S, Garcia M, et al. 2006. Deciphering function and mechanism of calcium-binding proteins from their evolutionary imprints [J]. *Biochim Biophys Acta*, **1 763**: 1 238–1 249
- Mortimer JC, Laohavisit A, Macpherson N, et al. 2008. Annexins; multifunctional components of growth and adaptation [J]. *J Exp Bot*, **59** (3): 533–544
- Moss SE, Morgan RO. 2004. The annexins [J]. *Genome Biol*, **5**: 1–8
- Shin HS, Brown RM. 1999. GTPase activity and biochemical characterization of a recombinant cotton fibre annexin [J]. *Plant Physiol*, **119**: 925–934
- Truman W, Bennett MH, Kubigsteltig I, et al. 2007. *Arabidopsis* systemic immunity uses conserved defense signalling pathways and is mediated by jasmonates [J]. *Proc Natl Acad Sci*, **104**: 1 075–1 080
- Vandeputte O, Lowe OY, Burssens S, et al. 2007. The tobacco Ntann12 gene, encoding an annexin, is induced upon *Rhodococcus fascians* infection and during leafy gall development [J]. *Mol Plant Pathol*, **8** (1): 85–194
- Vellosillo T, Mart'nez M, Lo'pez MA, et al. 2007. Oxylipins produced by the 9-lipoxygenase pathway in *Arabidopsis* regulate lateral root development and defense responses through a specific signalling cascade [J]. *Plant Cell*, **19**: 831–846
- White PJ, Bowen HC, Demidchik V, et al. 2002. Genes for calcium-permeable channels in the plasma membrane of plant root cells [J]. *Biochem Biophys Acta*, **1 564**: 299–309
- Zhang Hai-Jian, Yao Deng-Fu, Yao Min, et al. 2012. Expression characteristics and diagnostic value of annexin A2 in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, **41** (18): 5 897–5 904
- Zhang HJ (张海健), Qin CL (秦呈林), Yao NH (姚宁化), et al. 2012. Abnormal expression of Annexin A2 and its clinicopathologic characteristics in tissues of hepatocellular carcinoma (肝癌组织膜联蛋白 A2 异常表达及临床病理特征分析) [J]. *J Nantong Univ: Med Sci Edit (南通大学学报·医学版)*, **32** (2): 110–113