



LEPROTs 调控包被蛋白复合物 I 逆向运输维持高尔基体形态的机制研究*

高经虎^{1,2,3)}**,*** 赵琳玥⁴⁾** 张雨露¹⁾ 伍艳芳²⁾ 颜冰²⁾

(¹⁾ 绍兴大学医学院, 绍兴 312000; (²⁾ 中国科学院生物物理研究所生物大分子全国重点实验室, 北京 100101;

(³⁾ 南开大学生命科学学院, 天津 300071; (⁴⁾ 南京大学医学院附属鼓楼医院病理科, 南京 210008)

摘要 目的 高尔基体带状结构 (Golgi ribbon) 的稳态维持依赖于胞内各运输通路间的膜流平衡, 但特定运输支路对高尔基体宏观形态的调控机制尚不完全明确。本研究旨在阐明包被蛋白复合物 I (coat protein complex I, COPI) 介导的逆向运输在高尔基体带状结构维持中的核心作用, 并解析跨膜货物受体 LEPROT/LEPROTL1 (LEPROTs) 与 COPI 接头蛋白 GOLPH3 在此过程中的协同关系。**方法** 通过 siRNA 干扰或基因缺失手段, 在 HeLa 细胞中特异性阻断 COPI 或接头蛋白复合物 1 (adaptor protein complex 1, AP-1) 介导的膜运输通路。结合共聚焦显微镜定量分析高尔基体带的“角度”分布特征, 并通过透射电子显微镜观察高尔基体超微结构及周边囊泡密度。此外, 利用免疫荧光共定位技术检测 COPI 组分在亚细胞结构中的动态分布。**结果** 选择性抑制 COPI 逆向运输显著诱导高尔基体带沿核周发生过度延伸, 而阻断 AP-1 介导的正向运输则导致高尔基体皱缩, 二者呈对立效应。LEPROTs 缺失细胞表现出与 COPI 功能受损高度一致的高尔基体延伸表型。在 LEPROTs 双敲除背景下进一步敲低 GOLPH3 导致高尔基体延伸程度显著加剧, 呈典型的叠加效应, 提示二者在 COPI 相关运输过程的调控中发挥非冗余作用。机制研究显示, LEPROTs 或 GOLPH3 缺失导致 COPI 组分在内质网出口位点异常积聚, 并伴随高尔基体周边 COPI 样囊泡密度显著降低。超微结构分析进一步揭示, 缺陷细胞的高尔基体扁平囊在堆叠数不变的情况下, 呈现“长度缩短、厚度增加”的形态重塑特征。**结论** 活跃的 COPI 逆向运输是限制高尔基体带过度延展、维持其紧凑形态的关键因素。LEPROTs 与 GOLPH3 协同促进 COPI 组分的循环与囊泡化过程, 从而在高尔基体边缘维持其结构约束。本研究为理解高尔基体形态稳态的膜运输动力学基础提供了新的实验证据。

关键词 高尔基体, 包被蛋白质复合物 I, LEPROT/LEPROTL1, GOLPH3, 膜运输动力学

中图分类号 Q244, Q247

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0077

CSTR: 32369.14.pibb.20260077

高尔基体 (Golgi apparatus) 是真核细胞分泌途径的核心枢纽, 负责蛋白质与脂质的加工、分选及向不同细胞器/细胞表面的定向运输^[1]。在哺乳动物细胞中, 高尔基体通常表现为由多个扁平囊堆叠 (cisternae stacks) 侧向连接而成的核周带状结构 (Golgi ribbon)^[2]。这一高度有序的结构并非静态存在, 而是依赖于持续而活跃的膜运输过程得以维持^[3]。高尔基体的形态稳定与分泌通路中的膜通量密切相关。来自内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 的顺向运输主要由包被蛋白复合物 II (coat protein complex II, COPII) 介导的囊泡运输完成, 而高尔基体内部及其向 ER 的逆向运输则依赖包被蛋白复合物 I (coat protein complex I,

COPI) 介导的囊泡运输; 与此同时, 反面高尔基体网络 (trans-Golgi network, TGN) 通过网格蛋白及其接头蛋白复合物 (如接头蛋白复合物 1 (adaptor protein complex 1, AP-1)) 介导向内吞体和质膜的输出^[1, 4]。大量研究表明, 干扰膜运输, 例如用药物扰动 COPI/COPII 等, 能导致高尔基体结构碎片化或重新分布, 提示膜流本身是塑造

* 国家自然科学基金 (32100550, 82203346) 和绍兴文理学院科研项目 (2025LG011) 资助。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 0575-88345839, E-mail: gaojh@usx.edu.cn

收稿日期: 2026-02-09, 接受日期: 2026-04-08

高尔基体结构的重要决定因素^[3, 5]。

在多种膜运输途径中, COPI介导的逆向运输在维持高尔基体功能与结构方面尤为关键。COPI被膜复合体通过小GTP酶ADP核糖基化因子1 (ADP-ribosylation factor 1, ARF1) 的活化被招募至膜上, 并负责回收ER驻留蛋白、可溶性N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, SNARE) 以及高尔基体内腔酶, 从而维持分泌通路的方向性和成分稳态^[6]。已有研究显示, COPI功能受损不仅影响货物回收效率, 还会引起高尔基体堆叠和带状结构的异常, 强调了其在高尔基体形态调控中的基础性作用^[7-8]。COPI的膜招募和囊泡出芽过程依赖多种接头蛋白的协同作用。其中, 高尔基体磷蛋白3 (Golgi phosphoprotein 3, GOLPH3) 是一类研究深入的可溶性COPI接头蛋白, 能特异性结合高尔基体膜上的磷脂酰肌醇4-磷酸 (phosphatidylinositol 4-phosphate, PI4P)。早期研究认为, GOLPH3主要通过和肌球蛋白Myo18A相互作用, 将高尔基体与细胞骨架耦联以产生膜张力, 从而维持高尔基体带状结构并促进出芽^[9-10]。然而, GOLPH3在调控高尔基体形态中的具体机制近年来受到重新评估: 多项蛋白质相互作用组学及功能研究未能稳定检测到其与Myo18A或retromer复合物的相互作用, 对其介导膜张力的普适性提出了质疑^[11]。相较之下, 越来越多的证据支持GOLPH3的核心功能是作为广谱COPI货物接头蛋白, 直接参与多种跨膜蛋白在高尔基体内的分选、保留与逆向运输^[12]。因此, 厘清GOLPH3在“膜张力调控”与“货物分选”之间的功能权重, 对于理解其生物学本质至关重要。

近期研究发现, LEPROT和LEPROTL1 (统称LEPROTs) 是一类此前未被充分认识的COPI相关跨膜货物受体, 它们通过与COPI被膜复合体相互作用, 调控多种信号受体在高尔基体中的滞留^[13]。与GOLPH3等可溶性接头蛋白不同, LEPROTs属于跨膜蛋白, 可能更直接参与特定货物的选择与滞留过程, 从而为COPI介导的逆向运输提供额外的选择性调控机制。需要注意的是, LEPROTs缺失可能会导致高尔基体带状结构显著延伸^[13]。然而, 这一表型是否源于COPI运输整体效率的下降, 尚缺乏直接的形态学与机制层面的证据。

尽管近期研究逐步揭示了多类COPI接头蛋白在货物分选中的作用, 但目前尚不清楚, 这些已知COPI接头蛋白 (如GOLPH3) 在维持高尔基体形态稳态过程中是否处于同一线性调控关系, 或通过不同机制参与COPI相关运输过程的调控。更重要的是, COPI运输通量如何在细胞尺度上转化为高尔基体带状结构的宏观几何特征, 仍然是一个未被充分阐明的问题。

本研究结合定量共聚焦显微镜与电子显微镜技术, 系统分析了LEPROTs和GOLPH3对高尔基体形态的调控作用。通过遗传学和细胞生物学手段, 揭示了COPI运输缺陷是驱动高尔基体带延伸的主要原因, 并进一步证明LEPROTs与GOLPH3通过平行途径协同促进COPI的有效循环。本文结果支持这样一种模型: 多种接头蛋白共同维持足够活跃的COPI囊泡化活动, 从而在高尔基体边缘产生“束紧”效应, 限制高尔基体带的过度连接, 维持其紧凑而动态的结构稳态。

1 材料与方法

1.1 实验材料

HeLa细胞系购自American Type Culture Collection (ATCC)。本研究使用的LEPROT KO、LEPROTL1 KO以及LEPROT/LEPROTL1双敲除 (DKO) 细胞系与前期发表论文中所使用的细胞系一致, 相关构建及鉴定信息详见文献^[13]。转染试剂LabFect RNAi Transfection购自北京兰博利德公司, Lipofectamine购自Invitrogen公司。细胞固定及透化试剂包括4%多聚甲醛 (paraformaldehyde, PFA)、Triton X-100及牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)。

1.2 细胞培养与转染

HeLa细胞培养于含有10%胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的DMEM完全培养基中, 在37°C、5% CO₂的恒温培养箱中培养。siRNA介导的瞬时敲低实验使用LabFect RNAi Transfection Kit或Lipofectamine RNAiMAX按照厂家说明书进行操作。所用siRNA序列如下: AP1G1, 5'-GCGCC-UGUACAAAGCAAUU-3'; ARF1, 5'-CCUGAUC-UUCGUGGUGGACAGCAAU-3'; β -COP, 5'-AA-CUCCUGGACUUCUGAUGA-3'; GOLPH3, 5'-AAAUGAUGUGUAACCCUCGCGGUCC-3'。

1.3 免疫荧光染色

细胞接种于盖玻片上, 生长至适度汇合后, 于

室温下使用4%PFA固定15 min。PBS洗涤后,使用0.1%Triton X-100 (PBS配制)在室温下透化10 min,随后用3% BSA (PBS配制)在室温下封闭1 h。一抗使用3% BSA稀释,于4°C孵育过夜或室温孵育1 h。Alexa Fluor 488或568偶联的二抗(1:500, 3% BSA稀释)在室温避光条件下孵育1 h。荧光图像使用Nikon A1R+共聚焦显微镜采集。

本研究使用的一抗包括: anti-GM130 (BD Biosciences, 610823)、anti-COPB2 (Abclonal, A21294)、anti-SEC31A (BD Biosciences, 612351)以及anti- β -COP (Invitrogen, PA1-061)。所有Alexa Fluor偶联二抗均购自Invitrogen公司。

1.4 蛋白质印迹法 (Western blot)

细胞使用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的裂解液(25 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1%NP-40, 1 mmol/L EDTA, 5%甘油)裂解以提取总蛋白质。蛋白质样品经SDS-PAGE分离后转移至PVDF膜。膜以含5%脱脂奶粉的TBST封闭1 h,随后在4°C条件下,置于含2%脱脂奶粉的TBST配制的一抗稀释液(1:500)中孵育过夜。随后,使用TBST洗膜3次(10 min/次),再加入HRP标记的二抗(1:5000,使用含2%脱脂奶粉的TBST稀释),室温孵育1 h。再次洗膜3次后,采用HRP化学发光底物进行显色,并通过成像系统(Tanon 4600SF)采集信号。

本研究所用一抗包括: anti- β -COP (Invitrogen, PA1-061)、anti- β -tubulin (Santa Cruz, sc-101527)、anti-LEPROTL1 (Sangon Biotech; 利用人源LEPROTL1蛋白C端合成多肽免疫兔制备而成)、anti-GAPDH (BBI Life Sciences, D110016-0200)、anti-AP1G1 (BD Biosciences, 610385)、anti-ARF1 (Proteintech, 10790-1-AP)以及anti-GOLPH3 (Proteintech, 19112-1-AP)。

1.5 透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM)

细胞首先使用含2.5% (v/v)戊二醛的磷酸盐缓冲液(PB, 0.1 mol/L, pH 7.4)进行固定。随后用PB缓冲液清洗2次,并用去离子水清洗2次。之后,将细胞置于含1% (w/v)四氧化锇(OsO_4)和1.5% (w/v)亚铁氰化钾的水溶液中,在4°C条件下处理2 h。样品经清洗后,依次在不同浓度乙醇(30%、50%、70%、80%、90%、100%和100%)

中进行梯度脱水,8 min/步(4°C)。随后,样品在乙醇与SPI-PON812R树脂的梯度混合液(3:1、1:1、1:3;梯度混合液组分为21 ml SPI-Pon 812R树脂(SPI Supplies, USA)、12 ml 十二烯基丁二酸酐(dodecenyl succinic anhydride, DDSA)和13 ml 甲基纳迪克酸酐(nadic methyl anhydride, NMA))中逐步渗透,最终转入纯树脂中。随后,在含1.5%苄基二甲胺(benzyl dimethylamine, BDMA)的纯树脂中进行包埋,并于60°C聚合48 h。使用超薄切片机(Leica EM UC6)制备厚度约70 nm的超薄切片。切片经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后,采用TEM (FEI Tecnai Spirit 120 kV)进行观察,并使用EMSIS CCD相机(VELETA)采集图像。

1.6 图像处理与统计学分析

图像分析使用Fiji (ImageJ)或Imaris软件(Bitplane, Switzerland)完成。利用ImageJ插件JACoP (Just Another Co-localization Plugin)计算不同荧光信号之间的Manders共定位系数。实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示。两组之间的差异显著性采用非配对双尾Student's *t*检验进行分析。统计分析与作图使用GraphPad Prism 9软件。本研究中, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, “ns”代表无统计学意义。

2 结 果

2.1 COPI逆向运输受阻诱导高尔基体带状结构延伸

为了阐明囊泡运输在高尔基体宏观形态维持中的作用,本文利用siRNA干扰技术在HeLa细胞中选择性阻断不同的膜运输通路。为定量评估高尔基体形态变化,采用一种基于核周分布的角度分析方法。具体而言,利用ImageJ软件确定细胞核质心(centroid)作为顶点,并从质心向高尔基体荧光信号边缘绘制两条射线,测量两条射线所夹的高尔基体分布角(Golgi Angle)。该指标能够量化高尔基体带状结构在核周的空间分布:在多数生理状态下,高尔基体通常紧凑定位在细胞核一侧,对应较小夹角;而在膜运输受扰动或细胞处于特定功能状态时,高尔基体带可能发生延伸或解聚,表现为Golgi Angle增大。因此, Golgi Angle可作为评估高尔基体结构紧凑性及相对扩张程度的定量指标(图1a)。此前的研究表明,LEPROTs双敲除可导致高尔基体带沿核周发生显著的横向延伸。为判断

这一表型是否与特定被膜运输通路的功能障碍相关, 本文分别敲低了介导 TGN 输出的 AP-1 复合物亚基 AP1G1, 以及介导高尔基体逆向运输的 COPI 复合物亚基 β -COP (图 1b, c, e)。

免疫荧光分析显示, 敲低 AP1G1 并未诱导高尔基体延伸, 而是使其呈现更加致密、局限的分布形态; 相比之下, 轻度敲低 β -COP 明显促使高尔基体带沿核周扩展, 其整体形态特征与 LEPROT DKO 细胞中观察到的表型高度相似 (图 1b, e)。此外, 当敲低同时调控 COPI 和 AP-1 通路的关键 GTP 酶 ARF1 时, 细胞群体表现出异质性: 部分细胞的高尔基体呈现皱缩, 而另一部分则明显延伸。这种表型的分化提示, ARF1 下游的两条运输支路对高尔基体宏观构型可能具有不同的调控作用。进一步结合不同处理条件下的表型比较可以看出, 干扰 COPI 相关运输 (如 β -COP 敲低或 LEPROTs 缺失) 均呈现 Golgi Angle 增大的共同趋势, 而干扰 AP-1 通路则产生相反效应 (图 1e)。这些结果支持

这样一种关系: COPI 相关运输受扰与高尔基体带扩展呈一致变化趋势。因此, 本研究将 Golgi Angle 的变化作为反映 COPI 功能状态的一种形态学指标。为验证上述 Golgi Angle 定量分析的可靠性, 进一步对图 1b 中各处理组细胞的细胞核面积进行了定量分析, 结果显示, 不同处理组之间细胞核面积无显著差异 (图 1f), 表明以细胞核中心作为测量基准在不同实验条件下具有良好的稳定性。

以上实验结果证明, COPI 介导的运输缺陷足以引起高尔基体带的过度延伸, 提示 LEPROTs 缺失导致的高尔基体扩张可能与 COPI 功能受损密切相关。此外, 为进一步验证 LEPROTs 在该表型中的特异性作用, 在 LEPROT DKO 细胞中外源表达未加标签的 LEPROTL1, 结果显示, 该蛋白质可显著恢复高尔基体的正常形态分布 (图 1b, d, e)。这一结果进一步证明 LEPROTs 在维持高尔基体结构稳态中的关键作用。

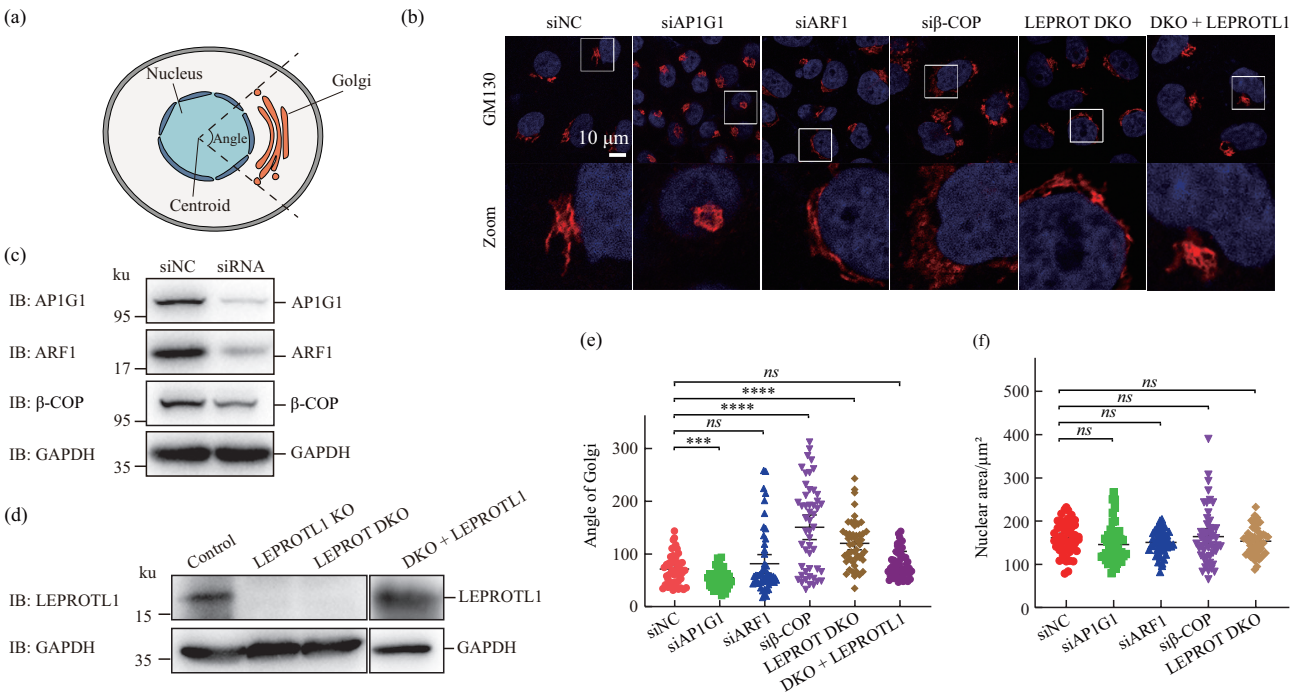


Fig. 1 Disruption of COPI-mediated trafficking induces Golgi ribbon extension

(a) Schematic diagram illustrating the measurement of the “Golgi Angle” to quantify Golgi circumferential distribution. (b) Immunofluorescence images of HeLa cells (WT or LEPROT DKO) transfected with siRNA targeting AP1G1, ARF1, or β -COP. Cells were immunolabelled with an antibody against GM130 (red) and nuclei were stained with DAPI (blue). The “DKO+LEPROTL1” group indicates LEPROT DKO cells overexpressing LEPROTL1. (c) Western blot analysis confirming the knockdown efficiency of AP1G1, ARF1, and β -COP. (d) Western blot analysis of LEPROTL1 protein levels in Control, LEPROTL1 KO, LEPROT DKO, and LEPROT DKO cells overexpressing LEPROTL1. (e) Quantification of the Golgi Angle shown in (b). Each dot represents one cell ($n=50$). (f) Quantification of the nuclear area shown in (b). Each dot represents one cell ($n=50$). *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns : not significant.

2.2 LEPROTs与GOLPH3协同调控高尔基体带状结构的紧凑性

接着本文探究了LEPROTs与已知COPI接头蛋白GOLPH3之间的功能关系。结果显示,在HeLa细胞中敲低GOLPH3同样会导致高尔基体带发生显著延伸(图2a, b, d)。有趣的是,在LEPROT DKO细胞中敲低AP1G1能够显著逆转原本延伸的高尔基体表型,使其呈现出向核周回缩的趋势(图2a, d)。这一观察结果提示,高尔基体的宏观形态可能取决于ARF1下游AP-1介导的正向运输与COPI介导的逆向运输之间的动态平衡。

进一步的实验发现,在LEPROT DKO背景下联合敲低GOLPH3后,高尔基体带的延伸程度显

著强于LEPROT DKO或siGOLPH3单一处理组,表现出明显的叠加效应(图2a, d)。为了排除瞬时敲低效率的潜在影响,本文进一步利用CRISPR/Cas9技术构建了LEPROTs-GOLPH3三敲除(TKO)细胞系,并证实了GOLPH3蛋白在其中的完全缺失(图2c)。定量分析显示,TKO细胞的高尔基体延伸表型与DKO背景下敲低GOLPH3的表型高度一致(图2a, d)。上述结果表明,LEPROTs与GOLPH3在维持高尔基体紧凑形态中发挥了非冗余的调节作用。这种表型的叠加提示,两者可能并非处于单一的线性调控通路,而是通过不同机制参与COPI相关过程的调控,从而共同维持高尔基体的结构稳态。

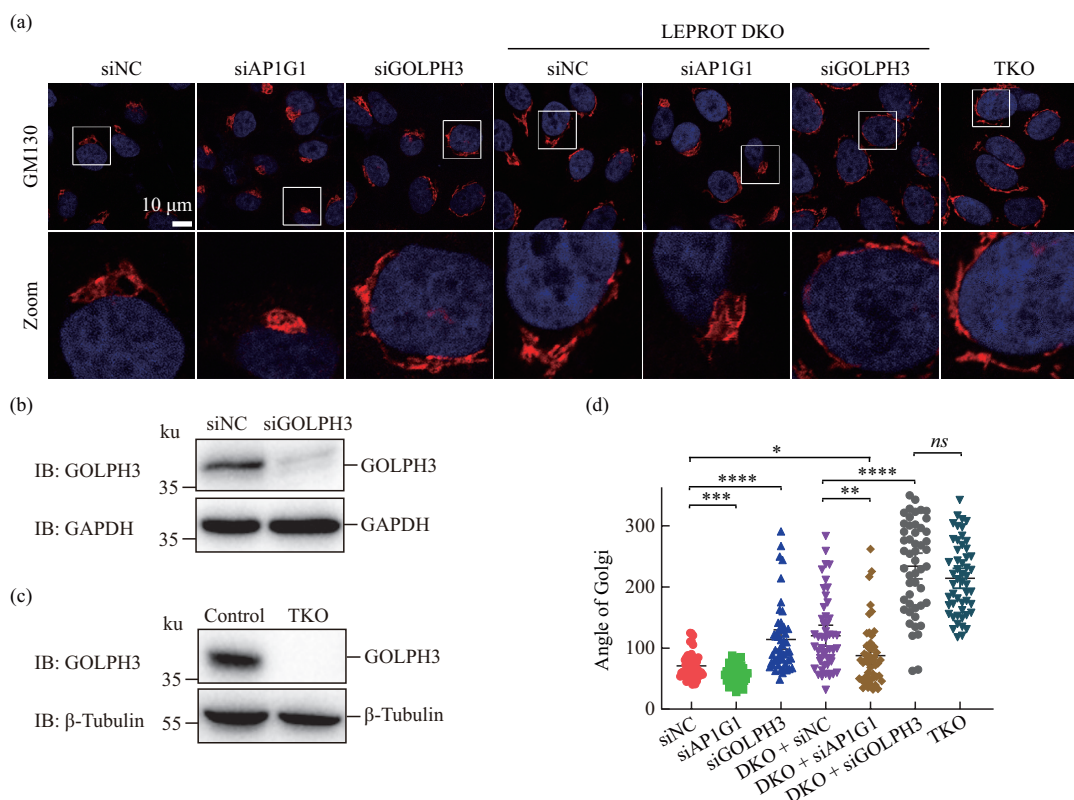


Fig. 2 LEPROTs and GOLPH3 cooperatively regulate Golgi ribbon compactness

(a) Confocal images of WT, LEPROT DKO, and LEPROTs-GOLPH3 TKO HeLa cells transfected with siRNA negative control (siNC) or siRNAs targeting AP1G1 or GOLPH3. Cells were stained with an antibody against GM130 (red), and nuclei were labeled with DAPI (blue). (b) Immunoblotting showing the knockdown efficiency of GOLPH3 in HeLa cells transfected with siNC or siGOLPH3. (c) Verification of GOLPH3 knockout in the LEPROTs-GOLPH3 TKO cell line (generated from the LEPROT DKO background). (d) Statistical analysis of the Golgi Angle in the indicated groups. Each dot represents one cell ($n=50$). $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, $****P<0.0001$, ns : not significant.

2.3 接头蛋白缺失导致COPI组分在内质网出口位点异常滞留

为了明确LEPROTs或GOLPH3缺失如何影响COPI的细胞内分布,本文检测了内源性COPI囊泡

的空间定位。免疫荧光成像显示,在LEPROT DKO或GOLPH3敲低的细胞中,除了高尔基体本身的形态改变外,胞质中出现了大量非高尔基体定位的β-COP阳性斑点(图3a, b)。为进一步增强

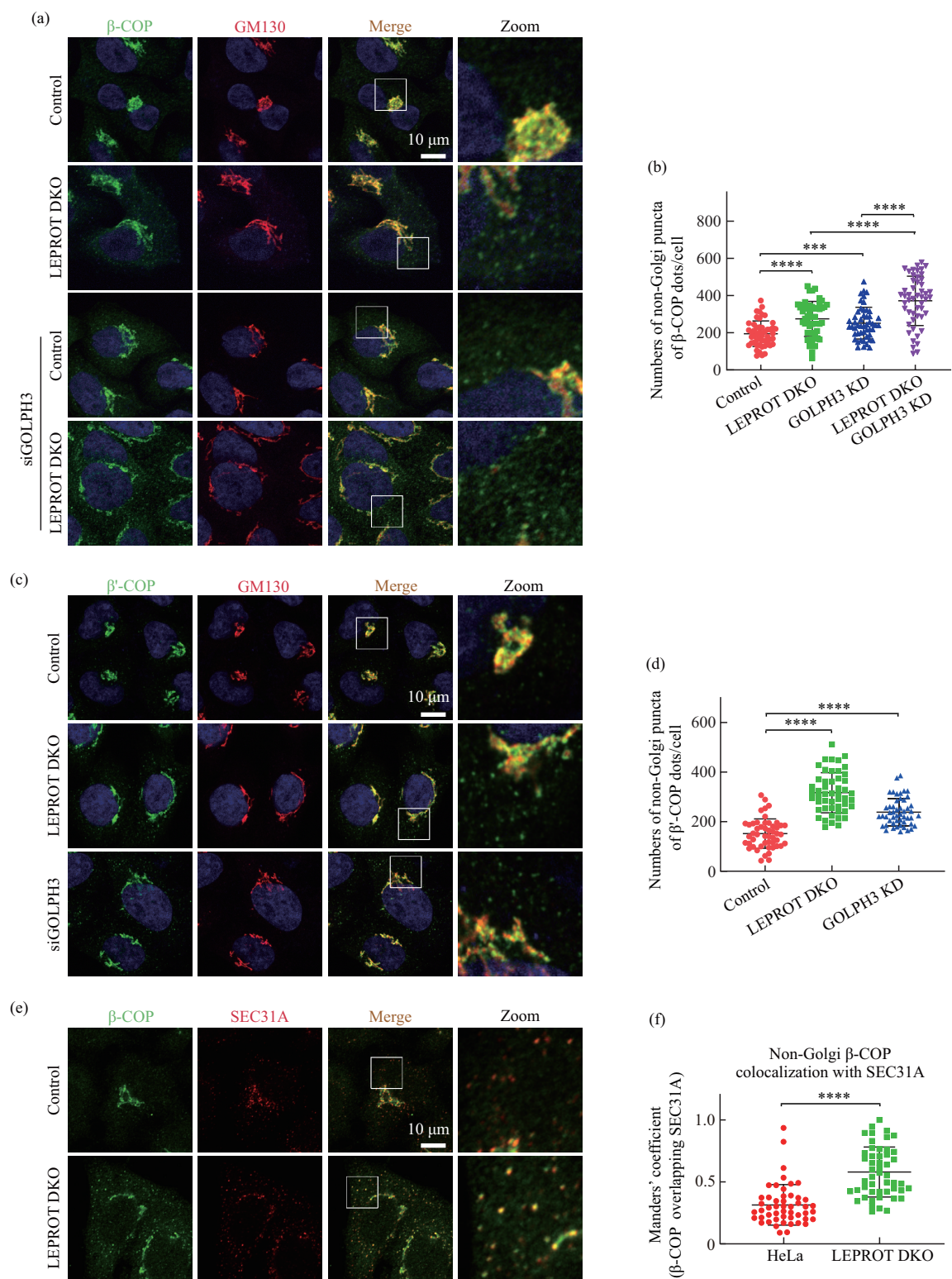


Fig. 3 Loss of LEPROTs or GOLPH3 alters the subcellular distribution of COPI components

(a) Confocal images of wild-type or LEPROT DKO HeLa cells transfected with siRNA negative control (siNC) or siRNA targeting GOLPH3. Cells were stained with antibodies against β-COP (green) and GM130 (red). Nuclei were labeled with DAPI (blue). (b) Quantification of non-Golgi β-COP-positive puncta in cells shown in (a). Each dot represents one cell; $n=50$ cells per condition. (c) Confocal images of wild-type or LEPROT DKO HeLa cells transfected with siRNA negative control (siNC) or siRNA targeting GOLPH3. Cells were stained with antibodies against β'-COP (green) and GM130 (red). Nuclei were labeled with DAPI (blue). (d) Quantification of non-Golgi β'-COP-positive puncta in cells shown in (c). Each dot represents one cell; $n=50$ cells per condition. (e) Confocal images of wild-type and LEPROT DKO HeLa cells stained with antibodies against β-COP and the ERES marker SEC31A. (f) Quantification of Manders' overlap coefficient between β-COP and SEC31A signals. Each dot represents one cell; $n=50$ cells per condition. **** $P<0.0001$, *** $P<0.001$.

结果的可靠性,对另一COPI核心亚基 β' -COP的分布情况进行了分析。结果表明, β' -COP同样出现了显著的非高尔基体点状分布表型,这一表型与 β -COP的观察结果高度一致(图3c, d)。这种多个COPI核心亚基一致性的稳态定位改变,表明在上述条件下,COPI复合物的细胞内分布发生了系统性扰动。值得注意的是,在LEPROT DKO背景下进一步敲低GOLPH3,这类异常斑点的数量显著多于任何单一缺失组(图3b)。这种表型的叠加提示,LEPROTs与GOLPH3在调控COPI相关过程时可能并非处于简单的上下游线性关系,而是通过部分独立的机制共同参与该过程的调控。

为了鉴定这些异常斑点的性质,利用内质网出口位点(ER exit sites, ERES)标志物SEC31A进行了共定位分析^[14]。结果显示,在LEPROT DKO细胞中,这些非高尔基体定位的 β -COP信号与SEC31A表现出高度的共定位(图3e),且Manders重叠系数显著高于对照组(图3f)。COPI介导的逆向运输囊泡最终抵达内质网上的内质网到达位点(ER arrival sites, ERAS),而ERAS通常与内质网出口位点在空间上高度耦合,这种 β -COP与SEC31A的高度共定位现象提示COPI组分在ER-Golgi交界区域发生了异常积聚^[15-16]。这一结果表明,在LEPROTs或GOLPH3缺失的情况下,COPI组分在抵达内质网后未能高效循环返回高尔基体,从而导致其在ERAS/ERES界面发生显著滞留。这种循环的阻滞可能进一步加剧了高尔基体区域COPI活性的匮乏。

2.4 超微结构分析揭示COPI囊泡化缺陷导致扁平囊缩短与增厚

为了从亚细胞结构层面解析高尔基体形态变化的基础,对对照组、LEPROT KO、LEPROTL1 KO、LEPROT DKO以及GOLPH3敲低HeLa细胞进行TEM分析。与荧光显微镜下观察到的高尔基体带状结构延伸不同,在超微结构层面,LEPROT DKO及GOLPH3敲低细胞的高尔基体展现出高度一致的形态改变:单个高尔基体扁平囊(cisterna)的横向长度(length)显著缩短,而纵向厚度(width/thickness)明显增加,呈现出一种更为“短粗”的扩张形态(图4a~d)。相比之下,每个高尔基体堆叠中扁平囊的层数并未发生显著变化(图4e),提示上述结构改变并非源于扁平囊数目的增减或重排。

进一步对高尔基体周边囊泡密度进行定量分

析。结果显示,与野生型细胞相比,LEPROT DKO细胞中高尔基体邻近区域的COPI样囊泡数量显著减少(图4f, g)。这一超微结构特征与荧光成像中观察到的“非高尔基体定位COPI组分异常增加”现象相呼应。综上所述,TEM分析表明,在LEPROTs或GOLPH3功能受损条件下,高尔基体扁平囊在保持堆叠数目相对稳定的前提下,表现出“长度缩短、厚度增加及周边囊泡减少”的特征,提示COPI介导的出芽或囊泡化过程存在缺陷。

3 讨 论

高尔基体的宏观形态被普遍认为依赖于顺向与逆向囊泡运输之间的动态平衡,而非单一运输通路的绝对活性^[17]。大量研究表明,高尔基体处于持续的膜交换状态,其结构稳态由囊泡介导的膜输入、输出及回收效率共同决定^[5]。然而,这些研究大多侧重于将高尔基体形态变化描述为“完整”或“碎片化”等相对粗略的分类,缺乏对其空间组织特征进行定量刻画。传统观点多将运输障碍与高尔基体碎片化联系在一起,尤其是在COPI或ARF1功能严重受损的条件下^[17-18]。与这一经典认识不同,本研究在未完全阻断运输通路的条件下,观察到一种不一样的形态响应:高尔基体并未解体,而是发生核周带状结构的连续性增强与横向延展。然而,本研究通过结合光镜定量分析与电子显微镜超微结构观察,提出了一种不同的形态调控模式:当特定运输通路受到部分抑制,尤其是COPI介导的逆向囊泡运输效率下降时,高尔基体并不必然会发生解体,反而可能在核周形成更为连续、延展的带状结构。

在超微结构层面,电镜数据清晰显示,LEPROTs或GOLPH3缺失导致高尔基体扁平囊横向长度缩短并伴随厚度增加,同时囊泡密度显著下降。这一结果与既往关于COPI功能受损导致囊泡出芽减少的观察一致,但进一步揭示了其对扁平囊几何参数(长度与厚度)的具体影响。既往研究已表明,COPI囊泡在高尔基体扁平囊边缘持续出芽,对回收高尔基体驻留蛋白及维持囊泡-扁平囊之间的膜交换具有关键作用^[6, 19]。因此,COPI活性的下降很可能削弱了囊泡出芽与回收过程,对扁平囊的膜面积与曲率调控产生直接影响,从而导致扁平囊结构发生局部重塑。这一结果支持COPI在维持高尔基体扁平囊形态稳定性中的基础作用,而非仅作为被动的逆向运输载体。

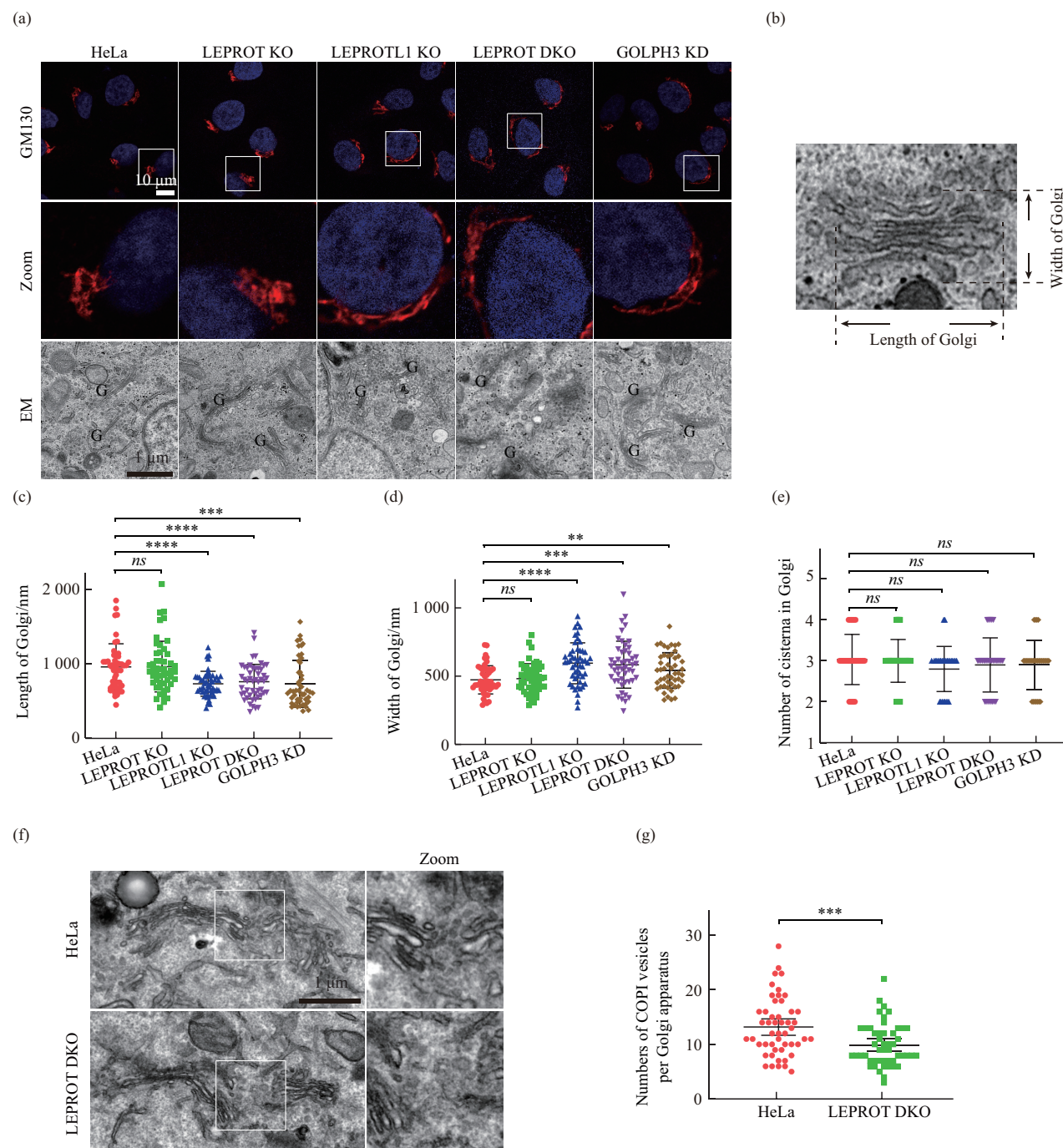


Fig. 4 Ultrastructural analysis reveals altered Golgi cisternal architecture upon LEPROTs or GOLPH3 loss

(a) Confocal images of Golgi structures labeled with GM130 and corresponding transmission electron microscopy images in wild-type, LEPROT KO, LEPROTL1 KO, GOLPH3 KO, and LEPROT DKO HeLa cells. Golgi stacks are indicated by “G”. Nuclei were labeled with DAPI (blue). (b) Representative TEM image illustrating the measurement of Golgi cisternal length and thickness. (c, d) Quantification of Golgi cisternal length (c) and thickness (d) based on TEM images shown in (a). Each dot represents one Golgi stack; $n=50$ stacks per condition. (e) Quantification of the number of cisternae per Golgi stack. Each dot represents one Golgi stack; $n=30$ stacks per condition. (f) Representative TEM images showing Golgi-associated vesicles in wild-type and LEPROT DKO HeLa cells. (g) Quantification of the number of COPI-like vesicles in the vicinity of Golgi stacks. Each dot represents one Golgi apparatus; $n=50$. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, ns: not significant.

值得注意的是，与微观层面的扁平囊缩短不同，光镜层面观察到的却是高尔基体带的显著延伸。这一“微观收缩-宏观延展”的组合表型在既

往研究中尚少有报道，提示不同空间尺度下的结构调控机制是相互独立的。这一表型并非相互矛盾，而是反映了不同空间尺度下形态调控机制的差异。

已有研究指出,高尔基体带的完整性与紧凑性不仅依赖于结构蛋白和微管系统,还受到囊泡运输活性所施加的持续物理与动力学约束^[20-21]。在正常条件下,高效的COPI循环与持续的囊泡出芽-融合过程可能有助于限制相邻高尔基体堆叠之间的过度物理连接,使高尔基体带状结构维持在相对紧凑、动态更新的状态。当COPI介导的逆向运输效率下降时,这种与囊泡运输相关的结构约束被削弱,从而使高尔基体更倾向于在核周形成连续而延展的带状构型。

在分子机制层面,本文的数据进一步明确了LEPROTs与GOLPH3在COPI循环动力学中的关键调控作用。既往研究多将GOLPH3视为调控高尔基体形态的重要因子,但其作用机制在膜张力调控与货物分选之间仍存在不同模型;相比之下,LEPROTs被认为主要参与特定货物的高尔基体滞留。本文的结果将这两类蛋白质统一纳入COPI循环调控框架中,提示其可能通过不同机制共同影响COPI的整体运输效率。COPI组分 β -COP在内质网出口位点及ERAS区域的异常滞留提示,COPI被膜组分的循环并非简单依赖于ARF1的激活状态,而需要高尔基体膜上特定接头蛋白的持续参与。既往研究已证明,COPI组分主要位于高尔基体相关膜结构中,因此当其完成逆向运输后需要从ERAS区域返回高尔基体,以维持稳定的囊泡生成能力^[6, 15]。本文的结果支持这样一种模型:LEPROTs与GOLPH3不仅参与货物识别,还通过在高尔基体膜上促进COPI组分的高效招募与再利用,维持COPI循环的整体效率。当这些接头蛋白缺失时,COPI组分在循环路径中的滞留显著增加,进一步削弱了高尔基体边缘的COPI活性,最终引发结构层面的适应性重构。

此外,ARF1敲低所产生的混合形态表型提示,高尔基体形态由多条囊泡运输通路共同塑造,而非单一方向的膜运输所决定。已有研究表明,AP-1介导的顺向运输与COPI介导的逆向运输在高尔基体及TGN区域之间形成动态平衡,共同参与高尔基体内膜流的稳态调控^[22]。我们观察到,抑制AP-1通路引起的高尔基体皱缩效应与COPI功能下降导致的延伸效应在方向上相互对抗,而在LEPROTs缺失背景下敲低APIG1可部分逆转高尔基体延伸表型,进一步支持高尔基体构型由不同运输通路之间的平衡关系所决定。这一结果在支持既往“膜流平衡决定高尔基体结构”观点的同时,进

一步揭示了不同运输通路在空间构型调控中的方向性差异。

最后,LEPROTs与GOLPH3的叠加缺失所产生的更严重表型强调了COPI介导逆向运输整体效率的重要性。尽管二者在货物谱上存在差异,分别偏向于不同类型的蛋白质,但其共同作用指向同一运输轴——COPI介导的逆向囊泡循环。已有研究表明,高尔基体的稳态与功能依赖于多个囊泡运输通路(包括顺向与逆向运输)及其协调运作,这些膜运输通路共同维持膜流的动态平衡,而不是由单一路径或单一货物分子的逆向回收所主导^[23-24]。因此,本文的结果表明,LEPROTs与GOLPH3构成维持COPI运输动力学的两条并行调控路径,共同决定高尔基体带状结构的紧凑性与稳定性。相较于以往主要关注单一蛋白质或单一运输步骤的研究,本研究从整体运输动力学角度出发,提出COPI循环效率是调控高尔基体宏观空间结构的重要决定因素,从而在细胞器形态调控层面提供了新的理解框架。

4 结 论

综上所述,本研究从宏观形态与超微结构两个层面系统分析了COPI介导逆向囊泡运输在高尔基体带状结构维持中的作用。研究结果表明,高尔基体的紧凑性并非简单依赖于扁平囊堆叠本身的稳定,而取决于由多类接头蛋白共同驱动的持续COPI囊泡化与循环效率。进一步的机制分析显示,跨膜货物受体LEPROTs与可溶性接头蛋白GOLPH3通过部分独立但相互协同的方式参与COPI循环过程的调控,其功能缺失会导致COPI组分在ER-Golgi界面发生动力学滞留,并伴随高尔基体带的异常延伸。

这些结果表明,高尔基体的宏观几何特征对逆向囊泡运输通路的整体效率高度敏感。本研究强调了COPI介导逆向运输在维持高尔基体结构稳态中的核心地位,并提出囊泡运输动力学失衡可作为驱动高尔基体形态重塑的重要因素。该发现为理解高尔基体结构调控的细胞生物学基础提供了新的实验依据,并为进一步探讨不同运输通路在细胞器空间组织中的协同作用奠定了理论框架。

数据可用性声明 本论文的关联数据(DOI: 10.57760/sciencedb.32044/CSTR: 31253.11.sciencedb.32044)可在Science Data Bank数据库

(<https://www.scidb.cn/>) 中访问获取。

参 考 文 献

- [1] Park K, Ju S, Kim N, *et al.* The Golgi complex: a hub of the secretory pathway. *BMB Rep*, 2021, **54**(5): 246-252
- [2] Ayala I, Colanzi A. Structural organization and function of the Golgi ribbon during cell division. *Front Cell Dev Biol*, 2022, **10**: 925228
- [3] Makhoul C, Gosavi P, Gleeson P A. Golgi dynamics: the morphology of the mammalian Golgi apparatus in health and disease. *Front Cell Dev Biol*, 2019, **7**: 112
- [4] Downes K W, Zanetti G. Mechanisms of COPII coat assembly and cargo recognition in the secretory pathway. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2025, **26**(12): 910-925
- [5] Arab M, Chen T, Lowe M. Mechanisms governing vesicle traffic at the Golgi apparatus. *Curr Opin Cell Biol*, 2024, **88**: 102365
- [6] Popoff V, Adolf F, Brügger B, *et al.* COPI budding within the Golgi stack. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, **3**(11): a005231
- [7] Khakurel A, Kudlyk T, Pokrovskaya I, *et al.* GARP dysfunction results in COPI displacement, depletion of Golgi v-SNAREs and calcium homeostasis proteins. *Front Cell Dev Biol*, 2022, **10**: 1066504
- [8] Tago T, Yamada Y, Goto Y, *et al.* Golgi clustering by the deficiency of COPI-SNARE in *Drosophila* photoreceptors. *Front Cell Dev Biol*, 2024, **12**: 1442198
- [9] Lesniak A M, Ye Z, Banfield D K. Identification of the client-binding site on the Golgi membrane protein adaptor Vps74/yGOLPH₃. *iScience*, 2025, **28**(10): 113494
- [10] Kuna R S, Field S J. GOLPH₃: a Golgi phosphatidylinositol(4) phosphate effector that directs vesicle trafficking and drives cancer. *J Lipid Res*, 2019, **60**(2): 269-275
- [11] Welch L G, Peak-Chew S Y, Begum F, *et al.* GOLPH₃ and GOLPH₃L are broad-spectrum COPI adaptors for sorting into intra-Golgi transport vesicles. *J Cell Biol*, 2021, **220**(10): e202106115
- [12] Rizzo R, Russo D, Kurokawa K, *et al.* Golgi maturation-dependent glycoenzyme recycling controls glycosphingolipid biosynthesis and cell growth via GOLPH₃. *EMBO J*, 2021, **40**(8): e107238
- [13] Gao J, Cong C, Wu Y, *et al.* A class of COPI cargo receptors regulates processing of transmembrane proteins by reinforcing their Golgi retention. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2026, **123**(4): e2512723123
- [14] Sun Y, Wang X E, Yang X, *et al.* V-ATPase recruitment to ER exit sites switches COPII-mediated transport to lysosomal degradation. *Dev Cell*, 2023, **58**(23): 2761-2775.e5
- [15] Roy Chowdhury S, Bhattacharjee C, Casler J C, *et al.* ER arrival sites associate with ER exit sites to create bidirectional transport portals. *J Cell Biol*, 2020, **219**(4): e201902114
- [16] Weigel A V, Chang C L, Shtengel G, *et al.* ER-to-Golgi protein delivery through an interwoven, tubular network extending from ER. *Cell*, 2021, **184**(9): 2412-2429.e16
- [17] Liu J, Huang Y, Li T, *et al.* The role of the Golgi apparatus in disease (Review). *Int J Mol Med*, 2021, **47**(4): 38
- [18] Bellouze S, Schäfer M K, Buttigieg D, *et al.* Golgi fragmentation in pmn mice is due to a defective ARF1/TBCE cross-talk that coordinates COPI vesicle formation and tubulin polymerization. *Hum Mol Genet*, 2014, **23**(22): 5961-5975
- [19] Taylor R J, Zubkov N, Ciazynska K A, *et al.* The mechanistic basis of cargo selection during Golgi maturation. *Sci Adv*, 2025, **11**(40): eaca0016
- [20] Fanani M L, Ambroggio E E. Phospholipases and membrane curvature: what is happening at the surface?. *Membranes*, 2023, **13**(2): 190
- [21] Mascanzoni F, Iannitti R, Colanzi A. Functional coordination among the Golgi complex, the centrosome and the microtubule cytoskeleton during the cell cycle. *Cells*, 2022, **11**(3): 354
- [22] Krahn A H, Pantazopoulou A, Austin J, *et al.* COPI-dependent intra-Golgi recycling at an intermediate stage of cisternal maturation. *bioRxiv*, 2025. DOI: 10.1101/2025.09.20.677526
- [23] Benyair R, Eisenberg-Lerner A, Merbl Y. Maintaining Golgi homeostasis: a balancing act of two proteolytic pathways. *Cells*, 2022, **11**(5): 780
- [24] Pantazopoulou A, Glick B S. A kinetic view of membrane traffic pathways can transcend the classical view of Golgi compartments. *Front Cell Dev Biol*, 2019, **7**: 153

Mechanistic Insights into The Role of LEPROTs and COPI Retrograde Transport in Regulating Golgi Morphology*

GAO Jing-Hu^{1,2,3)*,***}, ZHAO Lin-Yue^{4)**}, ZHANG Yu-Lu¹⁾, WU Yan-Fang²⁾, YAN Bing²⁾

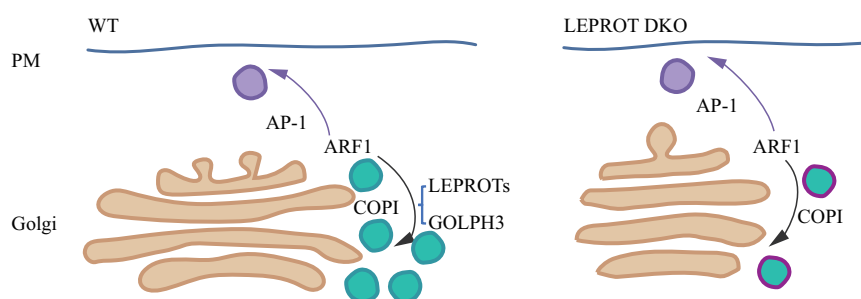
¹⁾School of Medicine, Shaoxing University, Shaoxing 312000, China;

²⁾Key Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

³⁾College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China;

⁴⁾Department of Pathology, Nanjing Drum Tower Hospital, The Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

Graphical abstract



Abstract Objective The Golgi apparatus serves as a central hub in the eukaryotic secretory pathway, responsible for the processing, sorting, and trafficking of proteins and lipids. In mammalian cells, the Golgi typically forms a perinuclear ribbon-like structure composed of laterally connected cisternae stacks. The maintenance of Golgi ribbon structure depends on the balance of membrane flux across multiple intracellular trafficking pathways, yet the specific contributions of distinct trafficking branches to Golgi macroscopic morphology remain elusive. In mammalian cells, the Golgi ribbon is typically organized as a perinuclear, laterally connected structure composed of stacked cisternae, and its integrity is highly dynamic and sensitive to perturbations in membrane trafficking. This study aims to elucidate the role of coat protein complex I (COPI)-mediated retrograde transport in maintaining the Golgi ribbon and to dissect the functional relationship between the transmembrane cargo receptors LEPROT/LEPROTL1 (LEPROTs) and the COPI adaptor GOLPH3.

Methods Using siRNA interference and gene-deficient cell lines, we selectively perturbed COPI- or adaptor protein complex 1 (AP-1)-mediated trafficking pathways in HeLa cells. To quantitatively evaluate Golgi morphology, we employed a “Golgi Angle”-based measurement to assess its circumferential distribution around

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32100550, 82203346) and the Shaoxing University Research Project (2025LG011).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

Tel: 86-575-88345839, E-mail: gaojh@usx.edu.cn

Received: February 9, 2026 Accepted: April 8, 2026

the nucleus. The spatial distribution of the Golgi ribbon was quantitatively analyzed using confocal microscopy, while Golgi ultrastructure and vesicle density were examined *via* transmission electron microscopy. Additionally, the subcellular distribution of COPI components was assessed by immunofluorescence co-localization. **Results** Selective inhibition of COPI retrograde transport significantly induced the circumferential extension of the Golgi ribbon around the nucleus, whereas blocking AP-1-mediated anterograde transport resulted in Golgi compaction, indicating opposing roles. These results suggest that different trafficking branches downstream of ARF1 exert distinct and even antagonistic effects on Golgi morphology. LEPROTs-deficient cells exhibited a Golgi extension phenotype highly consistent with COPI impairment. Furthermore, knockdown of GOLPH3 in a LEPROTs double-knockout background produced a significant additive effect on Golgi extension, suggesting that LEPROTs and GOLPH3 play non-redundant roles in regulating COPI-related trafficking processes. Mechanistically, loss of either LEPROTs or GOLPH3 led to the aberrant accumulation of COPI components at endoplasmic reticulum exit sites, accompanied by a reduction in COPI-like vesicles around the Golgi. This redistribution indicates a defect in COPI recycling between the ER-Golgi interface and the Golgi apparatus. Ultrastructural analysis revealed that Golgi cisternae in defective cells became shorter and thicker while maintaining a stable number of stacks. In parallel, the density of Golgi-associated vesicles was markedly decreased, further supporting an impairment in COPI vesicle formation or budding processes. **Conclusion** This study demonstrates that active COPI retrograde transport is a critical factor in restricting the over-connection of the Golgi ribbon and maintaining its compactness. Rather than causing fragmentation, partial disruption of COPI function leads to a distinct morphological outcome characterized by Golgi ribbon extension at the light microscopy level and cisternal remodeling at the ultrastructural level. LEPROTs and GOLPH3 cooperatively promote the recycling and vesiculation of COPI components, thereby imposing a structural constraint on the Golgi periphery. Our findings support a model in which multiple adaptor proteins act in parallel to sustain efficient COPI cycling, thereby maintaining Golgi structural homeostasis. These findings provide new cell biological evidence for the membrane trafficking basis of Golgi morphological homeostasis.

Key words Golgi apparatus, COPI, LEPROT/LEPROTL1, GOLPH3, membrane trafficking dynamics

DOI: 10.3724/j.pibb.2026.0077

CSTR: 32369.14.pibb.20260077