

磷酸二酯酶 5 参与平滑肌功能调节的机制

李 健 石放雄*

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095)

摘要 磷酸二酯酶 5 (phosphodiesterase type 5, PDE5) 又称对环鸟苷酸特异的磷酸二酯酶 (cGMP-specific phosphodiesterase), 广泛分布于机体的平滑肌细胞中, 通过对细胞内特定区域的 cGMP 水平的调节, 参与平滑肌(收缩、舒张)状态的快速调控。现对 PDE5 的基因表达和酶活性的调控方式, 亚细胞分布, 以及在平滑肌中的调节机制和药理应用进行综述。

关键词 平滑肌细胞; 磷酸二酯酶 5; 环鸟苷酸; 亚细胞定位

环腺苷酸(cAMP)和环鸟苷酸(cGMP)是细胞内的第二信使分子, 对生命活动起着重要作用。磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)是体内专门水解 cAMP 和 cGMP 的超家族酶系。到目前为止在哺乳动物组织中, 先后发现了 11 个不同的 PDE 基因超家族^[1]。它们在理化特性、氨基酸序列、催化和调节特征、底物特异性、组织和细胞分布以及对抑制剂的敏感性等方面存在差异。多数 PDE 亚家族中又包括不止一种基因, 而同种基因又可以编码多种 mRNA(通过不同的剪接和从不同的起始位点开始转录产生不同的剪接变体)。磷酸二酯酶 5 (phosphodiesterase type 5, PDE5) 是特异性的 cGMP 水解酶, 主要分布于机体的平滑肌细胞中, 通过水解胞浆中的 cGMP 来抑制平滑肌松弛。目前, 已经有 3 种不同的 PDE5A 同工酶被发现, PDE5A1、PDE5A2 和 PDE5A3。所有 PDE5 的变异体的差异都是在 N 端。第一种纯化的 PDE5 是从牛肺脏中得到的可溶性酶^[2]。最初被叫做 cGMP 结合蛋白或 cGMP 特异性的 PDE, 现被命名为 PDE5A1。它是 PDE5 的主要类型。人的 PDE5A1 和牛的 PDE5A1 很相似, 只是在 N 端插入了 10 个氨基酸^[3-5]。其他的变体, 如 PDE5A2 也包含一个有意义的更短的 N 端氨基酸残基, 并在许多物种中存在, 而 PDE5A3 只在人的组织中存在^[6,7]。近年来许多 PDE5 抑制剂被应用于临床, 并产生了很好的效果, 但同时也出现很多副作用。本文就 PDE5 的基因表达和酶活性的调控方式, 亚细胞分布, 在平滑肌中的调节机制和最新的药理应用进行了综述。

1 PDE5 基因的表达和调控

PDE5 由 PDE5A 基因编码。在人类的基因组中, PDE5A 基因位于 4q26 染色体上大约 110 kb 的片段

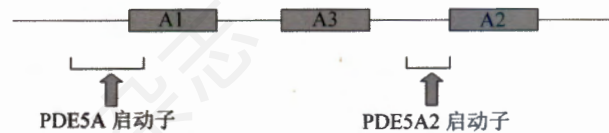


图 1 人的 PDE5A 基因上游区域的遗传图谱^[8]

图中 3 个方框分别代表 PDE5A1、PDE5A3、PDE5A2 基因的第一外显子, 并且注明了 PDE5A 启动子和 PDE5A2 启动子的位置, PDE5A 启动子序列与 PDE5A1 第一外显子的序列发生部分重合。

中, 包含 21 个外显子^[3,5]。目前已发现的 3 种 PDE5 同工酶, 它们的 mRNA 只在 5' 端存在差异, 对应的 3 个第一外显子在人的 PDE5A 基因中按 A1-A3-A2 的顺序排列。PDE5A 基因存在两个内源启动子, 一个位于编码 PDE5A1 第一外显子的上游, 并与其发生部分重叠, 它包含一个 139 bp 的启动子核心序列(其中 78 bp 与 PDE5A1 第一外显子发生重合), 一个 308 bp 的上游增强子, 一个 156 bp 的下游增强子, 它可能介导 3 种同工酶的表达。另一个稍弱的 182 bp 的 PDE5A2 启动子位于 A3 和 A2 外显子之间, 包含一个独立的 Sp1 结合序列, 只介导 PDE5A2 的表达^[8] (图 1)。

最近的研究表明, PDE5A 基因的转录可以同时为 cGMP 和 cAMP 激活。Lin 等^[9]通过基因剔除和突变研究发现, 139 bp 启动子核心片段的上游和下游延伸区域对 cGMP、cAMP 都具有反应性, 并可以独立地将刺激传递给启动子核心片段, 引起 PDE5A 基因转录。DNA 酶 I 印迹分析, 确定了 2 个 SP1 和 4 个 AP2 锚定区域在上游延伸区和 4 个 SP1 锚定位点在下游延伸区域。而且, 在 A3 和 A2 外显子之间的内含子区域内的启动子也含有能与转录因子 Sp1 和

收稿日期: 2007-12-25 接受日期: 2008-04-02

国家自然科学基金资助项目(No.30571335, No.30771553)

* 通讯作者。Tel/Fax: 025-84399112, E-mail: fxshi@njau.edu.cn

AP2 发生特异性结合的序列,它们在诱导启动子对 cAMP/cGMP 的反应性上起着关键作用。

由于 cGMP 对 PDE5A 和 PDE5A2 启动子具有正向调节作用,用来提高胞内 cGMP 浓度的药物如硝化甘油、一氧化氮(NO)可反过来增加 PDE5 的表达量,从而降低此类药物的疗效。例如,对肺动脉高压病人的治疗中,使用吸入性 NO 几天就产生抗药性,随后必须不断加大用药剂量^[8]。

2 PDE5 对平滑肌松弛的调节机制

PDE5 一级结构中,775 位的谷氨酸附近分布有较密集的疏水氨基酸,这一结构特点增强了 PDE5 对 cGMP 的亲合性,并且抑制其与 cAMP 的结合。

NO、心钠素(atrial natriuretic peptide, ANP)以及其他内源性的血管扩张素通过活化鸟苷酸环化酶(guanylyl cyclase, GC),生成大量 cGMP,激活蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG)。影响平滑肌收缩的 NO/cGMP 通路是由 PKG 而不是蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)介导的,因为 PKG-I 基因缺失的小鼠中,cGMP 介导的动脉平滑肌松弛过程被完全破坏^[10]。在平滑肌细胞中,PKG 通过磷酸化其特异性底物,如钙活化的 maxi 钾离子通道(BK 通道)^[11],三磷酸肌醇受体相关的 PKG-I 底物(IP₃ receptor-associated

PKG-I substrate, IRAG)^[12]等,降低胞内钙离子浓度,抑制肌球蛋白轻链激酶(myosin light chain kinase, MLCK)的活性;同时,激活肌球蛋白轻链磷酸酶(myosin light chain phosphatase, MLCP),使肌球蛋白轻链去磷酸化,与肌动蛋白分离,从而使平滑肌松弛^[13,14]。在平滑肌细胞中低 Ca²⁺ 浓度条件下,PDE5 作为主要的 cGMP 水解酶,有效地控制着 cGMP/PKG 信号途径,抑制平滑肌舒张(图 2)。

现在已经发现 PDE5 在血管和内脏(子宫和小肠)的各种平滑肌细胞中广泛分布。在阴茎海绵体动脉和静脉腔周围分布有丰富的上皮细胞和非胆碱能神经细胞,它们释放的 NO 引起海绵体平滑肌细胞松弛,西地纳非(伟哥)通过抑制 PDE5 的水解活性,使 NO 诱导产生的 cGMP 大量蓄积,从而引起平滑肌松弛,血管充血,最后使得阴茎勃起充分^[15]。西地纳非对阴茎勃起障碍治疗的成功应用,说明了 PDE5 对调节平滑肌状态具有重要作用。

3 PDE5 在平滑肌亚细胞水平的分布

PDE5 在大多数组织中都有表达,但主要分布于平滑肌组织中,如阴茎、血管、子宫和小肠。Dolci 等^[16]发现,PDE5 存在于平滑肌细胞的细胞质中,而在细胞核区域未见分布。通过共聚焦显微镜观察发

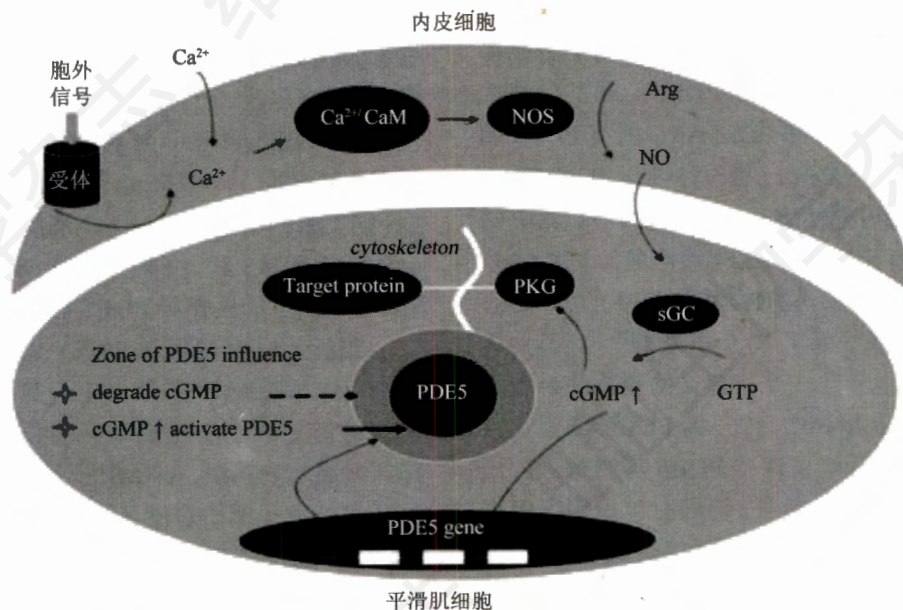


图 2 PDE5 对平滑肌松弛的调节机制及 PKG/PDE5 信号复合体^[8,9,14,17,22]

PDE5 具有组织特异性,在机体平滑肌中分布较丰富,首先配体与血管内皮细胞受体结合,引起 Ca²⁺ 内流,激活一氧化氮合酶(NOS),进而使胞内 Arg 分解产生 NO,NO 通过扩散作用进入周边的血管平滑肌细胞,作用于鸟苷酸环化酶使 GTP 分解成 cGMP,引起平滑肌松弛,当胞内 cGMP 水平升高后,引起 PDE5 的表达,并激活 PDE5,水解 cGMP,抑制松弛。PKG/PDE5 信号复合体以细胞骨架蛋白为中心,调节 cGMP 在亚细胞水平的生理活性。

现大部分 PDE5 位于胞内的中心体区域, 但其生物学意义尚不清楚; 另外在细胞处于非增殖状态时, PDE5 也大量分布于胞质中的一些离散的囊泡区域, 这可能是为了适应对局部 cGMP 的水解。并且其蛋白质水平受到有丝分裂活动的影响很大, 在细胞休眠和收缩状态下增加, 而在细胞增生时受到抑制。而同样具有 cGMP 水解能力的 PDE1C 多分布于细胞核内, 且其蛋白质水平在时间上的分布与 PDE5 正好相反, 即当细胞休眠和收缩状态下下降, 而在细胞增生时上升。并且 PDE5/PDE1C 在胞内的这种分布特点不存在细胞和种属特异性。这说明作为平滑肌细胞机械运动的调节蛋白 PDE5, 与作为平滑肌细胞增生的调节蛋白 PDE1C, 虽然拥有相同的作用底物 cGMP, 但由于二者在亚细胞水平时空分布上的严格不同, 从而可以主导不同的生理过程。

MacMillan-Crow 等^[17]发现, 平滑肌细胞骨架中的中间丝蛋白(intermediate filament protein vimentin)对 PKG 存在高亲和力, 决定了 PKG 的亚细胞定位, 同时细胞骨架还会锚定 PKG 的靶蛋白。以上研究发现, PDE5 呈囊泡状在胞浆内离散分布, 而 PDE 定位于不同的胞内位点是为了适应 cNMP 的降解, 这就使 cGMP/PKG 信号转导途径在细胞局部区域形成以细胞骨架和 PDE5 为核心的信号复合体。PKG 及其靶蛋白被细胞骨架锚定, 被 cGMP 激活, PDE5 被 cGMP 激活, 水解 cGMP, 从而使 cGMP 产生后在局部发挥特定作用, 又不至扩散(图 2)。

4 PDE5 活性的调节机制

4.1 PKG 诱导 PDE5 的磷酸化, 从而提高 PDE5 的活性

Wyatt 等^[18]利用同位素标记发现平滑肌细胞中的 PDE5 存在磷酸化过程, 随后的研究已确定 PKA 或 PKG 磷酸化 PDE5 的 N 端丝氨酸位点(serine 92), 这个磷酸化位点在牛、人、犬、大鼠、小鼠的 PDE5 中都有高度的保守性。Rybalkin 等^[10]应用 PKG I 基因剔除小鼠的大动脉平滑肌细胞进行试验发现, 只加入 8-Br-cAMP 或同时加入 8-Br-cAMP 和 8-Br-cGMP 都不能激活 PKG I^{-/-} 细胞的 PDE5 磷酸化过程。说明 PDE5 的磷酸化主要是由 cGMP/PKG I 通路介导, 而不是 cAMP/PKA 通路。

另一项对子宫平滑肌细胞的研究显示, 当 PKG 激活后, 25%~30% 的 PDE5 发生磷酸化, PDE5 的活性提高了 2~2.5 倍, 说明此位点的磷酸化, 大大提高了 PDE5 的活性^[10]。

4.2 cGMP 与 PDE5 的 GAF 区域结合直接激活 PDE5 的催化活性, 并不依赖于 PKG 磷酸化

PDE5 含有两个同源性的 N 端调节区域: GAF A 和 GAF B, 它们有相同的序列和类似的结构, 经研究证实, 这个区域存在于一系列的蛋白质中^[19]。其中 PDE5 的 GAF A 区域与 PDE2 的 GAF B 区域高度同源, 可以推测它们的 GAF 区域结构非常相似。

Rybalkin 等^[20]研究表明, cGMP 与调节性的 GAF A 区域结合可直接激活 PDE5, 而不需要 PKG 对 PDE5 磷酸化。运用针对 PDE5 的 GAF 区域的单克隆抗体阻断 cGMP 与 GAF A 的结合, 发现 PDE5 的水解活性显著地降低, 说明 cGMP 与 PDE5 的 GAF 区域结合将大幅度的提高 PDE5 催化区域的活性。而 PDE5 的磷酸化位点的丝氨酸突变成丙氨酸并没有改变通过 cGMP 调节 PDE5 活性的模式。

但是 PDE5 活化后, cGMP 与 PKG 对保持和提高 PDE5 的活性, 有协同作用。研究发现, cGMP 和 PDE5 的 GAF 区域结合使 PDE5 被激活, 并更易于被 PKG 磷酸化, 而 PKG 磷酸化作用又增强了 PDE5 对 cGMP 及其抑制剂的亲和力^[21,22]。由此看出, PDE5 在体内的磷酸化过程实际上是为了提高 cGMP 的结合稳定性, 维持酶的活性。

这些数据说明 PDE5 在体内至少有两种构象状态: 活化态和非活化态。PDE5 通过与 cGMP 结合, 使其构象改变, 催化位点暴露变为活化状态, 而 PKG 的磷酸化作用使其活化态构象保持相对稳定, 并且随着胞内 cGMP 浓度和 PKG 活性的改变, 这些过程是可逆的。而 PDE5 的这个构象的可逆变化过程具有不同的药物动力学和抑制特性。例如, 与非激活态 PDE5 相比, 被 cGMP 激活的 PDE5 对其特异性的抑制剂西地纳非有更高的敏感性。研究表明, cGMP 与 PDE5 的特定结合区域结合, 可以增加 ³H 标记的西地纳非(³H-sildenafil)与催化区域的结合^[23]。

以往的研究并没有发现 cGMP 对 PDE5 激活作用, 这可能与实验用 PDE5 的样品新鲜程度有关。当 PDE5 储藏于冰块中数周后, 它就逐渐失去对 cGMP 激活的反应性^[20]。

5 PDE5 的药理应用与展望

由于 PDE5 在机体中主要分布于平滑肌细胞中, 并对其收缩和舒张状态起调节作用, 利用这一机制, 临床上主要使用的一些制剂(NO、硝化甘油等)治疗高血压、肺动脉高压、子痫等相关病症, 其降压减阻的效果快速、明显, 但是由于它会造成 PDE5 的大

量表达,所以极易产生耐药性,而盲目的加大此类药物的使用剂量,对机体组织会产生毒副作用。最近,随着对PDE5结构分析的不断深入,各种PDE5抑制剂被研制出来,它们用于治疗时不会提高胞内的cGMP绝对浓度,所以效果更稳定。有试验表明,在治疗肺动脉高压等症中,使用西地那非代替NO源药物,不但效果更好而且稳定,不会快速产生严重的耐药性^[24-26]。Wareing等^[27]证实,通过PDE5抑制剂(UK-343664或西地那非)和NO的联合使用,可以更显著地缓解子痫症状,同时避免单独使用NO对母体和胎儿循环系统的伤害。

但是,现在所有开发的PDE5抑制剂的作用机制都是竞争性的与催化位点结合。而所有PDE的催化区域的氨基酸序列都高度的相似,所以绝大多数抑制剂对PDE的选择性至少也有部分的重叠。而且PDE之间越是相似,这种重叠性越大。例如,西地那非是对PDE5特异性最大的抑制剂,但是它在nmol/L浓度级仍对光感受体PDE6具有很强的抑制性,造成临床上一些服用了西地那非的病人出现了视力方面的副作用。而Tadalafil是一种新型的PDE5抑制剂,和PDE6相比,它对PDE5具有更好的特异性,但是它也是一种相当好的PDE11抑制剂,半抑制浓度只有37 nmol/L^[28]。

而最新的研究表明PDE5可以通过其GAF A区域与cGMP的结合直接被激活,这说明不管是PDE5活性的促进剂还是抑制剂都可以基于与这个位点结

合的机制来开发。而针对PDE5的GAF A位点的PDE5抑制剂(cGMP拮抗剂)特异性更强,并且它在胞内cGMP水平很低时就可直接抑制PDE5活性,发挥疗效。这在治疗由局部缺血和在灌注造成的神经兴奋性中毒时是有利的。所以对此类药物的研究和开发必将成为新的热点。

参考文献(References)

- [1] Soderling SH *et al. Curr Opin Cell Biol*, 2000, **12**: 174
- [2] Thomas MK *et al. J Biol Chem*, 1990, **265**: 14964
- [3] Loughney K *et al. Gene*, 1998, **216**: 139
- [4] Stacey P *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 1998, **247**: 249
- [5] Yanaka N *et al. Eur J Biochem*, 1998, **255**: 391
- [6] Kotera J *et al. Eur J Biochem*, 1999, **262**: 866
- [7] Lin CS *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **268**: 628
- [8] Lin CS *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **280**: 684
- [9] Lin CS *et al. Int J Impot Res*, 2002, **14**: 15
- [10] Rybalkin SD *et al. J Biol Chem*, 2002, **277**: 3310
- [11] Fukao M *et al. J Biol Chem*, 1999, **274**: 10927
- [12] Schlossmann J *et al. Nature*, 2000, **404**: 197
- [13] Surks HK *et al. Science*, 1999, **286**: 1583
- [14] Schlossmann J *et al. Ann Med*, 2003, **35**: 21
- [15] Ballard SA *et al. J Urol*, 1998, **159**: 2164
- [16] Dolci S *et al. Biochem Biophys Res Commun*, 2006, **341**: 837
- [17] MacMillan-Crow LA *et al. Biochemistry*, 1994, **33**: 8035
- [18] Wyatt TA *et al. Am J Physiol*, 1998, **274**: 448
- [19] Aravind L *et al. Trends Biochem Sci*, 1997, **22**: 458
- [20] Rybalkin SD *et al. EMBO J*, 2003, **22**: 469
- [21] Corbin JD *et al. Eur J Biochem*, 2000, **267**: 2760
- [22] Bessay EP *et al. J Pharmacol Exp Ther*, 2008, **325**: 62
- [23] Corbin JD *et al. Mol Pharmacol*, 2003, **63**: 1364
- [24] Michelakis E *et al. Circulation*, 2002; **105**: 2398
- [25] Toyoshima Y *et al. J Vet Med Sci*, 2007, **69**: 1073
- [26] Keogh AM *et al. J Heart Lung Transplant*, 2007, **26**: 1079
- [27] Wareing M *et al. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2006, **127**: 41
- [28] Rybalkin SD *et al. Circ Res*, 2003, **93**: 280

Involvement of Phosphodiesterase Type 5 in Regulation of Smooth Muscle Function

Jian Li, Fang-Xiong Shi*

(College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract Phosphodiesterase type 5 (PDE5) is a cGMP-specific PDE. As a major cGMP-hydrolyzing PDE, PDE5 regulates the development of smooth muscle relaxation and has a potential value in the fields of physiology, pathophysiology and pharmacology. Herein, regulation of PDE5 expression and activity, subcellular localization and mechanisms in smooth muscle functions are reviewed. Furthermore, the clinic applications of PDE5 mechanisms are discussed.

Key words smooth muscle cell; phosphodiesterase type 5; cGMP; subcellular localization

Received: December 25, 2007 Accepted: April 2, 2008

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30571335, No.30771553)

*Corresponding author. Tel/Fax: 86-25-84395701, E-mail: fxshi@njau.edu.cn