

- [21] Sutsui, K. et al., 2001, *J. Biol. Chem*, **276**: 5769 - 5778.
- [22] Yang, X. et al., 2000, *Science*, **287**: 131 - 134.
- [23] Biersack, H. et al., 1996, *PNAS*, **93**: 8288 - 8293.
- [24] Nakopoulou, L. et al., 2000, *Pathobiology*, **68**: 137 - 143.
- [25] Willman, J. H. et al., 2000, *Prostate*, **42**: 280 - 286.
- [26] Stathopoulos, G. P. et al., 2000, *Anticancer Res*, **20**: 177 - 178.
- [27] Mirski, S. E. et al., 2000, *Lab Invest*, **80**: 787 - 795.
- [28] Dingemans, A. M. et al., 1999, *Clin. Cancer Res*, **5**: 2048 - 2058.
- [29] Michelle, S. et al., 2000, *Nucleic Acids Research*, **28**: 1947 - 1954.
- [30] Hanlin, Gao. Et al., 1999, *PANS*, **96**: 12168 - 12173.
- [31] Ding, Z. et al., 2001, *Clin. Cancer Res*, **7**: 3336 - 3342.
- [32] Dennis, W. et al., 2000, *MCB*, **20**: 9127 - 9137.
- [33] Patel, S. et al., 2000, *Mol. Pharmacol*, **57**: 784 - 791.
- [34] Oloumi, A, et al., 2000, *Cancer Res*, **60**: 5747 - 5753.
- [35] Lori, A., et al., 2001 *Blood*, **98**: 1897 - 1903.
- [36] Errington, F. et al., 1999, *Mol. Pharmacol*, **56**: 1309 - 1316.

## $\gamma$ -氨基丁酸 B 型受体 (GABA<sub>B</sub>R) 研究最新进展

何晓兵 严缘昌

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

有两种类型的 GABA 受体,一种是离子通道型的受体, GABA<sub>A</sub>R 和 GABA<sub>C</sub>R, 这两者都是氯离子通道; 另外一种代谢型的受体——GABA<sub>B</sub>R。GABA<sub>B</sub>R 的大部分生理功能都与它通过 G 蛋白对电压敏感型钙通道(主要是 N, P/Q, L-型)和内向补偿性钾通道(Kir)的调节有关。在突触前膜, GABA<sub>B</sub>R 通过降低钙电导而抑制神经递质和神经肽的释放; 在突触后膜, GABA<sub>B</sub>R 通过激发内向型钾电流而使神经元超极化, 这也是晚期抑制性突触后电位发生的机制。晚期抑制性突触后电位与 GABA<sub>A</sub>R 介导的快速抑制性突触后电位相比, 它的起始较慢, 持续时间较长。最近的研究证明, 内向补偿性钾通道是突触后膜 GABA<sub>B</sub>R 主要的效应分子, 内向补偿性钾通道(Kir3.2)基因敲除的小鼠, 本应在 GABA<sub>B</sub>R 的激动剂 L-baclofen 刺激下出现的晚期抑制性突触后电位发生了大部分的缺失; 与此相类似的是, 一种名为 Weaver 突变品系的小鼠, 其 Kir3.2 发生了点突变, 突变发生在通道形成区, 致使 GABA<sub>B</sub>R 激发的钾电流大大降低。GABA<sub>B</sub>R 介导的对钾通道和钙通道的快速调节是一种局限于细胞膜的传导途径, 是通过 G 蛋白的  $\beta\gamma$  亚基在细胞膜上的作用而完成的<sup>[1]</sup>。

GABA<sub>B</sub>R 的激动剂 L-baclofen 有松弛肌肉和解痉的作用, 它发挥作用的基础就是它能够降低作用于脊髓腹根运动性神经元的兴奋性神经递质的释放。另外, L-baclofen 还可以有效治疗顽固性呃逆。鞘内注射 baclofen 可以减轻由于中风或脊柱受伤而引起的疼痛, 最近还发现 Baclofen 能够有效地治疗

可卡因成瘾。动物的认知能力可能因 GABA<sub>B</sub>R 拮抗剂的作用而提高。与此相反, GABA<sub>B</sub>R 的激动剂明显地对动物的学习能力造成了障碍。GABA<sub>B</sub>R 抑制剂另一个可能的又很重要的作用是可以抑制意识暂时丧失性癫痫发作。GABA<sub>B</sub>R 抑制剂和激动剂都有产生保护神经的潜能<sup>[1]</sup>。

### 一、GABA<sub>B</sub>R 基因的克隆及其结构

虽然 GABA<sub>B</sub>R 的概念已经提出了有二十多年, 对其功能也有了一定的了解, 可是其基因直到 1997 年才被克隆<sup>[2]</sup>。GABA<sub>B</sub>R 作为一种 G 蛋白偶联的受体(GPCR)属于 GPCR 中的 C 家族。和所有的 GPCR 一样, GABA<sub>B</sub>R 具有七跨膜结构, N 端位于胞外, C 端位于胞内。另外 GABA<sub>B</sub>R 具有 C 家族 GPCR 的结构特点: 很长的胞外区。GABA<sub>B</sub>R 最独特的是它必须由 GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 组成异二聚体才能具有完整功能, 这在 G 蛋白偶联的受体中是首次发现, 因为以前所有发现的 GPCR 要么由单个亚基构成, 要么即使是由两个亚基组成也是同源二聚构成有功能的受体。GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 通过分子 C 端形成螺旋-螺旋结构相互作用形成异二聚体<sup>[2-6]</sup>。至今, 在人和大鼠, 已有六种 GABA<sub>B</sub>R1 剪切拼接体被鉴定, 而人的 GABA<sub>B</sub>R2 剪切拼接体已发现有三种, 在大鼠只发现了一种 GABA<sub>B</sub>R2<sup>[3-11]</sup>。

#### 1. GABA<sub>B</sub>R1 的剪切拼接体

本文受国家重点基础项目(973)资助(G199055902)。

过去由于缺乏 GABA<sub>B</sub>R 不可逆或者高亲和力的放射性配体, GABA<sub>B</sub>R 一直没能被分离纯化;而且,在爪蟾卵母细胞中, GABA<sub>B</sub>R 与其效应分子的偶联效应很差,这使得运用基因表达来克隆 GABA<sub>B</sub>R 的努力也告失败。直到 1997 年,一种高亲和力的 GABA<sub>B</sub>R 的拮抗剂——<sup>[125I]</sup>CGP64213 的合成,才成功地克隆了大鼠 GABA<sub>B</sub>R1 的 cDNA 序列-GABA<sub>B</sub>R1a,紧接着,通过同源筛选发现了 GABA<sub>B</sub>R1b 的 cDNA 序列<sup>[2]</sup>。GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 属于同一基因的不同剪切体。它们的 cDNA 都比其它绝大多数 G 蛋白偶联受体长,大小与同属于 GPCR C 家族的 mGluR 类似。大鼠的 GABA<sub>B</sub>R1a 的基因有 20 个外显子,在人则有 22 个外显子, GABA<sub>B</sub>R1b 缺失了前四个外显子, GABA<sub>B</sub>R1a 基因第五个外显子和第四个内含子不同的拼接方式产生了主要是 N 端不同的其它剪切拼接体<sup>[8,12]</sup>。这一点与主要因在 C 端存在不同剪切方式而产生拼接体的 mGluR 不同。成熟的 GABA<sub>B</sub>R1b 与 GABA<sub>B</sub>R1a 蛋白质一级结构的区别在于,前者 N 端的 18 个氨基酸残基代替了后者的 147 个氨基酸残基,而其他氨基酸序列全都一样<sup>[2]</sup>。在 GABA<sub>B</sub>R1a 的 N 端特异性区域,包含了 2 个各由大约 60 个氨基酸残基构成的一致重复序列(又称为 Sushi 重复)。Sushi 重复广泛存在于补体蛋白和粘连蛋白(主要是选择素)。GABA<sub>B</sub>R1a 的 Sushi 结构域可能介导了 GABA<sub>B</sub>R1a 与其他蛋白的相互作用,或者可能作为 GABA<sub>B</sub>R1a 胞外区域的定位信号。除了 GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 之外, GABA<sub>B</sub>R1 还有其他两种剪切体, GABA<sub>B</sub>R1c 和 GABA<sub>B</sub>R1d,随后也通过 RT-PCR 的方法而获得<sup>[7]</sup>。GABA<sub>B</sub>R1c 与 GABA<sub>B</sub>R1b 的区别在于它在后者的第 5 个跨膜区和胞外第二个 LOOP 环之间插入了 31 个氨基酸残基。后来又有研究者发现了另外一种形式的 GABA<sub>B</sub>R1c,它是在 GABA<sub>B</sub>R1a 的第 5 个跨膜区和胞外第二个 LOOP 环之间插入了 31 个氨基酸残基,所以把它称之为 GABA<sub>B</sub>R1c(a)<sup>[8]</sup>。GABA<sub>B</sub>R1d 与 GABA<sub>B</sub>R1b 的区别在于,它在后者的 cDNA 3' 端插入了 566bp,但这 566bp 因为含有终止密码子而只编码了 25 个氨基酸,所以 GABA<sub>B</sub>R1d 与其他 GABA<sub>B</sub>R1 的剪切拼接体的 C 端序列存在明显差异。最近,还有 GABA<sub>B</sub>R1 的第五、第六种剪切拼接体 GABA<sub>B</sub>R1e 和 GABA<sub>B</sub>R1f 被发现。GABA<sub>B</sub>R1e 是因为 GABA<sub>B</sub>R1a 的第 11 个外显子被剪切,致使第

12 个外显子发生移码而引入了两个终止密码,最终形成的 GABA<sub>B</sub>R1e 完全缺失了 GABA<sub>B</sub>R1 其他剪切拼接体的跨膜区和胞内区<sup>[10]</sup>。GABA<sub>B</sub>R1f,它是 GABA<sub>B</sub>R1a 的 cDNA 的 5' 端 21bp 缺失,但它同时又像 GABA<sub>B</sub>R1c 一样在第 5 个跨膜区和胞外第二个 LOOP 环之间插入了 31 个氨基酸残基<sup>[11]</sup>。

## 2. GABA<sub>B</sub>R2 的剪切拼接体

目前在大鼠只发现了一种 GABA<sub>B</sub>R2<sup>[3-6]</sup>。而在人则有三种 GABA<sub>B</sub>R2 的剪切拼接体被鉴定,分别称之为 GABA<sub>B</sub>R2a、GABA<sub>B</sub>R2b 和 GABA<sub>B</sub>R2c,它们的差别都在其 C 端的最末端。其中, GABA<sub>B</sub>R2b 是 GABA<sub>B</sub>R2a C 端发生部分缺失的形式。而 GABA<sub>B</sub>R2c 则与前两者 C 端都不同。这三种剪切拼接体 C 末端的变化都没有影响到通过形成螺旋-螺旋结构而与 GABA<sub>B</sub>R1 相互作用的区域,所以三者都可与 GABA<sub>B</sub>R1 形成异二聚体;与具有由 Gly-Leu-Gly-Phe 模式形成 PDZ 结构域的辅助蛋白的相互作用可能会受到影响。PDZ 结构域通常结合受体 C 末端的短肽序列,对于受体在突触处的特异定位,胞吐和再循环都起了非常重要的作用<sup>[12]</sup>。

## 二、GABA<sub>B</sub>R 在组织和细胞中的分布和定位

原位杂交的结果显示, GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 的 mRNA 广泛分布于啮齿类和人的中枢神经系统(CNS),而且其分布与通过配体结合实验而得到的受体的分布是相一致的。在有 GABA<sub>B</sub>R1 或 GABA<sub>B</sub>R2 mRNA 表达的神经元区域,两种 mRNA 分子在 95% 的区域有共分布<sup>[13]</sup>。GABA<sub>B</sub>R2 的 mRNA 是神经元特异性的,而 GABA<sub>B</sub>R1 mRNA 不仅在神经元,而且在神经胶质细胞也有表达<sup>[2,13]</sup>。在 GABA<sub>B</sub>R2 和 GABA<sub>B</sub>R1 不共分布的区域,也许还有其他的有功能的 GABA<sub>B</sub>R 存在<sup>[13]</sup>。

### 1. GABA<sub>B</sub>R 在外周组织中的分布

在几乎所有的外周组织,用 RT-PCR 的方法都能检测到 GABA<sub>B</sub>R1a, GABA<sub>B</sub>R1b, GABA<sub>B</sub>R1c, GABA<sub>B</sub>R1e, GABA<sub>B</sub>R1f mRNA 的表达<sup>[7,10,11,15]</sup>;而 GABA<sub>B</sub>R1d mRNA 则只在肾脏、眼睛和膀胱中能检测到<sup>[7]</sup>。GABA<sub>B</sub>R1e 在神经组织里的表达量很低,它主要表达于外周组织,在肺、肾脏及小肠中的表达相对较高<sup>[10]</sup>。在外周组织中只有大鼠睾丸中用 RT-PCR 方法检测到了 GABA<sub>B</sub>R2 mRNA 的表达<sup>[14,15]</sup>。而且 Western blot 在蛋白水平上也确证

了 GABA<sub>B</sub>R1 在外周组织中的表达,却缺乏 GABA<sub>B</sub>R2 表达的证据。所以,GABA<sub>B</sub>R2 也许是神经组织特异性的或者在外周组织中还有其他尚未发现的 GABA<sub>B</sub>R2 存在<sup>[15]</sup>。

## 2. 个体发育过程中 GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 在中枢神经系统中的表达

在个体发育的过程中,GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 在中枢神经系统中的表达有明显的变化。在出生 1-5 天的大鼠,脑中 GABA<sub>B</sub>R1a 的表达量最高。在随后的 2 个星期内,表达量降至与成年大鼠脑中的一样。而 GABA<sub>B</sub>R1b 的表达量则在出生 5 天后开始上升,至第 10 天时达到最高峰,随后则渐渐降低至与成年大鼠脑中的一样。在刚出生的大鼠,其脑中 GABA<sub>B</sub>R1a 的表达量是 GABA<sub>B</sub>R1b 的 5 倍,在出生后的第十天,二者的表达量相同。在成年大鼠的脑中,mRNA 水平以 GABA<sub>B</sub>R1a mRNA 为主,但蛋白水平上 GABA<sub>B</sub>R1b 是 GABA<sub>B</sub>R1a 表达量的两倍,这可能是因为二者的 mRNA 稳定性不同或受到不同的翻译调控的结果。GABA<sub>B</sub>R1b 在出生后的第二和第三周达到高峰,而此时正是突触发生的高峰期,推测 GABA<sub>B</sub>R1b 与突触发生有关。总的来说,在脑发育至成熟的过程中,GABA<sub>B</sub>R1 总的表达量呈降低的趋势,其主要表达形式也由刚出生时的 GABA<sub>B</sub>R1a 转变为成年时的 GABA<sub>B</sub>R1b<sup>[16]</sup>。

## 3. GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 在成年大鼠脑中不同区域的分布<sup>[16]</sup>

在成年大鼠脑组织的大部分区域,GABA<sub>B</sub>R1b 都超过了 GABA<sub>B</sub>R1a 的表达量,尤其在大脑皮层、丘脑和小脑。只有在嗅球和纹状体,GABA<sub>B</sub>R1a 的表达量高于 GABA<sub>B</sub>R1b。

用针对 GABA<sub>B</sub>R1b 的特异性抗体,借助免疫组化技术,发现在松果体缰及内侧膝状体,小脑的分子层,丘脑,大脑皮层的浅层,以及脊髓背角都有很强的免疫着色,说明 GABA<sub>B</sub>R1b 在这些区域有高水平的表达。而在海马以及杏仁核,GABA<sub>B</sub>R1b 的表达水平相对较低;在嗅球,基底神经节,中脑及脑桥则更低;在白质则检测不到 GABA<sub>B</sub>R1b 的表达。

用针对 GABA<sub>B</sub>R1a 的特异性抗体,在纹状体、海马的 CA1 区、齿状回、视前区、下丘脑、顶盖、中央灰质、脑干以及小脑的颗粒细胞层都呈明显的 GABA<sub>B</sub>R1a 免疫阳性。

GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 的分布差异在海马区和小脑表现得尤为明显,前者主要集中于海马

CA1 区的锥体细胞层,齿状回和小脑的颗粒细胞层;而后者则分布于海马 CA3 区,CA1 区的腔隙层以及一部分非锥体细胞和小脑的 Purkinje 细胞。

值得提出的是,GABA<sub>B</sub>R1b 也表达于突触外位点,在小脑,GABA<sub>B</sub>R1b 特异性抗体在 Purkinje 细胞的胞体和树突有很强的免疫着色,但这些 Purkinje 细胞的树突并不能形成 GABA 能的突触。免疫电镜技术显示 GABA<sub>B</sub>R1b 在 Purkinje 细胞的胞体和树突的细胞膜上有集中分布,而在胞内则集中于内质网,而轴突的染色更强,也更为均匀。小脑分子层纵切面图显示 81.3% 树突呈现 GABA<sub>B</sub>R1b 免疫阳性,但是突触前膜和后膜的树突都呈 GABA<sub>B</sub>R1b 免疫阴性,说明 GABA<sub>B</sub>R1b 分布于突触外位点。GABA<sub>B</sub>R1b 在突触外位点的分布提示 GABA<sub>B</sub>R 起了神经调控的作用。在这种情况下,GABA<sub>B</sub>R 可能被邻近突触释放的 GABA 所激活。

## 4. GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 在脑组织表达的差异

Northern blot 结果显示 GABA<sub>B</sub>R2 mRNA 表达于在脑组织的各个区域。虽然在不同区域其表达水平有所差异,其中在大脑皮层,丘脑表达最高,而在胼胝体,尾核表达最低<sup>[12]</sup>。原位杂交结果显示,在有 GABA<sub>B</sub>R1 或 GABA<sub>B</sub>R2 mRNA 表达的神经元区域,两种 mRNA 分子在 95% 的区域有共分布,比如大脑皮层,海马,丘脑和后脑的许多区域包括小脑。虽然二者的 mRNA 在脑组织的绝大部分区域共表达,但 mRNA 的表达量在各区域并不完全相同,而且分布形式也存在差异,GABA<sub>B</sub>R1 的 mRNA 表达量相对较高,在脑组织的分布也更为均匀,而 GABA<sub>B</sub>R2 的 mRNA 的分布则呈现相对集中的特点。GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 的 mRNA 在大脑皮层、丘脑、中间及两侧膝状体,松果体缰和小脑表达水平基本一致。在大鼠的尾核几乎检测不到 GABA<sub>B</sub>R2 的 mRNA。而免疫组化技术在人的尾核却可以检测到 GABA<sub>B</sub>R2 的表达。而在中隔、视前区和下丘脑,GABA<sub>B</sub>R2 mRNA 远远低于 GABA<sub>B</sub>R1 的 mRNA 表达水平。虽然 GABA<sub>B</sub>R2 的 mRNA 在下丘脑的表达水平很低,但在下丘脑的室旁核和视上核的巨大神经元,它的表达却很丰富,在下丘脑的背中核和上交叉核,其表达也不少。而儿茶酚胺能的脑区,比如黑质和蓝斑,GABA<sub>B</sub>R2 呈低水平而 GABA<sub>B</sub>R1 呈高水平表达。虽然在海马区,GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 的 mRNA 表达都很高,但

其分布却存在很大的差异,从 CA1、CA2 到 CA3, GABA<sub>B</sub>R2 的 mRNA 表达依次升高,而 GABA<sub>B</sub>R1 的 mRNA 在整个海马区都呈均匀分布。在白质只有 GABA<sub>B</sub>R1 mRNA 却没有 GABA<sub>B</sub>R2 mRNA 的表达,说明了 GABA<sub>B</sub>R2 是神经元特异性的。在 GABA<sub>B</sub>R2 和 GABA<sub>B</sub>R1 不共分布的区域,也许还有其他的有功能的 GABA<sub>B</sub>R 存在。

### 三、GABA<sub>B</sub>R 是第一个被发现的由异二聚体组成的 G 蛋白偶联受体(GPCR)

单独表达的 GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 对 GABA<sub>B</sub>R 激动剂和拮抗剂的结合动力学几乎完全一样,激动剂和拮抗剂的亲和力次序对 GABA<sub>B</sub>R1a/1b 或天然的 GABA<sub>B</sub>R 完全一样,所以它们不可能是 GABA<sub>B</sub>R 的两种不同的亚型<sup>[2]</sup>。而表达的 GABA<sub>B</sub>R1a 或 GABA<sub>B</sub>R1b 对 Forskolin 刺激的 cAMP 水平上升的抑制也只有 30%。值得指出的是,GABA<sub>B</sub>R1a 或 GABA<sub>B</sub>R1b 与拮抗剂的结合能力跟天然的 GABA<sub>B</sub>R 几乎一样,可是它们对激动剂的结合能力却比天然 GABA<sub>B</sub>R 减弱了至少 100 倍。把 GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 共转染,对激动剂的亲和力并没有提高,这就说明 GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 即使形成聚合体也并不具有天然受体结合配体的特征。随后用 GABA<sub>B</sub>R1 的 cDNA 通过基因的同源搜索发现了 GABA<sub>B</sub>R2<sup>[3-5]</sup>。大鼠的 GABA<sub>B</sub>R2 由 940 个氨基酸组成,它跟 GABA<sub>B</sub>R1 的氨基酸序列有 35% 的同源性,而在跨膜区则有 41% 的同源性。在人则有三种 GABA<sub>B</sub>R2 被发现。几个实验室都各自用不同的方法发现了 GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 之间存在着相互作用<sup>[3-5]</sup>。如用 GABA<sub>B</sub>R1 的 C 端作为诱饵蛋白,借助酵母双杂交系统,发现与其相互作用的是 GABA<sub>B</sub>R 的另一亚基——GABA<sub>B</sub>R2。进一步的研究发现,GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 通过各自的 C 端形成了由螺旋-螺旋联结而成的异二聚体,而且有实验证明 GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 之间的相互作用是特异性的,各自也并不形成同源二聚体<sup>[17]</sup>。

虽然克隆的 GABA<sub>B</sub>R1 受体基本具有天然的 GABA<sub>B</sub>R 结构特点及药理学特征,但它在转染的哺乳动物细胞中却不能产生完全类似于天然 GABA<sub>B</sub>R 被激活的信号。将 GABA<sub>B</sub>R1a 转染到 HEK293 细胞,发现 GABA<sub>B</sub>R1a 的激活可以抑制腺苷酸环化酶

的活性,但抑制效率只有 30%,GABA<sub>B</sub>R 的拮抗剂可以完全抵消这种抑制效应<sup>[2]</sup>。克隆的 GABA<sub>B</sub>R2 对腺苷酸环化酶的抑制效应比 GABA<sub>B</sub>R1 强,可以达到 60%<sup>[6]</sup>。单独表达于爪蟾卵母细胞或 HEK293 细胞中的 GABA<sub>B</sub>R1 或 GABA<sub>B</sub>R2 都不能表达出激活内向补偿性钾通道(GIK)的活性<sup>[3,4,18]</sup>。单独表达的 GABA<sub>B</sub>R1 不能激活离子通道的可能原因之一是:GABA<sub>B</sub>R1 自身不能正确定位至细胞膜<sup>[20]</sup>。但当把 GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 共同表达时,所表现出来的药理学特征和功能都与天然的 GABA<sub>B</sub>R 相差无几<sup>[3]</sup>。

#### 1. GABA<sub>B</sub>R1 的胞内滞留信号

当把 GABA<sub>B</sub>R1a 或 GABA<sub>B</sub>R1b 单独表达于哺乳动物细胞时,都不能定位至细胞膜,而是滞留于细胞内部<sup>[19]</sup>。当把 GABA<sub>B</sub>R2 与 GABA<sub>B</sub>R1 共转染时,GABA<sub>B</sub>R1 可以正确定位至细胞膜,而与 GABA<sub>B</sub>R1 相比,单独表达的 GABA<sub>B</sub>R2 自身就可以定位至细胞膜,这就说明 GABA<sub>B</sub>R2 充当了 GABA<sub>B</sub>R1 的分子伴侣,对后者的正确定位起了很重要的作用<sup>[19,20]</sup>。

有研究发现,在 GABA<sub>B</sub>R1 分子的 C 末端存在胞内滞留信号<sup>[20]</sup>。通过缺失突变的方法,把这一胞内滞留信号定位至 C 末端 20 至 41 之间的一段多肽序列上,最终确定了这一信号是 RSRR(C 末端的 36-39 位氨基酸)。当把 RSRR 中的第一位或第三位的 Arg 突变时,GABA<sub>B</sub>R1 就可以定位至细胞膜;而把其中第四位的 Arg 突变为 Lys 时,GABA<sub>B</sub>R1 仍滞留于细胞内;进一步研究发现,RSRR 中第四位的 Arg 虽然不是胞内滞留信号所必须的,但它的存在可以增强滞留信号的有效性。而 RSRR 中第二位的 Ser 被 Glu 代替,并不影响它发挥功能,所以,GABA<sub>B</sub>R1 的胞内滞留信号模式为 RXR(R),X 代表任意氨基酸,这一信号与 K<sub>ATP</sub>通道的内质网滞留信号 RKR 很相似。当把 GABA<sub>B</sub>R1 C 末端的 36 个氨基酸与其他蛋白,如膜蛋白融合,同样可以引起膜蛋白在胞内的滞留,说明了它的有效性。

#### 2. GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 的相互作用对受体定位的影响<sup>[20]</sup>

GABA<sub>B</sub>R1 的胞内滞留信号 RSRR 位于其分子最末端,这一区域与 GABA<sub>B</sub>R2 形成螺旋-螺旋相互作用。螺旋-螺旋结构域参与了 GABA<sub>B</sub>R 异二聚体的形成。当把 GABA<sub>B</sub>R1 或 GABA<sub>B</sub>R2 螺旋结构域中位于螺旋外表面、通过疏水性相互作用的氨基酸

突变而致使螺旋-螺旋结构域被破坏时,即使突变的受体亚基与正常的另一亚基,如突变的 GABA<sub>B</sub>R1 和正常的 GABA<sub>B</sub>R2,或正常的 GABA<sub>B</sub>R1 和突变的 GABA<sub>B</sub>R2 共表达时,都不能使突变的或正常的 GABA<sub>B</sub>R1 定位至细胞膜,这说明了 GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 靠 C 末端的螺旋-螺旋结构域的相互作用,屏蔽了 GABA<sub>B</sub>R1 的胞内滞留信号,从而使 GABA<sub>B</sub>R1 可以正确定位至细胞膜。

另一值得注意的现象是,即使 GABA<sub>B</sub>R1 或 GABA<sub>B</sub>R2C 末端的螺旋-螺旋结构域被破坏,二者之间还存在着相互作用,说明除了螺旋-螺旋结构域之外还有其它可以相互作用的区域,但只有螺旋-螺旋结构域介导的受体两亚基之间的相互作用才能屏蔽胞内滞留信号而使 GABA<sub>B</sub>R1 定位至细胞膜。

### 3. GABA<sub>B</sub>R 由 GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 形成异二聚体才能形成有完整功能的受体

大量实验证明,单独表达的 GABA<sub>B</sub>R1 或 GABA<sub>B</sub>R2 都不具有完整的受体活性<sup>[2-4,18]</sup>。前面提到过,当 GABA<sub>B</sub>R1 单独表达时并不能定位至细胞膜,是不是 GABA<sub>B</sub>R1 不能定位至细胞膜而致使其功能的缺失呢? 实验证明,用定点突变的方法使 GABA<sub>B</sub>R1 的胞内滞留信号缺失,而使 GABA<sub>B</sub>R1 可以单独定位至细胞膜,可是受体仍不具有功能。虽然 GABA<sub>B</sub>R2 在单独表达时完全可以定位至细胞膜,但其功能仍不完整。把 C 末端螺旋结构域及胞内滞留信号都突变的 GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 共表达,虽然有一部分突变的 GABA<sub>B</sub>R1 定位至细胞膜,但受体仍不能激活内向补偿性钾通道,这就说明只有 GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 之间的完全结合才能形成有完整功能的受体<sup>[20]</sup>。

前面还提到了 GABA<sub>B</sub>R1e,它只是 GABA<sub>B</sub>R1a 胞外的部分,保留了 GABA<sub>B</sub>R1a 的配体结合区但却不能结合 GABA<sub>B</sub>R 的拮抗剂 CGP54626A。虽然它缺少 GABA<sub>B</sub>R1a 的 C 末端,但在体外表达系统中,GABA<sub>B</sub>R1e 可以分泌到胞外或定位至细胞膜,并且可以与 GABA<sub>B</sub>R2 形成异二聚体,从而与 GABA<sub>B</sub>R1a 竞争和 GABA<sub>B</sub>R2 的结合。但是 GABA<sub>B</sub>R1e 与 GABA<sub>B</sub>R2 组成的受体却不能激活内向补偿性钾通道,也不能抑制 Forskolin 刺激的 cAMP 水平的上升。鉴于 GABA<sub>B</sub>R1e 与 GABA<sub>B</sub>R2 形成异二聚体竞争了 GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R2 异二聚体的形成,在体内,GABA<sub>B</sub>R1e 有可能对受体的形成或功能的发挥起了调控作用<sup>[10]</sup>。

### 4. GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 之间的相互作用和受体的激活模式

GABA<sub>B</sub>R 像其他 C 家族的 GPCR 一样,有很长的胞外 N 端,其中含有与细菌周质氨基酸结合蛋白(PBP)同源的结构域,称之为 PBP-like 结构域,其作用是负责对配体的结合。把 PBP-like 结构域至第一个跨膜螺旋之间的部分称之为多肽接头(Peptide Linker)。和 GABA<sub>B</sub>R 同属 GPCR C 家族的 mGluR1 在 Glu 结合了 PBP-like 结构域之后,靠多肽接头的移动而使两个亚基(mGluR1 由同源二聚体组成)的跨膜螺旋靠近,导致了受体激活 G 蛋白,把这种受体激活模式称之为多肽接头模式(Peptide-Linker Model)。但另一方面,在配体结合了 PBP-like 结构域之后,PBP-like 结构域也可以直接与胞外的 Loop 环或跨膜螺旋接触从而激活受体,把这种激活受体的模式称之为直接接触模式(the Direct Contact Model)<sup>[22,23]</sup>。研究发现 GABA<sub>B</sub>R 的激活属于直接接触模式<sup>[21,22]</sup>。

GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 的分子结构可划分为胞外的 N 端以及三个 Loop 环,七个跨膜螺旋区和胞内的三个 Loop 环以及 C 端,在这些结构中,到底哪些对受体与配体的结合起作用,哪些又决定了受体的激活? 现在对这些结构的功能已经有了一定的认识。

GABA<sub>B</sub>R1 处于胞内的 C 端对于受体的激活,受体与效应分子如内向补偿性钾通道的偶联并不重要,相比之下,GABA<sub>B</sub>R2 的 C 端对于受体的功能却极为重要<sup>[21]</sup>。而把 GABA<sub>B</sub>R2 紧邻第七个跨膜螺旋区的两个氨基酸之后的片段全部缺失,与完整的 GABA<sub>B</sub>R1 共表达并不形成有功能的受体。进一步研究发现,GABA<sub>B</sub>R1 与缺失了 C 末端最后 161 个氨基酸的突变型的 GABA<sub>B</sub>R2 仍可形成有功能的受体,这种突变的 GABA<sub>B</sub>R2 胞内部分只保留了紧邻第七个跨膜螺旋的 36 个氨基酸,说明这段多肽对于受体与 G 蛋白的偶联是很重要的<sup>[22]</sup>。

GABA<sub>B</sub>R1 胞内三个 Loop 环若被 GABA<sub>B</sub>R2 或 mGluR1 的胞内 Loop 环所代替,它与 GABA<sub>B</sub>R2 共表达形成的受体和天然受体一样可以激活内向补偿性钾通道,这就说明 GABA<sub>B</sub>R1 胞内的三个 Loop 环结构对于 GABA<sub>B</sub>R 的功能并不重要<sup>[20]</sup>。但若把 GABA<sub>B</sub>R2 的胞内三个 Loop 环中的任一个用 GABA<sub>B</sub>R1 胞内 Loop 环代替都将导致受体功能的丧失,说明 GABA<sub>B</sub>R2 的胞内 Loop 环结构对于受体

与 G 蛋白的偶联是至关重要的<sup>[21]</sup>。

GABA<sub>B</sub>R1 胞外 N 端负责受体与配体的结合, 而 GABA<sub>B</sub>R2 的胞外 N 端则缺乏与配体、激动剂以及拮抗剂的结合位点。把 GABA<sub>B</sub>R1 与 GABA<sub>B</sub>R2 的胞外 N 端(指从第一个氨基酸到第一个跨膜螺旋之前两个氨基酸之间的部分)互换, 组成嵌和型受体(简称为 GBR2/1/GBR1/2)仍保持着天然受体激活内向补偿性钾通道的活性。在这需要指出的是, 单独表达的 GBR2/1 或 GBR1/2 都不具有功能。若只把 GABA<sub>B</sub>R1 的胞外段用 GABA<sub>B</sub>R2 的胞外部分代替, 形成的嵌和型受体(简称为 GBR2/1/GBR2)就失去了激活内向补偿性钾通道的功能, 这是显而易见的, 因为受体的两个胞外段都缺乏结合配体的功能<sup>[21]</sup>。

但若受体的胞外 N 端都由 GABA<sub>B</sub>R1 的胞外部分构成, 对其功能又会产生什么样的影响呢? 实验发现, 胞外段都由 GABA<sub>B</sub>R1 胞外 N 端构成的受体(简称为 GB1/GB1/2), 在 GABA 的刺激下不能刺激磷酸肌醇(IP)的产生, 也不能激活内向补偿性钾通道, 相反却抑制了钾电流; 虽然此时 GABA 对钾电流的抑制作用不如 GABA 通过天然 GABA<sub>B</sub>R 对钾电流的刺激作用那么强, 但这两种反应的起始以及持续的时间是一致的, 说明 GABA 的效应已经由激动剂转变为反向激动剂(reverse agonist)。GABA<sub>B</sub>R 的拮抗剂 SCH50911 可以消除 GABA 对钾电流的抑制作用。这种由 GABA<sub>B</sub>R1 胞外 N 端与 GABA<sub>B</sub>R2 跨膜螺旋和胞内段(简称为 GB1/2)构成的突变型受体, 与天然 GABA<sub>B</sub>R1 组成的受体有两个结合 GABA 的位点, 可是 GABA<sub>B</sub>R1 对 GABA 的结合并不介导受体对钾电流的抑制作用, 因为突变对 GABA 结合起重要作用的 Ser246, 并不能消除嵌和型受体对钾电流的抑制作用。但若突变 GB1/2 中的 Ser246, 嵌和型受体对钾电流的抑制作用随即消失, 但仍不具有天然受体激活内向补偿性钾通道的活性<sup>[21]</sup>。

值得注意的是, 含有两个 GABA<sub>B</sub>R1 胞外段的嵌和型受体, 在 GABA 的刺激下, 抑制而不是激活了内向补偿性钾通道, 而 GABA<sub>B</sub>R 的拮抗剂 SCH50911 作用正相反, 它表现出了激活钾电流的效应。而且, 与天然 GABA<sub>B</sub>R 相比, 嵌和型的 GB1/GB1/2 对 SCH50911 更为敏感, 而对 GABA 的敏感性正好相反; 表达 GB1/GB1/2 的细胞具有更高的 IP 水平, 说明 GB1/GB1/2 具有更高的本底活性, 对这些结果可能的解释是: GABA<sub>B</sub>R2 的 PBP-like 结构域在通常情况下抑制了 GABA<sub>B</sub>R 引发的信号传

导, 而 GABA 与受体的结合则解除了这种抑制效应。按照这一理论, GABA 通过 GB1/GB1/2 对钾电流的抑制正好反映了下面的事实: GABA<sub>B</sub>R1 的 PBP-like 结构域只有在与 GABA 结合的情况下才能使受体对钾电流的抑制成为可能。对 GB1/GB1/2 抑制钾电流的另外一种解释是: GB1/GB1/2 所具有的更强的本底活性反映出受体活性与非活性构象之间的平衡左移, 而拮抗剂 SCH50911 的结合则进一步稳定了受体的活性构象, 而 GABA 的结合则稳定了受体的非活性构象。从这两种解释都可以看出, 配体结合结构域的构象反映了受体的本底活性。

以上事实都说明 GABA<sub>B</sub>R2 的胞外 N 端对 GABA<sub>B</sub>R 的激活起了很重要的作用, 它并不能被 GABA<sub>B</sub>R1 的胞外 N 端所代替<sup>[21]</sup>。

当在 GABA<sub>B</sub>R1 或 GABA<sub>B</sub>R2 的多肽接头中引入一段能形成  $\alpha$ -螺旋的 11 肽或用这 11 肽代替多肽接头中的 11 个氨基酸时, 对受体的激活都不产生影响, 说明 GABA<sub>B</sub>R 的激活属于直接接触模式, 靠 PBP-like 结构域直接与胞外的 Loop 环或跨膜螺旋接触激活受体<sup>[21,22]</sup>。

综上所述, GABA<sub>B</sub>R1 的胞外区对配体的结合起了很重要的作用, GABA<sub>B</sub>R2 不但对 GABA<sub>B</sub>R1 的正确细胞定位, 而且对受体的激活起了相当重要的作用。GABA<sub>B</sub>R 激活 G 蛋白的决定因素在 GABA<sub>B</sub>R2 的胞内区, 而 GABA<sub>B</sub>R1 的胞内区增强了受体与 G 蛋白的偶联效应。另一方面, 虽然 GABA<sub>B</sub>R 结合配体的是 GABA<sub>B</sub>R1 的胞外区, 但是 GABA<sub>B</sub>R2 可以提高受体对配体的亲和力。这些都说明了 GABA<sub>B</sub>R 的两个亚基之间存在着变构作用, 这种相互作用对于受体发挥功能是必需的。

#### 四、GABA<sub>B</sub>R 与基因转录<sup>[24,25]</sup>

GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 通过其 C 端部分与两种相关的转录因子, CREB2(ATF4)和 ATF<sub>x</sub> 直接作用。GABA<sub>B</sub>R1 通过其 C 端的螺旋-螺旋结构域与 CREB 2、ATF<sub>x</sub> 的亮氨酸拉链区相互作用。GABA<sub>B</sub>R2 与 CREB2、ATF<sub>x</sub> 作用的区域却在亮氨酸拉链区以外。GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 靠其 C 端的螺旋-螺旋区形成异二聚体, 所以有可能有个三向的螺旋结构把受体与转录因子联结了起来, 或者受体的两个亚基的螺旋-螺旋先解离, 再实现与转录因子的结合。GABA<sub>B</sub>R 与 CREB2、ATF<sub>x</sub> 的直接相互作用对于 C 家族的 GPCR 来说, 至今是独一无二

的。

CREB2 和 ATF<sub>x</sub> 都是 ATF/CREB 转录因子家族中的一员,其结构特征是 C 端有亮氨酸拉链模式的 DNA 结合区,N 端是转录激活区。CREB2 的 N 末端有 MAPK 磷酸化位点,但缺乏 PKA 及 PKC 作用位点。CREB2 既可激活又可抑制基因的转录,还可与其它的转录因子,如 CCAAT/增强子结合蛋白形成二聚体。

在发育的过程中,GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 亚基及 GABA<sub>B</sub>R1 各剪切拼接体的表达水平都在变化。GABA<sub>B</sub>R1/GABA<sub>B</sub>R2 相对水平的改变可能影响了 GABA<sub>B</sub>R 与转录因子的结合能力,从而调控了发育过程中基因的表达。许多神经生长因子,如 NGF、BDNF,都受到 GABA 的调控,并且其启动子区域有 CRE 反应元件,这些基因的表达可能都受到 CREB2 的调控。

GABA<sub>B</sub>R 的激活,使 CREB2 的分布发生了改变,由原来的胞浆分布转为向细胞核积聚。而且在外源重组表达的细胞,CREB2 的转移直接影响了基因转录。已经表明 CREB2 激活的基因转录需要 G 蛋白及 MAPK 信号通路;可能是 G $\beta\gamma$  激活 Ras/Raf 通路,进而激活 MAPK。最终激活的 MAPK 使 CREB2 磷酸化。GABA<sub>B</sub>R/CREB2 信号通路的生物学作用至今还不清楚,但很重要的一点是,CREB 转录因子对于调节长期记忆和突触可塑性是极为重要的。所以,推测 GABA<sub>B</sub>R/CREB2 信号通路在神经系统的发育过程中起了很重要的作用。

## 五、问题和展望

GABA<sub>B</sub>R 作为第一个被发现由异二聚体构成的 G 蛋白偶联的受体,至今已经有六种 GABA<sub>B</sub>R1,三种 GABA<sub>B</sub>R2 的剪切拼接体被鉴定。相信以后肯定还会有更多 GABA<sub>B</sub>R 的剪切拼接体或其他辅助蛋白将被发现。这种情况下,针对某剪切拼接体的特异性激动剂、拮抗剂或抗体,必将对各种组合的受体的组织分布、细胞定位以及功能的研究起到极大的促进作用。对 GABA<sub>B</sub>R1 和 GABA<sub>B</sub>R2 亚基在受体与配体的识别和结合、受体与 G 蛋白的激活、受体与下游信号系统偶联中的作用需要进一步的研究。应该指出的是,对 GABA<sub>B</sub>R 的研究应该不仅仅局限于神经系统,对外周组织中 GABA<sub>B</sub>R 的组成和功能也不该被忽视。鉴于 GABA<sub>B</sub>R1a 和 GABA<sub>B</sub>R1b 在脑发育的过程中存在明显的表达差

异和 GABA<sub>B</sub>R 本身对突触神经传递所起的重要调控作用,需要对 GABA<sub>B</sub>R1a 或 GABA<sub>B</sub>R1b 与脑成熟、神经系统发育的关系进行深入研究。另外,GABA<sub>B</sub>R 与转录因子的直接结合也值得关注,这也许与 GABA<sub>B</sub>R 对整个神经系统的生理活动的长时调控有关。

总之,GABA<sub>B</sub>R 的克隆对 GPCR 的研究提出了很多新的挑战,同时无疑也提供了很多很好的思路。

## 参 考 文 献

- [1] Mohler. H. 2001. Pharmacology of GABA and glycine neurotransmission. springer. pp311 - 321.
- [2] Kaupmann K. et al., 1997, *Nature*, **386** (6622): 239 - 246.
- [3] White JH, et al., 1998, *Nature*, **396**(6712): 679 - 682.
- [4] Jones KA, et al., 1998, *Nature*, **396**(6712): 674 - 679.
- [5] Kaupmann K, et al., 1998, *Nature*, **396** (6712): 683 - 687.
- [6] Kuner R. et al., 1999, *Science*, **283**(5398): 74 - 77.
- [7] Isomoto S. et al., 1998, *Biochem Biophys Res Commun*, **253**(1): 10 - 15.
- [8] Pfaff T. et al., 1999, *Eur J Neurosci*, **11** (8): 2874 - 2882.
- [9] Makoff A. 1999. *Brain Res Mol Brain Res*. **64**(1): 137 - 140.
- [10] Schwarz DA. et al., 2000, *J Biol Chem*. **275**(41): 32174 - 32181.
- [11] Wei K. et al., 2001, *Neuroreport*. , **12**(4): 833 - 837.
- [12] Peters HC. et al., 1998, *Neurogenetics*, **2**(1): 47 - 54.
- [13] Clark JA. et al., 2000, *Brain Res*. **860**(1-2): 41 - 52.
- [14] He XB. et al., 2001, *Biochem Biophys Res Commun*, **283** (1): 243 - 247.
- [15] Calver AR. et al., 2000, *Neuroscience*, **100** (1): 155 - 170.
- [16] Fritschy JM. et al., 1999, *Eur J Neurosci*, **11**(3): 761 - 768.
- [17] Benke D, et al., 1999, *J Biol Chem*. , **274**(38): 27323 - 27330.
- [18] Kaupmann K, et al., 1998, *Proc Natl Acad Sci USA*. , **95** (25): 11499 - 14996.
- [19] Couve A, et al., 1998, *J Biol Chem*. , **273**(41): 26361 - 26367.
- [20] Marta Margeta-Mitrovic, et al., 2000, *Neuron*, **27**, 97 - 106.
- [21] Marta Margeta-Mitrovic, et al., 2001, *J Biol Chem*. , **98** (25): 14643 - 14648.
- [22] Marta Margeta-Mitrovic, et al., 2001, *J Biol Chem*. , **98** (25): 14649 - 14654.
- [23] Galvez T, et al., 1999, *J Biol Chem*, **274**(19): 13362 - 13369.
- [24] Nehring RB. et al., 2000, *J Biol Chem*. , **275**(45): 35185 - 35191.
- [25] White JH, et al., 2000, *Proc Natl Acad Sci USA*. **97** (25): 13967 - 13972.