专论与综述

γ－氨基丁酸(GABA)转运蛋白的结构、功能和调控

胡佳华　费　俭　郭礼和*

(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)

摘　要　神经信号的有效传递有赖于对神经递质的精确调节，转运蛋白在其中起着决定性的作用。作为哺乳动物中枢神经系统中最主要的抑制性系统，GABA 能系统在生物体内参与多种神经生理活动，自 90 年代初首次克隆了 GABA 转运蛋白基因以来，对它的研究也越来越深入和越来越多，本文对 GABA 转运蛋白的结构功能和调控仅作了简要综述。

γ-氨基丁酸(GABA)是哺乳动物中枢神经系统中最主要的抑制性神经递质，它作用于 $GABA_A$ 受体(配体门控通道，可选择性通过 Cl^- 离子)和 $GABA_B$ 受体(G 蛋白耦联受体，可降低 cAMP 水平和打开 K^+ 通道)，从而将神经信号传递下去。然而这种神经突触间的信号传递需要调节和控制，以便形成高度智能化的神经网络系统。神经递质的释放和清除是调控突触间神经信号传递的强弱和时程长短的关键。GABA 转运蛋白(GAT)参与了这一突触间信号传递调节过程，尤其是在清除 GABA 递质方面更为重要。

GABA 转运蛋白基因是最早克隆的神经递质转运蛋白基因。到目前为止，已克隆了四种 GABA 转运蛋白基因，它们属于 Na^+/Cl^- 转运蛋白家族[1]，其中人的 GAT-1 亚型基因由我们实验室最先克隆出来[2]，本文主要介绍 GABA 转运蛋白的结构、功能和调控。

一、γ-氨基丁酸转运蛋白的结构

1. GABA 转运蛋白的克隆

GAT-1 亚型是第一个从大鼠中克隆的 GABA 转运蛋白，随后又从大鼠中克隆了 GAT-2、GAT-3，另外一个 GABA 转运蛋白家族成员是从狗的肾脏中克隆的，即 BGT-1[3]。在小鼠中也分别克隆了四种 GABA 转运蛋白亚型，但命名与大鼠和人的转运蛋白不同：小鼠的 GAT1 同源于大鼠的 GAT-1，小鼠的 GAT2 同源于大鼠的 BGT-1，小鼠的 GAT3 同源于大鼠的 GAT-2，小鼠的 GAT4 同源于大鼠的 GAT-3。以上这四种转运蛋白亚型对 GABA 都具有高亲和力。另外，Smith 等从大鼠中克隆了一个具有低亲和力的 GABA 转运蛋白，即 TAUT[4]。人的 GABA 转运蛋白命名与大鼠一致。

2. GABA 转运蛋白的拓扑结构

GABA 转运蛋白具有 12 个跨膜结构，N 端和 C 端位于胞内，在第三和第四跨膜结构之间有一胞外大环，含有糖基化位点(结构示意见图 1)[2, 5]。不同种的哺乳动物相应蛋白同源性很高，而且家族之间的同源性也较高(见表 1)。

3. GABA 转运蛋白的转运功能

GABA 转运蛋白属于 Na^+ 和 Cl^- 离子依赖的神经递质转运蛋白家族，对多种神经元的 GABA 转运研究表明 GAT-1 在转运 GABA 时严格依赖 Na^+，部分依赖 Cl^-；在小鼠 LtK^- 细胞上，研究表明 GAT-1 每转运一分子 GABA 会有 2 个 Na^+ 和一个 Cl^- 离子发生共转移[6]，这一结果与纯化的转运蛋白体外实验结果相一致，也与电生理的研究相一致。BGT-1 在转运一分子 GABA 时却需 3 个 Na^+ 和 1－2 个 Cl^- 离子协同转运[7]。GABA 转运蛋白也表现出底物非依赖的 Li^+ 和 K^+ 离子诱导的漏电流，但能被底物和转运抑制剂所阻断[8]，这些特性提示 GABA 转运蛋白除了能终止突触抑制性信号传递之外，还能影响神经元和胶质细胞的兴奋性。破坏 Na^+/Cl^- 及 GABA 梯度或通过细胞去极化，GABA 转运蛋白会发生反向转运，导致非囊泡的 GABA 从胞内向突触间隙释放，这种非囊泡的释放在神经元和胶质细胞上均存在[9, 10]。改变海马神经元上的 Na^+ 或 K^+ 电化学梯度，可诱导由转运蛋白介导的 GABA 从神经元和/或胶质细胞释放出来，从而激活 $GABA_A$ 受体[11]。由于转运体介导的 GABA 释放并不依赖于 ATP，而是依赖于离子梯度，因此在癫痫等耗能巨大的疾病发作期间会有很大作用。

* 联系人。E-mail：lhguo@sunm.shcnc.ac.cn

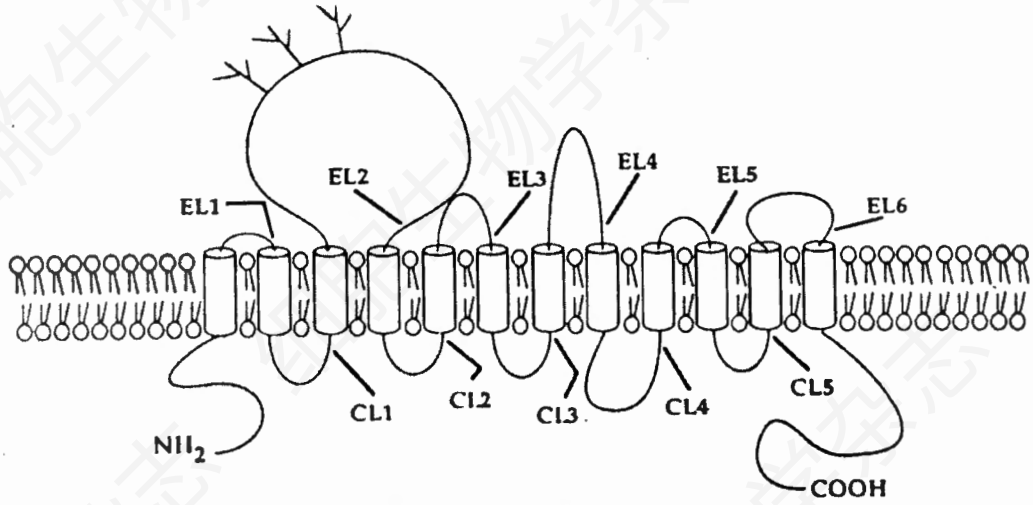

图 1 GAT-1 跨膜拓扑结构

图中示意了 GAT-1 十二次跨膜螺旋,N 端和 C 端都在胞内,在第三和第四跨膜螺旋有一胞外大环,含有糖基化位点。EL: 胞外环,CL: 胞内环。

不同亚型的 GABA 转运蛋白药理学特性不尽相同。GAT-1 仅对 GABA 具有高亲和力;GAT-2 和 GAT-3 对 GABA 和 β-丙氨酸都具有高亲和力;BGT-1 对 GABA 和甜菜碱有高亲和力;TAUT 对 β-丙氨酸和牛磺酸具有高亲和力,对 GABA 只具有低亲和力(见表 1)。

表 1 γ-氨基丁酸转运蛋白的性质描述

	氨基酸同源性	药理学特性	组织表达	脑部表达
GAT-1	人－大鼠:97% 人－小鼠:96% rGAT-1－rGAT-2:53%	高亲和力:GABA, 3－哌啶甲酸, ACHC, NO-711 低亲和力:β－丙氨酸	中枢神经系统,睾丸,	大脑皮层,海马,嗅球, 丘脑,小脑,纹状体,视网膜等; 与 GABA 能神经元分布一致
GAT-2	人－大鼠:90% 人－小鼠:91% rGAT-2－rGAT-3:67%	高亲和力:GABA,β-丙氨酸 低亲和力:ACHC,NO-711	中枢神经系统,肝,肾	软脑膜,脉络丛,室管膜,视网膜,小脑;成年脑基本不表达
GAT-3	人－大鼠:95% 人－小鼠:95% rGAT-3－rGAT-1:52%	高亲和力:GABA,β-丙氨酸 低亲和力:ACHC,NO-711	中枢神经系统特异表达	视网膜,脑干,嗅球,下丘脑
BGT-1	人－大鼠:86% 人－小鼠:87% hBGT-1－rGAT-2:70%	高亲和力:GABA,甜菜碱 低亲和力:β-丙氨酸, 3-哌啶甲酸, ACHC, NO-711	中枢神经系统,肾	广泛分布,并且在各个脑区中表达丰度相近
TAUT	大鼠－人:94% 大鼠－小鼠:95% rTAUT－rGAT-3:60%	高亲和力:β-丙氨酸,牛磺酸 低亲和力: GABA, ACHC, 3-哌啶甲酸	中枢神经系统,心脏,肝, 小肠,血管	海马和皮层等多个脑区, 表达丰度相近

4. GABA 转运蛋白结构与功能的关系

MabJeesh 和 Kanner 对 GABA 转运蛋白的氨基端和羰基端结构域做了一系列的突变[12],其中去除螺旋 1 起始端或螺旋 12 末端的一些氨基酸序列并不影响 GABA 的转运活性,但这些缺失的片段不应含有家族中保守的氨基酸残基,不然转运蛋白活性就会严重下降。这些突变研究还显示了蛋白序列中的很多氨基酸残基与功能相关:如在 GAT-1 中,突变 N-端的第 44 位精氨酸残基可影响净离子流;位于第一个 α-螺旋的 69 位精氨酸残基与结合 Cl^- 离子有关;位于连接 α-螺旋 1－2 的胞外小环上的 74 位半胱氨酸残基参与离子结合与通透;位于第三个 α-螺旋 140 位酪氨酸残基起着识别底物 GABA 的作用;位于第四个 α-螺旋的 222 位色氨酸残基与转运底物 GABA 的氨基结合;位于连接 α-螺旋 8－9 的胞内小环的 399 位半胱氨酸残基可能参与 GAT-1 拓扑结构的维持;位于第 5 胞外环的第 448 位赖氨酸残基与 GAT-1 pH 敏感性有关,并参与底物的结合。虽然越来越多的位点被鉴定出来与功能有关,但要想完整清楚地了解 GABA 转运蛋白的结构与

功能关系还有待于更深入地研究。

二、GABA转运蛋白在组织和细胞内的分布

1. 体内分布

用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和Northern杂交方法显示GAT-1和GAT-3是中枢神经系统特有的,但最近我们和其他实验室皆发现GAT-1在大鼠和小鼠的睾丸与精子上也表达[13,14]。GAT-2、BGT-1和TAUT除了在中枢神经系统表达外,在一些外周组织也有表达(如在肝、肾中表达丰度较高)。

2. 不同脑区分布

GAT-1主要分布在大脑皮层、海马、嗅球、丘脑、小脑、视网膜、纹状体等脑区,与底物GABA分布相一致,是神经系统中最重要的GABA转运蛋白[15]。GAT-3主要分布在视网膜、脑干、嗅球、下丘脑等脑区,在大脑皮层不表达,海马中只有非常微弱的表达。GAT-2主要表达在软脑膜、脉络丛、室管膜、视网膜和小脑,在新生鼠中的表达丰度远比成年鼠高,可能与发育有关。BGT-1在脑中广泛分布,各脑区的表达丰度很相近(见表1)。

3. 神经元和胶质细胞上的分布

早先认为GAT-1只在神经元上表达,后来发现在胶质细胞上也有表达,但在神经元上的表达还是起主要作用。GAT-2主要在Ⅰ型星形细胞上表达,最近发现神经元和上皮细胞上也有表达。GAT-3在胶质细胞和神经元上都有表达。BGT-1在中枢神经系统中主要在Ⅰ型和Ⅱ型星形细胞上表达,在培养的神经元上未检测到它的表达。TAUT在神经元、Ⅰ型和Ⅱ型星形细胞上都有表达,尤其在Ⅰ型星形细胞上表达量最多。

总之,以上四种高亲和力和一种低亲和力的GABA转运蛋白在不同的组织和细胞有着不同的表达模式,可能与不同生理功能有关。

三、GABA转运蛋白的功能

GABA是哺乳类动物中枢神经系统中最主要的抑制性神经递质,受多种亚型GABA转运蛋白的精确调控。GAT-1亚型在皮层神经元突触前膜上高表达,是参与GABA重摄取的主要蛋白。位于GABA能神经元附近胶质细胞上的GABA转运蛋白具有终止抑制性突触信号传递,调节GABA能突触的功能。远离GABA能神经元胶质细胞上的GABA转运蛋白具有清除扩散出来的GABA的功能。此外,胶质细胞重摄取GABA对兴奋性末稍突触前的$GABA_B$受体可能起调节作用。GABA被神经元突触前膜上的GABA转运蛋白重摄取,在突触前神经元可以被重复利用,减少了GABA的重新合成。GABA被胶质细胞上的GABA转运蛋白重摄取后,由GABA转氨酶迅速代谢。GAT-2主要表达于软脑膜,可能具有调节脑脊液中GABA浓度的作用。BGT-1在脑区的分布与GABA能通路并无关系,可能不具有终止突触信号的传递作用,但可能参与清除从突触区域扩散出来的GABA。另外,甜菜碱可以调节渗透压,由于BGT-1能转运甜菜碱,因此它可能也起着调控渗透压的作用[16]。最近Takanaga发现BGT-1参与血脑屏障处转运GABA的作用[17]。

在一些中枢神经系统疾病中,常会出现GABA能神经信号传递的降低,尤其是癫痫。对癫痫治疗的研究,人们主要寻找能增加GABA能神经元功能的药物。研究发现GABA转运蛋白的抑制剂对癫痫能起到很好的疗效,如tiagabine,SKF-89976,CI-966,NO-711(GAT-1选择性抑制剂)等都能起到良好的抗惊厥效果,其中tiagabine已在临床上使用[18]。GABA转运蛋白表达的上调可能导致了GABA能突触的信号传导下降,可能是癫痫发作的原因之一。抗惊厥药物Valproate具有下调神经元和胶质细胞GAT-1和GAT-3蛋白表达的功能。我们实验室用GAT-1转基因小鼠证实,过量表达GAT-1的小鼠对药物诱导的癫痫发作更敏感[19]。

除癫痫外,GABA转运蛋白还在一些其他的临床疾病中起作用。有些麻醉剂能够抑制GABA转运蛋白活性,表明它可能参与麻醉剂的作用[20]。另外,精神分裂症患者的皮层下脑区,会出现GABA重摄取位点变少,GAT-1表达下降。这些现象表明精神分裂症患者的GABA能传递机制不正常[21]。

我们实验室一直应用转基因动物研究GABA转运蛋白的生理功能。首先建立了CMV启动子指导的GAT-1转基因小鼠,发现过量表达GAT-1的小鼠会出现学习与记忆能力的损伤(经典条件性回避反应和新物体识别任务)[22]。最近,又建立了神经元特异性表达的GAT-1转基因小鼠,同样也表现出学习与记忆能力的衰退。这些实验结果证明GAT-1与学习记忆机制有关。令人感兴趣的是,用GAT-1抑制剂慢性处理6天后,这些学习与记忆能

力差的小鼠能得到逆转,说明 GAT-1 参与学习与记忆的机制可能是一种修饰的过程而不是造成不可逆的损伤。

其次,GABA 转运蛋白参与酒精耐受,酒精摄入后小鼠的大脑会很快引起 GABA 重摄取活性的升高。这种升高是由 GAT-1 从突触体内转移到突触体膜上引起的。GAT-1 特异性的抑制剂 3-哌啶甲酸乙酯和 NO-711 能使小鼠对酒精敏感,而过量表达 GAT-1 的转基因小鼠对酒精产生耐受。这些实验结果表明 GAT-1 参与了酒精对中枢神经系统的作用,GAT-1 有可能作为治疗酒精中毒和成瘾的靶标。

第三,GABA 转运蛋白参与了吗啡成瘾。注射吗啡 2hr 后小鼠的 GABA 转运蛋白功能得到增强;用条件性地点偏好(CPP)模型测试小鼠的成瘾性,结果表明与野生型小鼠相比,过量表达 GAT-1 的两种转基因小鼠均表现出对吗啡不太容易成瘾;就是吗啡成瘾后,转基因小鼠表现出的戒断症状也较野生型为轻;此外,转基因小鼠的吗啡镇痛效果也比野生型更强。这些研究结果提示升高 GAT-1 表达可加强吗啡的临床使用效果。

第四,GABA 转运蛋白与疼痛密切相关。用福尔马林炎症致痛后,小鼠脊髓和大脑的 GABA 转运蛋白生物活性均会升高;用热敏甩尾、福尔马林炎症反应和乙酸腹腔疼痛等实验证实 GAT-1 特异性抑制剂可以镇痛,GAT-1 转基因小鼠则表现出痛觉敏感。这些结果证明 GAT-1 与疼痛密切相关,而且 GAT-1 特异性抑制剂的镇痛作用具有药物不耐受和不成瘾的优点,提示 GAT-1 可能成为镇痛药物筛选的靶点。

第五,GAT-1 可能与机体肥胖相关。过量表达 GAT-1 的转基因小鼠每日饮食量无明显变化,但昼夜节律有改变。出现了明显的体重过重,血液中甘油三脂和胆固醇升高,腹腔脂肪显著增加。这些结果表明 GAT-1 功能的加强会造成机体肥胖[23]。

第六,GAT-1 过量表达会影响生殖功能。GAT-1 转基因鼠的睾丸曲细精管生精上皮会发生空泡化,间质区毛细管会发生异常增生[24],血液中睾酮含量会显著下降,睾丸产生精子明显减少,畸形化程度升高,雄性能育率仅在 50% 左右。这些结果提示 GABA 转运蛋白表达升高可能与某些类型的雄性不育症相关。

四、GABA 转运蛋白的调节

GABA 转运蛋白控制 GABA 能神经元信号传递的时程和强度,其本身也受到多种调控。

1. GABA 转运蛋白的快速或短期调控涉及其本身的磷酸化与去磷酸化

激活蛋白激酶 C(PKC)可以改变 GABA 转运蛋白的功能与底物亲和力,从而抑制了高亲和力的 GABA 重摄取[25, 26]。GABA 转运蛋白存在多个 PKC 磷酸化位点,提示磷酸化可调节 GABA 重摄取。遗憾的是突变掉 GAT-1 上的 PKC 磷酸化位点后,转化卵母细胞并不能消除对 GABA 重摄取的抑制[27]。最近的研究结果显示 GAT-1 酪氨酸残基磷酸化可改变其在膜上和在突触体内的分配,从而调节其生物功能[28]。我们也发现酒精可促使 GAT-1 去磷酸化导致 GAT-1 从突触体内转移到突触体膜上,从而增强了 GABA 重摄取的功能。

2. GABA 转运蛋白的功能受到了囊泡停泊和融合系统中的一些分子调节

对表达鼠脑混合 mRNA 的卵母细胞注射 synaptophysin 或 syntaxin 的反义寡核苷酸或肉毒杆菌毒素(BTXs),使 synaptophysin 或 syntaxin 调节蛋白失活,从而阻止 PKC 对 GAT-1 的调节[29],随后的研究表明 PKC 调节了 GAT-1 与 Syntaxin1A 的相互作用[30],进一步的研究表明 GAT-1 N 端结构域与 Syntaxin1A 的相互作用调节 GABA 转运速度[31]。

3. 细胞外的 GABA 也可调节 GAT-1 的功能

细胞外的 GABA 可刺激 GAT-1 功能的增强,这一过程涉及 GAT-1 的酪氨酸残基磷酸化[32]。

总之,GABA 转运蛋白在机体内有着多方面的生理功能,越来越受到研究者们的重视。对它的深入研究必将会提供重要的理论意义和展现广阔的临床应用前景。

参 考 文 献

[1] Nelson, N., 1998, *J Neurochem*, **71**: 1785-1803.
[2] Dominic Man-Kit Lam, et al., 1993, Molecular Brain Research, **19**: 227-232.
[3] Borden, L.A., 1996, *Neurochem Int*, **29**: 335-356.
[4] Smith, K. E., et al., 1992, *Mol. Pharmacol*, **42**: 563-569.
[5] Clark, J.A., 1997, *J Biol Chem*, **272**: 14695-14704.
[6] Keynan, S., et al., 1992, *Biochemistry*, **31**: 1974-1979.
[7] Matskevitch, I., et al., 1999, *J Biol Chem*, **274**: 16709-16716.
[8] Sonders, M. S., 1996, *Curr Opin Neurobiol*, **6**: 294-302.
[9] Yang, C. Y., et al., 1999, *Vis Neurosci*, **16**: 967-

979.
[10] Gallo, V., et al., 1991, *Glia*, **4**: 245－255.
[11] Gaspary, H. L., 1998, *J Neurophysiol*, **80**: 270－281.
[12] Bendahan, A., et al., 1993, *FEBS Lett*, **318**: 41－44.
[13] Ma, Y. H., et al., 2000, *Cell Res*, **10**: 59－69.
[14] Hu, J. H., et al., 2000, *Cell Res*, **10**: 51－58.
[15] Radian, R., 1990, *J Neuorsci*, **10**: 1319－1330.
[16] Borden, L. A., et al., 1995, *J Neurochem*, **64**: 977－984.
[17] Takanaga, H, et al., 2001, *J Cereb Blood Flow Metab*, **21**: 1232－1239.
[18] Meldrum, B. S., et al., 1999, *Epilepsia*, **40** (**suppl. 9**): S2－S6.
[19] Ma, Y. H., et al., 2001, *Cell Res*, **11**: 61－67.
[20] Mantz, J., et al., 1995, *Anesthesiology*, **82**: 502－511.
[21] Paul, B. B., 2002, *Int J Neuropsychopharmacol*, **5**: 159－179.
[22] Ma, Y. H., et al., 2001, *Acta Pharmacol Sin*, **22**: 340－348.
[23] Ma, Y. H., et al., 2000, *Cell Res*, **10**: 303－310.
[24] Ma, Y. H., et al., 2000, *Cell Res*, **10**: 59－69.
[25] Sato, K., et al., 1995, *FEBS Lett*, **375**: 99－102.
[26] Beckman, M.L., et al., 1998, *J Membrane Biol*, **164**: 1－10.
[27] Corey, J.L., et al., 1994, *J Biol Chem*, **269**: 14759－14767.
[28] Law, R. M., et al., 2000, *J Biol Chem*, **275**: 23986－23991.
[29] Quick, M. W., et al., 1997, *J Neurosci*, **17**: 2967－2979.
[30] Beckman, M. L., 1998, *J Neurosci*, **18**: 6103－6112.
[31] Deken, S.L., 2000, *Nat Neurosci*, **3**: 998－1003.
[32] Whitworth, T. L., 2001, *J Biol Chem*, **276**: 42932－42937.

成体干细胞及其可塑性的研究进展

郭 虹 赵春华*
（中国医学科学院 中国协和医科大学血液学研究所实验血液学国家重点实验室 天津 300020）

自从1998年第一次从内细胞团分离到人的胚胎干细胞，人们很快认识到胚胎干细胞在再生医学中的潜在应用价值。人们相信干细胞的研究将带来临床治疗各种疾病的革命。随着科学的进展，人们从胎儿和出生后个体的不同组织中分离到具有自我更新、多向分化潜能和增殖特性的细胞，并称之为成体干细胞(adult stem cells)。目前研究表明成体干细胞不仅对其所在的组织器官有重建和修复功能，而且成体干细胞突破性的进展在于其具有分化为其他组织细胞的可塑性(plasticity)特征，即不仅可以跨系分化，甚至还能够跨胚层分化。成体干细胞的可塑性现象引起了许多科研工作者的兴趣。本文主要介绍各组织器官成体干细胞及可塑性研究和目前存在的争议。

一、骨髓干细胞及其可塑性

骨髓内主要有两类干细胞群体，造血干细胞和间充质干细胞。两类干细胞的特征及功能已有许多文章，在这里主要介绍这两种干细胞的巨大分化潜能。另外最近研究表明成体骨髓中也具有血液血管干细胞(hemangioblast)特征的干细胞存在。

1．造血干细胞和间充质干细胞的可塑性

(1) 骨骼肌 在体外可以将骨髓间充质干细胞诱导分化为肌细胞[1]。当间充质干细胞移植到肌营养不良(mdx)小鼠肌肉中，发现出现肌营养不良蛋白阳性的纤维表达，而mdx小鼠肌肉是不表达此蛋白的，提示间充质干细胞可以向肌源方向分化并具有治疗肌肉疾病的潜能。进一步将高度纯化的造血干细胞移植到mdx小鼠，发现移植的细胞可以和肌营养不良蛋白阴性的纤维融合并表达此蛋白，但是阳性细胞的数目很低。为了避免宿主小鼠存在肌营养不良蛋白恢复表达所造成的假阳性，Ferrari应用mdx基因突变从而将野生型的肌营养不良蛋白用PT-PCR区别开来。然而，结果显示不管移植的骨髓细胞数目多少，只有1%的肌肉纤维表达肌营养不良蛋白，其认为骨髓移植不能纠正小鼠的肌营养不良，可能与骨髓含有的干细胞的数目非常低有关[2]。

(2) 肝脏 Petersen首先发现卵圆细胞和肝脏细胞来自循环中骨髓细胞[3]，将雌性大鼠骨髓细

本文由国家攀登计划专项基金项目(95-专-10)和China Medical Board of NY INC(CMB)：Stem Cell Biology, Engineering(Grant # 01-748)基金资助。
* 联系作者。E-mail: chunhuaz@public.tpt.tj.cn