

Na⁺/Cl⁻神经递质转运蛋白

马映华 费 俭 郭礼和

(中国科学院上海细胞生物学研究所 上海 200031)

在高等生物中,细胞间信号传导的主要方式是化学信号传导,化学信号传导需要胞外信使和靶细胞上/内的受体参与。胞外信使包括神经递质、激素、趋向因子以及其他可扩散的小分子等等。在神经系统中,神经细胞构成了感受器—神经中枢—效应器的复杂回路,以完成信号传入的整合并产生特异性的效应模式。突触传导作为神经系统中最为主要的信号传导方式,包括以下过程:神经冲动的传入(膜去极化、突触小泡与膜融合等);突触前膜释放神经递质;神经递质作用于突触后膜的靶受体;产生生理效应(离子通道开放等)。然而,一次神经冲动传导过后,释放于突触间隙的神经递质除少数依靠物理扩散或/和化学代谢外(如乙酰胆碱),大部分还要通过特异性、高亲和性转运蛋白的重摄取作用回收到突触前膜或周围胶质细胞内,才能保证下一次神经冲动传导的正常进行。研究表明,至少有四类转运蛋白参与了神经递质的重摄取跨膜转运:1. 小泡转运白蛋白,其主

要功能是将神经递质积累到位于突触前膜内的突触小泡和致密颗粒内^[1];2. Na⁺/Cl⁻依赖性转运蛋白^[2];3. Na⁺/K⁺依赖性转运蛋白,负责兴奋性氨基酸(如谷氨酸)的重摄取^[3];4. 普通氨基酸转运蛋白,主要负责神经递质从胞内到胞外的转运^[4]。

自1990年Guastella等^[5]克隆了第一个神经递质转运蛋白——γ-氨基丁酸转运蛋白以来,采用表达克隆和/或同源序列筛库等策略,相继克隆了去甲肾上腺素转运蛋白等许多转运蛋白家族成员,大大促进了人们对神经递质转运蛋白的认识,本文主要介绍Na⁺/Cl⁻转运蛋白家族。

Na⁺/Cl⁻神经递质转运蛋白的结构

编码Na⁺/Cl⁻转运蛋白家族的基因高度保守,大部分Na⁺/Cl⁻转运蛋白具有十二次跨膜螺旋和一个含糖基化位点的胞外大环的共同结构(图1)。

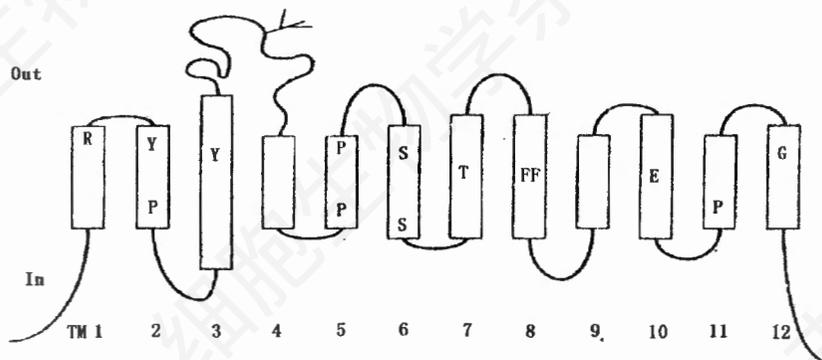


图1 哺乳动物Na⁺/Cl⁻神经递质转运蛋白的结构

图中示意了十二次跨膜α-螺旋3—4之间的胞外大环及其上潜在的糖基化位点,跨膜区中标明了一些高度保守的氨基酸残基^[25](Out细胞膜外,In细胞膜内,TM跨膜区)。

Eisenberg^[6]通过氨基酸疏水限制作图法,从理论上预测了Na⁺/Cl⁻转运蛋白十二次跨膜螺旋的存在及其拓扑结构。另外,氨基酸顺序分析表明,Na⁺/Cl⁻转运蛋白缺乏信号肽特征序列,鉴于信号肽是大部分蛋白质指导自身跨膜运输的一个基本组件,这一事实揭示Na⁺/Cl⁻转运蛋白的N端和C端可能都位于细胞膜朝向胞质的一侧。实验证据的支持主要来自于对具有代表性的Na⁺/Cl⁻转运蛋白的研究。Mabjeesh等^[7]对位于天然或重组小泡上的 γ -氨基丁酸转运蛋白(GAT1)用链霉蛋白酶作有限裂解,产生了一系列不同分子量的肽段,结合肽段——特异性抗体和位点专一性抗体分析表明,N端和C端存在于胞内一侧,糖基化大环位于胞外侧面并被定位于第三和第四跨膜 α -螺旋之间,其他结构域的定位亦与理论预测的相符。Melikian等^[8]采用针对N端、C端和胞外大环序列的特异性抗体对去甲肾上腺素转运蛋白的免疫荧光研究确证了Mabjeesh对上述三个结构域的定位。Nirenberg等对多巴胺转运蛋白电镜—免疫化学的研究亦将N端定位于胞内一侧。

Na⁺/Cl⁻转运蛋白十二个跨膜 α -螺旋的界限已被基本确定。 α -螺旋1—8相对保守,其作用可能是维持Na⁺/Cl⁻转运蛋白的四级结构和负责转运蛋白共有的功能,譬如Na⁺的转位等; α -螺旋9—12的保守性则相对较差,可能与倒置底物转运的特异性有关;C端和N端保守性最差,推测这两个结构域可能参与了转运过程的细微调控。 α -螺旋1—8中最保守的区域(同源性>50%)是 α -螺旋1和维系 α -螺旋1—2的胞外大环、 α -螺旋5和维系 α -螺旋4—5的胞内小环以及连接 α -螺旋5—6的胞外大环。在研究得较为清楚的 γ -氨基转运蛋白亚型1(GAT1)中,部分维持转运功能所必需的氨基酸残基已得到鉴定,其中,位于第一个 α -螺旋的精氨酸(69)负责结合Cl⁻,位于第四个 α -螺旋的色氨酸(222)则与转运底物—— γ -氨基丁酸的氨基基团结合^[9];通过定点突变,Golo-

vanevsky V.等发现位于连接 α -螺旋8—9的胞内小环上的半胱氨酸(399)对巯基试剂修饰作用的敏感性高度依赖于蛋白质构象,提示该氨基酸残基参与了GAT1拓扑结构的维持^[10]。一些哺乳动物Na⁺/Cl⁻转运蛋白的 α -螺旋3由38个不带电荷的氨基酸组成(如GAT1 124—161 aa),细菌中则由24个氨基酸残基构成。有证据表明 α -螺旋3与能量偶联和底物跨膜转位有关。另外,Na⁺/Cl⁻转运蛋白的一个显著特征是具有高度保守的WRFPXXXYNNGGAF序列,位于 α -螺旋1—2之间。这一序列不仅在氨基酸组成而且在RNA水平上亦相当保守,绝大多数Na⁺/Cl⁻转运蛋白都在三甘氨酸(-GGG-)编码序列内存在一个内含子,该内含子的位置在脊椎动物和昆虫中都很保守^[11]。

关于Na⁺/Cl⁻转运蛋白的结构仍存在争议,尤其是 α -螺旋1—3的界限。高分辨率结构生物学的发展将有助于在分子水平上进一步阐明Na⁺/Cl⁻转运蛋白的拓扑结构和功能。

Na⁺/Cl⁻神经递质转运蛋白的五个亚类

除植物、真菌和某些细菌外,人们已在真核生物、真细菌和古细菌都发现了神经递质转运蛋白或其同源序列,这意味着神经递质转运蛋白可能在生命进化的早期阶段即已出现。基于Na⁺/Cl⁻转运蛋白跨膜 α -螺旋4—7氨基酸序列构建的进化树显示^[12],Na⁺/Cl⁻转运蛋白可分为五个亚类: γ -氨基丁酸转运蛋白、单氨类转运蛋白、Na⁺/Cl⁻依赖性氨基酸转运蛋白、孤儿转运蛋白、细菌转运蛋白。前三个亚类家族具有确知的底物和药理学特性,除 γ -氨基丁酸转运蛋白亚型1(GAT1)和肌酸转运蛋白(CRETR)只能转运特异性单一底物(γ -氨基丁酸、肌酸)外,其他的亚类成员都能转运 β -丙氨酸。

1. γ -氨基丁酸转运蛋白

γ -氨基丁酸是广泛分布于哺乳动物脑中最为重要的抑制性递质,其在突触间隙的重摄取

由 γ -氨基丁酸转运蛋白实现,根据药理学特性,目前已克隆的 γ -氨基丁酸转运蛋白有四种亚型(GAT1-GAT4),其中GAT1是第一个被纯化的蛋白,其纯化制备物经溴化氰裂解、测序获得氨基酸序列,并根据氨基酸序列克隆了第一个神经递质转运蛋白——大鼠GAT1的cDNA。四种亚型具有不同的特性:(1)氨基酸序列同源性。该亚类家族成员之间具有较高的同源性,其中GAT2、GAT3、GAT4和牛磺酸转运蛋白的同源性 $>60\%$,但它们与GAT1的同源性仅为 50% ,与其他亚类的 Na^+/Cl^- 转运蛋白具有 40% 的同源性。(2)底物特异性和转运动力学特性。GAT1仅以 γ -氨基丁酸为特异性底物,而其他三种亚型除转运 γ -氨基丁酸外,GAT2还能转运甜菜碱,GAT3和GAT4还能转运 β -丙氨酸和牛磺酸。 γ -氨基丁酸转运蛋白对 γ -氨基丁酸的 K_m 范围在 $1\mu\text{mol/L}$ — $4\mu\text{mol/L}$ 之间^[13],其中GAT1和GAT4对 γ -氨基丁酸的亲和性较GAT2和GAT3高。目前认为,突触间隙的 γ -氨基丁酸主要是通过GAT1和GAT4的重摄取而终止作用,从而保证神经冲动的作用时程和作用强度。此外, γ -氨基丁酸转运蛋白还起着维持脑部不同区域 γ -氨基丁酸动态平衡的作用。(3)药理学特性。二氨基丁酸、四氢烟酸和Nipecotnic Acid强烈抑制GAT1和GAT4对 γ -氨基丁酸的转运,对GAT2、GAT3则只有轻微抑制作用;GAT2对Phloretin和Quinidine最敏感;GAT3和GAT4则对胍基丙酸、二氨基丙酸和次牛磺酸更为敏感;此外,GAT3、GAT4对 γ -氨基丁酸的转运作用能被 β -丙氨酸抑制,甜菜碱则能有效抑制GAT2对 γ -氨基丁酸的转运。(4)分布模式。GAT1主要存在于神经元上;GAT4存在于神经元和胶质细胞;GAT2除分布于神经元胞体、树突和轴突外,还在胶质细胞、室管膜细胞和脉络丛细胞等非神经元细胞中表达,GAT2在脑中的广泛分布据认为与全脑 γ -氨基丁酸浓度的调控有关^[14]。GAT1和GAT4的表达是脑组织特异性的;GAT2和GAT3则除

脑外还分布于外周组织,GAT3尤其在肝、肾的丰度很高。另外,GAT3在脑中的表达具有发育调控的特点——在新生脑中高表达,成年脑则不表达^[15,16],这一分布模式的意义在于脑部不同区域特异性转运蛋白的表达可能对中枢神经系统的发育起着重要作用。例如,出生0天时, γ -氨基丁酸是作为兴奋性递质存在于新生脑海马,而在出生后5天, γ -氨基丁酸戏剧性地转换为其成年时期的角色——抑制性递质,这一转换据认为主要是由于GABA_A、NMDA和AMPA三种离子型受体的功能转换所致。有趣的是,出生0天时,新生脑海马检测不到GAT1的表达,而在出生后5天,海马中GAT1已达到了相对较高的丰度——这一表达模式正好与上述 γ -氨基丁酸的角色转换相平行^[17]。

2. 单氨类转运蛋白

这一亚类包括去甲肾上腺素、5-羟色胺和多巴胺转运蛋白。人去甲肾上腺素转运蛋白的克隆使得这一亚类的研究取得了突破,许多属于这一家族的成员相继被克隆。 γ -氨基丁酸转运蛋白与5-羟色胺转运蛋白、去甲肾上腺素转运蛋白分别具有 38% 和 47% 的同源性。去甲肾上腺素转运蛋白广泛分布于脑的各个区域,其活性可被可卡因、Tricyclic抗抑郁剂和苯异丙胺抑制;多巴胺转运蛋白在COS和Hela细胞的表达呈现可卡因敏感特性;非神经类细胞表达的5-羟色胺转运蛋白则对抗抑郁剂敏感。

鉴于单氨类转运蛋白与药物滥用的密切关系,这一领域的研究近年来尤为引人注目,文献综述很多,在此不再赘述。

3. Na^+/Cl^- 依赖性氨基酸转运蛋白

这一家族仅有甘氨酸和脯氨酸两种转运蛋白。通过低严谨度筛库和PCR,Frémeau等^[18]1992年克隆了甘氨酸转运蛋白(GlyT1)和脯氨酸转运蛋白(PROT)。GlyT1由一个基因编码,通过选择性剪切产生两种不同的产物——GlyT1a和GlyT1b。第一个外显子编码GlyT1a 5'-端非翻译序列和N-端10个氨基酸,第二个外显子编码GlyT1b 5'-端非翻译序列和N-端

15个氨基酸。GlyT1a和GlyT1b具有完全相同的药理学和动力学特性。最近,又在人脑中发现了GlyT1的第三种剪切形式——GlyT1c。GlyT1和PROT mRNA在中枢神经系统兴奋性传导途径附近表达较高,提示两者可能在谷氨酸能神经传导中具有某种功能——一个可能的作用是清除谷氨酸受体周围环境中的甘氨酸和脯氨酸。

令人疑惑的是,根据GlyT1 mRNA所预测的分子量比从脑中纯化出的甘氨酸转运活性成分的分子量小,且GlyT1 mRNA的分布与甘氨酸受体的分布不相平行,于是推测应有其他亚型的转运蛋白存在。Liu等^[19]从大鼠cDNA文库克隆了另外一个新的甘氨酸转运蛋白——GlyT2, GlyT2与GlyT1、PROT分别具有48%和50%的同源性,其分子结构、药理学特性和组织分布都与GlyT1差异很大。GlyT2编码799个氨基酸, N端包含200个氨基酸,具有潜在的糖基化位点,其分子量与从脊髓分离得到的甘氨酸转运活性成分相符。原位杂交显示, GlyT2表达在除小脑外的大部分中枢区域且与马钱子碱——敏感型甘氨酸受体的分布平行,因此,有理由相信突触间隙的甘氨酸的重摄取主要依赖于GlyT2的跨膜转运功能。

4. 孤儿转运蛋白(NTT4)

孤儿转运蛋白因其底物至今无一鉴定而得名。底物鉴定困难的原因一是此类转运蛋白由众多类型的神经元合成,如谷氨酸能、 γ -氨基丁酸能、儿茶酚胺能、组胺能、5-羟色胺能神经元;二是此类蛋白可能具有特殊的性质,譬如其转运活性可能需要 β 亚基或其他异源性寡聚蛋白等辅助因子或是除 Na^+ 、 Cl^- 和 K^+ 以外的其他离子参与。

这一家族包括四种基因产物,与其他 Na^+/Cl^- 转运蛋白亚类具有35%的同源性,彼此同源性约为65%。其结构特征与前三个亚类的显著区别是具有两个更大的含潜在糖基化位点的胞外大环。原位杂交显示, NTT4高表达于脑和肾;在中枢神经系统主要表达于小脑、海

马、丘脑和大脑皮层,这一表达模式基本与兴奋性氨基酸——谷氨酸、天冬氨酸以及NMDA受体亚基NMDAR1 1-4b的分布相平行,推测NTT4可能参与了兴奋性神经传导。

5. 细菌转运蛋白

Liu等从细菌、昆虫和*C. elegans*中克隆到一类与神经递质转运蛋白具有高度同源性的蛋白,但其功能不为所知。与其他 Na^+/Cl^- 转运蛋白相比,这一类蛋白缺少胞外大环;第三个跨膜 α -螺旋由24个而不是38个不带电荷的氨基酸残基组成。细菌转运蛋白的发现可能具有进化上的意义。

Na^+/Cl^- 转运蛋白的生理功能

正常情况下,转运蛋白维持着突触间隙和细胞外神经递质的低浓度水平,其意义在于(1)调节突触传导的效应;(2)保证突触传导的忠实性;(3)减少过量兴奋性递质引起神经毒的可能性。因此,神经递质转运蛋白的功能失调与许多神经性疾病有密切关系。例如, During^[20]等发现癫痫源性海马中 γ -氨基丁酸转运蛋白的功能下调——这可能是膜去极化导致 γ -氨基丁酸转运反转所致。许多单胺类转运蛋白与药物成瘾性有关,有证据表明,可卡因(Cocaine)功能的发挥是因其与多巴胺转运蛋白结合引起多巴胺转运蛋白活性改变所致; Snyder等^[21]认为,多巴胺转运蛋白介导的神经毒素的积累可能促进了帕金森氏(Parkinson's)疾病伴随的多巴胺能神经退行性过程。5-羟色胺转运蛋白活性的改变有可能是导致精神抑郁症的一个因素,作为5-羟色胺转运蛋白的特异性抑制剂——Prozac是目前应用得最成功的抗抑郁症药物之一。另外,神经递质转运蛋白亦参与了神经内分泌功能的调节。最近,借助于多巴胺转运蛋白的特异性抑制剂——Mazindol, Demaria J. E.等^[22]发现多巴胺转运蛋白通过控制下丘脑神经内分泌多巴胺能神经元(NEDA)突触间隙的多巴胺浓度,参与了泌乳刺激素(PRL)分

摘 要

神经信号传导的终止依赖于特异性神经递质转运蛋白对神经递质的重摄取作用,而大部分的神经递质转运蛋白都属于 Na^+/Cl^- 转运蛋白家族。本文综述了 Na^+/Cl^- 转运蛋白家族的五个亚类以及 Na^+/Cl^- 转运蛋白的结构和生理学功能方面的研究进展。

参 考 文 献

- [1] Schuldiner, S. et al., 1994, *J. Neurochem*, 62:1067.
- [2] Schloss, P. et al., 1992, *FEBS Lett*, 307:76.
- [3] Kanner, B. I. et al., 1994, *FEBS Lett*, 356:191.
- [4] McGavin, J. D. et al., 1994, *Biochem. J*, 299:321.
- [5] Guastella, J. et al., 1990, *Science*, 249:1303.
- [6] Eisenberg, D. et al., 1984, *Annu. Rev. Biochem*, 53:595.
- [7] Mabeesh, N. J. et al., 1992, *FEBS Lett*, 299:99.
- [8] Melikian, H. E. et al., 1994, *J. Biol. Chem*, 269:12290.
- [9] Baruchi, K. et al., 1994, *J. Exp. Biol*, 196:237.
- [10] Golovanevsky, V. et al., 1999, *J. Biol. Chem*, 274:23020.
- [11] Liu, Q. R. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:6639.
- [12] Lill, H. et al., 1998, *Methods Enzymol*, 296:425.
- [13] Krogsaard, L. P. et al., 1987, *Epilepsy Res*, 1:77.
- [14] Conti, F. et al., 1999, *J. Comp. Neurol*, 409:482.
- [15] Lopez, C. B. et al., 1992, *J. Biol. Chem*, 267:17491.
- [16] Liu, Q. R. et al., 1993, *J. Bio. Chem*, 268:2106.
- [17] Ben, A. Y. et al., 1997, *trends neurosci*, 20:523.
- [18] Bengel, D. et al., 1998, *Mol. Phamcol*, 53:649.
- [19] Liu, Q. R. et al., 1993, *J. Biol. Chem*, 268:22802.
- [20] During, M. et al., 1995, *Nature*, 376:174.
- [21] Snyder, S. H. et al., 1986, *Neurology*, 36:250.
- [22] Demaria, J. E. et al., 2000, *Endocrinology*, 141:366.
- [23] Javitt, D. et al., 1997, *Neuropsychopharmacology*, 17:202.
- [24] Giros, B. et al., 1996, *Nature*, 379:606.
- [25] Nathan, N., 1998, *J. Neuchem*, 71:1785.

“杀手”蛋白酶 caspase

李小明 宋天保

(西安医科大学组织学与胚胎学教研室 西安 710061)

细胞凋亡(apoptosis)或称程序性细胞死亡(Programmed cell death, PCD)是多细胞生物正常发育、分化过程中进行细胞删除的一种基本机制,与组织自稳、衰老及细胞损伤密切相关。凋亡异常可引起人类难治性疾病,如 Parkinson's 和 Huntington's 病, AIDS、Alzheimer's 病、免疫缺陷、自身免疫紊乱、缺血性心血管疾病、神经系统疾病、秃发、白血病、淋巴瘤及其他癌症,并与肿瘤治疗抗性有关^[1,2]。虽然细胞凋亡时许多生化事件已被确认,但凋亡诱发、调控的分子生化机制仍不明

确。新近,凋亡时出现的生化事件,尤其是蛋白酶活性的改变已成为科学家们研究的热点。

PCD 重要成分的确立始于 1986 年 Ellis 等^[3]对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)发育过程中细胞死亡的遗传学调控研究。研究发现,构成线虫胚胎的 1090 个细胞中有 131 个细胞最终走向凋亡。目前已克隆出 15 个参与细胞凋亡各阶段的相关基因 CED,其中的 3 个基因 CED-3、CED-4、CED-9 的突变影响体细胞凋亡的进程。CED-3、CED-4 是细胞凋亡所必需的,而 CED-9 是细胞存活所必需的。CED-9