

- 282 (5391): 1141~ 1144
- 17 Shyng S L, Nichols C G. Membrane phospholipid control of nucleotide sensitivity of K_{ATP} channels. *Science* 1998, **282** (5391): 1138~ 1141
 - 18 Dzeja P P, Terzic A. Phosphotransfer reactions in the regulation of ATP-sensitive K^+ channels. *FASEB J*, 1998, **12** (7): 523~ 529
 - 19 Yokoshiki H, Sunagawa M, Seki T, *et al.* ATP-sensitive K^+ channels in pancreatic, cardiac, and vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 1998, **274** (1): C25~ C37
 - 20 Schulz R, Rose J, Heusch G. Involvement of activation of ATP-dependent potassium channel in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol*, 1994, **267** (4pt2): H1341~ H1352

New Light on the Study of K_{ATP} Channels. LIU Jie, JIANG Yong, ZHAO Ke-Sen (*Department of Pathophysiology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China*).

Abstract Adenosine triphosphate (ATP) -sensitive potassium channels (K_{ATP}) which couple cell metabolism to electrical activity are heteromultimers of sulfonylurea receptor (SUR) and inward rectifier K^+ channel ($K_{IR6.x}$) subunits associated with 1: 1 stoichiometry as a tetramer (SUR/ $K_{IR6.x}$)₄. SUR and $K_{IR6.x}$ genes come in pairs in chromosome.

$K_{IR6.x}$ subunit forms the electrical pore of the K_{ATP} channel and SUR endows the K_{ATP} channel with sensitivity to regulators such as sulfonylurea drugs, K^+ channel-opening drugs, and Mg^{2+} nucleotides. The characterizations of K_{ATP} channel subtypes are determined by the combination of SUR and $K_{IR6.x}$ subunits. The gates of K_{ATP} channels are ion-gated by $[ATP]_i$ and $[ADP]_i$. Phosphatidylinositol phosphates (PIPs) antagonized ATP inhibition of K_{ATP} channels and cellular phosphotransfer cascades also involve in the regulation mechanism of ATP/ADP. K_{ATP} channels are inhibited by sulfonylurea complexes (SUs) and activated by K^+ channel-opening drugs. G protein and protein kinase such as PKA, PKC, PKG also participate in the regulation of these channels. K_{ATP} channels play crucial roles in the secretion of insulin, preconditioning of cardiac myocytes and maintenance of blood vessel tone.

Key words ATP-sensitive potassium channels, inward rectifier potassium channel, sulfonylurea receptor, nucleotide diphosphate

溶血磷脂酸受体及其信号转导

马 睿

(中国协和医科大学阜外心血管病医院
中国医学科学院心血管病研究所, 北京 100037)

摘要 溶血磷脂酸 (lysophosphatidic acid, LPA) 是一种类生长因子的脂类信号分子。在血栓形成过程中被激活的血小板可以产生 LPA。自从证明 LPA 有胞外信号功能以后, 许多新的生物活性又被不断发现。LPA 最主要的作用是诱导各类细胞增殖。人们已经找到几种 LPA 受体 cDNA 克隆。LPA 主要通过 G 蛋白偶联受体影响靶细胞功能, 其信号转导系统包括已知的几条信号通路: 激活 G_q 从而激活磷脂酶 C; 激活 G_i 从而抑制腺苷酸环化酶并激活 MAPK 级联通路; 激活 $G_{12/13}$ 从而激活 Rho 级联通路等。

关键词 溶血磷脂酸, 受体 cDNA 克隆, 信号转导

学科分类号 Q54

1 LPA 的来源及功能简介

溶血磷脂酸 (1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate) 是一种细胞膜脂类衍生物, 它在体内主要产生于被激活的血小板。外界刺激使血小板聚集后, 质膜上的磷脂分子可以在磷脂酶 A_2 (PLA₂) 和磷脂酶 D

(PLD) 的作用下形成 LPA, 释放入血液, 所以它是血清的正常组分。作为血液凝聚过程中的产物, LPA 在血清中以清蛋白结合形式存在, 而在血浆中含量极少。

Tel: (010) 68331762; E-mail: marui@email.com.cn

收稿日期: 1999-01-14, 修回日期: 1999-06-16

LPA 的生物学功能非常广泛, 主要有: 刺激细胞增殖; 刺激血小板聚集; 刺激细胞形变等. 表 1 列出了目前发现的 LPA 的一些生物学功能, 新的功能还被不断地发现. 可以看出 LPA 非常类似于生长因子, 所以目前普遍认为 LPA 是一种具有生长因子活性的脂类分子^[1]. 事实上基于 LPA 源于血小板聚集而又具有促生长活性, 许多人认为 LPA 与组织损伤修复有关. 但与生长因子不同的是 LPA 的受体为 G 蛋白偶联受体 (G-protein coupled receptor, GPCR), 而前者的受体是酪氨酸激酶. 例如: LPA 和 bFGF 可以刺激鼠 C2C12 肌成纤维细胞生长并抑制其分化, 但两者作用方式却完全不同. LPA 的活性可以被百日咳毒素阻断, 说明它作用于 G_i 蛋白偶联受体, 而众所周知 bFGF 作用于酪氨酸激酶受体^[2].

表 1 LPA 的生物学功能

细胞增殖
血小板聚集
抑制细胞分化 (神经瘤细胞, 成肌细胞)
平滑肌收缩
应力纤维装配/细胞圆化/神经轴突回缩
细胞与界面间粘连蛋白结合
肿瘤细胞浸润
趋化性 (变形虫, 3T3 细胞)
Cl ⁻ 介导的细胞膜去极化 (成纤维细胞)
抑制基于间隙连接蛋白 43 的细胞间通讯
增加紧密连接的通透性 (脑内皮细胞)

2 LPA 的受体克隆

Bend 等^[3]首次报道了一种潜在的 LPA 受体. 他们采用荧光标记叠氮 LPA 的方法, 证实了在各种类型的细胞质膜上普遍存在着一种分子质量 38 ~ 40 ku 的受体蛋白. 从而证明 LPA 通过特定的受体发挥作用.

人们已经在不同种类的细胞中克隆了十余种潜在的 LPA 受体. 较为引人注目的是最近两个小组分别鉴定的两种 LPA 受体 cDNA 克隆.

1996 年, Hecht^[4]第一次成功地克隆了一种 LPA 受体. 他们采用差异杂交的方法从小鼠大脑皮层细胞中克隆了一种潜在的受体 cDNA. 该基因曾被命名为心室区基因-1 (ventricular zone gene-1,

Vzg-1). 它编码一个含有 364 个氨基酸残基的蛋白质, 其分子质量为 41 ku. 而 cDNA 全长 2 250 bp. 作者将 Vzg-1 基因在皮层细胞中过量表达, 该种细胞原本对 LPA 无反应, 实验结果 LPA 可以引起原先没有的细胞圆化 (细胞触角回缩, 胞体呈圆形), 且这种作用在 $10^{-10} \sim 10^{-7}$ mol/L 的 LPA 浓度范围内具有明显的剂量依赖性. 而其他磷脂类的作用与 Vzg-1 的过量表达无关, 说明这种圆化作用与该受体有关.

可是其后的研究工作并没有证实 Vzg-1 在其他类型细胞中同样具有这种作用, 所以它的具体功能还有待于进一步研究.

随后, An 等^[5]发现与 Vzg-1 具有高度同源性的 Edg-2 (endothelial differentiation gene 2) 基因 (Genbank 登记号: U80811) 编码了一种 LPA 功能性受体蛋白. 他们将 Edg-2 基因克隆到质粒载体上, 转入 293-5X2 及 CHO 细胞系, 结果发现质膜上的 LPA 结合位点与对照组相比有急剧的上升 (约 4 倍). 而且这种位点的上升与外源 LPA 的加入呈浓度正相关. 另一方面, RNA 印迹显示 Edg-2 在脑神经系统中表达最丰富, 这与 LPA 在神经细胞中显示的各种功能相一致.

Allard 等^[6]证明大鼠 Edg-2 (Genbank 登记号: AF014418) 基因也编码一种 LPA 受体. 所以, 现在人们认为各种动物细胞中的 Edg-2 同源基因可能均编码 LPA 受体, 而与 Edg-2 有一定同源性 (30% ~ 40%) 的 Edg-1 基因编码另一种脂类——鞘氨醇-1-磷酸 (sphingosine 1-phosphate, S1P)——的受体. S1P 在功能上非常类似于 LPA, 关于 LPA 的研究工作多数伴随着对 S1P 的研究.

最近, An 等^[7]又发现与人 Edg-2 蛋白有着 70% 左右氨基酸同源性的人 Edg-4 蛋白很可能是 LPA 受体的另一亚型, 它与 Edg-2 在功能上并不相互影响. 这说明二者可能承担着 LPA 的不同生物学功能. 随着研究的深入, 相信一些新的 LPA 受体亚型还将被发现.

3 LPA 的胞内信号转导过程

3.1 G 蛋白介导的信号过程

如前所述, LPA 主要通过质膜上的 G 蛋白偶联受体发挥生物学功能. 主要证据是 LPA 具有 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 的生物学特性^[8]: LPA 作用具有剂效关系, 并有同源脱敏现象; 细胞对 LPA 反应具 GTP 依赖性; LPA 引起反应的动力学

特性, 尤其是 Ca^{2+} 的转移与其他 GPCR 的配体无差别; G 蛋白偶联受体阻断剂苏拉明可以阻断 LPA 的选择性受体结合作用。

LPA 的受体至少偶联了三种不同 G 蛋白, 从而与已知的四条信号通路相连 (图 1): a. 通过 G_q 蛋白激活磷酸肌醇信号通路; b. 通过 G_i 蛋白抑制腺苷酸环化酶 (AC) 从而抑制 cAMP 信号通路; c. 通过 G_i 蛋白激活 Ras-MAPK 信号通路; d. 通过 $G_{12/13}$ 蛋白激活 Rho 信号通路, 引起细胞形变和早期基因转录。其中 Ras-GTP 也可以激活 Rho^[9], 引起 3T3 细胞的趋化行为。但在大多数细胞中 Rho 直接参与细胞的重建过程。

下面就不同的信号通路逐一给予介绍。

a. 激活磷酸肌醇通路

LPA 可以通过 G_q 的偶联作用激活细胞内磷脂

酶 C (PLC)。众所周知: 激活 PLC 的直接后果就是分解二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP_2) 产生三磷酸肌醇 (IP_3) 和二酰基甘油 (DG)。前者可使细胞内 Ca^{2+} 离子浓度增高, 从而导致一系列的反应。后者可激活蛋白激酶 C (PKC), 产生相应的磷酸化作用^[10]。LPA 等溶血磷脂类分子可由膜上的 PLA_2 催化产生, 所以有人认为 PLA_2 可以通过溶血磷脂为媒介影响 PKC 的功能^[11]。

b. 抑制 cAMP 通路

LPA 通过 G_i 蛋白抑制腺苷酸环化酶的活性, 从而抑制 cAMP 形成, 进一步抑制蛋白激酶 A (PKA) 的功能。用百日咳毒素处理成纤维细胞, 可以将这种抑制作用扭转, 其扭转程度仅在 50% 左右。这说明 LPA 对 cAMP 的抑制作用还可能源于其他因素, 并不完全通过 G_i 蛋白^[12]。

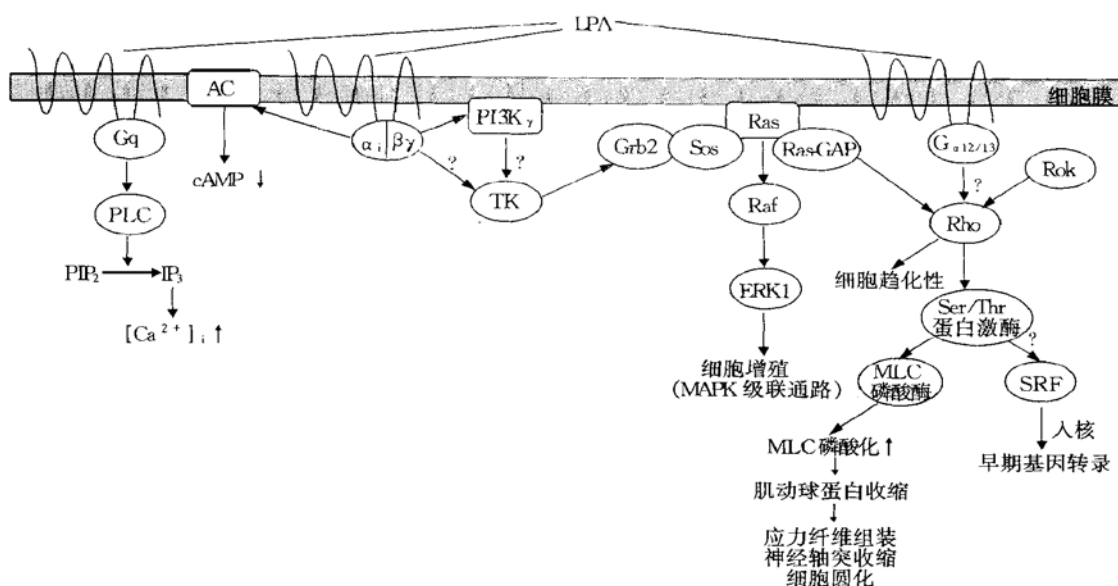


图 1 LPA 细胞内信号转导通路

AC: 腺苷酸环化酶; PLC: 磷脂酶 C; TK: 酪氨酸激酶; MLC: 肌球蛋白轻链磷酸酶; SRF: 血清反应因子。

c. 激活 Ras-MAPK 通路

LPA 的大多数生物学功能可以被百日咳毒素抑制, 这说明 LPA 的主要生物学功能由 G_i 蛋白介导。实验证实 LPA 可以引起 Ras-MAPK 信号级联通路中特定 $p21^{\text{Ras}}$ 蛋白的活化^[13], 这说明 LPA 可以通过 MAPK 通路引起细胞增殖。而现已知从 G_i 到 MAPK 的过程包括一种或更多蛋白酪氨酸激酶和信号蛋白 Shc、Grb、GDP/GTP 交换蛋白 SOS 的连续作用, 如图 1。转染实验表明在 LPA 活化 Ras-MAPK 的过程中, G_i 蛋白的 $\beta\gamma$ 亚基起主要作

用, 而且依赖于 Shc^[14], 这说明 LPA 也通过这种激活蛋白酪氨酸激酶的方式激活 MAPK: 首先通过 G_i 蛋白 β 和 γ 亚基激活一定的酪氨酸激酶, 后者再通过具有 SH2、SH3 结构域的 Grb2 蛋白连接 Sos 蛋白, 使之移动到膜上。而 Sos 可以与膜结合的 Ras 蛋白相互作用, 促使 GTP 取代 Ras 结合的 GDP, 从而使 Ras 成为活化状态。当然这其中的细节还没有被阐明。活化的 Ras-GTP 可以激活 Raf。Raf 是 MAPK 通路中的起始激酶。而 ERK (extracellular signal-regulated protein kinase) 是

MAPK 中的一种. LPA 可以持续地激活 ERK1, 而并不能激活 JNK1 (Jun N-terminal kinase 1)^[15]. 所以 LPA 可能主要通过 ERK1 发挥其细胞增殖的作用.

在众多激酶中比较引人注目的是磷酸肌醇-3-激酶 (PI3K). PI3K 的两种同型体 PI3K α (它与 p85 接头蛋白作用) 和 PI3K γ (它与 G 蛋白亚基作用) 都可能参与 Ras-MAPK 的激活, 而 PI3K γ 可能起主要作用. 但是在 LPA 引起的生物学功能是否与 PI3K 有关还不甚清楚^[14].

就目前来讲, G_i 到 MAPK 的过程中每种激酶的具体作用及哪一种激酶起主要作用还十分不清楚. 图 1 中所给的也只是根据一部分实验结果的推测.

此外, LPA 还可能是介导细胞内外 PLA₂ 对话的因子. 而 Ras-Raf-MAPK 信号通路在其中起了媒介作用^[16]. 细胞膜表面的 PLA₂ 可以在应激状态下催化生成 LPA, 而 LPA 又可以通过自身的信号通路影响细胞内的 PLA₂, 这一过程的意义在于可以使细胞内外的 PLA₂ 得以沟通, 从而将膜两侧的磷脂代谢关联起来.

d. 激活 Rho 通路

在成纤维细胞和神经元细胞中 LPA 受体通过一种百日咳毒素非敏感的 $G_{12/13}$ 蛋白 α 亚基激活 Rho^[17]. Rho p21 是一种 Ras 相关的蛋白, 目前发现三种: 包括 Rho、Rac、Cdc42. 它们与 GTP 结合后成为活性形式, 可以介导生长因子引起的细胞形变, 这种形变与肌动蛋白有关.

这三种蛋白分别由与之结合的激酶来调节. Rho 为 Rho-binding serine/threonine kinase (ROK), 其余两种为 p21-activated serine/threonine kinase (PAK). ROK 可以促进 Rho 引起的应力纤维的形成及粘附复合体 (focal adhesion complexes, FAC) 的形成 (应力纤维末端结合于 FAC 上). 而 PAK 与 ROK 的作用恰好相反^[18].

另一方面, LPA 还可以通过 Ras 间接激活 Rho. Leblanc 等^[9] 在 3T3 细胞中用抗体封闭实验证明 Ras-GAP (一种 Ras 的主要调节因子) 的 SH2、SH3 结构域有信号功能, 是内源 Rho 激活所必需的. 这就是说 LPA 可以通过 G_T -Ras 激活 Rho, 这可能是 Ras 依赖的成纤维细胞趋化性的基础.

Rho 的作用在于引起细胞粘着和运动, 增强细胞收缩反应和胞质环流. LPA 主要通过 Rho 发挥诸如细胞骨架重建、细胞形状改变, 肌动蛋白应力

纤维构建、细胞圆化、神经轴突收缩等作用. Rho-GTP 可以进一步激活下游的一种 Rho 相关 Ser/Thr 蛋白激酶, 该激酶磷酸化肌球蛋白轻链磷酸酶藉此抑制其活性^[19]. 由于磷酸酶被抑制, 造成磷酸化的肌球蛋白堆积, 结果导致肌动蛋白收缩能力的上升. 而细胞内肌动蛋白收缩力的增加是细胞各种形变反应的基础.

除此之外, Rho 还可以通过激酶通路激活血清反应因子 SRF 将生长信号传到核内以刺激静息成纤维细胞中的 DNA 合成^[17]. 而这一激酶通路并不通过已知的任何 MAPK 级联系统.

3.2 非 G 蛋白介导的信号过程

LPA 除了可以通过 G 蛋白偶联受体发挥作用外, 最近人们发现其还具有另外一些信号功能.

Schulze 等^[20] 报道 LPA 可引起快速、可逆、剂量依赖性的脑内皮细胞紧密连接通透增加. 而激活 PKC 可以减弱 LPA 的这种作用. 说明 LPA 有可能是生理、病理情况下的血脑屏障调节因子.

Postma 等^[21] 发现血清中结合于清蛋白的 LPA 引起成纤维细胞质膜发生去极化现象. 去极化主要源于阴离子电导上升导致的 Cl^- 外流. Cl^- 外流发生在 PLC 激活之后并与 Rho 相关的肌动蛋白重塑相伴随, 但是这一反应与 Ca^{2+} /PKC 信号系统无关, 也不需要 Rho 或 Ras 的激活.

另一个关于 LPA 的发现是它可以抑制细胞的间隙连接通讯. 在表达细胞间隙连接蛋白 connexin43 的细胞中, 细胞通讯可以被 LPA 快速而短暂地中断^[22]. 这种现象对百日咳毒素不敏感而且与已知的第二信使无关. 最近实验表明: 在用酪氨酸激酶抑制因子处理抑制 c-Src 基因表达后, 间隙连接保持开启. 因而, LPA 受体也许通过一种 Src 酪氨酸激酶通路 (磷酸化 connexin43 酪氨酸) 关闭细胞通讯. Moolenaar 认为细胞通讯临时性丧失可能在损伤修复中是十分必要的, 因为在损伤部位具有有丝分裂活性的细胞不能将信号传给周围的静息细胞.

以上简单介绍了 LPA 在信号转导方面的研究成果. 可以看出许多细节人们还了解得很不具体. 但是随着工作的深入, LPA 细胞内信号传递机制必将进一步明朗.

致谢 此文完成过程中, 陈曦教授给予了许多有益的指正, 在此特为感谢. 同时感谢荷兰肿瘤研究院 Moolenaar 教授的帮助.

参 考 文 献

- 1 Moolenaar W H. Lysophosphatidic acid: a multifunctional phospholipid messenger. *J Biol Chem*, 1995, **270** (22): 12949~12952
- 2 Yoshida S, Fujisawa-Sehara A, Taki T, *et al.* Lysophosphatidic acid and bFGF control different modes in proliferating myoblasts. *J Cell Biol*, 1996, **132** (182): 1~2, 181~93
- 3 van der Bend R L, Brunner J, Jalink K, *et al.* Identification of a putative membrane receptor for the bioactive phospholipid, lysophosphatidic acid. *EMBO J*, 1992, **11** (7): 2495~2501
- 4 Hecht J H, Weiner J A, Post S R, *et al.* Ventricular zone gene 1 (vzg-1) encodes a lysophosphatidic acid receptor expressed in neurogenic regions of the developing cerebral cortex. *J Cell Biol*, 1996, **135** (4): 1071~1083
- 5 An S, Dickens M A, Bleu T, *et al.* Molecular cloning of the human Edg2 protein and its identification as a functional cellular receptor for lysophosphatidic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **231** (3): 619~622
- 6 Allard J, Barron S, Diaz J, *et al.* A G-protein coupled receptor selectively expressed in myelin-forming cells. *Eur J Neurosci*, 1998, **10** (3): 1045~1053
- 7 An S, Bleu T, Hallmark O G, *et al.* Characterization of a novel subtype of human G protein coupled receptor for lysophosphatidic acid. *J Biol Chem*, 1998, **273** (14): 7906~7910
- 8 Moolenaar W H. LPA: a novel lipid mediator with diverse biological actions. *Trends in Cell Biol*, 1994, **4** (6): 213~219
- 9 Leblanc V, Tocque B, Delumeau I. Ras-GAP controls rho-mediated cytoskeletal reorganization through its SH3 domain. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (9): 5567~5578
- 10 van Corven E J, Groenink A, Jalink K, *et al.* Lysophosphatide-induced cell proliferation: identification and dissection of signaling pathways mediated by G proteins. *Cell*, 1989, **59** (1): 45~54
- 11 Asaoka Y, Oka M, Yoshida K, *et al.* Role of lysophosphatidylcholine in Tlymphocyte activation: involvement of phospholipase A2 in signal transduction through protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89** (14): 6447~6451
- 12 Pietruck F, Busch S, Virchow S, *et al.* Signalling properties of lysophosphatidic acid in primary human skin fibroblasts: role of pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1997, **355** (1): 1~7
- 13 Van Coreven E J, Hordijk P L, Medema R H, *et al.* Pertussis toxin sensitive activation of p21ras by G-protein coupled receptor agonists in fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (4): 1257~1261
- 14 Lopez-Illasaca M, Crespo P, Pellici P G, *et al.* Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signalling pathway through PI 3-kinase gamma. *Science*, 1997, **321** (3): 394~397
- 15 Cadwallader K, Beltman J, McCormick F, *et al.* Differential regulation of extracellular signal regulated protein kinase 1 and Jun N-terminal kinase 1 by Ca^{2+} and protein kinase C in endothelin-stimulated Rat-1 cells. *Biochem J*, 1997, **321** (Pt3): 795~804
- 16 Huwiler A, Staudt G, Kramer R M, *et al.* Cross talk between secretory phospholipase A2 and cytosolic phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1997, **1348** (3): 257~272
- 17 Narumiya S. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem (Tokyo)*, 1996, **120** (2): 215~228
- 18 Lim L, Manser E, Leung T, *et al.* Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *Eur J Biochem*, 1996, **242** (2): 171~185
- 19 Kimura K M, Ito M, Amano K, *et al.* Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho kinase). *Science*, 1996, **273** (5272): 245~248
- 20 Schulze C, Smales C, Rubin L L, *et al.* Lysophosphatidic acid increases tight junction permeability in cultured brain endothelial cells. *J Neurochem*, 1997, **68** (3): 991~1000
- 21 Postma F R, Jalink K, Hengeveld T, *et al.* Serum-induced membrane depolarization in quiescent fibroblasts: activation of a chloride conductance through the G protein-coupled LPA receptor. *EMBO J*, 1996, **15** (1): 63~72
- 22 Hui C S T, Oh S Y, Schmidt S A, *et al.* Lysophosphatidic acid inhibits gap junctional communication and stimulates phosphorylation of connexin43 in WB cells: possible involvement of the mitogen activated protein kinase cascade. *Biochem J*, 1994, **303** (2): 475~479

The Lysophosphatidic Acid Receptors and Signal Transduction. MA Rui (*Cardiovascular Institute of The Chinese Academy of Medical Sciences & FuWai Cardiovascular Hospital of The Peking Union Medical College, Beijing 100037, China*).

Abstract Lysophosphatidic acid (LPA) is a novel growth-factor-like lipid mediator. It can be released from stimulated platelets as a product of the blood-clotting process. The number and diversity of the known biological responses to LPA keep growing from many years ago when it was first found as an out-membrane messenger. The more important function of LPA is that it can induce proliferation of many types of cells. Several LPA receptor cDNA clones have been found. LPA influences target cells mainly by activating special G protein coupled receptors. The signal transduction system of LPA includes several known signal cascades: activating G_q to stimulate PLC; activating G_i to restrain adenylyl cyclase and stimulate MAPK cascade; and activating $G_{12/13}$ to stimulate Rho cascade, etc.

Key words lysophosphatidic acid, receptor cDNA cloning, signal transduction