

甘丙肽受体的研究进展

孙衍刚 胡一多 于龙川*

(北京大学生命科学院, 北京 100871)

摘要 目前已经克隆了3种甘丙肽受体(GalR1, GalR2, GalR3), 它们都是与G蛋白相偶联的受体. 3种甘丙肽受体的氨基酸序列、药理学特性以及第二信使系统各不相同. GalR1/3受体可以抑制腺苷酸环化酶并可以激活钾通道, GalR2受体可以激活磷脂酶C并增加胞内钙离子浓度. 用RNA印迹、反转录PCR以及原位杂交等技术对上述3种甘丙肽受体在人、大鼠和小鼠中的分布进行了研究, 发现它们具有不同的分布特征, 提示不同的甘丙肽受体可能参与不同的生理过程.

关键词 甘丙肽受体, G蛋白偶联受体, 第二信使, 中枢神经系统

学科分类号 Q753

甘丙肽(galanin, Gal)是一个由29个氨基酸残基组成的多肽, 它在外周和中枢神经系统内具有广泛的分布. 目前已经克隆了3种甘丙肽受体, 分别是GalR1、GalR2和GalR3^[1], 这3种甘丙肽受体都具有7个跨膜片段, 其糖基化的N端位于膜外, C端位于膜内. 另外, 胞外区I和II中保守的半胱氨酸可能形成双硫键, 胞内环和C端还有保守的磷酸化位点. 大量的研究工作表明, 激活甘丙肽受体可以抑制腺苷酸环化酶, 激活ATP敏感的钾通道, 抑制L和N型钙通道, 激活和/或抑制肌醇磷脂转化率, 激活磷脂酶A2, 激活MAPK(mitogen-activated protein kinase). 甘丙肽受体参与学习记忆、痛觉调节、摄食活动、神经内分泌的调节以及神经系统的发育等多种生理过程^[2,3]. 最近的研究表明, 早老年性痴呆早期患者的杏仁核中甘丙肽结合位点数目增加^[4], 抑郁症模型大鼠中缝背核的甘丙肽结合位点数目也增加^[5]. 另外, 甘丙肽可以通过自分泌或旁分泌的方式调节神经细胞瘤的生长和发育. 这说明甘丙肽受体在多种病理过程中也发挥重要作用.

最早克隆的甘丙肽受体是人的GalR1受体^[6], 以后陆续克隆了大鼠和小鼠的GalR1受体. 目前人和啮齿类的GalR2和GalR3受体亚型也已被克隆. 药理学研究结果提示体内可能还存在其他亚型的甘丙肽受体. GalR1受体的内含子/外显子形式与GalR2和GalR3受体有所不同, 说明至少存在两种甘丙肽受体的进化途径. 人的3种甘丙肽受体之间氨基酸序列的同源性只有38%~58%; 保守性高的序列主要存在于跨膜区, 而亲水性的胞外和胞内

段相似性很低. 不同甘丙肽受体序列上的差异对于其偶联不同的G蛋白和下游信号系统是至关重要的.

1 GalR1受体

人GalR1受体是1994年从人Bowes黑色素瘤细胞系中克隆的^[6], 含有349个氨基酸残基, 其编码基因在染色体上定位于18q23. 该基因至少含有两个内含子. 外显子1编码从N端到第五跨膜片段的末端, 外显子2编码第三胞内环, 外显子3编码第六跨膜片段到C端. 人的GalR1受体与人的GalR2受体(约42%), GalR3受体(约38%)以及生长抑素和阿片受体(约30%~34%)有一定同源性. 人和大鼠的GalR1受体有约92%的同源性, 并且N端的两个与氮相联的糖基化和胞内磷酸化位点都是一致的, 在第二和第三个胞内环上有7个磷酸激酶A(PKA)和磷酸激酶C(PKC)的作用位点, 但人的GalR1受体在其C端结构域上多了2个磷酸化位点. 人GalR1受体与甘丙肽的结合方式是: 甘丙肽的N端进入到受体的第三和第六跨膜片段间的袋状结构中, 其Trp2残基与受体的His264结合, 而Try9与位于受体第三胞外环的Phe282作用^[7]. GalR1受体蛋白在哺乳动物体内分布的研究很少, 免疫组化的结果表明胃肠中神经元、下丘脑、中缝背核、脊髓、三叉神经节和背根神经节中都有GalR1受体的分布^[8~10]. 采用RNA

* 通讯联系人.

Tel: 010-62762099, E-mail: yulc@pku.edu.cn

收稿日期: 2003-02-26, 接受日期: 2003-04-06

印迹、反转录 PCR (RT-PCR) 等方法分析表明, 在人脑内 GalR1 mRNA 主要分布在皮层、海马、丘脑以及杏仁核。在大鼠脑和脊髓内 GalR1 mRNA 广泛分布, 并且其分布区域与甘丙肽以及甘丙肽结合位点分布一致。

在某些生理或病理状态下, 组织内 GalR1 mRNA 的含量会发生变化^[11]。在吗啡戒断小鼠的蓝斑中 GalR1 mRNA 上调, 在动情周期的雌性大鼠下丘脑 GalR1 受体也上调。然而, 在坐骨神经切断或者致炎大鼠背根神经节中的 GalR1 mRNA 水平下调。在炎症状态下, GalR1 受体可能受转录因子 NF- κ B 的调节。神经生长因子 (NGF)、forskolin 或者氟波醇酯处理小鼠 Cath. A 细胞 (一种类似蓝斑的细胞系) 也能导致 GalR1 mRNA 上调。Forskolin 对 GalR1 mRNA 的调节似乎是由 cAMP 效应元件结合因子 (CREB) 结合到 GalR1 受体启动子的 CRE 位点所介导的。

药理学研究表明经甘丙肽处理后, 稳定转染了人或大鼠 GalR1 受体的中国仓鼠卵细胞 (Chinese hamster ovary cells, CHO 细胞) 中基础的或者 forskolin-激活的 cAMP 水平降低, 并且对百日咳毒素 (Pertussis toxin, PTX) 敏感。在转染大鼠 GalR1 受体的非洲爪蟾卵母细胞中, 激活 GalR1 受体可使其共表达的 G 蛋白偶联的钾通道开放并介导内向钾电流。上述反应也是 PTX 敏感的, 提示 GalR1 受体与 Gi/o 蛋白偶联。以上资料表明 GalR1 受体对细胞的功能主要起抑制作用。GalR1 受体被激活后降低突触的传递效率, 从而影响诸如摄食、情绪、记忆、痛觉传递、肠道分泌和运动等诸多生理过程。另外, 转染 GalR1 受体的 CHO 细胞经甘丙肽处理后, 可以引起 PTX 敏感的不依赖于 PKC 的 MAPK 激活, 提示甘丙肽通过 Gi/o 蛋白发挥营养因子的作用。由于 GalR1 受体的弱激动剂 M40 可以抑制由葡萄糖诱导的胰岛素释放, 推测甘丙肽对胰岛素释放和糖平衡的调节是通过 GalR1 受体介导的。GalR1 受体还可能在发育过程中起作用, 证明之一就是患有先天生长激素不足的儿童其 18 号染色体长臂上丢失了 2Mb, 而 GalR1 受体的基因正好位于此处。

2 GalR2 受体

GalR2 受体首先是从大鼠中克隆的^[12], 它含有 372 个氨基酸残基, 其编码基因具有一个内含子, 外显子 1 编码从受体 N 端到第三跨膜片段末

端, 外显子 2 编码第二胞内环到 C 端。大鼠 GalR2 受体的胞外区有 3 个与氮相联的糖基化位点, 而胞内区域有与 GalR1 受体不同的磷酸化位点。人 GalR2 受体的 C 端比大鼠的 GalR2 受体多 15 个氨基酸残基, 其编码基因在染色体上定位于 17q25.3。小鼠的 GalR2 定位于第 11 号染色体。人的 GalR1 和 GalR2 受体只有约 42% 的同源性, 提示这两种受体具有不同的调节功能。目前缺乏 GalR2 受体的抗体, 所以对 GalR2 受体分布的研究主要是通过对其 mRNA 进行的。通过 RT-PCR 技术分析发现, 人脑中 GalR2 mRNA 分布于皮层、海马、杏仁核、丘脑、下丘脑以及小脑。另外, 在人的小肠中也存在 GalR2 受体, 这可能是一个针对中枢 GalR2 受体位点进行药物治疗的障碍。GalR2 mRNA 的分布非常广泛, 但与 GalR1 mRNA 的分布特征不同。例如, 原位杂交的实验结果表明 GalR1 mRNA 和 GalR2 mRNA 都存在于海马中, GalR1 mRNA 主要集中在 CA1 区和下托, 而 GalR2 mRNA 局限于齿状回。大鼠的 GalR2 mRNA 的分布很广泛, 在中枢和外周神经系统以及其他一些器官组织中都有分布, 主要分布在下丘脑、海马、杏仁核、梨状皮层、齿状回、乳头体核和小脑皮层, 以及背根神经节、胃、大肠、胰腺衍生细胞 (如 RIN-m5f)、输精管、前列腺、子宫和卵巢。当消除内源性 RNA 酶的影响后, 用原位杂交和 RT-PCR 技术可以在垂体前叶发现 GalR2 mRNA 分布, 但没有 GalR1 mRNA 的分布, 由此推测 GalR2 受体介导甘丙肽对垂体激素释放的调节。另外, GalR2 mRNA 在大鼠的新皮层和扣带复合体 (cingulate complex) 中都有分布, 然而这些区域中并没有发现 GalR1 mRNA 的存在。在黑质、腹侧被盖区、几个脑神经运动核以及脊髓的腹侧也有 GalR2 mRNA 表达。这提示 GalR2 受体可能参与运动功能的调节。大鼠的 GalR2 mRNA 在丘脑中分布很少。在基底前脑、下丘脑、中缝背核和蓝斑中 GalR1 和 GalR2 的 mRNA 共存。从大鼠 GalR2 受体的分布可以推测, 它可能参与多种生理过程, 如催乳素和生长激素的释放、泌乳、摄食、情绪反应和学习记忆等生理过程。

关于 GalR2 受体表达调节的研究比较少。GalR2 mRNA 在大鼠脑的发育初期即出生后 1 ~ 7 天表达量丰富, 并且分布广泛。损伤成年大鼠单侧面神经可以导致同侧面神经核中的 GalR2 受体表达量持续增加 (14 ~ 21 天)。这些结果提示 GalR2 受体在中枢神经系统的发育和损伤修复中发挥一定作

用。最近的证据表明激活 GalR2 受体可促进小鼠感觉神经元神经突的生长^[13]。

GalR1 和 GalR2 受体之间的同源性很低, 提示它们可能与不同的 G 蛋白偶联, 并且其下游的信号通路也不同。研究表明 GalR2 受体可能与 Gq/11 蛋白偶联。GalR2 受体可以激活磷脂酶 C, 促进表达 GalR2 受体神经元的突触传递效率。另外, 在 CHO 和 HEK293 细胞中, GalR2 受体与 forskolin 激活的 cAMP 偶联, 并在 CHO 细胞中与 PKC 依赖的 MAPK 激活相偶联, 这两种效应都是 PTX 敏感的。这些特性与 Gi 偶联腺苷酸环化酶抑制以及 Go 偶联的 MAPK 激活是一致的, 说明 GalR2 受体也与 Gi/o 蛋白偶联。在不同的培养细胞中, GalR2 受体通过不同的 G 蛋白与不同的信号通路偶联, 而 GalR1 受体主要与 Gi 蛋白偶联。以上资料说明甘丙肽可以通过激活不同的受体引起神经元兴奋或抑制。然而, 这些结果都是从转染并过量表达甘丙肽受体的细胞系中获得的, 这种细胞系中甘丙肽受体与 G 蛋白之间的分子比 (stoichiometry) 和偶联特性并不能反映在体的真实情况。利用自身的内源性受体, 比如原代细胞进行研究则可以验证这些结果。

3 GalR3 受体

GalR3 受体也是首先在大鼠中克隆的, 它含有 370 个氨基酸残基^[14]。人的 GalR3 受体含有 368 个氨基酸残基, 其基因在与 GalR2 受体基因相同位置上也有一个内含子, 说明 GalR2 和 GalR3 受体可能具有相同的进化起源, 它与人的 GalR2 受体 (约 58%) 同源性高于人的 GalR1 受体 (约 38%)。人 GalR3 受体与大鼠的同源性高达约 90%, 并且有相同的保守的 N 端糖基化位点和几个磷酸化位点, 包括一个在 GalR1 和 GalR2 受体中未发现的 C 端 PKC 磷酸化位点。RNA 印迹分析表明, 在人的额叶、颞叶、纹状体、延髓、小脑和脊髓中, GalR3 受体的含量很高, 在海马、杏仁核和丘脑中含量较低。原位杂交实验表明, 大鼠脑内 GalR3 mRNA 主要分布于嗅皮层、海马回嗅觉小岛、Ammon 氏角的 CA 区、海马齿状回、下丘脑。关于 GalR3 受体表达的调节还未见报道。

药理学的研究结果表明, GalR3 受体的功能偶联与 GalR1 受体类似。甘丙肽作用于 GalR3 受体可以激活与其共表达的内向整流钾通道。GalR3 受体可以对情绪、摄食、痛觉传递、代谢和垂体激素的释放等生理过程起调节作用。GalR3 受体还可能参

与对胰岛素释放和糖平衡的调节。

4 甘丙肽受体的拮抗剂和激动剂

各种类型的甘丙肽受体拮抗剂和激动剂还在进一步研制中。目前还没有针对甘丙肽受体亚型的选择性受体拮抗剂。已经合成的一些多肽的嵌合肽, 对甘丙肽的作用有阻断或促进效应, 比如 M15、M32、M35、M40 和 C7 等^[15]。这些嵌合肽都是由甘丙肽的 1 ~ 13 片段和另一种神经肽的片段 (或合成多肽) 经过一个脯氨酸连接成的酰胺类化合物。这些拮抗剂和激动剂并不能用来确定是哪种甘丙肽受体亚型发挥作用。

目前已经开发了一种 GalR2 受体的特异性激动剂 AR-M1896^[16], 并广泛应用于各种研究中。另外一种激动剂 AR-M961 可同时激活 GalR1 和 GalR2 受体, 引起蓝斑神经元超级化, 而 GalR2 受体特异激动剂 AR-M1896 不能引起相同的效应, 说明上述效应是 GalR1 受体介导的。运用特异的 GalR2 受体激动剂, 发现低剂量甘丙肽的痛敏作用是 GalR2 受体介导的, 而高剂量甘丙肽的镇痛作用是 GalR1 受体介导的。反义肽核酸和反义核苷酸也是目前确定甘丙肽受体亚型的常用手段。用针对 GalR1 受体的反义肽核酸, 验证了脊髓水平甘丙肽对痛觉抑制作用是由 GalR1 受体介导的。用 GalR1 受体反义核苷酸还证明甘丙肽的抗惊厥作用也是 GalR1 受体介导的^[17]。

5 甘丙肽受体研究的展望

甘丙肽及其受体在神经系统和其他器官组织中的广泛分布, 以及这种分布的不均匀性和可塑性, 都说明了甘丙肽在多种生理过程中是一种重要的调节因子。利用现有的激动剂和拮抗剂得到了许多有价值的结果, 但是仍不能满足在药理学和信号转导方面对甘丙肽进行进一步研究的需要。研究者期待研制出更高选择性的拮抗剂或激动剂, 以及其他相关技术。目前认为甘丙肽在早老年性痴呆、痛觉和肥胖中具有重要的调节作用^[18], 小分子的甘丙肽受体激动剂和拮抗剂将推动甘丙肽受体作为药物靶点的研究和应用。

应用免疫组化和免疫电镜, 深入研究甘丙肽受体在中枢和外周组织中的分布, 应用分子生物学、细胞生物学的技术方法, 探索和验证各种甘丙肽受体的跨膜信息传递机制, 都具有重要的理论意义。

参 考 文 献

- 1 Branchek T A, Smith K E, Gerald C, *et al.* Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol Sci*, 2000, **21** (3): 109 ~ 117
- 2 Rajendren G. Increased galanin synapses onto activated gonadotropin-releasing hormone neuronal cell bodies in normal female mice and in functional preoptic area grafts in hypogonadal mice. *J Neuroendocrinol*, 2002, **14** (6): 435 ~ 441
- 3 Gundlach A L. Galanin/GALP and galanin receptors: role in central control of feeding, body weight/obesity and reproduction? *Eur J Pharmacol*, 2002, **440** (2 ~ 3): 255 ~ 268
- 4 Perez S, Basile M, Mash D, *et al.* Galanin receptor over-expression within the amygdala in early Alzheimer's disease: an *in vitro* autoradiographic analysis. *J Chem Neuroanat*, 2002, **24** (2): 109 ~ 116
- 5 Bellido I, Diaz-Cabiale Z, Jimenez-Vasquez P A, *et al.* Increased density of galanin binding sites in the dorsal raphe in a genetic rat model of depression. *Neurosci Lett*, 2002, **317** (2): 101 ~ 105
- 6 Habert-Ortoli E, Amiranoff B, Loquet I, *et al.* Molecular cloning of a functional human galanin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (21): 9780 ~ 9783
- 7 Church W B, Jones K A, Kuiper D A, *et al.* Molecular modelling and site-directed mutagenesis of human GALR1 galanin receptor defines determinants of receptor subtype specificity. *Protein Eng*, 2002, **15** (4): 313 ~ 323
- 8 Suzuki H, Iwanaga T, Yoshie H, *et al.* Expression of galanin receptor-1 (GALR1) in the rat trigeminal ganglia and molar teeth. *Neurosci Res*, 2002, **42** (3): 197 ~ 207
- 9 Pham T, Guerrini S, Wong H, *et al.* Distribution of galanin receptor 1 immunoreactivity in the rat stomach and small intestine. *J Comp Neurol*, 2002, **450** (3): 292 ~ 302
- 10 Larm J A, Shen P J, Gundlach A L. Differential galanin receptor-1 and galanin expression by 5-HT neurons in dorsal raphe nucleus of rat and mouse: evidence for species-dependent modulation of serotonin transmission. *Eur J Neurosci*, 2003, **17** (3): 481 ~ 493
- 11 Liu H X, Hokfelt T. The participation of galanin in pain processing at the spinal level. *Trends Pharmacol Sci*, 2002, **23** (10): 468 ~ 474
- 12 Smith K E, Forray C, Walker M W, *et al.* Expression cloning of a rat hypothalamic galanin receptor coupled to phosphoinositide turnover. *J Biol Chem*, 1997, **272** (39): 24612 ~ 24616
- 13 Mahoney S A, Hosking R, Farrant S, *et al.* The second galanin receptor GalR2 plays a key role in neurite outgrowth from adult sensory neurons. *J Neurosci*, 2003, **23** (2): 416 ~ 421
- 14 Wang S, He C, Hashemi T, *et al.* Cloning and expressional characterization of a novel galanin receptor. Identification of different pharmacophores within galanin for the three galanin receptor subtypes. *J Biol Chem*, 1997, **272** (51): 31949 ~ 31952
- 15 Pooga M, Jureus A, Razaei K, *et al.* Novel galanin receptor ligands. *J Pept Res*, 1998, **51** (1): 65 ~ 74
- 16 Liu H X, Brumovsky P, Schmidt R, *et al.* Receptor subtype-specific pronociceptive and analgesic actions of galanin in the spinal cord: selective actions via GalR1 and GalR2 receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (17): 9960 ~ 9964
- 17 Saar K, Mazarati A M, Mahlapuu R, *et al.* Anticonvulsant activity of a nonpeptide galanin receptor agonist. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (10): 7136 ~ 7141
- 18 Odorizzi M, Fernet B, Angel E, *et al.* Galanin receptor antagonists decrease fat preference in Brattleboro rat. *Neuropharmacology*, 2002, **42** (1): 134 ~ 141

Progress in The Study of Galanin Receptors

SUN Yan-Gang, HU Yi-Duo, YU Long-Chuan *

(College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Abstract Three types of galanin receptor (GalR1, GalR2, GalR3) have been cloned to date, and identified to be G-protein coupled receptors. These three galanin receptors show differences in their amino acids sequences, pharmacological properties, as well as in the second messenger system. Activation of GalR1/3 induces inhibition on adenylyl cyclase and to activate K^+ channels, while activation of GalR2 leads to the stimulation of phospholipase C and intracellular Ca^{2+} mobilization. The distribution of the three galanin receptors in human, rats and mice have been investigated by Northern blot, RT-PCR and *in situ* hybridization. The different distribution of the galanin receptor indicates that galanin participates a broad range of physiological activities.

Key words galanin receptor, G-protein coupled receptor, second messenger, the central nervous system

* Corresponding author. Tel: 86-10-62762099, E-mail: yule@pku.edu.cn

Received: February 26, 2003 Accepted: April 6, 2003