

## 高亲和力谷氨酸转运体结构和功能的研究进展\*

张云龙 瞿少刚\*\*

(南方医科大学基础医学院免疫学教研室, 广州 510515)

**摘要** 真核生物高亲和力谷氨酸转运体(excitatory amino acid transporters, EAATs)分为 GLAST(EAAT1)、GLT-1(EAAT2)、EAAC1(EAAT3)、EAAT4 和 EAAT5 等 5 个亚型。高亲和力谷氨酸转运体结构学的研究, 揭示了谷氨酸转运体的跨膜拓扑结构、真核和原核生物 EAATs 结构的差异, 以及在底物转运过程中的一些底物和协同转运离子的结合位点。其功能学的研究发现, EAATs 在参与突触的传递, 避免兴奋性氨基酸的毒性效应中发挥重要作用, 同时也参与了对学习、记忆以及运动行为的调控。结合我们既往的工作, 就近几年 EAATs 的结构和功能研究做一综述。

**关键词** 高亲和力谷氨酸转运体, 结构, 功能

**学科分类号** Q7

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00474

真核生物高亲和力谷氨酸转运体(也称为兴奋性氨基酸转运体, excitatory amino acid transporters, EAATs)主要表达于神经元和神经胶质细胞膜上, EAATs 一方面参与突触间隙兴奋性信号的传递, 另一方面通过摄取吸收突触间隙的谷氨酸, 可以避免兴奋性毒性效应对神经系统的损伤。EAATs 的拓扑结构包括 8 个跨膜区域(transmembrane domains, TM) TM1~TM8 和 2 个发夹结构(hairpin loop, HP) HP1、HP2。近几年的研究证实了这些区域在转运循环中的相互作用以及底物、协同转运离子的结合位点。功能学的研究证实 EAATs 在终止兴奋性传递的同时, 还参与学习、记忆等高级精神活动和运动行为的调节。本文就 EAATs 结构和功能研究的相关进展综述如下。

### 1 高亲和力谷氨酸转运体的结构研究

真核生物高亲和力谷氨酸转运体分为 GLAST (glutamate/aspartate transporter, 亦称 EAAT1)、GLT-1 (glutamate transporter-1, 亦称 EAAT2)、EAAC1 (excitatory amino acid carrier-1, 亦称 EAAT3)、EAAT4 和 EAAT5 等 5 个亚型。1992 年, Stoffel 等、Hediger 等和 Kanner 等分别克隆出了 GLAST、EAAC1 和 GLT-1 三种真核生物的谷氨酸转运体<sup>[1-3]</sup>, 其中 GLAST 和 GLT-1 来源于大

鼠, EAAC1 来源于兔。1994 年, 在人类确定了分别与 GLAST、GLT-1 和 EAAC1 相对应的 EAAT1、EAAT2 和 EAAT3<sup>[4]</sup>。1995 年和 1997 年 Amara 实验室克隆了来自人的 EAAT4、EAAT5<sup>[5-6]</sup>, 5 种谷氨酸转运体之间具有 50%~60% 的同源序列。

早期 EAATs 拓扑结构的研究主要应用融合肽和半胱氨酸点突变的方法, 证实在 EAATs 的 N 端存在 6 个跨膜区域, 在 TM3 和 TM4 之间的第二个胞外环都有一个糖基化位点。EAATs 在 C 端存在高度保守的疏水区, 一些实验室分别进行了细菌转运体以及大鼠和人类 EAAT1 C 端拓扑结构的研究, 普遍认为位于 C 端 TM7~TM10 的区域在与底物的结合和共转运离子的相互作用中发挥重要作用, 该区域可能形成识别、转运底物和离子的结构域。Amara 实验室<sup>[7]</sup>在 2000 年对 EAAT1 拓扑结构的研究表明, EAAT1 分为 11 个区域, 疏水区 TM1~7 和 TM11 形成  $\alpha$  螺旋结构, TM8 形成凹环, 位于

\* 国家自然科学基金(31170734)资助项目, 广东省科技计划项目(2012B050200003), 广州市科技计划项目(2013J4500018), 广东省高等学校人才引进项目(201143001)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(新教师类)(20114433120002)资助项目。

\*\* 通讯联系人。

Tel: 020-61647275, E-mail: sgq9528@163.com

收稿日期: 2014-02-12, 接受日期: 2014-06-25

TM9 和 TM10 的位点与胞外相通. 该研究认为 TM7 形成跨膜区域, 而在 GLT-1 上该区域被证实形成凹环结构. Kanner 实验室<sup>[8]</sup>应用半胱氨酸点突变的方法, 表明 GLT-1 有 8 个跨膜区域, TM3 和 TM4 之间的胞外环上包含 2 个糖基化位点, 在 C 端有 2 个跨膜区域(TM7 和 TM8), TM7 和 TM8 之间有一个孔环结构和一个疏水连接, TM7 包含 2 个参与  $K^+$  结合和转运的位点, 另外还有 5 个位点参与了  $Na^+$  的结合与转运, 在 GLT-1 底物结合位点附近的一个丝氨酸位点被证实和  $Na^+$  结合的选择性有关. 其后, 该实验室又发现了 GLT-1 上 1 个新的凹环结构, 与之前得出的凹环方向相反, 但都包含对转运有重要作用的位点<sup>[9]</sup>. 但是这些研究对于 C 端跨膜区域的数目以及二级结构的种类存在较大争议.

2004 年, Gouaux 实验室<sup>[10]</sup>成功解析了谷氨酸转运体的同族体, 原核生物 *Pyrococcus horikoshii* 天冬氨酸转运体  $Glt_{ph}$  的晶体结构. 研究表明, 它是一个由 3 个单体组成的碗状三聚体, 其中的每个单体都有一个底物转运通道, 是一个独立的功能单位, 由 8 个跨膜区段 TM1~TM8 以及 2 个方向相反的发夹结构 HP1、HP2 组成. 由 TM7、TM8、HP1 和 HP2 组成的高度保守的羧基端位于中央, 氨基端的 TM1~TM6 形成圆筒状外壳环绕在外<sup>[10]</sup>. 对原核生物谷氨酸转运体  $GltT$  的研究表明, 三聚体界面由 TMs 2、4 和 5 组成, 并且在转运底物过程中它们的空间位置保持不变<sup>[11]</sup>.  $Glt_{ph}$  的拓扑结构与之前 Kanner 等<sup>[9]</sup>提出的 GLT-1 的拓扑结构很相似, 两者之间 TM 和 HP 的数量相同. 从  $Glt_{ph}$  晶体解析中得出的拓扑结构与以前用生物化学方法对 EAATs 拓扑结构的研究结果相比, 二者具有高度的相似性.

谷氨酸转运体通过“交替接近机制”发挥作用, HP2 作为外侧闸门, 控制着底物由细胞外进入结合袋的通路, HP1 作为内侧闸门, 控制着底物由结合袋进入细胞内的通路<sup>[10, 12-13]</sup>. 首先, HP2 向胞外移动暴露底物结合位点, 底物和共转运离子与转运体结合后 HP2 回至原位, 关闭外侧闸门. 然后, 转运体向胞内发生构象改变, 整个底物结合区域包括 HP1、HP2、TM7 及 TM8 向胞浆方向移动, 随着内侧闸门 HP1 向胞浆的开放, 底物释放进入胞浆内<sup>[10, 12-13]</sup>. 最后,  $K^+$  与转运体结合并促使转运体构象转变为向胞外开放(图 1)<sup>[12]</sup>.

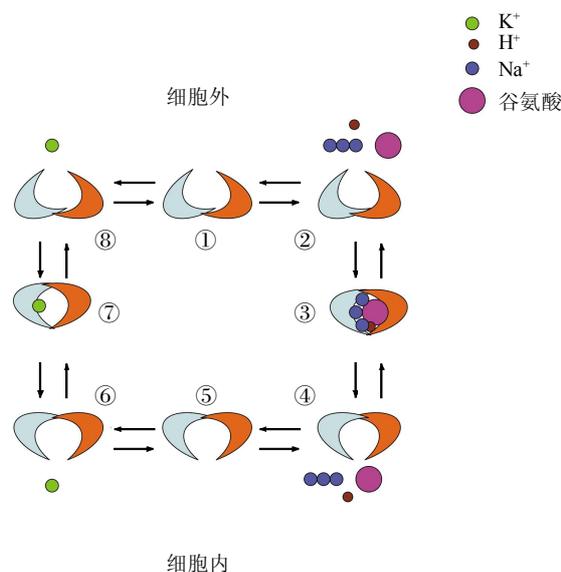


Fig. 1 Mechanism of glutamate transporters

图 1 谷氨酸转运体的转运机制

处于向胞外开放的空载状态的谷氨酸转运体(①), 在结合谷氨酸、质子和 3 个钠离子后(②), 随即处于关闭状态, 此时转运体与细胞内、外均不相通(③), 随后, 转运体向胞内开放, 同时将谷氨酸、质子和钠离子释放到胞内(④). 转运体又处于向胞内开放的空载状态(⑤), 向胞内开放的谷氨酸转运体与钾离子结合后(⑥), 处于关闭状态, 此时转运体与细胞内、外均不相通(⑦), 随后, 转运体向胞外开放, 同时将钾离子释放到胞外(⑧), 恢复到向胞外开放的空载状态, 进入下一个转运循环(①).

真核生物与原核生物的谷氨酸转运体属于同一个膜转运蛋白家族, 它们之间具有 36% 的同源性. 由于难以获得哺乳动物 EAATs 的蛋白质晶体结构,  $Glt_{ph}$  的晶体结构可用作 EAATs 结构研究的参考模板. 而且在真核生物谷氨酸转运体的研究中, 通过生物化学和电生理学的方法人们得到了关于其结构变化的许多数据, 在许多方面二者的数据都可以得到相互印证. 例如, 应用半胱氨酸交联的方法, 证实了位于 EAAT1 TM7 上 395 位点和 HP2 上 440 位点在转运循环中相互靠近<sup>[14]</sup>, 当把这些位点投射到晶体结构  $Glt_{ph}$  上时, 同样证实了这些位点的相互靠近关系. 而以  $Glt_{ph}$  晶体结构为模板, 来研究真核生物 EAATs 时, 也得出了相似的结论. 位于 EAATs C 端的保守区域(TM7、8 和 HP1、2)在底物和离子的结合、转运过程中发挥重要作用, 对真核生物 GLT-1/EAAT2、EAAC1/EAAT3 的研究支持了 HP2 作为外侧闸门, HP1 作为内侧

闸门的转运机制, 并且 HP1、HP2 及 TM7、TM8 组成底物结合袋, 该区段诸多位点被证实参与了底物和钠离子的转运, 并且在该区段, EAAT1 和  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  氨基酸序列的同源性达到 45%.

尽管  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  晶体结构为 EAATs 结构与功能研究提供了许多重要的信息, 但  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  晶体结构只是某一转运时相转运体结构的静止图片, 无法反映整个转运过程中的全息动态构象变化. 与底物结合的  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  晶体结构(PDB ID 1XFH)反映了此时转运体处于负荷状态, 内、外闸门均关闭时的结构构象<sup>[10]</sup>. 与底物非转运性抑制剂 D, L-TBOA(D, L-threo- $\beta$ -benzyloxyaspartate)结合的  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  晶体结构(PDB ID 2NWW)则反映了转运体外侧闸门 HP2 开放时的结构构象, 由于 D, L-TBOA 体积较天冬氨酸大, 与转运体结合后不能被转运, 导致转运体被锁定于 HP2 开放状态, 阻碍了转运体构象的进一步改变<sup>[12]</sup>. Boudker 实验室<sup>[13]</sup>2009 年解析了  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  另一晶体结构(PDB ID 3KBC), 它反映了转运体内侧闸门 HP1 向胞内开放时的结构构象. 后二种晶体结构反映了转运体转运过程中与底物结合及将底物释放入胞浆这两个关键节点. 介于这二者之间必然发生着许多构象动态变化, 研究这些构象动态变化对彻底阐明转运体的转运机制十分重要. Boudker 实验室<sup>[15]</sup>2012 年解析了  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  另一时相的晶体结构(PDB ID 3V8G), 此晶体结构反映了  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  三聚体中两个亚基处于向胞内开放状态, 而另一个亚基介于向胞外与胞内开放之间的过渡状态. 处于过渡状态的亚基 TM2 及 TM5 上的一些氨基酸残基形成了一个小的腔, 此小腔可能交替暴露于胞外、胞内溶液之中, 从而介导转运体  $\text{Na}^+$  及底物门控的极性溶液通透性<sup>[15]</sup>. 利用分子动力学模拟与电脑模型技术, Weinstein 等<sup>[16]</sup>发现,  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  转运过程中过渡状态的构象改变主要涉及转运通道及三聚体界面, 二者运动方向相反, 其中三聚体界面中的 TM3~4 环向上运动然后复位. Mindell 等<sup>[17]</sup>对  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  的研究发现, TM3~4 环在转运过程中会发生底物诱导的构象变化, 并且对转运底物具有必不可少的重要作用.

如前所述, 原核生物 *Pyrococcus horikoshii* 谷氨酸转运体  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  的晶体结构已经明了, 并用来指导对真核生物谷氨酸转运体的研究<sup>[18]</sup>. 应用生物化学和分子生物学的方法, 我们对谷氨酸转运体的结构和功能进行了长期的研究, 通过半胱氨酸对突变体交联作用研究证实了 HP2 环作为转运体胞外

闸门, 在底物转运过程中不断向前向后运动, 允许底物从细胞膜外侧端进入细胞膜内结合部位<sup>[19]</sup>. 通过生物化学与电生理学的方法鉴定了谷氨酸转运体的一个阳离子结合位点 Asp-455(EAAC1 序号), 研究表明在转运体转运底物的两个步骤中, Asp-455 对于转运体与阳离子的相互作用都是必不可少的, 先后参与了  $\text{Na}^+$  及  $\text{K}^+$  结合过程<sup>[20]</sup>. 我们从  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  中鉴定出了二组不同的反向拓扑重复结构, 通过此二组反向拓扑重复结构推测出转运体向胞内面变构后的结构模型, 并通过生物化学的方法验证了此模型, 研究表明, 反向拓扑结构对蛋白质从朝向胞外面与朝向胞内面的相互转变中起着重要的调节作用, 此模型也为进一步的结构与功能研究提供了重要的参考依据<sup>[21]</sup>. 我们发现, 在谷氨酸转运体转运底物过程中, TM5 与 TM8 在转运体向胞外开放时相互靠近, 而在转运体向胞内开放时相互远离, TM8 全程参与了转运通道的组成<sup>[22]</sup>. 对 TM5 水相通透性的研究表明, TM5 胞外区段的一些氨基酸残基位点参与了底物的转运过程<sup>[23]</sup>.

尽管原核生物谷氨酸转运体的晶体结构为研究真核生物 EAATs 结构与功能提供了许多重要的信息, 但是它与真核生物 EAATs 存在 3 个非常重要的区别: a. 底物特异性, 真核生物 EAATs 可以同时转运天冬氨酸和谷氨酸, 而  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  只能转运天冬氨酸; b. 离子特异性, 与真核生物 EAATs 不同,  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  不需要钾离子参与即可介导底物的净转运; c. 与 EAATs 相比,  $\text{Glt}_{\text{ph}}$  转运底物的速率较慢<sup>[18]</sup>. 因此最终揭示真核生物谷氨酸转运体的结构还需要更加深入的研究.

## 2 高亲和力和谷氨酸转运体在中枢神经系统的分布

GLAST 和 GLT-1 主要表达在神经胶质细胞上, 其中 GLAST 在小脑分子层的 Bergmann 神经胶质细胞含量最为丰富, 在脊髓、前脑以及内耳、视网膜等处也有少量表达<sup>[18]</sup>. GLT-1 在中枢神经分布广泛, 主要位于前脑、大脑皮质、海马等部位的星形胶质细胞膜上, 同时也表达在发育阶段的神经元上, GLT-1 负责清除大约 90% 的谷氨酸. 近来还发现了仅在肽链 C 端发生改变的 GLT-1 剪切变体, 其中 GLT-1a、GLT-1b(又名 GLT-1v)和 GLT-1c 发现与神经退行性疾病具有密切的相关性. 其分布在不同的细胞类型上呈互补性, 主要

分布于神经元, 也表达于星形胶质细胞和小胶质细胞<sup>[24]</sup>. GLT-1 和 GLAST 不仅可以单独表达, 也可同时表达于星形胶质细胞的不同部位, 两者负责清除突触间隙大部分谷氨酸. EAAC1 主要分布于神经元的突触后膜, 在海马 CA1-CA4 区以及皮质锥体细胞层表达丰富. 研究表明, EAAC1 在幼鼠海马中的表达含量最高, 每克组织约含 0.013 mg 的 EAAC1. EAAT4 局限于小脑分子细胞层, 在蒲肯野细胞表达. EAAT5 则局限于视网膜的神经元和胶质细胞上, 表达于光感受器、双极细胞、无长突细胞等, 新近的研究表明, EAAT4 和 EAAT5 还表达在 I 型和 II 型的前庭毛细胞上.

### 3 高亲和力谷氨酸转运体的转运特性

EAATs 主要利用  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶形成的  $\text{Na}^+$  和  $\text{K}^+$  的电化学浓度梯度来完成对谷氨酸的转运. EAATs 每转运 1 个谷氨酸分子, 伴有 3 个  $\text{Na}^+$  和 1 个  $\text{H}^+$  同向转入细胞内, 1 个  $\text{K}^+$  转至细胞外. 整个转运过程产生两种电流, 一种是转运离子所产生的 2 个正电荷的跨膜电流, 另一种是底物转运所产生的非耦合的氯离子内流引起的外向电流<sup>[25]</sup>.

将 GLT-1 表达在爪蟾卵母细胞后, 谷氨酸可诱导出瞬时电流和稳态电流. 同时, EAATs 在转运时, 铷和铯可取代  $\text{K}^+$ , 尽管锂可以占据一个  $\text{Na}^+$  位点并被转运, 但没有离子可取代  $\text{Na}^+$ . 在正常情况下, EAATs 利用  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶将谷氨酸逆浓度梯度摄取进入胞内, 但是, 当胞外  $\text{K}^+$  浓度升高时, EAATs 将进行反向转运<sup>[25]</sup>.

另外, EAATs 作为氨基酸门控的氯离子通道, 可通透氯离子和大量的阴离子, 其中 EAAT4 和 EAAT5 的作用尤其重要<sup>[26]</sup>. 虽然转运时必须要有谷氨酸或天冬氨酸存在, 但通透氯离子的过程与底物转运并非在热力学上相耦联. Ryan 等<sup>[26]</sup>的研究表明, EAATs 转运底物时构象的改变导致了阴离子通道的开放和关闭, 从而产生阴离子流. 阴离子流的产生, 可以反馈抑制细胞的兴奋性, 预防谷氨酸的过度释放. 然而最近的一项研究却表明, 编码 GLAST 的基因 290 位点突变后, 导致了细胞膜表面 GLAST 表达的降低和谷氨酸摄取的下调, 同时, 表达突变体的细胞较野生型产生了较大幅度的阴离子电流, 从而 GLAST 表达的降低和阴离子电流的产生, 共同参与了 6 型周期性共济失调 (episodic ataxia type 6) 的病理演变过程, 提示了 EAATs 产生的阴离子流在疾病发生中的作用<sup>[27]</sup>.

## 4 高亲和力谷氨酸转运体的功能研究

### 4.1 在突触传递中的作用

近年来, 对于 EAATs 的研究较多关注其在星形胶质细胞和神经元突触前、后膜组成的三元突触中的作用.

星形胶质细胞和神经元相互影响, 位于星形胶质细胞膜上的 EAATs 通过清除突触间隙的谷氨酸, 调节突触周围代谢性谷氨酸受体, 使谷氨酸达到最有效的分布, 完成突触间信息准确的传递. 并且, EAATs 能够促进谷氨酸能突触周围的星形胶质细胞快速释放谷氨酰胺, 被神经元摄取用来合成谷氨酸和  $\gamma$  氨基丁酸(GABA).

星形胶质细胞和神经元的共同培养能够提高星形胶质细胞上 GLT-1 的表达, 当神经元突触缺乏谷氨酸能信号传入时, 导致 GLT-1 表达的下调, 而增强突触的活性则能提高 GLT-1 的表达水平. 早期形态学的研究发现, 星形胶质细胞在与神经末梢、轴突等形成突触部位要比其与毛细血管、树突等形成突触部位的 EAATs 分布更为广泛, 说明神经元的活性可以调节 GLT-1 在星形胶质细胞的分布和距离突触的相对位置<sup>[28]</sup>. 其后 Dailey 等通过实验证实, 在海马组织中 GLT-1 与神经元特异性的突触核蛋白共表达, 当用河豚毒素抑制神经元的活性后, 伴有 GLT-1 在星形胶质细胞表面分布的降低, 表明神经元和星形胶质细胞构成的三元突触结构对于 EAATs 的调控起到重要作用<sup>[29]</sup>. 在神经元内, 提供能量的线粒体主要分布于高代谢区域, 而在星形胶质细胞中, EAATs 摄取谷氨酸的同时伴随有  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$  酶的激活, 也需要较高的能量. 最近, Robinson 等实验室进一步从能量代谢的角度, 动态地研究了神经元的活性对于星形胶质细胞上 GLT-1 分布的影响, 他们的研究发现, 神经元内线粒体迁移的比例要比星形胶质细胞多, 并且通过提高神经元的活性, 能够提高星形胶质细胞内 GLT-1 和线粒体位置的接近. 研究提示, 神经元可能通过能量代谢的途径来调节星形胶质细胞上 EAATs 的表达和分布<sup>[30]</sup>. 如果三元突触的稳定发生异常, 则影响 EAATs 的功能, 进一步影响突触信息的传递, 导致疾病的发生. Cassano 等<sup>[31]</sup>的研究表明, GLT-1 和 EAAC1 在阿尔茨海默病小鼠模型的海马组织中表达下调的同时, 伴随有线粒体呼吸链复合物 I、II 和 IV 的功能降低, 说明 EAATs 在三元突触中功能的异常可能参与了一些神经系统

变性疾病的发病, 并且此过程与能量代谢失衡关系密切.

基于三元突触的理论, Berger 实验室研究设计了一种计算机模型来证实位于星形胶质细胞膜上的 EAATs 通过谷氨酸的摄取对突触信息传递和神经元放电的影响, 该模型还研究了 EAATs 如何调整突触传递中谷氨酸和受体的结合<sup>[32]</sup>.

如果突触间隙的谷氨酸不能够被及时清除, 则造成胞外谷氨酸过度蓄积, 谷氨酸过度兴奋位于突触后神经元上的谷氨酸能受体, 介导“兴奋性毒性效应”: 谷氨酸一方面通过激活 I 型促代谢性受体, 活化细胞内磷脂酶 C (PLC), 使磷酸肌醇脂水解为三磷酸肌醇(IP<sub>3</sub>)和二酰甘油(DAG), 其中 IP<sub>3</sub> 诱导细胞内 Ca<sup>2+</sup> 释放, DAG 则可激活蛋白激酶 C (PKC), 加强 N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体介导的兴奋性毒性效应, 导致细胞内 Ca<sup>2+</sup> 超载, 过度生成活性氧自由基和活性氮自由基, 造成线粒体功能障碍; 另一方面, 通过  $\alpha$ -氨基-3-羟基-5-甲基异恶唑-4-丙酸受体 ( $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid receptor, AMPAR) 和海人藻酸受体 (kainic acid receptor, KAR) 介导 Na<sup>+</sup> 内流和神经细胞急性渗透性肿胀, 最终共同促进神经元死亡.

EAATs 迅速移除兴奋性突触释放出的谷氨酸, 有效维持了细胞外谷氨酸的低浓度, 防止了兴奋性扩布的发生, 同时也限制了潜在的兴奋性毒性效应.

#### 4.2 提供其他物质合成的原料

EAATs 还可以提供半胱氨酸或谷氨酸用于谷胱甘肽、GABA 和一些蛋白质的合成. 例如 EAAC1 与半胱氨酸具有高亲和力, 其在摄取谷氨酸的同时, 还摄取半胱氨酸, 用来合成谷胱甘肽, 对抗机体产生的氧自由基损伤.

研究表明, 在体外培养脑皮质神经元时, 通过药物阻断 EAAC1, 即使培养基中有充足的半胱氨酸, 神经元谷胱甘肽的合成也会受到明显抑制. Swanson 等<sup>[33]</sup>从细胞转录水平报道了 EAAC1 表达上调参与了谷胱甘肽的合成, 在氧化应激条件下, 中枢神经系统通过激活转录因子 2-抗氧化剂应答元件通路, 一方面上调神经元转运体 EAAC1 的表达, 促进 EAAC1 将半胱氨酸摄取入神经元以合成谷胱甘肽, 另一方面促使星形胶质细胞释放谷胱甘肽. Kirischuk 等<sup>[34]</sup>的研究表明, 应用 D, L-TBOA 抑制 EAATs 的功能后, 同时也抑制了 GABA 能神经元突触后膜产生的自发电位的频率.

#### 4.3 参与调节学习、记忆和运动行为

谷氨酸是神经系统主要的兴奋性神经递质, 在调节人的兴奋状态、协调运动中枢的功能活动以及学习、记忆中发挥极大的作用, 而负责摄取谷氨酸的 EAATs 也参与了对学习、记忆等高级神经、精神活动以及运动行为的调节.

神经元突触前膜通过释放谷氨酸, 激活突触后膜的 NMDA 受体, 引起 Ca<sup>2+</sup> 内流, 细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的升高, 触发一系列生化反应, 导致与学习、记忆密切相关的长时程增强效应 (long term potentiation, LTP) 的产生. 谷氨酸发挥作用后被位于星形胶质细胞和神经元突触后膜上的 EAATs 重新摄取, 谷氨酸在其内转化为谷氨酰胺, 通过神经元和星形胶质细胞之间的谷氨酸-谷氨酰胺循环, 重新进入神经元, 合成谷氨酸, 产生下一次的 LTP. 有研究表明, 通过提高 GLT-1 的表达, 进而提高了谷氨酸的摄取, 从而促进了海马晚期长时程增强效应, 说明 EAATs 对海马编码和储存信息起到重要作用<sup>[35]</sup>. 谷氨酸一方面通过兴奋性信号的传递, 来促进与学习、记忆密切相关海马长时程增强效应的产生, 另一方面, 其兴奋性毒性作用可以损伤海马神经元, 从而与学习、记忆功能的减退密切相关. 有研究表明, 麻醉药物异氟烷能够导致成年大鼠的空间学习和记忆缺陷, 在海马组织中, 发现胞外的谷氨酸浓度持续升高, 说明谷氨酸的兴奋性毒性效应参与了疾病的发生, 而与此同时, 也发现了 GLAST 表达增加, 表达增加的 GLAST 发挥调节和补偿作用, 对抗谷氨酸的兴奋性毒性效应对海马神经元的损伤, 在一定程度上改善了异氟烷造成的空间学习和记忆功能缺陷<sup>[36]</sup>. Cook 等发现, 阿尔茨海默病模型的细胞内存在非溶性 GLT-1 和 EAAC1 的聚集, 其原因是活性氧对 EAATs 进行了翻译后的氧化修饰, 从而形成功能异常的高分子量多聚体, 这些非溶性 EAATs 的聚集, 参与了阿尔茨海默病认知损害的病理过程<sup>[37]</sup>. Kaneoke 等的研究表明, 3 周的慢性束缚应激在导致大鼠产生痛觉过敏和攻击行为的同时, 伴随有中脑导水管周围灰质星形胶质细胞骨架蛋白——胶质纤维酸性蛋白和 GLT-1 表达下调, 作者推测, 慢性束缚刺激导致 GLT-1 表达下调的同时, 造成中脑导水管周围灰质谷氨酸代谢失衡, 胞外蓄积的谷氨酸介导兴奋性毒性效应, 导致该区域神经元的退化和功能异常<sup>[38]</sup>.

除了参与对学习、记忆等高级神经活动的调节, EAATs 也参与了一些精神疾病的发病. 精神

分裂症存在谷氨酸能递质功能低下, 尸检结果显示, 未服用抗精神病药物的精神分裂症尸体的前额皮质, GLT-1 在 mRNA 水平和蛋白质水平的表达均增加, 而在应用抗精神病药物组, GLT-1 的表达水平接近或低于正常对照组. 作者得出, GLT-1 在精神分裂症患者的前额皮质高表达<sup>[39]</sup>. 其后的研究也显示, 抗精神病药物氯氮平可以降低 GLT-1 的表达和谷氨酸的摄取, 从而提高了胞外谷氨酸的水平<sup>[40]</sup>. 因此, GLT-1 的高表达导致谷氨酸的摄取增多, 从而降低了胞外谷氨酸的浓度, 参与了精神分裂症的发病, 而氯氮平可以通过降低 GLT-1 的表达, 维持胞外较高水平的谷氨酸浓度, 起到治疗作用.

如前所述, EAAC1 在摄取谷氨酸的同时, 还可以摄取半胱氨酸来合成谷胱甘肽. 有研究表明, 应用神经毒素 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP) 的帕金森病小鼠模型, 在出现运动缺陷的同时, 伴有黑质多巴胺神经元 EAAC1 表达的下调, 作者推测, MPTP 造成的氧化应激损伤通过下调 EAAC1 的表达, 降低了对于半胱氨酸的摄取, 从而导致谷胱甘肽合成的减少, 在一定程度上参与了帕金森病小鼠运动缺陷的发病过程<sup>[41]</sup>. 当编码 GLT-1 的 *slc1a2b* 基因突变后, 导致发育中斑马鱼的运动功能障碍<sup>[42]</sup>. 小鼠在感染人类冠状病毒后, 其麻痹症状出现的同时伴随有 GLT-1 表达的下调<sup>[43]</sup>. 以上的研究说明 EAATs 的表达异常与中枢神经系统病变导致的行为异常有密切关系. 上调 EAATs 的表达具有一定的改善作用, 例如, 头孢曲松钠能够通过提高谷氨酸转运体 GLT-1 的表达, 保护多巴胺神经元免受兴奋性毒性作用, 从而减弱 6-OHDA 造成的运动缺陷, 显示了该类药物应用于帕金森病的前景<sup>[44]</sup>.

目前关于谷氨酸转运体和神经退行性疾病关系的研究进展较快, 特别是对于 EAATs 在与神经元突触构成的三元突触中的作用研究, 揭示了星形胶质细胞除了支持作用以外的更多功能. 以提高谷氨酸转运体的表达和功能为靶标来治疗神经退行性疾病, 在动物模型上取得了较好的疗效, 一些药物也逐渐进入临床试验阶段. 例如, 可以提高 GLT-1 表达的头孢曲松钠在肌萎缩侧索硬化症中进行的 III 期临床试验已经于 2012 年底结束, 头孢曲松钠有望代替利鲁唑, 为肌萎缩侧索硬化症患者带来新的福音<sup>[45]</sup>. 但是, 目前仍有诸多问题尚未阐明, 例

如, 谷氨酸转运体在不同的神经退行性疾病, 以及在疾病的不同阶段, 其表达并不一致, 而且, 某些情况下谷氨酸转运体反向转运谷氨酸, 将会加重神经退行性疾病的进展. 因此, 以 EAATs 为靶标来治疗神经退行性疾病还需要更深入的研究, 目前我们实验室正在进行相关的研究, 取得了一定的进展.

## 5 结 语

目前对于 EAATs 的结构和功能有了较为深入透彻的研究, 逐步揭示了 EAATs 不同时相的结构构象和转运循环中的一些底物、协同转运离子的结合位点. 功能学的研究证实 EAATs 可以防止谷氨酸的兴奋性毒性效应对神经系统的损伤, 并且对于学习、记忆以及运动行为具有一定的调控作用, 但其中还有很多问题尚未阐明. 相信随着 EAATs 结构、功能研究的展开以及在各种神经退行性疾病中病理机制的阐明, 必定为揭示神经系统退行性疾病的发病机制和防治措施提供有益的借鉴.

## 参 考 文 献

- [1] Storck T, Schulte S, Hofmann K, *et al.* Structure, expression, and functional analysis of a Na<sup>+</sup>-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**(22): 10955-10959
- [2] Kanai Y, Hediger M A. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature*, 1992, **360**(6403): 467-471
- [3] Pines G, Danbolt N C, Bjoras M, *et al.* Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature*, 1992, **360**(6403): 464-467
- [4] Arriza J L, Fairman W A, Wadiche J I, *et al.* Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from motor cortex. *J Neurosci*, 1994, **14**(9): 5559-5569
- [5] Fairman W A, Vandenberg R J, Arriza J L, *et al.* An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature*, 1995, **375**(6532): 599-603
- [6] Arriza J L, Eliasof S, Kavanaugh M P, *et al.* Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**(8): 4155-4160
- [7] Seal R P, Leighton B H, Amara S G. A model for the topology of excitatory amino acid transporters determined by the extracellular accessibility of substituted cysteines. *Neuron*, 2000, **25**(3): 695-706
- [8] Grunewald M, Bendahan A, Kanner B I. Biotinylation of single cysteine mutants of the glutamate transporter GLT-1 from rat brain reveals its unusual topology. *Neuron*, 1998, **21**(3): 623-632
- [9] Grunewald M, Kanner B I. The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *J Biol Chem*, 2000, **275**(13): 9684-9689

- [10] Yernool D, Boudker O, Jin Y, *et al.* Structure of a glutamate transporter homologue from *Pyrococcus horikoshii*. *Nature*, 2004, **431**(7010): 811–818
- [11] Groeneveld M, Slotboom D J. Rigidity of the subunit interfaces of the trimeric glutamate transporter GltT during translocation. *J Mol Biol*, 2007, **372**(3): 565–570
- [12] Boudker O, Ryan R M, Yernool D, *et al.* Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature*, 2007, **445**(7126): 387–393
- [13] Reyes N, Ginter C, Boudker O. Transport mechanism of a bacterial homologue of glutamate transporters. *Nature*, 2009, **462** (7275): 880–885
- [14] Leighton B H, Seal R P, Watts S D, *et al.* Structural rearrangements at the translocation pore of the human glutamate transporter, EAAT1. *J Biol Chem*, 2006, **281**(40): 29788–29796
- [15] Verdon G, Boudker O. Crystal structure of an asymmetric trimer of a bacterial glutamate transporter homolog. *Nat Struct Mol Biol*, 2012, **19**(3): 355–357
- [16] Stolzenberg S, Khelashvili G, Weinstein H. Structural intermediates in a model of the substrate translocation path of the bacterial glutamate transporter homologue Glt<sub>tr</sub>. *J Phys Chem B*, 2012, **116**(18): 5372–5383
- [17] Compton E L, Taylor E M, Mindell J A. The 3-4 loop of an archaeal glutamate transporter homolog experiences ligand-induced structural changes and is essential for transport. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(29): 12840–2845
- [18] Vandenberg R J, Ryan R M. Mechanisms of glutamate transport. *Physiol Rev*, 2013, **93**(4): 1621–1657
- [19] Qu S, Kanner B I. Substrates and non-transportable analogues induce structural rearrangements at the extracellular entrance of the glial glutamate transporter GLT-1/EAAT2. *J Biol Chem*, 2008, **283**(39): 26391–26400
- [20] Teichman S, Qu S, Kanner B I. The equivalent of a thallium binding residue from an archeal homolog controls cation interactions in brain glutamate transporters. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(34): 14297–14302
- [21] Crisman T, Qu S, Kanner B I, *et al.* Inward-facing conformation of glutamate transporters as revealed by their inverted-topology structural repeats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, **106**(49): 20752–20757
- [22] Zhang X, Qu S. Proximity of transmembrane segments 5 and 8 of the glutamate transporter GLT-1 inferred from paired cysteine mutagenesis. *PLoS ONE*, 2011, **6**(6): e21288
- [23] Zhang X, Qu S. The accessibility in the external part of the TM5 of the glutamate transporter EAAT1 is conformationally sensitive during the transport cycle. *PLoS ONE*, 2012, **7**(1): e30961
- [24] Berger U V, DeSilva T M, Chen W, *et al.* Cellular and subcellular mRNA localization of glutamate transporter isoforms GLT-1 a and GLT-1 b in rat brain by in situ hybridization. *J Comp Neurol*, 2005, **492**(1): 78–89
- [25] Kanner B I, Bendahan A. Binding order of substrates to the sodium and potassium ion coupled L-glutamic acid transporter from rat brain. *Biochemistry*, 1982, **21**(24): 6327–6330
- [26] Vandenberg R J, Huang S, Ryan R M. Slips, leaks and channels in glutamate transporters. *Channels*, 2008, **2**(1): 51–58
- [27] Winter N, Kovermann P, Christoph F. A point mutation associated with episodic ataxia 6 increases glutamate transporter anion currents. *Brain*, 2012, **135**(11): 3416–3425
- [28] Chaudhry F A, Lehre K P, van Lookeren Campagne M, *et al.* Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron*, 1995, **15**(3): 711–720
- [29] Benediktsson A M, Marrs G S, Tu J C, *et al.* Neuronal activity regulates glutamate transporter dynamics in developing astrocytes. *Glia*, 2012, **60**(2): 175–188
- [30] Jackson J G, O'Donnell J C, Takano H, *et al.* Neuronal activity and glutamate uptake decrease mitochondrial mobility in astrocytes and position mitochondria near glutamate transporters. *J Neurosci*, 2014, **34**(5): 1613–1624
- [31] Cassano T, Serviddio G, Gaetani S, *et al.* Glutamatergic alterations and mitochondrial impairment in a murine model of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, 2012, **33**(6): 1121.e1–12
- [32] Allam S L, Ghaderi V S, Bouteiller J M, *et al.* A computational model to investigate astrocytic glutamate uptake influence on synaptic transmission and neuronal spiking. *Front Comput Neurosci*, 2012, **6**: 70
- [33] Escartin C, Won S J, Malgorn C, *et al.* Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 facilitates neuronal glutathione synthesis by upregulating neuronal excitatory amino acid transporter 3 expression. *J Neurosci*, 2011, **31**(20): 7392–7401
- [34] Dvorzhak A, Unichenko P, Kirischuk S. Glutamate transporters and presynaptic metabotropic glutamate receptors protect neocortical Cajal-Retzius cells against over-excitation. *Pflugers Arch*, 2012, **464**(2): 217–225
- [35] Pita-Almenar J D, Zou S W, Colbert C M, *et al.* Relationship between increase in astrocytic GLT-1 glutamate transport and late-LTP. *Learn Mem*, 2012, **19**(12): 615–626
- [36] Qu X, Xu C, Wang H, *et al.* Hippocampal glutamate level and glutamate aspartate transporter (GLAST) are up-regulated in senior rat associated with isoflurane-induced spatial learning/memory impairment. *Neurochem Res*, 2013, **38**(1): 59–73
- [37] Woltjer R L, Duerson K, Fullmer J M, *et al.* Aberrant detergent-insoluble excitatory amino acid transporter 2 accumulates in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2010, **69**(7): 667–676
- [38] Imbe H, Kimura A, Donishi T, *et al.* Chronic restraint stress decreases glial fibrillary acidic protein and glutamate transporter in the periaqueductal gray matter. *Neuroscience*, 2012, **223**: 209–218
- [39] Matute C, Melone M, Vallejo-Illarramendi A, *et al.* Increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1 in the prefrontal cortex of schizophrenics. *Glia*, 2005, **49**(3): 451–455
- [40] Vallejo-Illarramendi A, Torres-Ramos M, Melone M, *et al.* Clozapine reduces GLT-1 expression and glutamate uptake in astrocyte cultures. *Glia*, 2005, **50**(3): 276–279
- [41] Aoyama K, Matsumura N, Watabe M, *et al.* Oxidative stress on

- EAAC1 is involved in MPTP-induced glutathione depletion and motor dysfunction. *Eur J Neurosci*, 2008, **27**(1): 20–30
- [42] McKeown K A, Moreno R, Hall V L, *et al.* Disruption of Eaat2b, a glutamate transporter, results in abnormal motor behaviors in developing zebrafish. *Developmental Biology*, 2012, **362**(2): 162–171
- [43] Brison E, Jacomy H, Desforges M, *et al.* Glutamate excitotoxicity is involved in the induction of paralysis in mice after infection by a human coronavirus with a single point mutation in its spike protein. *J Virol*, 2011, **85**(23): 12464–12473
- [44] Leung T C, Lui C N, Chen L W, *et al.* Ceftriaxone ameliorates motor deficits and protects dopaminergic neurons in 6-hydroxydopamine-lesioned rats. *ACS Chem Neurosci*, 2012, **3**(1): 22–30
- [45] Berry J D, Shefner J M, Conwit R, *et al.* Design and initial results of a multi-phase randomized trial of ceftriaxone in amyotrophic lateral sclerosis. *PLoS ONE*, 2013, **8**(4): e61177

## Progress in The Research of The Structure and Function of High-affinity Glutamate Transporters\*

ZHANG Yun-Long, QU Shao-Gang\*\*

(Department of Immunology, School of Basic Medical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**Abstract** Eukaryotic high-affinity glutamate transporters (also called excitatory amino acid transporters, EAATs) contain five isoforms, GLAST (EAAT1), GLT-1 (EAAT2), EAAC1 (EAAT3), EAAT4 and EAAT5. Structural analysis reveal the membrane topology of glutamate transporters, the structural differences between the eukaryotic and prokaryotic glutamate transporters, and the binding sites for substrate and coupled ions during the transport cycle. Functional studies indicate that EAATs are involved in synaptic transmission, and EAATs play key roles in avoiding glutamate excitotoxicity. Besides, EAATs also participate in regulating learning, memory and motor behavior. In this review, combined with our previous work, we summarize the progress in the research of the structure and function of high-affinity glutamate transporters recently.

**Key words** high-affinity glutamate transporters, structure, function

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2013.00474

---

\* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31170734), The Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (2012B050200003), The Science and Technology Planning Project of Guangzhou (2013J4500018), and The Specialized Research Fund for Talent Introduction of Colleges and Universities of Guangdong Province (201143001) and Specialized Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education (20114433120002).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-20-61647275, E-mail: sqg9528@163.com

Received: February 12, 2014 Accepted: June 25, 2014