

## 综述

G 蛋白  $\beta\gamma$  亚基介导的信号转导途径与心肌细胞肥大

郑 猛综述, 余细勇审校

(广东省心血管病研究所药理室, 广东 广州 510080)

摘要: 导致心肌细胞肥大的胞外刺激因素通过 G 蛋白偶联受体将信号传入胞内。异三聚体 G 蛋白由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚基所组成, 最近发现  $G\beta\gamma$  可以激活 PI3K $\gamma$ 、Ras、MAPKs 等, 参与引起心肌细胞肥大反应的细胞内信号转导通路, 可作为防治心肌肥厚的新靶点。

关键词: G 蛋白; 亚基; 信号转导; 心肌细胞肥大

中图分类号: R542.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)5S-0155-03

心肌肥厚是以心肌细胞增生肥大、心成纤维细胞增殖和心肌间质胶原合成增多为主要病变的疾病。心肌肥厚的发生与血流动力学负荷过重及神经内分泌等因素有关。交感神经系统的激活是心肌肥厚中最敏感的调节与代偿机制, 心脏超负荷时, 交感神经活性和循环中的儿茶酚胺含量明显增加, 血浆去甲肾上腺素(NE)浓度与左室重量指数正相关<sup>[1]</sup>。心脏的肾上腺素能受体(adrenergic receptors, AR)主要是  $\beta$ 1-AR, 而  $\alpha$ 1-AR 激动剂则是迄今所知最重要的致肥厚因子, 两受体都是 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptors, GPCRs), 必须与 G 蛋白偶联才能产生胞内信使如 cAMP、IP<sub>3</sub> 等, 将信号传到胞内<sup>[2]</sup>。从细胞和分子水平看, 心肌肥厚是一系列基因异常表达, 导致细胞生长调控失常的结果, 不同的肥大刺激信号可诱发特异性基因的活化, 产生各种特征性的心肌肥厚, 这主要取决于被启动的信号转导通路。GPCRs-PI3K $\gamma$  (phosphatidylinositol 3-kinase  $\gamma$ , 磷酸肌醇 3-激酶  $\gamma$ )-Ras-MAPKs (mitogen activated protein kinases, 有丝分裂原活化蛋白激酶)途径是细胞内信号转导通路, 调控细胞增殖分化, 对于心肌细胞肥大的发生、发展起重要作用<sup>[3]</sup>。

## 1 G 蛋白的生物学功能

与跨膜信息传递有关的异三聚体 G 蛋白(heterotrimeric GTP binding protein)由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚基所组成, 目前发现有 21 种  $\alpha$  亚基( $G\alpha$ ), 6 种  $\beta$  亚基和 12 种  $\gamma$  亚基, 它们可以形成多种特异性组合<sup>[4]</sup>。 $G\beta\gamma$  是膜结合蛋白, 在体内以异源二聚体形式存在, 作为一个功能单位参与细胞信号转导。过去认为  $G\beta\gamma$  不能直接调节效应器, 仅具有“关闭”激活的  $G\alpha$  的作用并增强  $G\alpha$  与膜的结合。近年来发现  $G\beta\gamma$  和  $G\alpha$  一样均可引起效应蛋白的激活, 在细胞信号转导中起同样重要作用。 $G\beta\gamma$  除调节  $G\alpha$ 、受体本身和许多效应分子如  $K^+$  通道、腺苷酸环化酶、磷脂酶 C- $\beta$ 、G 蛋白偶联受体激酶(G protein coupled receptor kinases GRKs)<sup>[5]</sup>, 还可以激活 PI3K $\gamma$ 、Ras、MAPKs 等, 参与引起细胞增殖反应的细胞内信号传递通路,  $G\beta\gamma$  还是 GPCRs 和受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinases RTKs)两种跨膜传导系统的交叉点<sup>[3]</sup>。

GPCRs 和 RTKs 协同调节 MAPKs 的激活, GPCRs 可能

通过与 RTKs 共有的信号途径产生有丝分裂信号, 进而促进细胞的增生分化。不同的 GPCRs 需要不同的 G 蛋白亚基介导激活 MAPKs,  $Gq/G11$  偶联的 M1 乙酰胆碱受体和  $\alpha$ 1-AR 主要经  $G\alpha$  激活 MAPKs;  $G_i$  偶联的 M2 乙酰胆碱受体,  $\alpha$ 2-AR 和  $G_s$  偶联的  $\beta$ -AR 主要经  $G\beta\gamma$  激活 MAPKs<sup>[6]</sup>,  $G\beta\gamma$  经 Ras 依赖的途径对 MAPKs 的活性及细胞周期进行调节。在  $G\beta\gamma$  激活 MAPKs 途径中, 细胞内效应物 PI3K $\gamma$ 、PLC $\beta$ 、Src 和小 G 蛋白 Ras 是早期介导环节, 这取决于细胞的种类与不同亚型的  $G\beta\gamma$ <sup>[3]</sup>。

2  $G\beta\gamma$  激活 PI3K $\gamma$ , 启动 GPCRs-PI3K $\gamma$ -Ras-MAPKs 信号通路

PI3K 是一族催化磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PtdIns)肌醇环上第 3 位羟基磷酸化的脂酶, PI3K 及其产物调节细胞增殖、分化、凋亡和细胞构架蛋白合成, 在细胞信号转导中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。PI3K 有 3 种同工酶, I 型为异源二聚体, 包括一个调节亚基(P85、P55/50、P101)和催化亚基 P110。P110 有 4 个异构体( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ), 都具有 Ras 结合位点。I 型 PI3K 可根据其结合的调节亚基的类型分为 A 和 B 两个亚型。I<sub>B</sub> 型 PI3K 家族成员是 PI3K $\gamma$ , 它由调节亚基 p101 和催化亚基 p110 $\gamma$  所组成, 其活性受 GPCR 调节。 $G\beta\gamma$  可结合 p110 $\gamma$  亚基, 直接激活 PI3K $\gamma$ , p101 亚基的功能是增加 PI3K $\gamma$  对  $G\beta\gamma$  刺激的敏感性<sup>[8]</sup>。PI3K $\gamma$  增加 Src 家族酪氨酸激酶活性, PI3K $\gamma$  可能是  $G\beta\gamma$  的下游激活物和 Src 家族酪氨酸激酶的上游激活物。在心肌细胞中,  $G\beta\gamma$  依赖的 MAPKs 激活可被 PI3K 的抑制剂 wortmannin 所抑制, 被  $G\beta\gamma$  直接激活的 PI3K $\gamma$  在  $G_i$  偶联受体活化 MAPKs 时起关键作用。 $\beta$ 2-AR 激动剂引起的新生大鼠心成纤维细胞蛋白合成过程中, 与  $G\beta\gamma$  相互作用的 PI3K $\gamma$  发挥了重要作用<sup>[9]</sup>。PI3K $\gamma$  参与  $G\beta\gamma$  活化 SAPKs (stress-activated protein kinase, 应激激活蛋白激酶)途径, 介导氧化应激所致的大鼠心室肌细胞蛋白合成。PI3K 在慢性压力负荷使代偿性心肌肥大转变为成失代偿性心力衰竭的过程中可能发挥重要的作用。

## 3 Ras 的活化及功能

Ras 是  $M_r = 21 \times 10^3$  的小 G 蛋白, 是 ras 基因产物,  $G\beta\gamma$

收稿日期: 2002-07-01

作者简介: 郑 猛(1975-), 男, 山东兖州人, 硕士生。

导致 MAPKs 的最终激活可被负显突变的 Ras 蛋白所阻断。G $\beta\gamma$  介导调制蛋白 Shc 的酪氨酸残基磷酸化, Shc 与 Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2, 生长因子受体结合蛋白 2) 相互作用形成有活性的 Shc-Grb2 复合物。c-Src 或 Src 样激酶, 如 Fyn、Lyn 和 Yes 酪氨酸激酶通过使调制蛋白 Shc 的酪氨酸残基磷酸化而增加 Shc-Grb2 复合物形成, 是联系 G $\beta\gamma$  与 Shc 的环节<sup>[10]</sup>。Sos(son of sevenless) 是胞质内 Ras 鸟苷酸释放因子, 它与 Shc-Grb2 中 Grb2 的 C 末端 SH3 结合后形成 Shc-Grb2-Sos 复合物。此复合物通过 G $\beta\gamma$  的转位作用转移至细胞膜, 引起膜质区 Sos 浓度的增高, 并导致 Sos 与其底物 Ras 相互作用, 使 Ras-GDP 成为活化型 Ras-GTP。由于 Ras 内源性 GTP 酶活性很低, 不能达到生理条件下水解 GTP、失活 Ras 的作用, 因此需在 GTP 酶激活蛋白 Raf-1 (丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶-1) 的催化下, 活化态 Ras 迅速水解 GTP, 从而结束其功能状态。同时, Raf-1 作为 MAPKK 激酶 (MAPK kinase kinase, MAPKKK) 使 MAPK 激酶 (MAPK kinase, MAPKK 或 MEK) 磷酸化活化<sup>[3]</sup>, 继之活化的 MEK 又对下游 MAPKs 丝氨酸、苏氨酸双位点磷酸化使其活化。

#### 4 MAPKs 家族简介

MAPKs 是一族  $M_r = 40 - 60 \times 10^3$  的蛋白激酶, 存在于细胞质和细胞核内, 能被许多与细胞生长、转化和分化有关的细胞外信号激活, 被认为是引起细胞增殖反应的细胞内信号传递的共同通路或汇聚点。在哺乳动物细胞已鉴定了 4 个 MAPKs 亚族: 细胞外信号调节激酶 (extracellular signal regulation kinase, ERKs), c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNKs) / SAPKs, ERK5 / 大丝裂原活化蛋白激酶 1 (BMK1) 和 p38 MAPK, 其中 JNK 和 p38 属于应激反应 MAPK (stress-responsive MAPK, SR-MAPK)。心肌肥厚发生过程中, 心肌细胞处于应激状态, SR-MAPK 被激活, 如果应激因素持续存在, 心肌细胞的正常生理活动将受到损害, 最终因心功能失代偿而导致心衰。

#### 5 p38 MAPK 在心肌细胞肥大中的作用

来自 G $\alpha_s$  / G $\alpha_i$  或 G $\alpha_q$  / G $\alpha_{11}$  的 G $\beta\gamma$  经 Ras-ERK 途径或 JNK 和 p38 MAPK 途径与效应器相互作用<sup>[11]</sup>。在 HEK293 细胞中,  $\beta$ -AR 和 M2-AchR 激活 p38 MAPK 主要依靠 G $\beta\gamma$ <sup>[9]</sup>。p38 MAPK 酪氨酸和苏氨酸残基被 MKK3/6 磷酸化而活化, 进而激活转录因子 ATF-2, CHOP 和 MAPK 激活蛋白激酶 2/3 (MAPKAP2/3), 后者磷酸化小热休克蛋白 25/27 (heat shock protein, HSP25/27) 从而诱导细胞因子基因转录<sup>[11]</sup>。p38 MAPK 有 6 个亚型 ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$  和  $\delta$ ), 人类心脏中主要是  $\alpha$  和  $\beta$  亚型。在幼鼠心肌细胞, p38 $\alpha$  引起肥大, p38 $\beta$  引起凋亡<sup>[12]</sup>。自发性高血压大鼠发生心肌肥厚时, 心肌 p38 MAPK 被持续活化, 诱导心肌纤维化和凋亡。P38 MAPK 调节炎性细胞因子如肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 白介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 的产生及其活性, 导致心肌肥厚、凋亡和收缩力降低等类似慢性心衰的表现<sup>[13]</sup>。p38 $\alpha$  特异性抑制剂 SB239063 可以明显降低自发性高血压大鼠心肌肥厚的发病率和死亡率, 同时心肌舒张功能明显改善<sup>[14]</sup>。在心肌缺血和再灌注早期, 应

用 p38 MAPK 抑制剂 SB203580 不但减少缺血后的心肌细胞凋亡, 而且明显改善再灌注后心脏功能的恢复<sup>[15]</sup>。因此, p38 MAPK 可作为治疗心肌肥厚并阻断向心衰发展的治疗靶点。

#### 6 心肌胚胎型收缩蛋白基因的表达

活化的 MAPKs 磷酸化核内多种转录因子, 调节细胞增殖所需基因的打开与关闭。磷酸化的转录因子使细胞初级应答基因 (primary response gene) 表达, 表达产物再作用于下游结构基因, 启动次级应答基因 (secondary response gene) 转录和翻译, 从而介导外界刺激物的细胞增生效应。初级应答基因主要是其产物在核内发挥转录因子作用的原癌基因, 如 c-jun, c-fos, c-myc 等<sup>[3]</sup>。次级应答基因主要是心肌胚胎型收缩蛋白基因, 包括  $\beta$  肌球蛋白重链 ( $\beta$ -myosin heavy chain,  $\beta$ -MHC)、骨架型  $\alpha$  肌动蛋白 (S,  $\alpha$ -actin) 和心钠素 (ANF), 这类基因的作用出现较晚, 而持续时间长, 可直接引起心肌蛋白合成, 细胞体积增大、间质细胞增殖和激素分泌<sup>[11]</sup>。心肌细胞有两种表型: 收缩型和合成型 (或称胎儿型)。MAPKs 激活后引起心肌细胞由收缩型向合成型迁移, 使  $\beta$ -MHC, S,  $\alpha$ -actin 过度合成, 结果细胞内蛋白含量上升, 细胞体积或横截面积增大, 从而产生心肌细胞肥大。但其表达蛋白为胎儿型, 收缩力下降, 耗氧增多, 且心肌重构后血供受阻, 当收缩型向合成型迁移达到最大时, 代偿性心肌肥厚转变成失代偿性心功能不全<sup>[16]</sup>。

#### 7 G $\beta\gamma$ 的应用前景

由于心肌肥厚的发病机制尚未完全明了, 故目前的治疗方法不能从根本上逆转心肌肥厚并阻断其向心衰发展。信号通路 GPCRs-PI3K $\gamma$ -Ras-MAPKs 在心肌细胞肥大过程中的作用重要, 起始环节 G $\beta\gamma$  对该通路起关键的调节作用, 可作为一个新的治疗位点, 在细胞信号转导水平治疗心肌肥厚。

#### 参考文献:

- [1] Hefti M A, Harder B A, Eppenberger H M, *et al.* Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(11): 2873.
- [2] Morris A J, Malbon C C. Physiological Regulation of G Protein-Linked Signaling [J]. *Physiol Rev* 1999, 79(4): 1373.
- [3] Lopez-Illasaca M. Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascade [J]. *Biochem Pharmacol* 1998, 56(3): 269.
- [4] Hamm H E. The many faces of G-protein signaling [J]. *J Biol Chem*, 1998 273(2): 669.
- [5] Schwindinger W F, Robishaw J D. Heterotrimeric G-protein  $\beta\gamma$ -dimers in growth and differentiation [J]. *Oncogene* 2001, 20 (13): 1653.
- [6] Yamauchi J, Nagao M, Kaziro Y, *et al.* Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by signaling through G-protein-coupled receptors [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272(44): 27771.
- [7] Chris J. Vlahos. Signaling pathways mediated by the  $\beta_2$ -adrenergic receptor in the fibroblast: a novel role for PI3-kinase [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(6): 1049.

- [8] Sathyamangla V, Prasad N, Esposito G, *et al.* G $\beta$  $\gamma$ -dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with *in vivo* pressure overload hypertrophy [ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275(7): 4693.
- [9] Colombo F, Noel J, Mayers P, *et al.*  $\beta$ -Adrenergic stimulation of rat cardiac fibroblasts promotes protein synthesis via the activation of phosphatidylinositol 3-kinase [ J ]. *J Mol Cell Cardiol*, 2001, 33(6): 1091.
- [10] Luttrell L M, Hawes BE, Lefkowitz R J, *et al.* Role of c-Src tyrosine kinase in G-protein-coupled receptor and G Subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases [ J ]. *J Biol Chem*, 1996, 271(32): 19443.
- [11] Pomerance M, Hannah-Belle A, Kamerji S, *et al.* Thyroid-stimulating hormone and cyclic AMP activate p38 mitogen-activated protein kinase cascade [ J ]. *J Biol Chem*, 2000, 275(5): 40539.
- [12] Singh K, Communal C, Sawyer D B, *et al.* Adrenergic regulation of myocardial apoptosis [ J ]. *Cardiovascular Res*, 2000, 45(3): 713.
- [13] Krown K A, Page M T, Nguyen C, *et al.* Tumor necrosis factor  $\alpha$  induced apoptosis in cardiac myocytes: involvement of the sphingolipid signaling cascade in cardiac cell death [ J ]. *J Clin Invest*, 1996, 98(12): 2854.
- [14] Behr T M, Nerurkar S S, Nelsen H, *et al.* Hypertensive end-organ damage and premature mortality are p38 mitogen-activated protein kinase dependent in a rat model of cardiac hypertrophy and dysfunction [ J ]. *Circulation*, 2001, 104(11): 1292.
- [15] Ma X L, Kumar S, Gao F, *et al.* Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decrease cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion [ J ]. *Circulation*, 1999, 99(13): 1685.
- [16] Lorell B H. Transition from hypertrophy to failure [ J ]. *Circulation*, 1997, 96(11): 3824.

(编辑 张敏瑞)

## Rh 抗原分子研究进展

赵 阳, 肖露露

(广州血液中心血型研究室, 广东 广州 510095)

关键词: Rh 血型; 多态性

中图分类号: R722.18

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2002)5S-0157-02

Rh 血型在 60 年前被首次提出, 现已证明至少有 45 个独立的等位基因, 在人类血型系统中最富有多态性, 是 ABO 血型之后最有临床输血意义的血型系统。自从认识 Rhd-NA (Rh 互补 DNA) 以来, 已开展了大量的工作去揭示隐藏在 Rh 系统抗原下的分子基础。通过克隆 cDNA 和对 Rh 蛋白的编码基因测序, 已对相关 Rh 抗原分子基础有了初步的了解。目前已知主要临床相关 Rh 抗原改变的基因机制包括基因缺失 (D 阴性表型), 基因互换 (C/c 多态性), 对位错义突变 (E/e), 其它错义突变 (VS 和 V)<sup>[1]</sup>。Rh 基因表现出庞大的分支, 不同的基因又在不同种族重组。本文从 Rh 抗原分子结构, 表型多态性与临床意义两方面简述之。

### 1 分子结构

D 的多样性可能比想象更普遍, 单克隆抗 D 与不同 Rh 基因人群红细胞反应又可有相同的格局。1 个例子是杂交基因编码的 D<sup>III</sup> 表型, 最近证实存在于纽约市的 18% 黑人和 28% 来自巴西的黑人<sup>[2]</sup>。D 存在时对 C 基因分型是困难的, 因为 RHC (E/e) 和 RHD 都在 1, 2 号外显子有鉴定序列, RHC 定型可能要通过揭示 RHCE 2 号内含子的多态性来完成, 它包括 RHC (E/e) 内的 109 对插入的 DNA, 但 Rhd (E/e) 或 RHD 内没有这种插入<sup>[3, 4]</sup>。目前所有的分子基因分型技术都可能对非洲黑人和亚洲人 D 阴性和携带无功能阴性 RHD 基因者误判为 D 阴性, 但少见于白种人<sup>[5]</sup>。人群中常见的不表达 RHD 基因限制了分子基因分型技术的临床应

用。2 个表达 dCe 表型的白人, 1 个的 RHD 基因 1 号外显子有一终止密码, 另 1 个在 4 号外显子缺失 4 个氨基酸<sup>[5]</sup>。对非洲人祖先的 RHD 主要沉默等位基因 (RHD<sup>ψ</sup>) 的分子基础测定中发现 DNA 有 37 对碱基, 是内含子 3/ 外显子 4 边缘的复制品, 在外显子 5 有一错义突变; 在外显子 6 有无义和错义突变<sup>[6]</sup>。D<sub>a</sub> 表型 (D 抗原可被吸收放散试验去除) 缺失 RHD, 包括内含子 8 外显子 9, 内含子 9 共 1013 个碱基对的缺失<sup>[7]</sup>。

特异性多克隆抗 D 与未知红细胞反应可鉴定部分 D 抗原表型, 同样可以通过已知部分 D 抗原表型的红细胞测定患者的抗 D 抗体。针对不同抗原决定簇的人类单克隆抗体现在可用来区分部分 D 抗原, 从早期模型 8~9 个到今天的 16, 30, 37 个 D 决定簇 (epD)<sup>[8]</sup>。影响 Rh 多态表现型基因机制至少有 4 种: ①重排, 发生在 RHCE 和/或 RHD 之间。②点突变, 引起任一氨基酸改变, 某些决定簇序列和/或低频抗原的丢失。③无义突变。④移码突变, 产生移码和成熟前终止密码。有证据显示 Rh 基因上存在 Alu IV 的重组热点<sup>[9]</sup>。缺失 D 决定簇可产生部分 D 抗原表型, 但缺失 1 个 D 决定簇不一定总会直接改变表型, 被顺式和反式基因编码的 Rh 蛋白也会影响单克隆抗 D。例如, R<sub>0</sub><sup>H<sub>0</sub></sup> 和 D<sup>V<sub>a</sub></sup> 一般不含有任何 RHD 外显子, 对单克隆抗 D 有交叉反应, 造成血清学鉴定 D 困难。因 1 个氨基酸置换或新的嵌合型蛋白的生成, 将影响 D 蛋白与单克隆抗 D 的接合。涉及连接单克隆抗 D 的某些蛋白已通过定点诱变技术 (SDM) 筛查, 显示 3 个 D 特异

收稿日期: 2002-07-03

作者简介: 赵 阳 (1972-), 男, 河南许昌人, 学士, 主管技师。