

磷脂酶 D2及其在神经退行性疾病中的作用

福建医科大学基础医学院免疫学系 (350004)

张洁莹 综述 朱玲 审核

摘要: 磷脂酶 D2 (PLD2) 作为细胞信号转导中一种重要的酶分子, 参与了细胞功能的诸多方面, 如细胞骨架重排、囊泡转运、细胞增殖、分化及凋亡等。本文从抗凋亡、细胞骨架重排和囊泡转运三方面就 PLD2 与神经退行性疾病的关系进行了一综述。

关键词: 磷脂酶 D2; 信号转导; 神经退行性疾病

磷脂酶 D (phospholipase D, PLD) 首先在植物中发现, 随后细菌和哺乳动物的 PLD 基因相继被克隆。哺乳动物的 PLD 有两种异构体: PLD1 和 PLD2。PLD2 作为细胞信号转导中重要的酶分子, 参与了细胞功能的诸多方面, 其具体的作用机制成为目前关注的热点。

1 PLD2 的特点

1.1 结构特点

随着对 PLD 研究的进一步深入, 现已证明 PLD 是一个多基因家族, 具有多分子的异质性, 其 cDNA 序列具有高度保守性^[1]。PLD2 作为 PLD 家族成员之一是继 PLD1 之后于 1997 年从啮齿动物中克隆出来的。hPLD2 基因全长 3.5 Kb, 开放读码框架 (open reading frame, ORF) 编码 933 个氨基酸残基, 分子量 106 kDa。PLD2 和 PLD1 约有 50% ~ 53% 的同源性, 包含所有真核生物 PLD 都具有的 I ~ IV 保守的一致性序列。其中 I 和 IV 包含具有催化作用的 HXKX4DX5GSXN 序列, 简称为 HKD 基序, 该基序在 PLD 家族中具有高度保守的特点。通过对 hPLD1 的研究表明 HKD 基序中的 His、Lys、Asp、Gly 及 Ser 残基为催化作用所必需^[2]。HKD 基序是 PLD 的标志序列, 是催化水解的活性部位。PLD2 的 N 末端由 1-308 的氨基酸组成, 其中包含了一个被命名为 PX 的区域 (包含 41-218 的氨基酸)。PLD2 的 C 末端的基序为所有真核生物 PLD 都具有的保守序列。Sung 等^[3] 通过实验得出了 N-末端并非 PLD2 活性所必需, 但可起到调节 PLD2 活性的作用。不同于 N-末端, C-末端则为 PLD2 催

化活性所必需的。

1.2 表达分布特点

PLD2 的分布十分广泛, 几乎在所有组织和细胞都有表达。Park 等^[4] 通过实验证明胚胎期的小鼠海马齿状回的颗粒细胞及出生后其小脑颗粒细胞中 PLD2 有较高水平表达, 这说明了 PLD2 在神经系统的发育方面有着重要作用。在亚细胞定位上, PLD2 主要位于细胞膜。Liscovitch 等^[5] 进一步发现 PLD2 主要是位于胞膜窖 (caveolae)。胞膜窖是细胞膜上特定的, 富含胆固醇、鞘磷脂 (sphingomyelin) 和鞘糖脂 (glycosphingolipids), 并且以窖蛋白 (caveolin) 分子为特征的一个信号分子聚集的场所。许多膜相关酪氨酸激酶位于胞膜窖中^[6]。由此可推测 PLD2 在信号转导中起着重要的作用。

1.3 抑制性调节的特点

虽然重组的 PLD2 具有较高的基础活性, 但在体内, PLD2 的活性受到许多蛋白的抑制。Jenco 等^[7] 借助蛋白微序列分析和 Western Blot 分析发现, 重组表达的 α 和 β -突触核蛋白 (synuclein) 能抑制 PLD2 的活性, 由于 PLD2 是信号转导中的重要分子, 而突触核蛋白与帕金森病 (PD) 和阿尔茨海默病 (AD) 等疾病发生均相关, 从而推测, 突触核蛋白对 PLD2 调控在神经系统变性疾病的发生发展中起着重要作用。Lee 等^[8] 在大鼠的脑细胞的胞质中发现了两种抑制 PLD2 活性的蛋白: Synaptotagmin 和网格蛋白 (AP180)。Synaptotagmin 主要是通过脱磷酸化使 PIP2 失活而抑制 PLD2 的活性, 与 Synaptotagmin 不同, AP180 则是通过直接与 PLD2 相作

基金项目: 福建省科技厅基金 (2004Y010)

收稿日期: 2005-12-13 修回日期: 2006-08-09

作者简介: 张洁莹 (1982-), 女, 在读硕士, 主要从事抗感染免疫研究。

通讯作者: 朱玲, Tel 0591-83569048

用来抑制它的活性。他们还发现了一种位于神经末梢的由 amphiphysin I (AmphI) 和 AmphII 所组成的蛋白也会抑制 PLD2 的活性。此外, PLD2 与许多细胞骨架蛋白(如 *gecklin*、肌动蛋白、辅肌蛋白)相联系, 这些蛋白也会抑制 PLD2 的活性^[9, 10]。

2 神经退行性疾病

神经退行性疾病主要包括: 阿尔茨海默病(AD)、血管性痴呆、帕金森病(PD)、Huntington 病、艾滋病所致神经病变、Pick 病以及药物和物理因素等所致痴呆。

神经退行性病变有两个主要特点: 老年斑块的沉积和神经纤维缠结。其表现为: ①脑退变和痴呆, 神经元数量减少及变性, 是由于 A β 沉积和轴突、树突及突触病变所致; ②血管性痴呆, 是由于血管病变、脑血管闭塞而致脑梗死及脑容量减少所致; ③老年性非特异性脑细胞变性及减少。因此, 保护皮质及皮质下结构神经元总量, 保持神经胶质细胞正常组合、形态及功能是十分重要的。

3 PLD2 与神经退行性疾病

3.1 PLD2 与神经细胞的凋亡

神经退行性疾病中神经细胞数目的减少主要是由凋亡引起的。细胞凋亡是一种主动的、受遗传控制的程序化现象, 是机体为更好地适应生存环境所采取的一种主动的、生理性的细胞死亡过程。但许多神经系统变性疾病的发病机制也与凋亡有关, 如帕金森病、阿尔茨海默病、肌萎缩侧索硬化症; 其它的一些神经系统疾病, 如脑梗塞和外伤, 病理过程中也涉及凋亡。短暂性脑缺血可引起神经元坏死或凋亡。

信号转导和氧化途径是引起细胞凋亡的两种机制。PLD2 作为信号转导中一种重要的磷脂酶, 其在细胞凋亡中的作用近年来已受广泛关注。Kim 等^[11]研究发现, 在谷氨酸盐所诱导的 PC12 细胞的凋亡中 PLD2 起着保护性作用, 通过在细胞内过量的表达 PLD2 会抑制由谷氨酸盐所诱导的细胞凋亡, 但其具体机制仍不清楚。还有研究发现在 H₂O₂ 所引起的 PC12 凋亡中 PLD2 起着重要的抗凋亡作用。Kim 等^[12]通过体内外实验证明了 PLD2 是通过与磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)结合后活化的。H₂O₂ 会引起 GAPDH 中的反应性半胱氨酸的改变, 这种变化一方面降低了 GAPDH 的酶活性, 另一方面则赋予 GAPDH 结合 PLD2 的活性从而活化 PLD2。Banno 等^[13]则通过研究进一步发现了 PLD2

活化后所参与的具体途径。他们认为活化后的 PLD2 参与了由 H₂O₂ 所诱导的 Src 和 Pyk2 的复杂混合物的形成并促进由 Src 所引起的 Pyk2 的磷酸化, 从而激活了抗凋亡的细胞活化信号途径 PI3K/Akt/p70S6K。

由此可见, PLD2 通过参与抗凋亡的信号途径在神经细胞的抗凋亡中起着重要的作用。

3.2 PLD2 与神经细胞轴突的生长

神经系统虽然具有损伤后修复或重建的能力, 但这个过程的实现既需要神经细胞自身具备发育适宜的各项条件, 又需要相当复杂的局部环境。脑部和脊髓的神经损害之所以很难得到修复, 很大部分原因是因为细胞表面对神经纤维起保护作用的髓磷脂阻碍了神经细胞轴突的生长。

目前已经发现大量对神经轴突生长具有导向作用的分子, 这些分子可以分为两大类: 一类分子固着在细胞膜表面或细胞外基质中, 影响局部的神经纤维生长, 这类分子包括 ephrin、髓鞘相关蛋白(myelin-associated glycoprotein, MAG)、Nogo 等; 另一类是分泌性分子, 能扩散一定的距离并形成浓度梯度起作用, 如 netrin、slit、semaphorin 家族的大多数成员, 及各种神经营养因子等。神经轴突前端的生长锥(growth cone)结构对环境信号起着探测的作用, 其表面存在各种导向分子的受体, 它们特异地识别环境中各种分子, 并向细胞内传递吸引或是排斥的信号, 从而引导神经纤维沿特定路线生长。

作为固着于质膜上的一种分子, PLD2 与神经轴突的关系已初见端倪。Klarlund 等^[14]将具有基础活性的 PLD2 转染到 PC12 细胞中会观察到轴突的生长。他们还进一步将 PLD2 的下游产物磷脂酸(phosphatidic acid, PA) 添加到 PC12 细胞的培养液中, 同样也观察到轴突的生长。这说明了 PLD2 可能是通过水解 PC 后得到的产物 PA 来促进轴突的生长。但他们并没有阐述体内的 PLD2 是如何活化的。Watanabe 等^[15]则将这一问题得到了解决, 他们通过研究发现引起 PC12 细胞轴突生长的信号主要是通过 ERK 信号通路来传导的。生长因子与细胞膜上的特异受体结合, 可使受体形成二聚体, 二聚化的受体使其自身酪氨酸激酶被激活; 受体上磷酸化的酪氨酸又与位于胞膜上的生长因子受体结合蛋白 2(Grb2) 的 SH2 结构域相结合, 而 Grb2 的 SH3 结构域则同时与鸟苷酸置换因子 SOS (Son of Sevenless) 结合, 后者使小分子鸟苷酸结合

蛋白 Ras 的 GDP 解离而结合 GTP, 从而激活 Ras。激活的 Ras 进一步与丝/苏氨酸蛋白激酶 Raf-1 的氨基端结合, 通过未知机制激活 Raf-1; Raf-1 可磷酸化 MEK1/MEK2 (MAP kinase/ERK kinase) 上的二个调节性丝氨酸, 从而激活 MEKs。MEKs 为双特异性激酶, 可以使丝/苏氨酸和酪氨酸发生磷酸化, 最终高度选择性地激活 ERK1 和 ERK2 (即 p44MAPK 和 p42MAPK), 进而磷酸化下游的 PLD2 使之活化。活化后的 PLD2 的水解磷脂酰胆碱 (phosphatidylcholine, PC) 生成 PA, PA 会激活 PP2 激酶从而增加 PP2 的合成, 在非神经元细胞的研究中已证实了 PP2 具有调节细胞骨架重排和胞膜运动的作用, 二者在神经细胞突触生长中都是必要的事件。Watanabe 等发现转染到 PC12 细胞中的 PLD2 主要分布在生长锥 (growth cone) 中, 并且在其周围发现了 F-肌动蛋白 (F-actin), 进一步证实了 PLD2 可通过调节细胞骨架的重排来促进轴突的生长。

3.3 PLD2 与神经递质释放

神经递质合成、贮存、释放或降解的异常, 以及受体数量或亲和性方面的改变, 都能影响神经传递并引起临床疾病 (如帕金森病、阿尔茨海默病)。神经递质贮存在神经末端部位的囊泡内, 突触前神经元的兴奋传到其轴突分支末端时, 使突触前膜对 Ca^{2+} 的通透性增加, Ca^{2+} 内流, 使囊泡膜与神经末端的膜融合, 激发许多囊泡同时释放出神经递质, 通过胞吐 (exocytosis) 将神经递质从开口处排出, 进入突触间隙。已证实在非神经元细胞中 PLD2 有促进胞吐的作用^[16, 17]。质膜上 PC 经 PLD2 作用转变为 PA, 而 PA 是一种致膜融合的磷脂。另外, PA 还通过降低膜联蛋白 (annexins) 对钙的需求而增强了膜联蛋白的作用。膜联蛋白是一种钙依赖的磷脂结合蛋白。它在分泌颗粒与质膜之间形成“桥联” (crosslinking), 促使膜的融合而在胞吐过程中起作用。因此, 我们可推测 PLD2 在神经细胞中也会通过调节膜囊泡转运控制神经递质释放。

在突触前膜的终末池中存在一种重要的调节突触囊泡循环的蛋白—— α -突触核蛋白。在体外的研究发现 α -突触核蛋白会通过 PLD2 的 N 端重复区域相结合并抑制其活性。那是相对于静息状态而言, 而当机体受到某些刺激, α -synuclein 对于 PLD2 的抑制作用就被胞质中活化的 G 蛋白偶联受体激酶解除^[18]。激酶通过磷酸化 α -synuclein 上特定位点使其丧失抑制 PLD2 的作用, 使得 PLD2

活化从而调节囊泡的形成和转运, 促进神经递质的释放。 α -synuclein 最早是从电鲟鱼的带电器官中分离得到的, 由于其分布于神经元的突触末梢和细胞核, 因此又称为突触核蛋白。大量的研究报道已表明, α -synuclein 是神经退行性疾病如帕金森病、阿尔茨海默病和伴有路易小体的痴呆的特征分子^[19]。在帕金森症的发病机制中, 有一种是因为磷酸化 α -synuclein 的激酶发生了变异, 由于酶发生了功能障碍, 使其不能使 α -synuclein 磷酸化, 则它对 PLD2 的抑制作用就无法解除而导致囊泡循环数量减少, 从而不利于神经递质的储存和释放。还有报道这种蛋白的突变能导致一种罕见的遗传性早发帕金森症^[20]。这可能是由于 α -synuclein 上的磷酸化位点发生了突变而导致其不能被磷酸化而造成的。这些为探讨 PLD2 与神经退行性疾病的关系提供了又一佐证。

4 发展前景

由此可见, PLD2 在减轻神经细胞的凋亡, 诱导神经细胞分化填补损伤区域及促进神经递质释放方面都起到一定的作用。这三个方面对于神经退行性疾病的治疗来说都是十分重要的, 而且为我们进一步研究 PLD2 与神经退行性疾病提供了很好的依据。且随着分子生物学的发展, 给我们更好的利用 PLD2 来治疗神经退行性疾病带来了希望, 我们可以尝试将上述基因包装在一种合适的载体中, 然后局部注射到大脑需要的位置, 那么这些基因就会在那里起到促进神经再生和防止神经变性死亡的作用。虽然目前这只是一设想, 但毕竟我们已经看到了希望的曙光。

参 考 文 献

- 01 Steed PM, Clark KL, Boyar WC, et al. Characterization of human PLD2 and the analysis of PLD isoform splice variants. *FASEB J*, 1998, 12(13): 1309-1317.
- 02 Sung TC, Roper RL, Zhang Y, et al. Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J*, 1997, 16(15): 4519-4530.
- 03 Sung TC, Altshuler YM, Morris AJ, et al. Molecular analysis of mammalian phospholipase D2. *J Biol Chem*, 1999, 274(1): 494-502.
- 04 Choi JS, Pak HJ, Jo YC, et al. Immunohistochemical localization of phospholipase D2 in embryonic rat brain. *Neurosci Lett* 2004, 357(2): 147-151.
- 05 Czamy M, Lavie Y, Ficuci G, et al. Phospholipase D2

- functional interaction with caveolin in low-density membrane microdomains. *FEBS Lett*, 2000, 467(2-3): 326-332.
- 06 Cohen AW, Hnasko R, Schubert W, et al. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev*, 2004, 84(4): 1341-1379.
- 07 Jenco JM, Rawlingson A, Daniels B, et al. Regulation of phospholipase D2: selective inhibition of mammalian phospholipase D isoenzymes by alpha- and beta-synucleins. *Biochemistry*, 1998, 37(14): 4901-4909.
- 08 Lee C, Kim SR, Chung JK, et al. Inhibition of Phospholipase D by Amphiphysins. *J Biol Chem*, 2000, 275(25): 18751-18758.
- 09 Park JB, Kim JH, Kim Y, et al. Cardiac Phospholipase D2 Localizes to Sarcolemmal Membranes and Is Inhibited by α -Actinin in an ADP-ribosylation Factor-reversible Manner? *J Biol Chem*, 2000, 275(28): 21295-21301.
- 10 Lee S, Park JB, Kim JH, et al. Actin directly interacts with phospholipase D, inhibiting its activity. *J Biol Chem*, 2001, 276(30): 28252-28260.
- 11 Kim KO, Lee KH, Kim YH, et al. Anti-apoptotic role of phospholipase D isozymes in the glutamate-induced cell death. *Exp Mol Med*, 2003, 35(1): 38-45.
- 12 Kim JH, Lee S, Park JB, et al. Hydrogen peroxide induces association between glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and phospholipase D2 to facilitate phospholipase D2 activation in PC12 cells. *Neuro Chem*, 2003, 85(5): 1228-1236.
- 13 Yoshiko B, Kenji O, Naoki M, et al. Implication of Phospholipase D2 in Oxidant-induced Phosphoinositide 3-Kinase Signaling via Pyk2 Activation in PC12 Cells. *J Biol Chem*, 2005, 280(16): 16319-16324.
- 14 Karlund K, Olejniczak D. Enhanced Outgrowth of Neurites in Response to Phosphatidic Acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002, 43: E-Abstract 1617.
- 15 Hiroshi W, Takeaki Y, Masakazu Y, et al. Essential role for Phospholipase D2 activation downstream of ERK/MAP Kinase in nerve growth factor-stimulated neurite outgrowth from PC12 cells. *J Biol Chem*, 2004, 279(36): 37870-37877.
- 16 O'Luanaigh N, Pardo R, Fensme A, et al. Continual Production of Phosphatidic Acid by Phospholipase D Is Essential for Antigen-stimulated Membrane Ruffling in Cultured Mast Cells. *Mol Biol Cell* 2002, 13(10): 3730-3746.
- 17 Choi WS, Kim YM, Combs C, et al. Phospholipases D1 and D2 Regulate Different Phases of Exocytosis in Mast Cells. *J Immunol* 2002, 168(11): 5682-5689.
- 18 Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A, et al. Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem*, 2000, 275(34): 26515-26522.
- 19 Minkolenko I, Plenikova O, Kavas CH, et al. Alpha-synuclein lesions in normal aging, Parkinson disease, and Alzheimer disease: evidence from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *J Neuropathol Exp Neurol* 2005, 64(2): 156-162.
- 20 Yanaguchi K, Cochran EJ, Murrell JR, et al. Abundant neuritic inclusions and microvacuolar changes in a case of diffuse Lewy body disease with the A53T mutation in the alpha-synuclein gene. *Acta Neuropathol (Berl)*, 2005, 110(3): 298-305.