

GRK5 功能缺失与阿尔茨海默病的相关性研究进展

赵仲艳, 何祥英, 吴婵姬, 文国强, 黄仕雄

(海南省人民医院神经内科, 海南 海口 570311)

【摘要】 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的发病机制涉及到很多方面, 新近研究表明 G 蛋白信号转导途径异常在 AD 的发病中起着重要作用。AD 患者脑中信号转导活性明显增强, 且信号转导缺陷的位点出现在“受体-G 蛋白界面”, 研究表明 G 蛋白耦联受体激酶(GRKs)功能缺陷, 主要是 GRK5, 与 AD 的发生联系密切。

【关键词】 GRK5; 功能缺失; 阿尔茨海默病

【中图分类号】 R741 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)01-0082-04

Research progress in the correlation study between GRK5 deficiency and Alzheimer's disease. ZHAO Zhong-yan, HE Xiang-ying, WU Chan-ji, WEN Guo-qiang, HUANG Shi-xiong. Department of Neurology, People's Hospital of Hainan Province, Haikou 570311, Hainan, CHINA

【Abstract】 The pathogenesis of Alzheimer's disease (AD) involves many aspects. Recent studies have shown that the G-protein signal transduction deficits play important roles in the pathogenesis of AD. The signal transduction activity in AD brain is significantly enhanced, and the site of the signal transduction defects is at the “receptor-G protein interface”. Studies have indicated that the G protein-coupled receptor kinases (GRKs) functional deficiency, primarily GRK5, plays a significant role in AD pathogenesis.

【Key words】 G protein-coupled receptor kinase5 (GRK5); Function deficiency; Alzheimer's disease

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种起病隐袭的进行性发展的神经系统退行性疾病, 临床表现为认知和记忆功能不断恶化, 日常生活能力进行性减退, 并有各种神经精神症状和行为障碍, 是老年期痴呆最常见的类型。AD 的病理学特征主要包括细胞外 β -淀粉样斑块(老年斑)、神经纤维缠结、神经元和神经突触异常丢失等^[1]。随着社会老龄化现象日益严重, AD 的患病率逐年增高, 现已成为导致老年人死亡的第四位主要原因。虽然对 AD 的研究已有 100 多年的历史, 并且提出多种发病机制, 但至今其病因仍未明确, 因此对该病目前仍无有效的治疗措施。而与此同时, 这个特殊患者群体的治疗费用也因治疗措施的昂贵而不成比例的增加, 因此充分理解 AD 发病机制对提高其预防治疗水平是非常迫切的。新近的研究表明 G 蛋白信号转导途径异常在 AD 的发病中起着重要作用。研究者们指出 AD 信号转导缺陷的位点出现在“受体-G 蛋白界面”, 即 G 蛋白耦联受体激酶(G protein-coupled receptor kinases, GRKs)主要的作用位点, 其中以 GRK5 (G protein-coupled receptor kinases-5, GRK5)与 AD 发病的关系最为密切。本文将详细的阐述 GRK5 功能缺失与 AD 之间的相关性。

1 GRKs 简介

1.1 GRKs 的种类、结构及分布 GRKs 属于丝/酪氨酸蛋白激酶家族, 主要功能是对 G 蛋白耦联受体(G Protein-coupled receptors, GPCRs)进行磷酸化, 抑制受体及下游信号的持续激活, 介导 GPCR 的脱敏反应^[2], 在多个生理系统中都发挥着广泛而多样的调节作用, 介导多种生理功能、病理过程及药物作用。GRKs 家族迄今已发现 7 种亚型, 按发现时间顺序分别命名为 GRK1~GRK7。而根据序列同源性及活性调控作用机制相似性它们又可分为 3 个亚家族: 视紫红质激酶亚家族(GRK1 和 GRK7)、 β 肾上腺素受体激酶亚家族(GRK2 和 GRK3)、GRK4 亚家族(GRK4、GRK5 和 GRK6)。不同家族成员的分布、底物各有特异性, 调节方式也不完全相同, 所表现出的生理功能也有所差异。视紫红质激酶亚家族主要分布在视网膜, β 肾上腺素受体激酶亚家族广泛分布在心、脑、肺、肾、骨骼肌等组织^[3], GRK4 亚家族中的 GRK4 仅在睾丸高水平表达^[4], GRK5、GRK6 则在全身各组织均有表达, 作用底物广泛。不同的 GRKs 异构体具有各自相应的选择性底物: 如 GRK2 基因敲除(GRK2KO)小鼠可以选择性的减低对肾上腺素能受体的去敏化, GRK6KO 小鼠显示出对多巴胺能超敏性^[5], 易发生自

身免疫性疾病^[6];而 GRK5KO 小鼠则表现出对乙酰胆碱能受体去敏感化功能的减弱^[7]。尽管如此,所有的 GRKs 成员都拥有一类似的结构组成:一个位于细胞外 N-末端由约 185 个氨基酸残基组成的弱保守区,一个由 263~265 个氨基酸残基组成的蛋白激酶催化区,和一个细胞内由 100~230 个氨基酸残基组成的 C-末端区。

1.2 GRKs 的功能 GRKs 的主要功能是使活化的 GPCRs 脱敏化,这个负性调节过程包括:活化受体的磷酸化、受体-G 蛋白结合的解耦联化及启动受体的内在化。GRKs 磷酸化激活状态下的 GPCRs,受体磷酸化后与抑制蛋白(Arrestin)结合,使受体与 G 蛋白脱耦联,引起受体脱敏。受体与抑制蛋白结合后参与网格蛋白(Clathrin)磷酸化的受体重新敏感化,并将其运回细胞膜再次利用^[2,8]。因此,位于 G 蛋白-受体界面的 GRKs 的主要功能就是使激活状态下的 GPCRs 发生脱敏,调节多种信号转达过程。

1.3 GRKs GPCRs 在受体去敏感化中的作用 GPCRs 是一个大家族,包括 M 型乙酰胆碱受体、肾上腺素受体、血管紧张素 II 受体等等。GPCRs 在中枢神经系统内对正常脑功能的维持具有极其重要的作用,它们与相应的受体激动剂结合后,通过与细胞膜内侧的 G 蛋白耦联,由 G 蛋白将信号传递至细胞内,继而产生一定的效应从而对细胞发挥作用。激动剂持续作用于 GPCRs 时,GPCRs 对激动剂的敏感性往往会下降,导致激动剂的效应性降低,称为去敏反应^[2,9]。研究认为 GPCRs 的磷酸化、调节蛋白 β -arrestin 与磷酸化的受体的结合而导致受体的内吞以及受体的下调等都是 GPCRs 减敏的主要机制^[9]。目前认为 GRKs 和 Arrestins 两大蛋白家族介导了这一快速的同源减敏:GRKs 先结合并磷酸化被激动剂占领的 GPCRs,GPCRs 被磷酸化后与 Arrestins 蛋白结合,使其与 G 蛋白脱耦联并发生内吞,阻止 GPCRs 与 G 蛋白发生作用,造成 GPCRs 功能减退,进而调控细胞内信号传递的级联反应。此外,如果 GRKs 功能出现异常,那么激活的 GPCRs 与它们对应的 G 蛋白脱耦联而启动受体的内在化势必会出现障碍,从而引起下游信号分子的持续激活而出现过度反应^[2,9]。

1.4 GRK5 作为 GRKs 家族中的一员,GRK5 除具有 GRK 家族的共同特点外还有其自身的特殊点。GRK5 由 590 个氨基酸残基构成,广泛分布于全身多种器官,对多种 GPCR 具有选择性的调节作用,在循环系统、呼吸系统、神经系统等系统生理功能调节中发挥着重要作用^[4]。GRK5 的 mRNA 在脑组织中

也有广泛表达。在中枢神经系统,GRK5 的 mRNA 适度表达于边缘系统、扣带皮质、隔-海马核、丘脑前核、海马椎体齿状回、中央松果体、蓝斑和小脑皮质,以侧间隔处的表达水平最高^[10]。GRK5 多表达于神经递质的分泌处,这说明 GRK5 在神经系统信号转导中起着重要作用。根据 GRK5 的分布和功能研究确定出了它的结构和功能域:N-末端磷脂酰环己六醇-4,5-二磷酸(PIP2)结合域、磷脂结合域、自体抑制结构域、两个钙调蛋白(CaM)结合域以及 DNA 结合细胞核定位序列。PIP2 结合域和磷脂结合域具有促进 GRK5 与膜结合的功能,这使 GRK5 能够直接和磷脂层结合,这与 GRK1、GRK4 和 GRK6 通过与脂质的共价修饰结合而与膜磷脂结合不同,属于 GRK5 特有的性质之一^[11]。CaM 结合区的存在使 Ca^{2+} /CaM 与 GRK5 的 CaM 结合位点直接作用,促使了 GRK5 的核输出作用^[12]。GRK5 除了可以介导多种 GPCR 信号转导外,它还能够结合并调节胞浆中多种非受体底物,有特殊的核定位信号序列,能发生细胞核-胞浆的穿梭,并可结合和影响转录因子^[4]。由于 GRK5 参与了多种细胞信号系统的转导,因此其可能与心脏病、高血压病、药物成瘾性和帕金森病、阿尔茨海默病等疾病的发生有关。目前对 GRK5 的研究多集中在这些疾病中。

2 GRKs 与 AD 的关系

神经信号传导系统失衡是 AD 的一病理学特征。主要表现为:(1)增强某些蛋白激酶的活性和(或)降低某些蛋白磷酸化酶的活性将有助于神经纤维变性^[13];(2)增加 A β 蛋白水解产生或降低 A β 蛋白的清除会使脑组织出现 β -淀粉样改变^[14];(3)过度激活神经小胶质细胞和星形胶质细胞会导致神经元出现炎症性损伤^[15]。研究发现,AD 患者的大脑信号传导系统普遍处于功能极度活跃的状态^[16],特别是各种 GPCRs 及其下游信号。更为具体的是,多位研究者指出信号转导缺陷的位点出现在“受体-G 蛋白界面”,即 GRKs 的主要作用位点^[17]。Suo 等^[18]于 2004 年最早提出了 GRKs 功能紊乱与 AD 发病相关的理论。研究显示功能性(膜上)GRK5 缺陷与 A β 沉积及早期 AD 存在联系,并发现阈下剂量 A β 可以诱导细胞膜上 GRKs 减低而胞浆内 GRKs 聚积^[19]。更有意义的是在早期 AD 转基因动物和患者体内均存在 GRKs 表达异常^[18]。机理研究揭示 GRKs 功能缺陷引起的受体脱敏障碍可能为 AD 致病因素创造了一种易感环境^[20]。所有这些都表明 GRKs 功能异常引起的 GPCRs 受体脱敏障碍在 AD 发病机制中具有重要潜在作用。

3 GRK5 功能缺失与 AD 的相关性

3.1 导致 GRK5 缺失的因素 胞膜结合力和胞质结合力之间的平衡调节决定了 GRK5 的亚细胞定位^[21],然而与 AD 或衰老有关的因素可以打破这一调节平衡导致膜 GRK5 的缺失。事实上,随着年龄增长 GRK5 的总量是逐渐增多的,但与低龄小鼠相比,老龄小鼠表现出严重的膜 GRK5 缺失,在 AD 中 GRK5 的缺失则更为严重,由此亦提示膜 GRK5 的缺乏与衰老中的基因变异可能有关。此外,研究已证实低剂量可溶性 A β ^[18]、谷氨酸、同型半胱氨酸及氧化应激等都可导致膜 GRK5 的缺失^[22]。

3.2 GRK5 功能缺失与 AD 的相关性

3.2.1 GRK5 功能缺失会出现早期 AD 的病理学特征 GRK5 基因的缺失同早期 AD 的病理改变具有密切的联系^[18,20,23]:(1)在体外低剂量可溶性 A β 预处理后,胞膜上的 GRK5 迅速移至胞质,使得 GRKs 的活性受到抑制,凝血酶信号通路中的 GRCP 受体不能及时脱敏,最终导致预处理后的细胞极度活跃。在转基因鼠及 AD 患者死后尸解的脑内同样存在此种情况^[18]。(2) GRK5KO 小鼠的动物模型认知行为学测试研究发现,GRK5KO 小鼠可以出现选择性的工作记忆障碍,而其他方面的认知功能没有受到损害,同时动物脑内总的乙酰胆碱(Ach)水平下降。同时研究还发现在 GRK5KO 小鼠显示年龄相关的海马区神经轴突的肿胀、缺失,严重时可以在部分小鼠中发现细胞外 γ -淀粉样纤维沉积,同时伴有轴突成分的变性。其脑内典型的病理改变为小鼠海马区内不典型的神经炎性斑块(Neuritic plaques, NPs)的增加。高倍镜下的研究显示这种 NPs 为一种由异常磷酸化的 Tau 蛋白聚集的,伴有 NFT 阳性蛋白的包绕的早期的营养不良性的未成熟的炎性斑块^[23]。(3)具有人 β -淀粉样前体蛋白 (β -APP) 基因突变的小鼠中同时进行 GRK5 基因敲除(GRK5KO)后,可以发现轴突的缺失和轻微的胆碱能神经元变性而导致的轻度认知功能障碍,而且当 β -APP 在 GRK5KO 小鼠中过表达时,具有这种双重基因突变的小鼠脑内炎症改变明显的加重^[20]。

3.2.2 GRK5 功能缺陷对机体损害具有一定的选择性 mAChR 受体属于 GPCR 受体家族,在持续的胆碱能刺激下胆碱能受体的去敏感化和复敏功能的正常是维持细胞内乙酰胆碱能神经递质传递的重要前提。目前已知 5 种 mAChR 亚型(M1、M2、M3、M4 和 M5 受体)。在海马区域中的 M 受体主要是 M1、M2 和 M4,其中 M1 受体位于突触后膜,M2/M4

受体则位于突触前膜。已有研究证明,AD 动物模型脑内突触后 M1 受体的信号减弱,同时会增加 Tau 蛋白磷酸化水平,导致神经纤维的变性,体外实验已证实 M1 受体激动剂可以降低 Tau 蛋白的磷酸化;而且 M1、M3 和 M5 受体信号显示具有抗凋亡作用^[24],而 M2 和 M4 受体则无类似作用。目前已公认海马区内 Ach 水平的减少可导致胆碱能神经元中 Tau 蛋白磷酸化,加重神经纤维的变性以及细胞的凋亡。研究发现用毒蕈碱刺激 GRK5KO 小鼠可引起中枢和外周反应,且这种反应主要是由 M2 受体的功能受到调节所导致^[25],这提示 GRK5 缺陷对于 M2 的影响具有亚型选择性,且已有研究证实了这一发现并进一步论述这种选择性主要针对 mAChR 受体中全部 M2、部分 M4,但不包括 M1^[26]。GRK5 功能缺陷可引起突触前 M2 受体信号的延长或突触前胆碱能过度活跃,而突触前胆碱能过度活跃反过来会降低海马记忆回路中 Ach 的释放,使得包括突触后 M1 在内的突触后胆碱能活动减退^[26]。这可能是促成与 AD 密切相关的海马内胆碱能功能低下的原因。

3.2.3 GRK5 缺失可增强低浓度 A β 潜在的毒性效应 高浓度的 A β 对神经元、星型胶质细胞和血管内皮细胞具有直接的毒性作用,并可导致剂量依赖性的小胶质细胞激活^[27]。这意味着当 A β 浓度低于致细胞毒性的域值,即域值浓度以下(Sub-threshold)时,它所导致的多种有害效应将会难以观察到,但是这并不意味着域值下浓度的 A β 没有任何效应。有研究表明域值浓度下的 A β 可明显增强内皮缩血管肽-1 (Endothelin-1) 所致的血管收缩^[28],引起脑血流量降低,且这亦可发生在早期 AD 患者中^[29]。进一步的研究表明,域值浓度下 A β 可通过激活一定的 GPCR 受体(如凝血酶、谷氨酸等)而导致海马小胶质细胞的激活并且可能促进 Tau 蛋白的过度磷酸化和聚集^[20-30]。GRK5 缺失会导致 GPCR 去敏感化降低,增强 GPCR 对相应受体的刺激反应度,因此针对一定的 GPCR 刺激,域值浓度下 A β 似乎可以增加细胞的敏感性及反应性^[18]。

3.2.4 GRK5 缺失为两种假说之间联系的纽带 在 AD 众多的发病假说中,A β 淀粉样蛋白沉积假说和胆碱能损伤假说是目前广为接受的两种。前者认为 AD 发病的核心是 A β 在脑内沉积;后者则提出中枢胆碱能神经功能障碍是 AD 认知功能下降的主要原因。而 GRK5 功能缺陷可成为联系二者之间的桥梁:一方面 A β 是诱导 GRK5 缺乏的主要因素之一;另一方面 GRK5 缺乏会选择性地导致胆碱能功能损

伤。由此形成一恶性循环,导致 A β 异常积聚和胆碱能异常,加速 AD 的病理进程。

综上所述,GRK5 基因缺陷同 AD 的早期的病理改变以及动物认知水平下降具有密切联系,且 GRK5 基因缺陷可致 M2/M4 受体去敏化作用的减弱进而引起乙酰胆碱水平降低,这些将为今后进一步评估目前对于试图通过纠正低胆碱能活性治疗 AD 的策略,以及纠正 GRK5 的缺陷对于阻止或延缓 AD 疾病进展的作用提供重要的理论基础。

参考文献

- [1] Nelson PT, Braak H, Markesbery WR. Neuropathology and cognitive impairment in Alzheimer disease: a complex but coherent relationship [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2009, 68(1): 1-14.
- [2] Kohout TA, Lefkowitz RJ. Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization [J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 63(1): 9-18.
- [3] Premont RT, Gainetdinov RR. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins [J]. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 511-534.
- [4] Watari K, Nakaya M, Kurose H. Multiple functions of G protein-coupled receptor kinases [J]. *J Mol Signal*, 2014, 9(1): 1.
- [5] Gainetdinov RR, Bohn LM, Sotnikova TD, et al. Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice [J]. *Neuron*, 2003 38(2): 291-303.
- [6] Nakaya M, Tajima M, Kosako H, et al. GRK6 deficiency in mice causes autoimmune disease due to impaired apoptotic cell clearance [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1532.
- [7] Walker JK, Gainetdinov RR, Feldman DS, et al. G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(2): L312-L319.
- [8] Ribas C, Penela P, Murga C, et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1768(4): 913-922.
- [9] Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling [J]. *Pharmacol Rev*, 2001, 53(1): 1-24.
- [10] Gainetdinov RR, Premont RT, Bohn LM, et al. Desensitization of G protein-coupled receptors and neuronal functions [J]. *Annu Rev Neurosci*, 2004, 27: 107-144.
- [11] Yang P, Glukhova A, Tesmer JJ, et al. Membrane orientation and binding determinants of G protein-coupled receptor kinase 5 as assessed by combined vibrational spectroscopic studies [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e82072.
- [12] Johnson LR, Scott MG, Pitcher JA. G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence [J]. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(23): 10169-10179.
- [13] Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, et al. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2000, 33(1): 95-130.
- [14] Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics [J]. *Science*, 2002, 297(5580): 353-356.
- [15] Mcgeer PL, Mcgeer EG. Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease [J]. *Neurobiol Aging*, 2001, 22(6): 799-809.
- [16] Saitoh T, Horsburgh K, Masliah E. Hyperactivation of signal transduction systems in Alzheimer's disease [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1993, 695: 34-41.
- [17] Suo WZ, Li L. Dysfunction of G protein-coupled receptor kinases in Alzheimer's disease [J]. *Scientific World Journal*, 2010, 10: 1667-1678.
- [18] Suo Z, Wu M, Citron BA, et al. Abnormality of G-protein-coupled receptor kinases at prodromal and early stages of Alzheimer's disease: an association with early beta-amyloid accumulation [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(13): 3444-3452.
- [19] Zhang Y, Chen L, Shen G, et al. GRK5 dysfunction accelerates tau hyperphosphorylation in APP (swe) mice through impaired cholinergic activity [J]. *Neuroreport*, 2014, 25(7): 542-547.
- [20] Li L, Liu J, Suo WZ. GRK5 deficiency exaggerates inflammatory changes in TgAPPsw mice [J]. *J Neuroinflammation*, 2008, 5: 24.
- [21] Sallèse M, Iacovelli L, Cumashi A, et al. Regulation of G protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1498(2-3): 112-121.
- [22] Stanciu M, Wang Y, Kentor R, et al. Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(16): 12200-12206.
- [23] Suo Z, Cox AA, Bartelli N, et al. GRK5 deficiency leads to early Alzheimer-like pathology and working memory impairment [J]. *Neurobiol Aging*, 2007, 28(12): 1873-1888.
- [24] Sadot E, Gurwitz D, Barg J, et al. Activation of m1 muscarinic acetylcholine receptor regulates tau phosphorylation in transfected PC12 cells [J]. *J Neurochem*, 1996, 66(2): 877-880.
- [25] Walker JK, Gainetdinov RR, Feldman DS, et al. G protein-coupled receptor kinase 5 regulates airway responses induced by muscarinic receptor activation [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286(2): L312-L319.
- [26] Liu J, Rasul I, Sun Y, et al. GRK5 deficiency leads to reduced hippocampal acetylcholine level via impaired presynaptic M2/M4 autoreceptor desensitization [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(29): 19564-19571.
- [27] Fang F, Lue LF, Yan S, et al. RAGE-dependent signaling in microglia contributes to neuroinflammation, A β accumulation, and impaired learning/memory in a mouse model of Alzheimer's disease [J]. *FASEB J*, 2010, 24(4): 1043-1055.
- [28] Suo Z, Su G, Placzek A, et al. A beta vasoactivity *in vivo* [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 903: 156-163.
- [29] O'Barr S, Cooper NR. The C5a complement activation peptide increases IL-1 β and IL-6 release from amyloid-beta primed human monocytes: implications for Alzheimer's disease [J]. *J Neuroimmunol*, 2000, 109(2): 87-94.
- [30] Suo Z, Wu M, Citron BA, et al. Rapid tau aggregation and delayed hippocampal neuronal death induced by persistent thrombin signaling [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(39): 37681-37689.

(收稿日期:2014-05-22)