

神经性疾病相关的谷氨酸转运体研究进展

杨娜¹, 隋峰^{2*}, 姜廷良^{2*}

(1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069;
2. 中国中医科学院中药研究所唐氏中药研究中心, 北京 100700)

[摘要] 谷氨酸是哺乳动物中枢神经系统中最重要神经递质之一。谷氨酸转运体可分为兴奋性氨基酸转运体 (excitatory amino acid transporters, EAATs), 即高亲和力转运体和囊泡谷氨酸转运体 (vesicular glutamate transporters, VGLUTs), 即低亲和力转运体 2 种类型。其中, EAATs 为维持正常的兴奋性突触的转运及受体激活所必需, 人类已发现有 5 个胞浆膜谷氨酸转运体亚型 (EAAT1-EAAT5); VGLUTs 的功能是特异地将突触囊泡外的谷氨酸转运至突触囊泡内, 主要由 3 个成员组成, 分别为 VGLUT1, VGLUT2 和 VGLUT3。近年研究发现: 很多神经系统疾病都伴随着谷氨酸转运体功能的异常, 且其病理特征与谷氨酸转运体亚型、分布、结构以及功能相关。有报道认为, 中药中某些成分如麝香酮抗脑缺血损伤与其调节谷氨酸转运体有关。

[关键词] 谷氨酸; 谷氨酸转运体; 神经系统疾病

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2011)07-0255-04

Glutamate Transporters Involved in Disorders of Central Nervous System

YANG Na¹, SUI Feng^{2*}, JIANG Ting-liang^{2*}

(1. School of Chinese Materia Medica, Capital medical university, Beijing 100069, China;
2. Tang Center for Herbal Medicine Research Institute of Chinese Materia Medica China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] Glutamate transporters play a key role in the central nervous system (CNS). Glutamate transporters comprise of excitatory amino acid transporters (EAATs) and vesicular glutamate transporters (VGLUTs). In addition to their fundamental role in mediating neurotransmitter uptake, EAATs may contribute to the modulation of a variety of cellular processes. Activation of the excitatory amino acid (EAA) carriers generates an electrogenic current attributable to ion-coupled cotransport. Structurally distinct subtypes of human glutamate transporters, EAAT1-EAAT5 (1, 2, 11), have been identified and characterized by molecular cloning. VGLUTs transport specifically glutamates into synaptic vesicles in the presynaptic terminal for further release into the synaptic cleft. VGLUT1, VGLUT2 and VGLUT3 are three subtypes of VGLUTs. Recent studies show that many central nervous system disorders are accompanied by abnormal functions of glutamate transporters and the pathological characteristics of the disease are closely related to the particular subtypes, distribution, structures and functions of the glutamate transporters.

[Key words] vesicular glutamate; glutamate transporter; central nervous system disorder

[收稿日期] 20101029(005)

[基金项目] 国家重大新药创制(2009ZX09301-005)

[第一作者] 杨娜, 硕士, 研究方向: 中药药理, Tel: 13810117843, E-mail: yona.yangna@gmail.com

[通讯作者] * 隋峰, 副研究员, 研究方向: 中药药理与中药药性, Tel: 010-64041008, E-mail: suifeng2136@126.com, * 姜廷良, 研究员, 研究方向: 中药药理与新药开发, Tel: 010-64041008, E-mail: jiangt2005@sohu.com

谷氨酸是哺乳动物体内主要的兴奋性神经递质,与突触的适应性和记忆以及神经和胶质细胞的死亡关系密切。谷氨酸经囊泡上谷氨酸转运体(VGLUTs)摄取后,主要贮存于突触的囊泡内。一旦释放后,则在突触内通过离子型或代谢型受体的介导而起效,发挥作用后很快被位于星形胶质细胞和神经细胞胞浆膜的兴奋性氨基酸转运体(EAATs)所终止。VGLUTs 和 EAATs 分属 2 个不同的转运体家族,两者在功能特征方面有很多不同之处。近年,通过基因敲出或其他实验模型的研究对这两类转运体的生理功能和病理意义有了更深入的了解,尤其是在神经疾病中的生理学意义和调节作用等受到了极大的关注。研究表明,EAATs 的功能和表达改变与中风、癫痫、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、阿尔茨海默病(AD)、帕金森(PD)、亨灵顿舞蹈病(HD),HIV 感染相关的痴呆病、恶性胶质细胞瘤以及其他神经疾病关系密切。也有报导称,患 PD 和 AD 疾病的患者 VGLUT 缺失。

表 1 囊泡谷氨酸转运体(VGLUTs)

转运体		主要分布			位置	是否与其经神经递质标记物共存	
VGLUTs(SCL17A7)	新皮质(I-III)	梨状皮质	内鼻皮质	背侧纹状体	小脑	突出前	否
VGLUTs(SCL17A6)	新皮质(IV)	绣球	齿状回	伏隔核	下丘脑	突出前	否
VGLUTs(SCL17A8)	分布广泛、不集中					突出前 细胞体 树突	是

神经发育过程中,VGLUTs 的表达是受到严格调节和控制的。最初的研究发现,VGLUT1 和 VGLUT2 的表达部位具有一定的互补性,VGLUT1 主要表达在大脑和小脑皮质及海马中,而 VGLUT2 则表达在皮质下神经细胞中。而近年研究表明,这两个亚型也会共同表达在同一突触末端。在成年机体中枢神经系统中,囊泡中谷氨酸的摄取有 80% 由 VGLUT1 来完成的。基因敲低小鼠实验表明 VGLUT1 在神经突触可塑性的发育和形成过程中起到一定的作用,但出生的早期缺乏这种转运体可由 VGLUT2 部分性的进行补偿。VGLUT3 不仅表达在谷氨酸能神经,也表达在 γ -氨基丁酸(GABA)、5-羟色胺能和胆碱能神经中,提示:表达 VGLUT3 的神经尚能同时释放氨基酸和其他类的神经递质^[4]。

EAATs 为维持正常的兴奋性突触的转运及受体激活所必需。EAATs 属 SLC1 家族成员之一。到目前为止,人类已发现有 5 个胞浆膜谷氨酸转运体亚型(EAAT1-EAAT5)(表 2)。EAAT1 和 EAAT2 表达在胶质细胞中,EAAT3 和 EAAT4 在神经细胞上,EAAT5 则在视网膜细胞上。近来的分子学和生物物理学的证据显示,EAAT 由 3 个相同亚基组成,并与 Na^+ 、 K^+ -ATP 酶在功能上形成了偶合,组成了大分子复合体。目前的化学计量学模型表明,EAATs 是通过“交替接近机制”发挥作用,通过这种机制 1 分子的谷氨酸与 3 个 Na^+ 和 1 个 H^+ 同向转运至胞内相耦合。另外,EAATs,尤其是 EAAT4 和 EAAT5,还可作为氨基酸门控的 CL 通道,形成了在化学计量学上不与谷氨酸摄取相耦合的阴离子流^[5,6]。

1 谷氨酸转运体的分布及生理学特征

到目前为止,已经发现了 3 种 VGLUTs 亚型-VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3,其功能特征也已经得到了相应的鉴别(表 1)。VGLUT1 和 VGLUT2 选择性表达在谷氨酸能神经的突触前膜的末端,而 VGLUT3 则表达在谷氨酸能和非谷氨酸能神经的胞体和树突以及星形胶质细胞中^[1-2]。谷氨酸神经递质是通过磷酸酶激活的谷氨酸酶的作用在突触前末端由谷氨酸合成,并通过谷氨酸转运体转运至突触前囊泡腔内。VGLUT 各亚型属于溶质转运蛋白家族(SLC)中 SLC17 I 型磷酸盐转运体家族。各成员之间具有高度的同源性,由 12 个跨膜区域组成。谷氨酸摄取的动力来自于空泡型 ATP 酶在囊泡膜上形成的氢离子依赖性的电学梯度。与其他神经递质转运体不同的是,VGLUTs 的动力主要依赖于囊泡膜上的电势梯度,而非 pH 梯度^[3]。

表 2 兴奋性氨基酸转运体(EAATs)

谷氨酸转运体亚型	细胞型	分布
EAAT1	胶质细胞和寡树突胶质细胞	小脑、皮质和脊髓
EAAT2	胶质细胞	全脑和脊髓
EAAT2b	胶质细胞和神经	全脑和脊髓
EAAT3	神经(高密度分布于突出后膜)	海马、纹状体和小脑
EAAT4	浦肯野细胞(突出周边和树突脊)	小脑
EAAT5	光受体和双极细胞	视网膜

脑内星形胶质细胞上的 EAATs,主要是 EAAT2,负责谷氨酸的大量摄取。星形胶质细胞的 EAATs 有很多重要的功能:①终止谷氨酸的突触效应;②防止胞外谷氨酸的潜在毒性蓄积;③将谷氨酸递质递呈给星形胶质细胞以合成谷氨酸,参与氨的解毒和循环;④传递邻近神经元的代谢需求,激活星形胶质细胞的糖酵解。表达在脑星形胶质细胞终足毛细血管上的 EAAT1 和 EAAT2,可将脑内谷氨酸转运至血管内,从而防止谷氨酸形成蓄积毒性,起到了神经保护的作用。体外研究尚表明,啮齿动物同源物 EAAT2(GLT1)与水通道蛋白亚型 4(AQP4)和 K^+ 通道 Kir4.1 在星形胶质细胞共存,提示神经系统中可能存在着活性依赖的谷氨酸摄取、细胞体积以及 K^+ 稳态等生物学过程相互之间的耦合机制^[7,8]。

神经元上的 EAATs,包括 EAAT3 和 EAAT4,可以控制突触后代谢型谷氨酸受体的激活,并限制谷氨酸在相邻突触间

的溢出,例如,位于小脑浦肯野细胞中的 EAAT4,限制了参与细胞突触可塑性形成的代谢型谷氨酸受体的激活。位于前脑神经元的主要谷氨酸转运体是 EAAT3,通过其对谷氨酸摄取的调节,控制着 GABA 前体物的获取,从而影响抑制性中间神经元 GABA 的生物合成。EAAT5 的离子通道样特性可能在调节视网膜突触传递过程中发挥着一定的作用^[9,10]。树突状细胞上也存有 EAAT1, EAAT2, EAAT3 等 EAATs。这些转运体在机体发育过程中均起着不同的作用,并被认为是白质中谷氨酸移除的主要机制。EAAT 的功能受多种因素的影响。短期的调节包括募集和翻译后调节,尤其是磷酸化过程。与谷氨酸受体一样,EAATs 与胞浆膜多种蛋白有着明显的相互作用。其固有的活性和在细胞膜表面的表达量即受到它们与骨架蛋白相互作用的调节,也与蛋白激酶的活性(PKC、磷酸酶等)有关。生长因子、神经肽、肿瘤坏死因子等神经化学因素对胞浆膜募集 EAATs 和 EAATs 活性有一定的影响^[11-12]。

长期的调节作用主要包括启动子水平的 EAAT 表达量的变化和转录产物的选择性 mRNA 剪切。通过对 GLT1/EAAT2 启动子的识别,目前已可进行 EAATs 的转录调节研究。最近采用整体和离体模型的研究表明,神经轴突与星形胶质细胞的相互作用是星形胶质细胞的 GLT1/EAAT2 在启动子水平上转录激活的充分和必要条件。许多神经化学信号均可影响 EAAT2 启动子,例如表皮生产因子(EGF)和转化生产因子(TGF)- α 可增强 EAAT2 的转录,而 TNF- α 则对其产生抑制作用^[13]。

2 神经性疾病方面的意义

鉴于谷氨酸能的神经传递在神经兴奋的过程中扮演关键角色,不难理解 EAATs 的功能损伤可能引起谷氨酸介导的神经和胶质细胞受损,目前已知脑缺血、创伤、癫痫、脱髓鞘性疾病以及其他多种神经退行性疾病与此相关^[14]。EAAT 功能的失常可能涉及多种机制及环节,如 EAAT mRNA 剪切、表达量、募集,EAAT 磷酸化和翻译后蛋白的修饰等方面的异常,以及 EAAT 转运能力下降和星形胶质细胞 EAAT 功能失调等。有研究将编码 GLT1/EAAT2 的基因敲除,小鼠海马区发生了病变,并出现了癫痫,数周后死去;大鼠 GLAST/EAAT1 和 GLT1/EAAT2 缺失后出现了谷氨酸引起的兴奋毒和进行性麻痹,而 GLAST/EAAT1 缺失小鼠则发生了由于创伤性或缺血性损伤引起的严重小脑水肿。在转基因氧化物变化酶 1(SOD1) ALS 模型中脊髓的 GLT1/EAAT2 的表达出现了减少。这些研究结果表明,EAAT 在与能量耗竭相关的多种病理过程以及神经退行性疾病中扮演一定角色^[15]。

异常的 EAAT2 RNA 剪切将形成截短的 mRNA,会产生截短的 EAAT2 蛋白,最终导致有功能的转运体的数量相对减少。有关异常 EAAT2 mRNA 剪切的首次报导是在 ALS 中。最近也有研究报道谷氨酸介导的兴奋毒可能对 ALS 的神经功能缺失的发生至关重要,但选择性 mRNA 剪切引起的 EAAT2 表达异常并不只存在于该疾病中,也有报道于其他疾

病中,如 AD、胶质细胞瘤、颞叶癫痫等。值得注意的是,剪切变异体也存在于 ALS 病人的非病变组织或正常个体中。体外实验表明,在 AD 中,淀粉样斑块附近的海马组织中 EAAT2 表达下降,且 β -淀粉样物质减少了胶质细胞 EAAT 的表达和谷氨酸转运。此外,患有难治性癫痫的病人手术切除的脑组织样本中也多次被发现有 EAAT 表达的异常变化,如患有颞叶癫痫的患者,发生硬化的海马中 EAAT2 的表达下降等。另外,在新皮质癫痫患者中尚发现有神经 EAAT3 和 EAAT4 mRNA 表达减少^[16-18]。

研究表明,在缺氧、癫痫以及其他能量耗竭的疾病过程中,星形胶质细胞中 EAAT2 的功能会发生损伤,EAAT2 对谷氨酸可能产生反转运,而导致胞外谷氨酸的大量堆积,这些病理变化的发生可能与 EAAT2 胞内氨基酸残基被非氧自由基的氧化有关,也可能与驱动钠离子依赖性的转运谷氨酸的 ATP 酶活性的缺失有关。韦尼克(Wernicke)脑病可能与 EAAT1 和 EAAT2 的缺失密切相关,而人室周白质软化症患者缺氧和缺血损伤区,胶质细胞和巨噬细胞 EAAT2 的表达则发生了上调;多发性硬化症的兴奋毒引起的白质损伤可能与寡树突胶质细胞的 EAAT1 和 EAAT2 的表达减少有关;神经退行性疾病也报道发现 VGLUT 的表达发生了变化^[19]。

VGLUT1 和 VGLUT2 是谷氨酸能神经的特异标记物,它们的表达变化能够反应神经退行性疾病谷氨酸能神经末端的完整性,如,在 AD 中,VGLUT1 和 VGLUT2,尤其是后者,在前额叶皮质区表达下降,其下降的程度与认知的损伤程度呈一定的相关性^[20],而在患有 PD 的脑壳核中,VGLUT1 和 VGLUT2 的表达略微升高(分别上升 24% 及 29%),在前额和颞叶皮质区则下降了 50%,这些变化可能能够反应出谷氨酸能神经或末端发生损伤,或谷氨酸能神经传递过程中活性依赖的可塑性产生了变化,抑或两者兼有。总之,这些实验数据表明,神经退行性疾病与谷氨酸能神经传递的功能损伤有密切关系^[21]。

3 中药对谷氨酸转运体的影响

应用传统中药治疗神经性疾病已经具有悠久的历史,而以谷氨酸转运体为药物作用靶点开发中药新药则是一种全新的视角。近年来,随着多种谷氨酸转运体亚型被克隆,人们以谷氨酸转运体为药靶,寻找和发现新的神经保护药物的研究亦逐年增多,目前已有多种药物被报道对谷氨酸转运体具有激动或抑制作用^[22]。如头孢曲松、苯环己哌啶、胞二磷胆碱、利鲁唑、凝血酶、蛋白激酶 B 等能够上调 EAAT2 的活性;依托咪酯、氯氮平、天冬酰胺类衍生物、内皮素等下调 EAAT2 的活性。麝香在中医临床上常用于治疗脑缺血、脑炎等脑病,是芳香开窍的代表性药物。有研究认为^[23]其主要活性成分麝香酮可下调 EAAT3 的表达,而 EAAT3 在脑缺血状态下起逆向转运作用,可促使谷氨酸从胞内向胞外释放,产生兴奋毒性,EAAT3 的下调意味着谷氨酸转运体 EAAT3 逆向转运减少,从而减轻了兴奋性毒性作用。据此推之,麝香抗脑缺血损伤和减轻脑梗塞的临床疗效可能与其活性成分

麝香酮的兴奋性毒性的抑制作用相关。有研究认为,增强谷氨酸的兴奋性毒性可能是 6-羟基多巴胺(6-OHDA)的神经毒性机制之一,而 6-OHDA 的神经毒性性与帕金森病有关。环维黄杨星-D(CVB-D)是从黄杨木中提取的有效单体,研究发现^[24],CVB-D 对 PC12 细胞的保护作用可能与其增强谷氨酸转运体的转运功能以及对 6-OHDA 诱导的 PC12 细胞死亡产生的保护作用关系密切。

4 体会

大量的实验数据支持 VGLUTs 和 EAATs 对中枢神经突触内谷氨酸稳态的维持扮演着关键角色,也因此与多种神经性疾病的发生密切相关。有研究认为,VGLUT 表达的变化是神经末梢或突触末端早期损伤的标记物^[20],而 EAAT 活性的下降可能是神经和胶质细胞兴奋毒损伤的重要影响因素^[15],提示:通过调节谷氨酸转运体的功能从而促进神经保护可能是一个有效的干预和治疗策略,针对这一环节和相关机制研发高质量新药将有可能为谷氨酸转运相关的神经性疾病的治疗提供一种新途径。值得关注的是,在中医临床疗效的指引下,以谷氨酸转运体为靶点,从中药中寻找和挖掘治疗神经相关疾病的中药新药应是今后中医药研究中的一个重要研究方向,也必将为中药新药的研究和神经性疾病的治疗注入新的活力。

[参考文献]

[1] M Liguz-Lecznar, J Skangiel-Kramaska. Vesicular glutamate transporters (VGLUTs): the three musketeers of glutamatergic system [J]. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2007, 67(3): 207.

[2] Y Moriyama, H Omote. Vesicular glutamate transporter acts as a metabolic regulator[J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(10): 1844.

[3] R T Fremereau Jr, M D Troyer, I Pahner, et al. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse[J]. Neuron, 2001, 31(2): 247.

[4] Erin M Rose, Joseph C P Koo, Jordan E. Antflick, et al. Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase[J]. J Neurosci, 2009, 29: 8143.

[5] Hans Peter Koch, Ronald Lane Brown, Hans Peter Larsson. The glutamate-activated anion conductance in excitatory amino acid transporters is gated independently by the individual subunits [J]. J Neurosci, 2007, 27: 2943.

[6] VI Teichberg, K Cohen-Kashi-Malina, I Cooper, et al. Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies [J]. Neuroscience, 2009, 158(1): 301.

[7] Zeng X N, Sun X L, Gao L, et al. Aquaporin-4 deficiency down-regulates glutamate uptake and GLT-1 expression in astrocytes[J]. Mol Cell Neurosci, 2007, 34(1): 34.

[8] Tzingounis A V, Wadiche J I. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission [J]. Nat Rev Neurosci, 2007, 8

(12): 935.

[9] Stafford M M, Brown M N, Mishra P, et al. Glutamate spillover augments GABA synthesis and release from axodendritic synapses in rat hippocampus [J]. Hippocampus, 2010, 20(1): 134.

[10] Tara M DeSilva, Anatoli Y Kabakov, Patricia E Goldhoff, et al. Regulation of glutamate transport in developing rat oligodendrocytes [J]. J Neurosci, 2009, 29: 7898.

[11] Y Bakiri, V Burzomato, G Frugier, et al. Glutamatergic signaling in the brain's white matter [J]. Neuroscience, 2009, 158(1): 266.

[12] Su Z Z, Magdalena Leszczyniecka, Dong-chul Kang, et al. Insights into glutamate transporter regulation in human astrocytes: Cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2) [J]. PNAS, 2003, 100: 1955.

[13] Beart P M, O'Shea R D. Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement [J]. Br J Pharmacol, 2007, 150(1): 5.

[14] A Yamashita, K Makita, T Kuroiwa, et al. Glutamate transporters GLAST and EAAT4 regulate postischemic Purkinje cell death: an *in vivo* study using a cardiac arrest model in mice lacking GLAST or EAAT4 [J]. Neurosci Res, 2006, 55(3): 264.

[15] Lin C L, Bristol L A, Jin L, et al. Aberrant RNA processing in a neurodegenerative disease: the cause for absent EAAT2, a glutamate transporter, in amyotrophic lateral sclerosis [J]. Neuron, 1998, 20(3): 589.

[16] Kondratskaya E, Shin M C, Akaike N. Neuronal glutamate transporters regulate synaptic transmission in single synapses on CA1 hippocampal neurons [J]. Brain Res Bull, 2010, 81(1): 53.

[17] Jacob C P, Koutsilieri E, Bartl J, et al. Alterations in expression of glutamatergic transporters and receptors in sporadic Alzheimer's disease [J]. J Alzheimers Dis, 2007, 11(1): 97.

[18] Rakhade S N, Loeb J A. Focal reduction of neuronal glutamate transporters in human neocortical epilepsy [J]. Epilepsia, 2008, 49(2): 226.

[19] Hazell A S, Sheedy D, Oanea R, et al. Loss of astrocytic glutamate transporters in Wernicke encephalopathy [J]. Glia, 2010, 58(2): 148.

[20] A Kashani, E Lepicard, O Poirel, et al. Loss of VGLUT1 and VGLUT2 in the prefrontal cortex is correlated with cognitive decline in Alzheimer disease [J]. Neurobiol Aging, 2008, 29(11): 1619.

[21] A Kashani, C Betancur, B Giros, et al. Altered expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in Parkinson disease [J]. Neurobiol Aging, 2007, 28(4): 568.

[22] 李成敏, 颜慧, 宫泽辉. 谷氨酸转运体亚型谷氨酸转运体 1 与其调控药物的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(10): 1264.

[23] 梁辉, 陈虎, 高颖等. 麝香酮抗局灶性脑缺血损伤的实验研究 [J]. 中成药, 2003, 25(3): 226.

[24] 李海涛, 胡刚. 环维黄杨星-D 对 6-羟基多巴胺诱导的 PC12 细胞死亡率的影响 [J]. 中国药科大学学报, 2004, 35(6): 562.

[责任编辑 邹晓翠]