

Rho 蛋白信号通路和神经元树突重塑*

魏丹^{1,2} 赵飞鹏^{1,2} 张璐¹

(¹ 南方医科大学病理生理学教研室, 广东 广州 510515; ² 南方医科大学第一临床医学院, 广州 510515)

摘要 神经元树突重塑是神经元正常生长发育关键环节。实验证明 Rho GTPase 信号通路在神经元树突重塑过程中发挥着重要的作用。Rho GTPase 是神经细胞骨架形成的关键性调节因子, 作为信号转导通路中的信号转换器和分子开关, 它可以作用于细胞骨架或其靶蛋白, 影响肌动蛋白的聚合与肌球蛋白的激活, 从而影响神经元树突重塑。本文将重点介绍 Rho GTPase 的下游传导途径以及它在神经元树突重塑过程中所发挥的重要作用。

关键词 树突重塑; 信号通路; Rho GTPase

中图分类号: R338.1+2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-9760(2011)04-133-03

Rho 家族蛋白是 Ras 超家族中小分子量 G 蛋白的成员之一, 到目前为止已发现 20 余种, 包括 Rho, Rac, cdc42, TC10, TCL, Wrch1, Chp/Wrch2, RhoG, RhoH/TTF, 和 Rnd。这是一组分子量大约为 20~25KD 的鸟嘌呤核苷酸结合蛋白, 具有 GTP 酶活性。各成员之间有 50%~55% 同源性, 但就是它们在一级结构上的微小差别决定了它们可以识别不同的下游效应因子。Rho 家族蛋白以非活性 GDP 结合形式和活性 GTP 结合形式存在。Rho 家族蛋白与 GDP 结合形式游离于胞浆中, 与 GTP 结合形式则作用于细胞内的效应因子。通过这两种形式的相互转变来调节下游的信号传导因子, 产生复杂的信号传导网络, 进而影响神经元的生物学功能, 包括神经元树突重塑。在 Rho 蛋白中, 目前被广泛研究的主要是 Cdc42、Rac1 和 RhoA。

1 Cdc42 信号通路与神经元树突重塑

1.1 Cdc42 信号通路

Cdc42 GTPase 是细胞骨架形成和质膜运输的主要调节因子, 它参与了多种生物学过程, 如细胞增殖、运动、极化、有丝分裂和生长。在细胞内信号传导网络中, Cdc42 是一个重要的信号转导辐合点, 介导着多条信号转导通路。Cdc42 的激活依赖于鸟核苷酸转换因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEFs) 的催化, 它可以将 Cdc42 由无活性的 GDP 结合形式转化为有活性的 GTP 结

合形式。与此同时, Cdc42 还受上游调节因子鸟核苷酸分解抑制剂 (guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs) 的调控, GDIs 可以阻碍 Cdc42 与 GEFs 的结合, 从而抑制 Cdc42 的活化。只有被激活的 Cdc42 才可以发挥正常的作用。它可以介导一系列的信号级联反应使得下游效应因子依次激活, 从而引起细胞的各种生理活动。目前研究认为 Cdc42 的主要效应因子结合位点是 Switch I 结构域, 该结构域及其周围的氨基酸残基可以与下游分子相结合, 从而诱导细胞的转化。Cdc42 可以通过该途径激活它下游的 p21-活性激酶 (p21-activated kinase, PAK)^[1]。PAK 是丝氨酸/苏氨酸激酶, 主要参与细胞骨架的动力学变化。在皮质神经元的试验中发现, 组成性活性 PAK 的表达可以增加树突的数量, 而显性负性 PAK 的表达则导致树突的明显减少。所有的 PAK 在 C-末端都有一个保守的催化结构域, N-末端虽无催化作用, 但含有一个 p21 结合结构域 (p21 binding domain, PBD) 与 Cdc42 和 Rac1 结合。在静息状态下, PAK 在细胞质中通常以休眠状态存在, 这是由于它的 N-末端有一个自动抑制区, 从而阻碍了 C-末端激酶结构域的活化。然而 PAK 一旦与有活性的 Cdc42-GTP 相结合, 便会触发自动抑制区的解体, 导致 PAK 的激活与自磷酸化。PAK 又可激活它下游 Lin-11, Isl-1 和 Mec-3 区域的激酶 (Lin-11, Isl-1, and Mec-3 domain-containing kinases, LIMK), 活化的 LIMK 可以使 cofilin (一种肌动蛋白脱聚合因子) 磷酸化而失活, 从而增加细胞丝状肌动蛋白的数量。cofilin 还被认为可以通过影响肌动蛋白

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 30770821), 广东省自然科学基金重点项目 (编号: 92510515000008)

丝的聚合、稳定,成核运动^[1]而促进细胞突起的形成以及神经元细胞的极化^[2]。PAK 还可以直接导致 MLC(myosin light chain)的磷酸化,稳定局部的肌动蛋白网从而促进树突棘的形态发生^[3]。此外,PAK 也可以间接调节肌球蛋白的磷酸化,被 Cdc42 激活的 PAK 可以使 MLCK 磷酸化,抑制 MLCK(myosin light chain kinase)的活性,使得 MLC 无法磷酸化,从而抑制了肌球蛋白的回缩,有利于肌球蛋白的稳定。与此同时,PAK 还可以导致下游 op18 的第 16 位丝氨酸磷酸化,阻碍 op18 与微管相结合,抑制 op18 使微管失稳的能力,保持微管的稳定性^[4]。

另有证据证明 Cdc42 影响细胞骨架与 Wiskott-Aldrich-Syndrome 蛋白家族 (Wiskott-Aldrichsyndrome protein, WASP)^[5] 有关, WASP 是 Cdc42 的自动抑制因子,两者具有高度的亲和力,当两者相互作用时,可激活下游的肌动蛋白成核因子——Arp2/3 复合物(actin-related proteins 2 and 3)。Arp2/3 复合物引起的新肌动蛋白丝的生长为细胞提供了其生长、运动、骨架重塑所需的机械力。Cdc42 除了可以直接激活 WASP 以外,还可以与 Toca-1 (Transducer of Cdc42-dependent actin assembly) 相互作用,从而激活下游的 WASP,同时也可以通过抑制 WIP(WASP interacting Protein, WASP 的抑制剂)来间接激活 WASP^[6],促进丝足的形成。

1.2 Cdc42 与神经元树突重塑

大量实验证明 Cdc42 在神经元的树突重塑中发挥重要作用。在敲除了 Cdc42 的小鼠海马区神经元中,由于 Cdc42 的缺如,下游的效应因子无法正常激活, WASP、Arp2/3 复合物的表达明显下降,引起肌动蛋白细胞骨架的异常重组,从而导致神经元树突棘密度的减少以及由树突棘所形成的一些兴奋性神经突触的缺失。同样, Cdc42 突变小鼠皮质神经元中,也出现了树突分支的减少、直径的缩短以及树突棘密度的降低^[7]。由上可知, Cdc42 与 PAK3 的结合在神经元新突起发生的起始阶段发挥重要作用, Cdc42 可以通过 PAK 来影响新突起的生长、稳定。因此干扰小鼠海马区神经元 Cdc42 与 PAK3 的结合也导致了神经元形态结构的异常^[8]。因此, Cdc42 在神经元结构重塑,尤其是树突、树突棘重塑方面发挥重要作用。

2 Rac1 信号传导通路与神经元树突重塑

2.1 Rac1 信号传导通路

Rac1 在调节细胞骨架、细胞转录、分泌和凋亡方面均发挥着重要的作用。在静息的细胞中, Rac 存在于细胞质中,与 Rho GDI 以复合物的形式存在。一旦细胞受到刺激, Rac RhoGDI 复合物立即发生解体, GEF 介导 Rac 由无活性的 GDP 状态向有活性的 GTP 状态转变,从而引发下游一系列的级联反应。与 Cdc42 类似, Rac1 也可以通过直接激活 PAK 来影响肌动蛋白细胞骨架和微管的发生与发展,不同的是, GTPase Rac1 在神经突触向外生长的过程中可以调节下游的周期性依赖蛋白激酶(cyclin-dependent kinase 5, cdk5)和神经特异性调节因子 p35 的定位与活性从而间接作用于 PAK。Rac1 通常直接作用于 p35 进而影响 cdk5, 干扰被持续激活的 PAK 的活性。因此, Rac1 在激活 PAK 的同时,还可以通过 p35、cdk5 抑制 PAK 的活性,使其维持在一个相当稳定的状态,从而促进新突触的形成与巩固^[9]。

Rac1 还可以激活下游的 WAVE(WASP family Verprolin-homologous protein),从而触发层足版(lamellipodia)和丝足(filopodia)的形成。WAVE 主要通过一些中间媒介因子与 Rac 蛋白相连。如特定的 Rac 相关蛋白、PIR121(a p53-inducible mRNA)、NCK 相关蛋白(Nck-associated protein, Nap1)、Abl 蛋白(Abl interactor)和 HSPC300(heat-shock protein C300)多肽。正常情况下, Sra/Nap/Abi/WAVE 和 HSPC300 组成一种称为 WAVE 复合物的稳定蛋白聚合体^[10]。Rac1 通过 p140 诱发 WAVE 复合体的自动抑制区解体^[11]。WAVE 复合体一旦被激活,便释放出 HSPC300 和活性的 WAVE,从而活化下游的 Arp2/3,促进肌动蛋白的聚合,驱动层形足版的伸出。

2.2 Rac1 与神经元树突重塑

实验发现在小鼠的浦肯野细胞中,激活的 Rac1 的表达可引起树突棘形态的剧烈改变,如树突棘的延长,树突棘密度的增加。最近又有实验证明, Fas 不仅可以介导细胞的凋亡,还可以诱导 Rac1 的激活,并通过 Rac1 的活化引起肌动蛋白细胞骨架的重新组合,导致神经元结构重塑。在用人 Fas-FLAG 转染的小鼠胚胎皮质细胞中发现神经元中 Rac1 的活性明显增强,神经元突起的数量增多,且在这些突起上又出现了新的分支点。而 Fas 缺失的小鼠海马区、皮质区神经元的轴突、树突分支则明显减少,树突棘的密度也有所降低^[12]。

由此可知,Rac1 可以促进神经元树突及树突棘的发生发展,从而影响神经元结构重塑。

3 RhoA 信号传导通路 with 神经元树突重塑

3.1 RhoA 信号传导通路

目前,RhoA 在决定树突及树突棘的发生发展和形态学方面发挥着越来越重要的作用。RhoA 同样受到 GEFs 和 GDI 的双重调节,使其在无活性的 GDP 结合形式与有活性的 GTP 结合形式之间不断转换。与 Cdc42 和 Rac1 不同,关于 RhoA 对树突生长分枝作用的报道并不一致。但一般而言,RhoA 是树突生长的负性调节因子,例如,活性 RhoA 突变体的表达可以严重缩短树突的长度^[13]。RhoA 可以激活下游的 Rho 激酶,Rho 激酶直接引起肌球蛋白轻链(MLC)磷酸化,形成 MLC-P(myosin light chain phosphatase),从而使得肌球蛋白整体磷酸化的下降,并最终导致肌球蛋白的回缩,大量研究显示,使用 ROCK 抑制剂或针对 MBS 上 ROCK 磷酸化位点的特异性抗体可以通过 RhoA/ROCK 途径引起肌球蛋白的收缩^[14]。目前有实验发现了 MLCP 复合体的一个新成员——肌球蛋白磷酸酶-Rho 作用蛋白(M-RIP),它可以直接与 MBS 羧基末端的亮氨酸拉链结构域相结合,抑制 MLCP 的活性。除此之外,M-RIP 还是一种锚定蛋白,使 MLCP 和 RhoA 定位于应力纤维上,调节肌球蛋白轻链的磷酸化^[15-16],导致肌球蛋白的回缩。当然 RhoA 对于细胞骨架的生长、稳定也起到一定的促进作用。RhoA 可以激活效应因子 Dia(Diaphanous-related formins),Dia 含有一个开放结构,可以与肌动蛋白丝的带刺末端相结合,它还可以抑制阻碍肌动蛋白丝延长的帽蛋白的结合,从而促进肌动蛋白的聚合,维持微管的稳定,同时也可通过 Dia 激活下游因子 IRSP53 来发挥作用。

3.2 RhoA 与神经元树突重塑

实验证明,在 RhoAV14-转染的神经元细胞中,多数细胞只有光秃秃的树突主干,树突棘的密度明显降低甚至是缺如,即使是存在的树突棘也发生了明显的形态学改变,树突棘的长度明显缩短。C3 转移酶(C3 transferase)是一种 Rho 阻滞剂,在加入了 C3 转移酶的锥细胞中发现树突棘延长。另有实验发现,在苯丙酮尿症小鼠模型中,小鼠脑部浦肯野细胞上的 RhoA 表达量增加,神经元细胞的树突分支明显减少,树突与树突棘的长度也显著缩短。而在使用 Rho 蛋白激酶的特异性抑制剂 Y-27632 后,神经元异常的形态学变化有所逆转,表

明 RhoA 信号转导通路在神经元树突分支方面发挥重要作用^[7]。

综上所述,Cdc42、Rac1 主要是促进肌动蛋白的聚合和微管的稳定,RhoA 则恰好相反,主要是诱导肌动蛋白的解聚。肌动蛋白和微管等细胞骨架可影响神经元形态的发生发展。Rho 蛋白通过其特定的上下游信号通路在神经元细胞轴突、树突及树突棘的迁移、定位、生长过程中发挥重要的调节作用。Rho 蛋白信号通路及分子机制的深入研究为一些神经性疾病的治疗提供了潜在药物靶点。

参考文献:

- [1] Wayne Huang, Zikai Zhou, Suhail Asrar, et al. p21-Activated kinases 1 and 3 control brain size through coordinating neuronal complexity and synaptic properties[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2011, 31: 388-403.
- [2] Arimura N, Kaibuchi K. Neuronal polarity: from extracellular signals to intracellular mechanisms[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8: 194-205.
- [3] Christelle Gally, Frédéric Wissler, Hala Zahreddine, et al. Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation; LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles[J]. *development*, 2009, 136(18): 3109-19.
- [4] Takahashi Kand, Suzuki K. Membrane transport of WAVE2 and lamellipodia formation require Pak1 that mediates phosphorylation and recruitment of stathmin/Op18 to Pak1-WAVE2-kinesin complex[J]. *Cell Signal*, 2009, 21(5): 695-703.
- [5] Nahm M, Long AA, Pail SK, et al. The Cdc42-selective GAP rich regulates postsynaptic development and retrograde BMP transsynaptic signaling[J]. *J Cell Biol*, 2010, 191(3): 661-75.
- [6] Misra A, Rajmohan R, Lim RP, et al. The mammalian verprolin, wire induces filopodia independent of N-WASP through IRSp53[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 15: 316(17): 2810-24.
- [7] ZHANG YJ, ZHANG HW, YUAN XB, et al. Differential effects of phenylalanine on Rac1, Cdc42, and RhoA expression and activity in cultured cortical neurons. *Pediatric Research*, 2007, 62(1): 8-13.
- [8] Patricia Kreis, Emmanuel Thevenot, Veronique Rousseau, et al. The p21-activated Kinase 3 Implicated in Mental Retardation Regulates Spine Morphogenesis through a Cdc42-dependent Pathway[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(29): 21497-21506.
- [9] Chen LY, Rex CS, Babayan AH, et al. Physiological activation of synaptic Rac>PAK(p-21 activated kinase) signaling is defective in a mouse model of fragile X syndrome[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(33): 10977-84.
- [10] Stradal. Regulation of actin dynamics by WASP and WAVE family proteins[J]. *Trends Cell Biol*, 2004, 14: 303-311.

能具有重要的意义,自动调节功能的受损会导致大脑不同程度的损害。现在脑血管疾病的发病率很高,许多脑血管疾病都会导致自动调节功能受损,受损的脑血流自动调节功能可能导致疾病的恶化,因此脑血流自动调节功能的研究对于脑血管疾病的临床诊断与治疗都是很有意义的。

参考文献:

- [1] Grigoreva AN, Nesterova MV. Effect of cavinton forte on the cerebral hemodynamic and autoregulation mechanisms of cerebral blood flow in patients with chronic cerebral ischemia [J]. Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova, 2009, 109(7): 90-91.
- [2] Aries MJ, Elting JW, De Keyser J, et al. Cerebral autoregulation in stroke; a review of transcranial doppler studies [J]. Stroke, 2010, 41(11): 2697-2704.
- [3] Czosnyka M, Brady K, Reinhard M, et al. Monitoring of cerebrovascular autoregulation: facts, myths, and missing links [J]. Neurocrit Care, 2009, 10(3): 373-386.
- [4] 王盛章, 姚伟, 丁光宏. 脑血流自动调节的三单元集中参数模型[J]. 医用生物力学, 2007, 22(3): 268-272.
- [5] 王盛章, 姚伟, 丁光宏. 脑血流自动调节的五单元模型[J]. 生物医学工程学, 2009, 26(5): 1115-1118.
- [6] Freeman SS, Udomphorn Y, Armstead WM, et al. Young age as a risk factor for impaired cerebral autoregulation after moderate to severe pediatric traumatic brain injury [J]. Anesthesiology, 2008, 108(4): 588-595.
- [7] Lang EW, Mehdorn HM, Dorsch NW, et al. Continuous monitoring of cerebrovascular autoregulation; a validation study [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2009, 72(5): 583-586.
- [8] Yam AT, Lang EW, Lagopoulos J, et al. Cerebral autoregulation and ageing [J]. J Clin Neurosci, 2005, 12(6): 643-646.
- [9] Wang X, Krishnamurthy S, Evans J, et al. Transfer function analysis of gender-related differences in cerebral autoregulation [J]. Biomed Sci Instrum, 2007, 41(2): 48-53.
- [10] Deegan BM, Sorond FA, Lipsitz LA, et al. Gender related

differences in cerebral autoregulation in older healthy subjects [J]. Con Proc IEEE Eng Med Biol Soc, 2009, 13: 2859-2862.

- [11] 何宗泽, 黄广富. 尼莫地平治疗蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛研究进展 [J]. 实用医院临床杂志, 2010, 7(2): 139-141.
- [12] Behrouz R, Sullebarger JT, Malek AR. Cardiac manifestations of subarachnoid hemorrhage [J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2011, 9(3): 303-307.
- [13] KIm JH, Park LS, Park KB, et al. Intraarterial Nimodipine Infusion to treat symptomatic cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. J Korean Neurosurg Soc, 2009, 46(3): 239-244.
- [14] Rose JJ, Vanhecke TE, Mc Cullough PA. Subarachnoid hemorrhage with neurocardiogenic stunning [J]. Rev Cardiovasc Med, 2010, 11(4): 254-263.
- [15] Ming-Yuan Teseng, M. Phil. Effects of acute treatment with satins on cerebral autoregulation in patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage [J]. Neurosurg Focus, 2006, 21: 1-6.
- [16] Hattingen E, Blasel S, Dettmann E, et al. Perfusion-weighted MRI to evaluate cerebral autoregulation in aneurysmal subarachnoid haemorrhage [J]. Neuroradiology, 2008, 50(11): 929-938.
- [17] 陈刚, 王文明, 盛玉国, 等. 急性蛛网膜下腔出血患者脑动脉循环时间与病情和预后的关系 [J]. 山东医药, 2009, 49(49): 30-31.
- [18] Emily R, Atkins Fiona G, Brodie, et al. Dynamic cerebral autoregulation is compromised acutely following mild ischaemic stroke but not transient ischaemic attack [J]. Cerebrovascular Diseases, 2010, 29(4): 228-235.
- [19] Powers WJ, Videen TO, Diringner MN, et al. Autoregulation after ischaemic stroke [J]. J Hypertens, 2009, 27(11): 2218-2222.
- [20] Menees DS, Bates ER. Symptomatic carotid artery stenosis; what is the preferred treatment? [J]. Pol Arch Med Wewn, 2011, 121(1-2): 35-39.

(收稿日期 2011-03-12)

(上接第 135 页)

- [11] Patel FB, Bernadskaya YY, Chen E, et al. The WAVE/SCAR complex promotes polarized cell movements and actin enrichment in epithelia during *C. elegans* embryogenesis [J]. Dev Biol, 2008, 15: 324(2): 297-309.
- [12] Wenjing Ruan, Christopher T, Lee, et al. A novel juxtamembrane domain in tumor necrosis factor receptor superfamily molecules activates Rac1 and controls neurite growth [J]. Mol Biol Cell, 2008, 19(8): 3192-3202.
- [13] Huesa G, Baltrons MA, Gómez-Ramos P, et al. Altered distribution of RhoA in Alzheimer's disease and AβPP overexpressing mice [J]. J Alzheimers Dis, 2010, 19(1): 37-56.

- [14] Zhang G, Lehmann HC, Manoharan S, et al. Anti-ganglioside antibody-mediated activation of RhoA induces inhibition of neurite outgrowth [J]. J Neurosci, 2011, 31(5): 1664-75.
- [15] Koga Y, Mitsuo I. p116RIP decreases myosin II phosphorylation by activating myosin light chain phosphatase and by inactivating RhoA [J]. J Biol Chem, 2005, 280: 4983-4991.
- [16] Surks HK, Riddick N, Ohtani K. M-RIP targets myosin phosphatase to stress fibers to regulate myosin light chain phosphorylation in vascular smooth muscle cells [J]. J Biol Chem, 2005, 280(52): 42543-42551.

(收稿日期 2011-03-10)