

神经颗粒素与脑老化、疾病及应激关系*

李欢欢 林文娟

(中国科学院心理研究所脑-行为研究中心, 北京 100101)

摘要 神经颗粒素是一种神经元特异性、Ca²⁺敏感性的钙调蛋白 (CaM) 结合蛋白, 是蛋白激酶C的突触后底物, 与信号传导和长时程增强 (LTP) 有关。这是一种新发现的脑特异性蛋白质。主要分布在前脑和海马, 在皮质、海马CA1-CA3区、齿状回、纹状体和杏仁核中高表达。在大脑发育的不同阶段, 神经颗粒素在脑内的含量和分布区域会发生变化, 其生物学作用受到国内外学者的关注。近年来国外学者开始对神经颗粒素与脑老化、疾病及应激关系进行考查。该文将着重介绍对神经颗粒素在脑老化、疾病和应激过程中所扮演的角色的研究工作及其新发现, 目的是对脑与行为关系的理解及有关的脑机制的研究提供一个新的视点。

关键词 神经颗粒素, 老龄化, 疾病, 应激。

分类号 B845

神经颗粒素 (Neurogranin, NG) 是一种含78个氨基酸的蛋白质, 是由Watson等1990年在使用除小脑以外的皮质区域提取的cDNA探针对大鼠脑中cDNA文库进行筛选时首次发现^[1]。也有文献将它称为RC3和p - 17^[2]。自该物质发现以来, 在一定范围内引起了国外学者的关注, 因为这似乎为脑科学中关于大脑各种高级功能机制的物质基础及心理与行为乃至疾病的脑机制研究提供了一个新的视点。近2~3年国外从对神经颗粒素的基础研究开始转向涉及神经颗粒素与行为和健康关系的研究, 包括考查神经颗粒素在学习、记忆, 老龄化 (aging) 某些疾病过程中的作用。其中对神经颗粒素与学习和记忆的关系主要是从脑内长时程增强 (Long-term potentiation, LTP) 长时程抑制 (Long-term depression, LTD) 和蛋白激酶信号传导途径中神经颗粒素作用的角度来研究^[3-6]。此外, 也有少数的文章涉及神经颗粒素与应激之间的关系, 但主要是从生化角度考查它在应激后脑内分布含量上的变化。而国内关于神经颗粒素的研究很少, 也主要是涉及神经颗粒素在突触可塑性, 蛋白激酶信号传导过程中的功能等。对脑高级功能、疾病和应激行为所涉及的大脑物质基础的研究无疑是具有相当的理论和实践意义, 这可以有助于进一步探索相关的脑机制, 并对大脑在上述过程中所发生的物质变化有更深入的了解。神经颗粒素作为一种新发现的脑特异性蛋白质, 探讨其可能的生物学作用一直是国内外学者研究所关注的。在脑老化、疾病和应激过程中神经颗粒素的变化提示它有可能作为一种中介物质在脑 - 行为 - 健康关系中发挥作用。本文是对神经颗粒素的结构

收稿日期: 2003-09-10

* 中国科学院重点基金和自然科学基金以及中国科学院创新工程资助 (KSCX2 - 2 - 03)

通讯作者: 林文娟, E-mail: Linwj@psych.ac.cn

和功能、脑内分布特点进行描述,并主要介绍它与脑老化、疾病和应激行为关系的研究和发现,探讨其在认知功能、疾病和应激行为可能涉及的脑机制中的作用途径和生物学功能。

1 神经颗粒素的结构和功能

目前研究表明神经颗粒素是一种大脑特异性、突触后蛋白激酶C (Protein kinase C, PKC) 的底物,是Ca²⁺敏感性的钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 结合蛋白。它与钙调蛋白的亲合力受到磷酸化作用和氧化作用的调节^[3]。牛蛋白激酶C (PKC) 底物神经颗粒素/钙调蛋白结合性蛋白B - 50免疫反应性C - 激酶底物 (bovine homolog neurogranin/B-50 immunoreactive C-kinase substrate, BICKS) 是NG的75/78氨基酸结构上的同源体,两者用于PKC磷酸化和与钙调蛋白结合的区域重叠,并与突触前生长膜相关蛋白神经调节蛋白(the presynaptic 43-kDa growth-associated protein, GAP-43) 的这些区域类似^[1,7,8]。NG、GAP-43和小脑高丰度肽 (the small cerebellum-enriched peptide, PEP - 19) 是一类小分子、酸稳定性蛋白质,同属于Calpacitin 蛋白家族成员。这类蛋白质与CaM结合的部位是相同的,并均含有一个IQ序列^[9]。NG的蛋白激酶磷酸化部位是在IQ区域内。此外, Baudier等研究证实NG主要的蛋白质结构中除具有用于PKC磷酸化和与钙调蛋白结合的共同序列 (consensus sequence) 以外,还包含了用于G₀蛋白活化的共同序列^[10]。NG所具有的这些共同序列提示它在大脑中是作为PKC底物发挥作用,并可能在功能上将突触后Ca²⁺/钙调蛋白信号途径和PKC介导的第二信使系统连接起来,而存在于其氨基酸末端的G₀蛋白活化区域则提示NG可能影响G₀蛋白的GTP酶活性^[11]。Gerendasy等研究则表明NG在大鼠新生期的突触起源性和成年期的突触可塑性相关的Ca²⁺介导的第二信使级联过程中扮演了关键的角色^[12]。Watson等还提出在突触发育和重塑过程中,NG是作为一种PKC介导的分子级联反应的“第三信使”底物^[11]。但目前对于NG这种脑特异性蛋白质的大部分生物学作用仍未明了。

2 神经颗粒素在大鼠脑发育过程中的变化及其脑内分布特点

NG作为一种大鼠脑特异性蛋白质,在其大脑发育和成熟过程中会经历一些结构分布和表达密度上的变化。Alvarez - Bolado 等采用特异抗体标记发现大鼠脑中 NG 的出现是呈双向变化的,较早期在解剖学上的表现为被抑制的、低密度表达阶段,之后出现分布广泛的、高密度表达阶段^[13]。即 NG 的表达开始于胚胎期第 18 天,并一直局限于在杏仁囊腔的梨状皮质直到出生后第一天。在生后的第一天,NG 的表达明显增加,并出现在嗅皮质、新皮质、大脑下脚,海马和纹状体部位。NG 较早表达的大脑皮层是躯体感觉层的 4、5 层,扣带回前部的 2、5 层和粒状岛叶皮质。在生后第一周末出现 NG 由细胞内移位至树突末梢部位和树突棘的现象,这一移位过程在生后第二周末到达顶峰,此时形成大鼠成年期 NG 的分布模式。

现在研究已证实 NG 主要分布在前脑和海马,在皮质、海马 CA1-CA3 区、齿状回、纹状体和杏仁核中高表达,常见于这些区域的神经元胞体和树突,偶见于轴突和内囊区,而后脑和小脑区域未发现 NG 的表达。此外, Martin 等研究揭示 NG 在内侧丘脑的神经元中

也有较高水平的表达^[11]。

3 神经颗粒素与老龄化 (aging)

新近研究发现大脑的老龄化过程与细胞内 Ca^{2+} 平衡状态下调有关,后者可以导致 Ca^{2+} - 依赖性信号途径缺陷以及改变神经元的功能。NG 作为一种新发现的突触后脑特异性、 Ca^{2+} 敏感性钙调蛋白结合蛋白,在 Ca^{2+} 和钙调蛋白水平的突触后调节中可能扮演了关键的角色,因而它的数量和功能在老龄化过程中也会发生年龄相关性变化。在老龄化过程中它发生变化的规律以及发生变化后可能对大脑认知功能损害的作用近年来引起了国外学者兴趣。Enderlin 等研究发现与 3 月龄小鼠相比,22 月龄小鼠 NG 表达水平明显降低^[14]。Mons 等对 3、12、24 和 31 月龄的小鼠脑中 NGmRNA 和蛋白质表达水平的年龄相关性改变进行了分析,结果发现在背侧海马下区、后压部和初级运动皮质区域,老龄化引起 NGmRNA 和蛋白质表达的显著下降。对海马 CA1 区和后压部 NG 免疫反应性分析表明老龄鼠中 NG 蛋白质减少主要发生在锥形神经元的树突部分。这些数据提示在选择性脑区,特别是海马,突触后 NG 的年龄相关性改变可能在变更 Ca^{2+} /钙调蛋白信号途径、突触可塑性的区域特异性损害和认知功能衰减中起作用^[15]。Angenstein 等研究也发现 NG 磷酸化状态存在年龄依赖性差异^[16]。说明 NG 作为脑中 PKC 的底物,在老龄化过程中除了会出现脑内含量上的变化,其磷酸化作用也会出现不同程度的下降。这种 NG 激活程度上的减少继而会影响到大脑的认知功能。Krazem 等采用原位杂交方法对成年鼠(约 7~8 周)和老龄鼠(约 21~22 周)脑中 NGmRNA 表达进行考查,结果表明老龄化过程伴随着编码 NG 的 mRNA 数量的减少,特别是在复杂认知功能中扮演关键角色的海马区域^[17]。Chang 等发现 NGmRNA 存在选择性移位到树突的现象,认为它是通过这种选择性移位来对突触的可塑性做出反应^[18]。老龄化过程中随着 NG 数量的减少,必然会出现移位现象减少,因而会降低 NG 对突触可塑性的反应能力,从而影响到以突触可塑性为基础的大脑的高级功能。

4 神经颗粒素与疾病

现在研究还发现 NG 涉及某些中枢神经系统疾病的病理改变过程。AD 是一种中枢神经系统退行性疾病,发病率较高。随着病程进展,对大脑认知功能的损害渐进性加重。对于 AD 病程中大脑发生的病理学改变已有较明确地认识,但对其发病机制仍在进一步研究。突触病变作为 AD 发病的重要表现已经引起越来越多的关注。Davidsson 等为了解 AD 的突触病变是否涉及整个突触或只局限于它的特异性成分这一问题,对 AD 和血管性痴呆 (VCD) 患者脑组织(包括额皮质、海马和小脑)中三种不同的突触囊泡蛋白 (rab3a、synaptotamin、突触素)、突触前膜蛋白 GAP-43 和突触后 NG 进行研究。结果发现在 AD 患者脑组织中所有的突触蛋白均减少,早期 AD 患者突触蛋白减少程度比晚期 AD 患者明显。而在 VCD 患者脑组织中仅发现突触蛋白的微小变化^[19]。Chang 等研究则发现在 AD 患者新皮质组织中,几乎没有 NGmRNA 移位到树突的证据,从而出现对突触可塑性的反应下降,可能是 AD 患者脑功能损害的潜在机制。但在额颞叶痴呆 (Fronto-temporal dementia) 患者的新皮质,仍有保留了

提供给NG进行树突移位的顶部树突NGmRNA靶位^[18]。该研究指出了突触的完整性和在人类新皮质中NGmRNA靶位的树突细胞骨架潜在的重要性。LI等通过一项免疫组化研究表明大鼠脑挫伤后在受损部位表现出NG免疫反应性的缺乏,而大脑中动脉阻塞(occlusion of the middle cerebral artery, MCAO)可导致同侧大脑半球广泛性的NG染色缺失^[20]。Shughrue等将大鼠采用颈总动脉阻塞的方法建立缺血模型进行研究时发现,缺血后大鼠海马CA1区NGmRNA表达明显下降,考虑为该区域的神经元存在急剧的、选择性缺失所致^[21]。上述研究结果均提示NG是AD、外伤性和缺血性脑组织损害等多种中枢神经系统疾病引起大脑病理改变所涉及物质基础之一。此外,NG与多种人类遗传疾病的关系也开始引起注意。Cicarelli等研究发现NG作为蛋白激酶C的突触后底物,涉及多种人类遗传性疾病的分子机制。因为NG的PH区域中含有一种高度保守的序列子,称为HIKE区,HIKE区域能调节NG、Gbeta、和 Bruton酪氨酸激酶(Bruton tyrosin kinase, BTK)的PH区与下游效应分子和细胞膜的交互作用。HIKE区变异在多种人类遗传性疾病中是普遍现象,在蛋白激酶中的HIKE变异能导致组织活化和细胞畸形,如急性髓样和肥大细胞性白血病、遗传性乳突状肾癌和多发性骨髓瘤。激酶非活化性HIKE突变可引起先天性巨结肠、部分白化病、胰岛素耐受和发育异常。BTK的PH区HIKE突变可导致性染色体相关性-无丙种球蛋白血症。含有HIKE的分子突变还可以引起不同形式的淀粉样变性^[22]。NG所涉及的这些人类遗传疾病的分子机制包括NG与下游效应器分子或细胞膜交互作用的变化,以及胞内运输缺陷。

5 神经颗粒素与应激(stress)

应激对人类身心健康的影响不容忽视,国内外大量研究都在为阐明应激对人类健康产生影响的作用途径和机制作尝试。传统的应激理论认为应激是通过交感-肾上腺髓质系统和下丘脑-垂体-肾上腺(Hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴激活使外周儿茶酚胺和糖皮质激素分泌增多,通过后两者作用于机体循环、呼吸、代谢等器官,从而引起机体的生理反应。而现在的心理神经免疫学则还强调了心理行为与脑和免疫系统的关系,因为除了引起生理反应以外,应激还能影响人和动物行为的改变,这包括应激可能使人的躯体协调、行为技能等发生改变,使动物产生攻击性行为、呆滞行为和排泄行为增多等。有关应激引起行为改变的脑机制,包括所涉及物质基础,作用途径和信号传导方式是目前神经科学研究的一个新方向。神经颗粒素作为一种新发现的大脑特异性蛋白质,是否在应激所致行为改变的脑机制中起作用,或者是应激本身能否引起大脑中神经颗粒素分布的变化等问题值得关注。

迄今,国内外关于应激与神经颗粒素之间关系的研究鲜有报道, Martin 等对 Sprague - Dawley 大鼠进行 24 小时睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)后,考查其脑中 NGmRNA 和蛋白质水平的变化。结果发现 24 小时 SD 后 NGmRNA 表达在所有皮层下前脑区域和中脑区域(the total of subcortical forebrain plus midbrain areas, SFMA, 不包括海马和嗅球)明显减少,在大脑皮层表达的减少不显著。但 NG 蛋白质水平则是在大脑皮层区域明显下降,而在 SFMA 区域变化不显著^[11]。这种现象可能是由于在 SFMA 区域 NG 蛋白质水平上存在延迟性减少,而这种减少还不能被现在的实验所识别,但不能排除在 SFMA 区域 NGmRNA 的浓度变化

并不是随着蛋白质水平改变而发生的这种情况。Chen 等在考查电惊厥发作后小鼠脑中蛋白激酶 C 同工酶和底物蛋白质变化时发现,在电休克发作后的小鼠脑中 PKC 总活性不变,但神经颗粒素的磷酸化作用下降^[23]。这两项研究所采用的模型虽然并不是经典的应激实验范式,但均带有应激的成分。由于神经颗粒素主要存在于神经元的树突棘上,这些研究结果提示应激后可能存在着神经元突起数量减少和形态学方面的改变,导致 NG 表达水平的下降。而在电休克小鼠中 PKC 总活性不变,NG 磷酸化作用下降,除了存在 NG 数量减少的可能性之外,还有可能是磷脂酶活性增加所致。上述研究提示了 NG 可能是应激后发生改变的大脑物质基础之一,有可能在应激所致的行为改变中起到中介作用。但这种假设还需要进一步的研究加以证实。

6 结语

脑老化、疾病和应激都是目前健康心理学所关注的问题,围绕这些问题所作的研究一直在为探索相关的脑机制做努力,并取得了相当的进展。神经颗粒素作为新近发现的一种脑特异性蛋白质,经过国内外学者的研究已经证实在脑老化、中枢神经系统疾病和应激过程中,它的数量、分布方式和磷酸化水平会发生变化,是大脑某些生理和病理过程的物质基础,与机体中许多蛋白质一样,是通过磷酸化和去磷酸化发挥其生物学功能。脑老化和某些中枢神经系统疾病可以在部分脑区(背侧海马下区、后压部和初级运动皮质)出现 NG 基因选择性移位到树突的现象减少,NG 基因表达的显著下降,甚至缺乏和 NG 蛋白质水平下调。这些改变与脑老化和中枢神经系统疾病大脑病理改变过程中上述脑区锥形神经元数量的减少,以至于 NG 基因在锥形神经元树突部位的靶位丧失密切相关。然而,关于神经颗粒素与应激的关系的研究,国内尚未涉足,国外所做也较少,且采用的是非经典的应激模型,也未进行动物行为学指标上的观察。因而值得思考的是,神经颗粒素究竟是作为信号传导途径的中介物质,参与了在应激过程中发生的行为变化的脑机制,还仅仅只是应激过程中大脑发生改变的物质基础之一,而与应激所致的行为改变无明显关系。由此,采用经典的应激模型,建立动物行为学观察指标,来研究应激、行为改变和神经颗粒素之间的关系,可以作为应激所致行为改变的脑机制今后的研究方向之一,这对脑与行为关系的理解及有关的脑机制的研究可能提供一个新的视点。

参考文献

- [1]Watson J B, Sutcliffe J G, Fisher R S. Localization of the protein kinase C phosphorylation/calmodulin-binding substrate RC3 in dendritic spines of neostriatal neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992, 89(18): 8581~8585
- [2]Pasinelli P, Ramakers G M, Urban I J, et al. Long-term potentiation and synaptic protein phosphorylation. *Behavioural Brain Research*, 1995, 66(1-2): 53~59
- [3]Wu J, Li J, Huang K P, et al. Attenuation of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase signal transduction in the neurogranin knockout mouse. *The Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(22): 19498~19505
- [4]Ressler K J, Paschall G, Zhou X L, et al. Regulation of synaptic plasticity genes during consolidation of fear conditioning. *The Journal*

- of Neuroscience, 2002, 22(18):7892~7902
- [5]van Dam E J, Ruiters B, Kamal A, et al. N-methyl-D-aspartate-induced long-term depression is associated with a decrease in postsynaptic protein kinase C substrate phosphorylation in rat hippocampal slices. *Neuroscience Letter*, 2002, 320(3):129~132
- [6]Krucker T, Siggins G R, McNamara R K, et al. Targeted disruption of RC3 reveals a calmodulin-based mechanism for regulating metaplasticity in the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 2002, 22(13):5525~5535
- [7]Cohen R W, Margulies J E, Coulter P M, et al. Functional consequences of expression of the neuron-specific, protein kinase C substrate RC3 (neurogranin) in *Xenopus* oocytes. *Brain Research*, 1993, 627(1): 147~152
- [8]Huang K P, Huang F L, Chen H C. Characterization of a 7.5-kDa protein kinase C substrate (RC3 protein, neurogranin) from rat brain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1993, 305(2): 570~580
- [9]Gerendasy D. Homeostatic tuning of Ca²⁺ signal transduction by members of the calpacitin protein family. *The Journal of Neuroscience Research*, 1999, 58(1): 107~119
- [10]Baudier J, Deloulme J C, Van Dorselaer A, et al. Purification and characterization of a brain-specific protein kinase substrate, neurogranin(p17). *The Journal of Biological Chemistry*, 1991, 266:229~237
- [11]Neuner-Jehle M, Rhyner T A, Borbely A A. Sleep deprivation differentially alters the mRNA and protein levels of neurogranin in rat brain. *Brain Research*, 1995, 685(1-2): 143~153
- [12]Gerendasy D D, Herron S R, Watson J B, et al. Mutational and biophysical studies suggest RC3/neurogranin regulates calmodulin availability. *The Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(35): 22420~22426
- [13]Alvarez - Bolado ,Rodriguez-Sanchez P, Tejero-Diez P, et al. Neurogranin in the development of the rat telencephalon. *Neuroscience*, 1996, 73(2): 565~580
- [14]Enderlin V, Pallet V, Alfons S, et al. Age-related decreases in mRNA for brain nuclear receptors and target genes are reversed by retinoic acid treatment. *Neuroscience Letter*, 1997, 229(2): 125~129
- [15]Mons N, Enderlin V, Jaffard R, et al. Selective age-related changes in the PKC-sensitive, calmodulin-binding protein, neurogranin, in the mouse brain. *Journal of Neurochemistry*, 2001, 79(4): 859~867
- [16]Angenstein F, Buchner K, Staak S. Age-dependent differences in glutamate-induced phosphorylation systems in rat hippocampal slices. *Hippocampus*, 1999, 9(2): 173~185
- [17]Krazem A, Mons N, Higuieret P, et al. Chronic ethanol consumption restores the age-related decrease in neurogranin mRNA level in the hippocampus of mice. *Neuroscience Letter* , 2003 , 338(1):62~66
- [18]Chang J W, Schumacher E, Coulter P M 2nd, et al. Dendritic translocation of RC3/neurogranin mRNA in normal aging, Alzheimer disease and fronto-temporal dementia. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 1997, 56(10): 1105~1118
- [19]Davidsson P, Blennow K. Neurochemical dissection of synaptic pathology in Alzheimer's disease. *International psychogeriatrics*, 1998, 10(1): 11~23
- [20]Li G L, Farooque M, Lewen A, et al. MAP2 and neurogranin as markers for dendritic lesions in CNS injury. An immunohistochemical study in the rat. *Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, 2000, 108(2): 98~106
- [21]Shughrue P J, Merchenthaler I. Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. *Neuroscience* , 2003 , 116(3):851~861
- [22]Ciccarelli F D, Acciarito A, Alberti S. Large and diverse numbers of human diseases with HIKE mutations. *Human molecular genetics*, 2000, 9(6): 1001~1007
- [23]Chen C C. Alterations of protein kinase C isozyme and substrate proteins in mouse brain after electroconvulsive seizures. *Brain Research*, 1994, 648(1): 65~72

Involvement of Neurogranin in Aging, Disease, and Stress

Li Huanhuan, Lin Wenjuan

(Brain-Behavior Research Center, Institute of Psychology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: Neurogranin (RC3) is a brain-specific protein newly found, which is a neuron-specific, Ca^{2+} sensitive/calmodulin-binding protein kinase C substrate, and is involved in the process of signaling conduction and long-term potentiation. It is mainly distributed in the hippocampus and forebrain. Furthermore, it has been mostly found in dendritic spines and neuronal cell bodies of these areas, with some infrequent presence in axonal profiles and in the internal capsule. During the different phase of brain development, the numbers and distribution of neurogranin will be happened to change. Recently the studies on neurogranin began to focus on examining the relationship between it and aging, diseases and stress, and to discuss the functional pathway and the possible brain mechanism involving in aging, disease and stress. This review attempts to introduce the related researches, which may shed new light on the understanding of the relationship between brain and behavior as well as the mechanism studies.

Key words: Neurogranin, aging, disease, stress.