

# GDNF 家族成员及其受体的研究进展\*

董民 胡兵

(中国科学技术大学生命科学学院, 合肥 230027)

**摘要** 胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 家族是一类结构上属于转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 超家族的神经营养因子, 目前包括 GDNF, neurturin (NTN) 和 persephin (PSP) 三种因子, 它们在体内有着广泛的作用. 近年来发现 GDNF 和 NTN 的受体均为多组分结构, 由不同的糖基磷脂酰肌醇 (GPI) 蛋白和共享的跨膜酪氨酸激酶受体 Ret 蛋白构成. 有关这一家族的因子及其受体的研究正在不断深入.

**关键词** 神经营养因子, 胶质细胞源性神经营养因子, 酪氨酸激酶受体 Ret 蛋白, 多组分受体

**学科分类号** Q593.2

神经营养因子在神经元的存活、生长、分化、神经再生、突触形成与突触可塑性以及神经退行性疾病的过程中起着重要的作用, 对它的研究已成为目前神经科学领域中的热点之一. 于 1993 年发现的胶质细胞源性神经营养因子 (glial-cell-line-derived neurotrophic factor, GDNF)<sup>[1]</sup>, 1996 年发现的营养因子 neurturin (NTN)<sup>[2]</sup> 和 1998 年 2 月报道的营养因子 persephin (PSP)<sup>[3]</sup>, 它们在结构和功能上有很大的相关性, 被认为构成一个新的家族, 称为 GDNF 家族. 本文将简述 GDNF 家族中各营养因子及其受体的研究进展.

## 1 GDNF 家族中各因子的发现与生物学特性

### 1.1 GDNF

1993 年 Lin 等<sup>[1]</sup> 从大鼠的胶质细胞株 B49 中提纯到的一种新的营养因子, 能有效地促进多巴胺神经元摄取多巴胺, 命名为 GDNF. 对 GDNF 的结构分析表明它是 TGF- $\beta$  超家族中的远亲<sup>[1]</sup>. 近期发表的鼠源 GDNF 晶体结构分析也表明它与 TGF- $\beta$ 2 有着十分相似的结构<sup>[4]</sup>. 但是 GDNF 与 TGF- $\beta$  家族中其他成员的同源性均小于 20%.

一系列的研究表明 GDNF 有着广泛的神经营养作用, 这方面已有较详细的综述<sup>[5]</sup>. 关于 GDNF 基因敲除小鼠的研究表明, 缺失 GDNF 还会引起肠道神经元的完全缺失和肾发育畸形<sup>[6]</sup>, 表明 GDNF 在肠道神经和肾脏的发育过程中也起着关键性的作用.

### 1.2 Neurturin (NTN)

1996 年 Kotzbauer 等<sup>[2]</sup> 发现了一种新的因子, 对颈上神经节的交感神经元有明显的营养作用, 命

名为 neurturin (NTN). 成熟的 NTN 蛋白与 GDNF 有 42% 的同源性, 它也含有 TGF- $\beta$  超家族的七个保守半胱氨酸残基, 和 TGF- $\beta$  超家族的其成员之间的同源性也小于 20%, 因而 NTN 和 GDNF 代表着一个结构上属于 TGF- $\beta$  超家族新的神经营养因子家族<sup>[2]</sup>.

Widenfalk 等<sup>[7]</sup> 研究了 NTN 在小鼠中的表达分布, 发现在胚鼠和新生小鼠的中枢神经系统中有着广泛的表达; 在外周组织中 NTN 表达在许多交感和感觉神经元的靶组织中, 包括肾、肠道的环肌层、尿道平滑肌、细支气管和感觉器官, 以及唾液腺的上皮组织和心肌. 在成熟鼠中 NTN 则表达于脑部的垂体, 睾丸的支持细胞和输卵管的上皮细胞等处.

对 NTN 的生理功能尚未完全了解, 目前已发现它对外周神经系统中的交感神经元和结状神经节的感觉神经元有着显著的营养作用<sup>[2]</sup>, 对运动神经元和中脑多巴胺能神经元也有营养功能<sup>[8]</sup>. NTN 在许多组织中有着广泛的表达, 表明 NTN 可能和 GDNF 一样有着广泛的生物学功能.

### 1.3 Persephin (PSP)

1998 年 2 月, Milbrandt 等<sup>[3]</sup> 报道了 GDNF 家族的一个新成员——persephin (PSP). PSP 的氨基酸序列与 NTN 和 GDNF 大约有 40% 的同源性, 它不仅拥有 TGF- $\beta$  家族的七个保守半胱氨酸, 同时也拥有只在 NTN 和 GDNF 之间出现的保守序列. 研究发现 PSP 以非常低的含量表达于胚鼠和成年

\*中国科学院生物科学与技术研究特别支持费资助 (STZ97-2-01, STZ98-2-09).

收稿日期: 1998-06-08, 修回日期: 1998-08-17

鼠的大部分组织中,各组织中含量相近且未剪切的 mRNA 的含量相对较高,这暗示对其 mRNA 剪切加工的调控在调节 PSP 蛋白的表达量中可能起着重要的作用。

对 PSP 功能的研究还刚刚开始<sup>[3]</sup>,实验中发现它对运动神经元和多巴胺能神经元有营养作用,同时它也能促进培养的输尿管芽(ureteric bud)的发育。但与 NTN 和 GDNF 不同,PSP 对外周神经系统中的交感神经元、感觉神经元和肠道神经元都没有营养作用。

综上所述,这三种因子都对中脑多巴胺神经元和运动神经元有营养作用,说明对这些神经元来说存在多种因子冗余的营养作用,这与在 GDNF 基因敲除小鼠中多巴胺神经元和运动神经元只产生部分缺损的现象相符。与之形成对比的是虽然体外实验证实这三种因子在肾脏的发育过程中都有营养作用,但 GDNF 的缺失却会造成严重的肾脏发育缺损,因此对于不同的细胞,这三种因子可能有着不同的重要性。

因为 GDNF 家族有着广泛的生物学作用,并且有可能应用于神经退行性疾病的临床治疗,所以从分子水平上了解其作用机制就显得十分重要。研究其作用机制的第一步是了解其受体结构,近两年来的研究表明 GDNF 家族存在着独特的多组分受体结构。

## 2 GDNF 家族受体研究进展

### 2.1 GFR -1 和 Ret 蛋白

1996年6月,Jing等<sup>[8]</sup>和 Treanor等<sup>[9]</sup>两个实验组采用“表达克隆法”(expression cloning)发现了与 GDNF 有高亲和力的受体蛋白 GFR -1 (原先命名为 GDNFR-),结构分析表明 GFR -1 蛋白含 468 个氨基酸残基,包括 31 个半胱氨酸残基,N 端有一段分泌信号肽,C 端有一个长约 20~23 个氨基酸的疏水区,而且 C 端的最前方是 3 个小氨基酸(rGFR -1 为:Ala Ser Ser),形成一个糖基磷脂酰肌醇(GPI)结合位点锚定于细胞膜外表面。

Treanor 等<sup>[9]</sup>用磷脂酰肌醇磷脂酶 C (PIPLC)——一种能特异地切开 GPI 连结的酶——处理了多种对 GDNF 有依赖性的神经元,发现处理后的神经元即使在饱和浓度的 GDNF 中成活率也下降了 50%~90%。在用 PIPLC 处理过的运动神经元的培养液中,只有同时加入 GDNF 和 GFR -1,才能恢复 GDNF 的营养作用<sup>[9]</sup>,表明

GFR -1 在介导 GDNF 的生物学效应的过程中是必不可少的一员。

因为 GFR -1 是分布于膜外的 GPI 蛋白,因此必然存在其他的成分将信号传导到胞内。研究中发现 GDNF 基因敲除小鼠与缺失原癌基因 *c-ret* 的小鼠有着极其相似的表型,特别是都表现出肾脏发育畸形和肠道神经缺失<sup>[10]</sup>。*c-ret* 基因编码的是一种跨膜的酪氨酸激酶受体,在鼠胚的神经系统和肾脏中有高表达。这些事实使人们推断 Ret 蛋白可能是 GDNF 传导通路中的一员。实验发现 GDNF 能引起 Ret 蛋白的磷酸化,但 GDNF 并不能与 Ret 蛋白直接结合,进一步的实验发现这种磷酸化不仅可以被 PIPLC 去除,而且在加入溶解的 GFR -1 蛋白后可以恢复<sup>[8,9]</sup>。利用免疫沉淀法最终证实 GDNF 可以通过 GFR -1 引起 Ret 蛋白的磷酸化,而且这三种物质在膜上可以形成复合物<sup>[8,9]</sup>。

根据以上实验,目前认为 GDNF 是通过膜表面的 GFR -1 蛋白与 Ret 蛋白结合并引起 Ret 蛋白酪氨酸位点发生自磷酸化,从而启动信息在胞内的传导。目前已有一些实验证实 GDNF 可以引起 Ret 蛋白的二聚化并形成 Ret-Shc-Grb2 蛋白复合体<sup>[11]</sup>,而后进一步激活 Ras 和 Raf 蛋白进入 MAPK 途径<sup>[12]</sup>。

### 2.2 GFR -2 与 Ret 蛋白

1997年,几个实验组利用 GFR -1 的序列,找到了同源性的新的受体蛋白 GFR -2 (原先命名为 NTNR-),含 464 个氨基酸残基,与 GFR -1 有 48%~49% 的同源性,含有 30 个半胱氨酸残基,位置与 GFR -1 含有的半胱氨酸残基(31 个)的位置相同,并且同样靠 GPI 连接锚定在细胞膜外表面。

人们首先发现 GFR -2 与 NTN 有高亲和力的结合,并且在介导 NTN 的效应中是必不可少的,用 PIPLC 处理运动神经元,鸡胚结状神经节感觉神经元和新生鼠颈上神经节神经元后都可以完全阻断 NTN 的营养功能,而且这种阻断可以为加入的 GFR -2 蛋白所恢复<sup>[13,14]</sup>,通过免疫沉淀法证实 NTN 与 GFR -2 结合后同样通过 Ret 蛋白传导信息<sup>[13,14]</sup>。

在发现 GFR -2 之后,人们探讨了各因子与受体之间的交叉结合特性。Buj-Bello 等<sup>[14]</sup>发现表达 GFR -2 和 Ret 蛋白的原代培养神经元只有在 GDNF 浓度很高(50 μg/L,是  $K_d$  的 1000 倍左右)时才能接受其营养作用,而表达 GFR -1 和

Ret 的细胞即使在这样高的浓度下也不能接受 NTN 的营养作用, 表明这两种 GPI 蛋白对其配基因子有一定的结合特异性. 另一些实验发现对表达 GFR -1 和 Ret 蛋白的细胞, 相同浓度的 NTN 和 GDNF 将引起 Ret 蛋白同等程度的磷酸化, 而表达 GFR -2 和 Ret 蛋白的细胞则对 NTN 更加敏感<sup>[15]</sup>. 目前有较多的证据表明两种 GFR 受体蛋白都可以与 GDNF 和 NTN 结合, 其中 GFR -1 是 GDNF 主要的受体, GFR -2 是 NTN 主要的受体<sup>[16]</sup>. Sanicola 等<sup>[17]</sup>发现 GFR -2 与 GDNF 只有在 Ret 蛋白存在时才会有高亲和力的结合, 表明 Ret 蛋白在体内可能参与调节 GFR 受体对 GDNF 与 NTN 的结合特异性. 目前的实验发现 PSP 不能引起表达 GFR -1 和 GFR -2 的细胞的 Ret 蛋白的磷酸化. 它的受体还是一个未知数<sup>[13]</sup>.

### 2.3 GFR -3

在 1998 年 2 月, Dixon 等和 Ernfors 等两个实验组几乎同时发表了第三个受体成员 GFR -3<sup>[18,19]</sup>, 其氨基酸序列与 GFR -1 和 GFR -2 的同源性分别为 32% ~ 33% 和 36% ~ 37%, 它只含有 28 个保守的半胱氨酸残基, 表明 GFR -3 是 GFR 家族中的一个较远的成员. 它与前两种受体有很大的不同, 是通过经过修饰的 GPI 蛋白锚定在细胞膜上, 不能用 PIPLC 切下来; 实验中发现它虽然可以与 Ret 蛋白结合, 但是 GDNF 不能通过它激活 Ret 蛋白. 目前尚不知道其具体的配基.

## 3 GDNF 家族受体的表达分布研究

研究各种因子的表达分布有助于了解其在体的生理功能. 正如预期的一样, GFR -1 和 Ret 蛋白共表达于大部分已知的 GDNF 的作用区域<sup>[20]</sup>. GFR -2 在中枢神经系统中有着广泛的表达, 在外周神经系统中表达于感觉神经节和自主神经节处的神经元, 以及发育中的肾和肠<sup>[8]</sup>. 虽然 GFR -1 与 GFR -2 共表达于许多区域, 但也有不同的地方, 比如颈上神经节神经元只表达 GFR -2 和 Ret 蛋白, 而多巴胺能神经元和运动神经元中则只表达 GFR -1 和 Ret 蛋白, 实验中发现 GDNF 和 NTN 对他们都有营养作用, 说明在体内 GDNF 家族因子与 GFR 受体之间有交叉作用.<sup>[8,15,20]</sup> GFR -3 的表达与前两者不同, 在中枢神经系统中它只在发育期表达, 而且往往在 GDNF, NTN 及其受体表达丰富的区域; 它在外周器官与神经节中则发育期和成年期都有广泛的表达, 而且与 Ret 的表达有较

紧密的连锁关系<sup>[18,19]</sup>.

实验中也发现受体复合物中的 GPI 蛋白与 Ret 蛋白在表达上并不完全重合, 比如雪旺氏细胞只表达 GFR -1 而不表达 Ret 蛋白, 目前认为这些雪旺氏细胞表达的 GFR -1 可能参与积聚游离的 GDNF, 并递呈给受损的神经元<sup>[20]</sup>. Dixon 等和 Yu 等更进一步提出, 在体内 Ret 蛋白与 GFR 蛋白之间的作用方式有两种, 一种是 Ret 蛋白与同一细胞上的 GFR 结合, 称为“同位”(in cis), 另一种是 Ret 蛋白与游离的或另一细胞上的 GFR 结合, 称为“异位”(in trans)<sup>[16,19]</sup>.

综合以上的研究结果, 可以看出 GDNF 和 NTN 的受体均为多组分的复合体, 由不同的 GPI 蛋白和共享的跨膜酪氨酸激酶 Ret 蛋白构成. 其中 GPI 蛋白是配基结合亚基, 而 Ret 蛋白则通过自身磷酸化来传导信号并且有可能参与调节 GPI 蛋白的结合特异性, 参见图 1<sup>[21]</sup>. 这种传导通路的特点是具有不同底物特异性的多种配基结合亚基可以激活同一条信息传导通路, 从而使不同的外来因子在功能上有冗余性. 这种受体结构也存在于 CNTF 受体<sup>[22]</sup>, 细菌内毒素受体<sup>[23]</sup>等体系中.

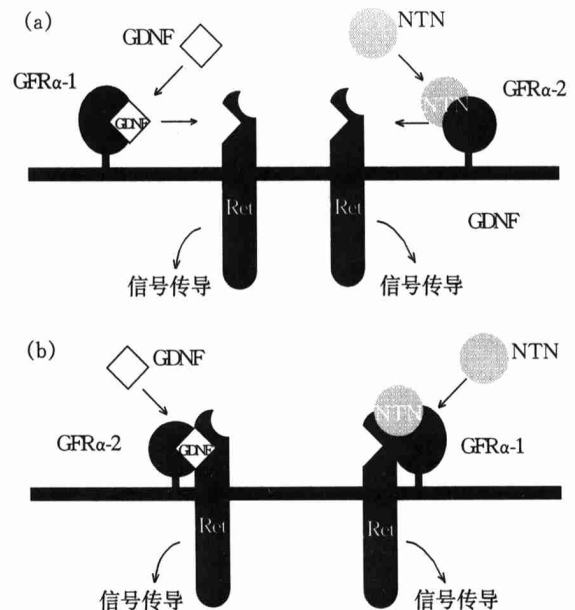


图 1 GDNF 家族的因子与其多组分受体之间在体内可能存在多种作用方式

(a) NTN 和 GDNF 可以与其对应的特异性 GPI 蛋白结合, 然后这个复合物可以激活 Ret 蛋白. (b) Ret 蛋白可以与两种 GPI 蛋白结合并调节其结合特异性, 形成的复合物能被另一营养因子激活.

目前对于 GDNF 家族及其受体的研究正在不

断深入, 未来的研究重点包括 NTN 和 PSP 的功能, PSP 的受体成分, Ret 激酶的具体激活机制和在体内与 GFR 蛋白的作用方式, 受体复合物的具体形成过程以及寻找 GDNF 家族中更多的成员和受体成分。

新近 Milbrandt (Neuron, 1998, Dec, 21 (6): 1291 ~ 1302) 小组又克隆出 GDNF 家族中第 4 个成员 Artemin, 并证实它就是先前报道的 GFR 3-Ret 的唯一配基。Artemin 促进感觉和交感神经元的存活, 也能激活 GFR 1-Ret 并促进中脑多巴胺能神经元的存活。另外, Davies (Curr Biol, 1998, 8 (18): 1019 ~ 1022) 小组证实 PSP 与鸡的 GFR 4 结合, 而在哺乳类中尚未发现 GFR 4。

### 参 考 文 献

- Lin L F, Doherty D H, Lile J D, *et al.* GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science*, 1993, **260** (5111): 1130 ~ 1132
- Kotzbauer P T, Lampe P A, Heuckeroth R O, *et al.* Neurturin, a relative of glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Nature*, 1996, **384** (6608): 467 ~ 470
- Milbrandt J, de Sauvage F J, Fahrner T J, *et al.* Persephin, a novel neurotrophic factor related to GDNF and neurturin. *Neuron*, 1998, **20** (2): 245 ~ 253
- Eigenbrot C, Gerber N. X-ray structure of glial cell-derived neurotrophic factor at 1.9 Å resolution and implications for receptor binding. *Nat Struct Biol*, 1997, **4** (6): 435 ~ 438
- 陈 燕 (Chen Y). 胶质细胞源神经营养因子研究进展. *生物化学与生物物理进展* (Prog Biochem Biophys), 1996, **23** (6): 524 ~ 526
- Sanchez M P, Silos-Santiago I, Frisen J, *et al.* Renal agenesis and the absence of enteric neurons in mice lacking GDNF. *Nature*, 1996, **382** (6586): 70 ~ 73
- Widenfalk J, Nosrat C, Tomac A, *et al.* Neurturin and glial cell line-derived neurotrophic factor receptor- (GDNFR-), novel proteins related to GDNF and GDNFR- with specific cellular patterns of expression suggesting roles in the developing and adult nervous system and in peripheral organs. *J Neurosci*, 1997, **17** (21): 8506 ~ 8519
- Jing S, Wen D, Yu Y, *et al.* GDNF-induced activation of the Ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-, a novel receptor for GDNF. *Cell*, 1996, **85** (7): 1113 ~ 1124
- Treanor J J, Goodman L, de Sauvage F, *et al.* Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature*, 1996, **382** (6586): 80 ~ 83
- Schuchardt A, D Agati V, Larsson-Blomberg L, *et al.* Defects in the kidney and enteric nervous system of mice lacking the tyrosine kinase receptor Ret. *Nature*, 1994, **367** (6461): 380 ~ 383
- Ohiwa M, Murakami H, Iwashita T, *et al.* Characterization of Ret-Shc-Grb2 complex induced by GDNF, MEN2A, and MEN 2B mutations. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, **237** (3): 747 ~ 751
- Durick K, Gill G N, Taylor S S. Shc and Enigma are both required for mitogenic signaling by Ret/ptc2. *Mol Cell Biol*, 1998, **18** (4): 2298 ~ 2308
- Klein R D, Sherman D, Ho W H, *et al.* A GFP-linked protein that interacts with Ret to form a candidate neurturin receptor. *Nature*, 1997, **387** (6634): 717 ~ 721
- Buj-Bello A, Adu J, Pinon L G, *et al.* Neurturin responsiveness requires a GFP-linked receptor and the Ret receptor tyrosine kinase. *Nature*, 1997, **387** (6634): 721 ~ 724
- Baloh R H, Tansey M G, Golden J P, *et al.* TrnR2, a novel receptor that mediates neurturin and GDNF signaling through Ret. *Neuron*, 1997, **18** (5): 793 ~ 802
- Jing S, Yu Y, Fang M, *et al.* GFR-2 and GFR-3 are two new receptors for ligands of the GDNF family. *J Biol Chem*, 1997, **272** (52): 33111 ~ 33117
- Sanicola M, Hession C, Worley D, *et al.* Glial cell line-derived neurotrophic factor-dependent RET activation can be mediated by two different cell-surface accessory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94** (12): 6238 ~ 6243
- Worby C A, Vega Q C, Chao H J, *et al.* Identification and characterization of GFR-3, a novel co-receptor belonging to the glial cell line-derived neurotrophic receptor family. *J Biol Chem*, 1998, **273** (6): 3502 ~ 3508
- Naveilhan P, Baudet C, Mikaelis A, *et al.* Expression and regulation of GFR-3, a glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (2): 1295 ~ 1300
- Trupp M, Belluardo N, Funakoshi H, *et al.* Complementary and overlapping expression of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), c-ret proto-oncogene, and GDNF receptor- indicates multiple mechanisms of trophic actions in the adult rat CNS. *J Neurosci*, 1997, **17** (10): 3554 ~ 3567
- Davis S, Aldrich T H, Stahl N, *et al.* LIFR and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science*, 1993, **260** (5115): 1805 ~ 1808
- Lee J D, Kravchenko V, Kirkland T N, *et al.* Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored or integral membrane forms of CD14 mediate identical cellular responses to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90** (21): 9930 ~ 9934

**Progress in Research of GDNF Family and Their Multicomponent Receptors.** DONG Min, HU Bing (School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China).

**Abstract** Glial cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin (NTN) and persephin (PSP) define a new family of neurotrophic factors which are distant members of the transforming growth factor- (TGF-) superfamily and play widely physiological roles *in vivo*. Recent studies have revealed the existence of a novel family of multicomponent receptors for GDNF family, composed of distinct glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-linked cell surface proteins and a shared transmembrane tyrosine kinase receptor, Ret.

**Key words** neurotrophic factors, GDNF, Ret, multicomponent receptors