

DARPP-32、多巴胺系统与神经元信息整合

王学斌¹, 蒋锦昌², 李东风³

(1. 临沂师范学院生命科学系 山东 临沂 276005; 2. 中国科学院生物物理研究所视觉信息加工重点实验室, 北京 100101;

3. 华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631)

摘要: Dopamine and CAMP-regulated Phosphoprotein (DARPP-32)是脑内新纹状体等重要核团的神经元内存在的一种具有多方面信息调节与整合作用的蛋白质。多巴胺、谷氨酸等神经递质与相应受体结合后,使 DARPP-32 的 34- 苏氨酸等的磷酸化状态发生改变,继而影响 PP-1、PP2B 等重要磷酸酯酶的活性,使神经元内从各种途径获取的信息得以整合,神经元的生理功能及其控制的行为发生改变。DARPP-32 的功能与多种神经递质及其受体密切相关,其功能可用基因敲除技术进行探究。

关键词: DARPP-32; 多巴胺; 神经递质; 受体; 信息传递与整合

中图分类号: Q51 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2003)01-0001-06

保守地估计,人脑内的神经元数量至少有 140 亿,有人甚至认为有 1000 亿^[1],这些神经元之间通过突触联系形成庞大的神经网络。突触的信息传递与整合问题一直是神经生物学领域的重要研究课题。关于突触的信息传递是电学过程还是化学过程的问题,生理学界曾有过长期的争论。20 世纪 60 年代,确立了化学传递理论的统治地位,认为中枢神经系统内 99% 以上的信息交流是以神经递质化学释放的作用方式进行的,少量的电传递方式主要存在于较低等的动物^[1]。近年来,有关神经递质化学传递与信息整合的研究取得了重大进展,Green-gard 等并因此获得了诺贝尔生理学奖。

化学传递可分为快突触传递和慢突触传递两大类。快突触传递多以谷氨酸及 γ - 氨基丁酸 (γ -GABA) 为递质,传递过程在不到 1 毫秒的时间内完成;慢突触传递时程则需数百毫秒至数分钟,已知有 100 多种递质可参与慢传递过程,这些递质包括生物胺类、肽类和氨基酸类(其中谷氨酸和 γ -GABA 也有许多过程是通过慢突触传递实现的)等^[2]。其中对多巴胺能信号传递与整合过程的研究较为充分,取得了许多重要的具有普遍意义的结果,并发现了一个重要的中继调控分子—DARPP-32。DARPP-32 在神经元信息整合过程中可能具有中心作用^[3]。

1 多巴胺能信号传递系统

多巴胺 (dopamine, DA) 是儿茶酚胺类神经

递质家族中的一员,也是去甲肾上腺素 (NE) 和肾上腺素 (E) 合成的前体,曾经被认为只是 NE 和 E 合成过程中的中间产物。1958 年, Carlsson 报道,在纹状体内,DA 的含量很大,占全脑多巴胺总含量的 70% 以上,并首次提出 DA 可能是具有独立作用的神经递质^[3]。后来的研究表明,DA 是一种重要的神经递质,其传递过程发生故障时可导致多种神经或精神疾患,如帕金森症 (Parkinson disease)、亨廷顿症 (Huntington's disease)、强迫妄想 (obsessive-compulsive disorder)、精神分裂 (schizophrenia) 及吸毒成瘾 (addiction) 等^[4]。另外,多巴胺在学习记忆中也具有重要作用^[5,6]。

1.1 多巴胺能神经元的分布及其投射

中枢神经系统内的多巴胺能神经元分布较为集中,主要位于黑质附近的中脑腹侧被盖区、间脑及嗅球等处^[5,7]。这些神经元主要投射到纹状体,也向边缘系统的其他结构及前额叶皮质、嗅皮层、内鼻皮层和前扣带回等的一些部位发出投射纤维,是锥体外系的重要组成部分^[7,8]。灵长类和啮齿类的分布有一定差异,如灵长类的运动皮层具有密集的多巴胺能神经末梢分布,而啮齿类则没有^[7]。纹状体的侧棘神经元 (medium spiny neurons) 占该区神经

收稿日期: 2002-05-22

基金项目: 教育部科学技术研究重点项目 (01062)

作者简介: 王学斌, 1966 年生, 副教授, 东北师大在读博士,

电话: (0539)8293611, E-mail: wangxuebin1966@163.com

元总数的96%以上,是多巴胺的主要接受靶,该区这些神经元也可接受谷氨酸、 γ -GABA、5-HT等递质^[1]。

1.2 多巴胺受体

侧棘神经元上的多巴胺受体有两大类, D_1 类和 D_2 类。每一类受体又有许多亚型,如 D_1 类受体有 D_{1A} 、 D_{1B} (灵长类中称 D_5)、 D_{1C} 、 D_{1D} 、 D_{1X} 等亚型; D_2 类受体有 D_2 、 D_3 、 D_4 等亚型,其中 D_2 亚型又可分为 D_{2long} 、 D_{2short} 的异构形式^[9]。每一亚型的受体与多巴胺结合后可能产生不同的生理效应,但总的来讲,被多巴胺激活后, D_1 类受体可增强腺苷酸环化酶 (AC) 的活性,从而增加 cAMP 的生成,主要由兴奋性 G 蛋白 (G_s) 介导; D_2 类受体可抑制 AC 的活性,降低 cAMP 的生成,主要由抑制性 G 蛋白 (G_i) 介导^[10,11]。

D_1 类和 D_2 类受体的生理功能与一种特殊的蛋白质分子——DARPP-32 密切相关。

2 DARPP-32

DARPP-32 是 Walaas 等在 1983 年发现的,其全称为多巴胺和 cAMP 调节的磷酸蛋白 (dopamine and cAMP-regulated phosphoprotein), 分子量为 32 kD, 其氨基酸序列高度保守。在灵长类, DARPP-32 是由 202 (大鼠是 205) 个氨基酸组成的酸性单肽链, 其中第 34 位(自氨基端计数)氨基酸为苏氨酸(Thr)^[12,13]。在不同条件下 34-Thr 可以磷酸化或去磷酸化, 是 DARPP-32 的重要活性部位。

2.1 分布

在大鼠胚胎发育的第 16~17 天就可测得 DARPP-32 的存在, 出生时 DARPP-32 量急剧增多, 至 3 周龄时达到稳定水平^[14]。成年哺乳动物的 DARPP-32 大量集中于新纹状体 (尾状核与壳核) 及伏隔核 (nucleus accumbens)、嗅结节 (olfactory tubercle)、杏仁体等的神经元内, 灵长类与啮齿类的分布有一定差异^[7,15,16]。鸟类脑的 DARPP-32 也主要集中于基底神经核、第二感觉区、边缘系统及运动区。第一体感区及视、听区没有或很少有含 DARPP-32 的神经元^[17]。

过去认为, DARPP-32 是 D_1 类受体的专一性标志物, 即它的调节作用只与 D_1 类受体的活动相关^[3]。但现在一些作者提出, 这些含 DARPP-32 的神经元膜上含有多种受体, 可接受不同脑区的多种

信息, 同时又是将新纹状体的信息传出的唯一通路, 所以它们必须将这些信息进行精确的分析和整合, DARPP-32 在信息整合过程中居于中心位置^[1,18]。在这一过程中, D_1 类和 D_2 类受体及其他激素受体协作调节 DARPP-32 的活性。

2.2 DARPP-32 的作用及其活性调节

DARPP-32 有 4 个主要的磷酸化位点, 其中 34-Thr 是最有效的位点。34-Thr 在蛋白激酶 (PKA 或 PKG) 的作用下磷酸化后, 可以对细胞内的重要调节酶——磷酸酯酶 I (PP-1) 产生强烈的抑制作用^[1,12]。由于 PP-1 可以调控神经元内的许多重要磷酸蛋白(如神经递质受体、离子通道、转录因子、离子泵等)的磷酸化状态^[12,19], 因此, DARPP-32 在神经元内具有重要的多方面的生理调节作用。

34-Thr 的去磷酸化作用由磷酸酯酶 2B (PP2B) 完成。34-Thr 去磷酸后, DARPP-32 对 PP-1 的抑制作用解除。因此, DARPP-32 的 34-Thr 磷酸化状态的数量以及由此而引起的 PP-1 的抑制程度反映了 34-Thr 磷酸化与去磷酸化之间的动态平衡。

PKA 和 PP2B 调节 34-Thr 磷酸化状态的能力受其他蛋白激酶和蛋白磷酸酶的调节, 而其他蛋白激酶和蛋白磷酸酶的活化或抑制又与该神经元接受的神经递质 (如多巴胺) 的种类及数量直接相关^[20]。

除了 34-Thr 外, DARPP-32 尚有另外 3 个位点可以进行磷酸化。75-Thr 可被 CDK5 (cyclin-dependent kinase 5) 磷酸化, 此时 DARPP-32 成为 PKA 的抑制剂, 可导致 PKA 使 DARPP-32 的 34-Thr 磷酸化的能力降低; 同时, 由于受到抑制, PKA 使其它底物磷酸化的能力也降低。相反, DARPP-32 的 102-Ser 被酪激酶 II (casein kinase II) 磷酸化后, 则使 DARPP-32 的 34-Thr 更易被 PKA 磷酸化, 但不影响被 PKG 磷酸化的能力, 也不影响 PKA 使其他底物磷酸化的能力; 137-Ser 可被酪激酶 I (casein kinase I) 磷酸化, 此时 DARPP-32 的 34-Thr 则变得不易被 PP2B 去磷酸化而保持较高的活力, 但不影响 PP2B 对其它底物去磷酸化的能力^[1,21]。

利用这 4 个位点上的苏氨酸或丝氨酸磷酸化及去磷酸化的平衡作用, DARPP-32 可以进行精细的分子活动调节, 因而在神经元的信息传递和级联放大作用中居于中心地位。这是迄今所发现的所有的

生物活性分子中唯一具有这种功能的分子。

3 多巴胺等神经递质是调节 DARPP-32 的“第一信使”

3.1 多巴胺与 DARPP-32

DARPP-32 的生理功能最初是在研究多巴胺 D₁ 类受体时发现的。多巴胺对 DARPP-32 的影响是迄今为止研究得最多、最详尽的。

多巴胺与 D₁ 类受体结合后，激活腺苷酸环化酶，生成 cAMP，从而激活 PKA 或 PKG，导致 DARPP-32 的 34-Thr 磷酸化^[2,13]，成为 PP-1 的高效抑制剂，其半抑制浓度(IC₅₀)为 10⁻⁹ mol/L^[19]。而新纹状体的侧棘神经元内所含的 DARPP-32 浓度很高，超过 10⁻⁵ mol/L^[1,19]，故该处多巴胺能神经末梢的少量释放即可引起 PP-1 的大量抑制，表现出极为强烈的级联 (cascade) 放大效应。

多巴胺与 D₂ 类受体结合后，可经两条途径导致 DARPP-32 的 34-Thr 去磷酸化：(1) 阻碍 D₁ 类受体的活动，使 cAMP 的生成减少；(2) 增加细胞间 Ca²⁺ 水平，激活 Ca²⁺ 依赖的蛋白磷酸酶 PP-2B，Ca²⁺ 或钙调素 (calmodulin) 依赖的蛋白磷酸酶或钙神经碱 (calcineurin) ^[22,23]。DARPP-32 的 34-Thr 去磷酸化后，对 PP-1 的抑制作用即解除。

D₁ 和 D₂ 类受体与多巴胺结合后的这种相互协调又相互拮抗的作用，使 DARPP-32 调节的神经元功能以及由此而致的行为 (称多巴胺依赖的行为) 发生明显变化^[18,24]。

3.2 其他神经递质对 DARPP-32 的调节

近来的研究表明，DARPP-32 并非仅受多巴胺的调制。其他许多因素如谷氨酸、可卡因、阿片、5-HT、苯丙胺、γ-GABA、NO、腺苷等神经递质及其类似物都可能影响 DARPP-32 的磷酸化^[8,18,25-27]，从而影响其功能(见图 1)。

以谷氨酸为例。新纹状体接受传入信息的主要

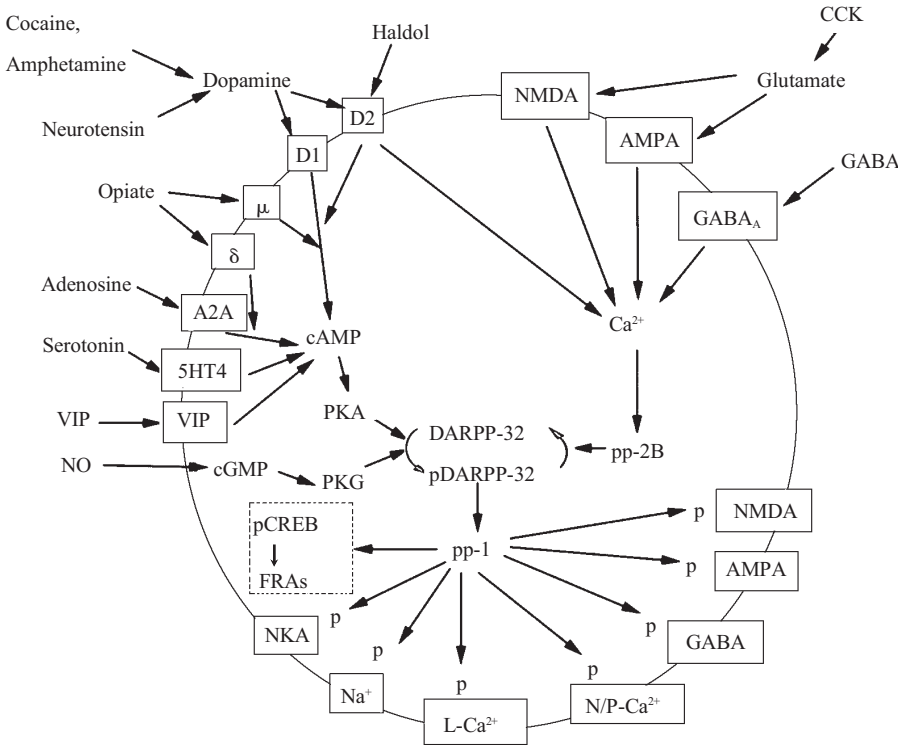


Fig.1 Sketch map about signaling pathway in the neostriatum^[1]

途径之一是由皮层发出的以谷氨酸为递质的投射纤维。纹状体的含 DARPP-32 的神经元细胞膜上存在谷氨酸的 NMDA 和 AMPA 型受体。这两种受体与谷氨酸结合后可作用于多巴胺的 D₁ 和 D₂ 类受体，共同调节 DARPP-32 的磷酸化状态^[12,28]。谷氨酸与 AMPA 型受体结合后，通过 Na⁺ 内流可致

快突触传递反应；但其慢突触传递则可由于活化 NMDA 或 AMPA 受体而增加细胞内的 Ca²⁺ 浓度，PP-2B 的活动加强，引起 DARPP-32 的 34-Thr 去磷酸化，从而抑制 DARPP-32 的活动；同时，DARPP-32 的活性也影响谷氨酸受体的活动：DARPP-32 调节的 PP-1 的抑制可使 AMPA 的蛋白

磷酸化作用增强,从而对谷氨酸更加敏感^[1,29]。

其他因素,如神经紧张素可调节多巴胺的释放,间接增加 DARPP-32 的磷酸化;成瘾药物和抗精神分裂药物都可通过调节 DARPP-32 的 34-Thr 磷酸化状态而影响神经元的活动和意识行为。如抗精神分裂症药物 Haldol,可阻断 D₂ 受体的活动,增强 DARPP-32 的磷酸化;mu 和 delta 阿片受体激动剂则可与 D₁、D_{2A} 受体作用,增加 cAMP 的量,因而增加 DARPP-32 的磷酸化。可卡因和苯丙胺,通过增加细胞间的多巴胺水平而增加 DARPP-32 的磷酸化^[1,21]。

因此,有多种生理活性物质可以调节 DARPP-32 的磷酸化和去磷酸化平衡,转而调控 PP-1 的活性状态,导致同一神经元可传出多种相异的信息。从这个意义上,可以认为 DARPP-32 是纹状体神经元内的一个信息整合中心。

4 DARPP-32 基因敲除

正常细胞内的结构和功能蛋白(如受体、通道蛋白等)大都有特异性的激动剂和拮抗剂,外源施加激动剂和拮抗剂可引起这些蛋白发生结构变化及功能亢进或抑制^[8]。但 DARPP-32 至今没有找到这样的因子。因此,一些作者利用基因敲除(knock-out)技术产生 DARPP-32 缺陷动物,来研究 DARPP-32 的重要细胞功能及其所引起的动物行为变化^[18,24]。

敲除 DARPP-32 基因的方法是利用转染技术将含 DARPP-32 基因的 DNA 片段被其他 DNA 序列(如抗新霉素基因)所取代。由此产生的动物纯合后提取其前脑纹状体产物,用免疫组化法确证其脑内没有 DARPP-32 存在^[24,30]。

利用这种 DARPP-32 缺陷鼠,一些作者成功地获取了 DARPP-32 的许多重要生理功能。比如,在动物的胚胎发育期,DARPP-32 似无重要的影响作用,因为缺少 DARPP-32 基因的鼠胚胎可形成具有正常形态结构的脑,而且神经元密度、神经末梢和树突棘等都与野生型鼠相同,一些基本的生理指标也无差别^[14,24]。但出现许多明显的电生理、生化、药理、毒理及行为的变异,如对 D₁ 受体激动剂 SKE38393 的反应大幅度降低;多巴胺引起的许多蛋白质磷酸化效应显著减弱;纹状体内由苯丙胺引起的 GABA 分泌明显减少;苯丙胺诱导的 c-fos 免疫反应减低;某些运动敏感化增强,而对去水吗

啡的敏感性降低;D₂ 受体介导的行为反应明显减弱等^[14,18,24,30]。

5 小结

DARPP-32 作为某些神经细胞内存在的一个特殊蛋白质分子,其磷酸化过程受到多种神经递质的调节,而它本身又可调节多种靶蛋白的磷酸化作用,因而在复杂的信号传递过程中居于中心位置。DARPP-32 基因敲除技术的应用还使这种新技术成为了分子生物学中的一个重要实验工具。对 DARPP-32 的研究也将为神经系统疾病如帕金森症、亨廷顿症、精神分裂症及吸毒成瘾等的治疗提供有效的依据和手段。

参考文献:

- [1] Greengard P. The neurobiology of slow synaptic transmission [J]. *Science*, 2001,294:1024~1029.
- [2] Greengard P, Nairn AC, Girault J, et al. The DARPP-32 protein phosphatase-1 cascade: a model for signal integration[J]. *Brain Research Reviews*, 1998,26:274~284.
- [3] 韩济生主编,神经科学原理[M].北京:北京医科大学,协和医科大学联合出版社.2000.365~382.
- [4] Carlsson A, Nicholas W, Susanna W, et al. Network interactions in schizophrenia-therapeutic implications [J]. *Brain Research Reviews*, 2000,31:342~349.
- [5] Suri RE, Bargas J, Arbib MA. Modeling functions of striatal dopamine modulation in learning and planning [J]. *Neuroscience*, 2001,103:65~85.
- [6] Salum C, Roque SA, Pickering A. Striatal dopamine in attentional learning: A computational model [J]. *Neurocomputing*, 1999,26-27:845~854.
- [7] Berger B, Gaspar P, Verney C. Dopaminergic innervation of the cerebral cortex: unexpected differences between rodents and primates [J]. *Trends Neurosci*, 1991,14:21~27.
- [8] Ghashghaei HT, Barbas H. Neural interaction between the basal forebrain and functionally distinct prefrontal cortices in the rhesus monkey [J]. *Neuroscience*, 2001,103:593~614.
- [9] John LW, Jeremiah JC, Fergal NM, et al. The psychopharmacology-molecular biology interface: exploring the behavioural roles of dopamine receptor subtypes using targeted gene deletion ('knockout') [J]. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat*, 2001,25:925~964.

- [10] Missale C, Nash SR, Robinson SW, et al. Dopamine receptors: from structure to function[J]. *Physiology Review*, 1998, 78:189~225.
- [11] Sibley DR. New insights into dopaminergic receptor function using antisense and genetically altered animals[J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1999,39:313~341.
- [12] Hemmings HC, Williams KR, Konigsberg WH, et al. DARPP-32, a dopamine- and adenosine-3',5'-monophosphate-regulated neuronal phosphoprotein. I. Amino acid sequence around the phosphorylated threonine [J]. *J Biol Chem*, 1984,259:14486~14490.
- [13] Nishi A, Snyder GL, Greengard P. Bidirectional regulation of DARPP-32 phosphorylation by dopamine [J]. *J Neurosci*, 1997,17:8147~8155.
- [14] Ehrlich ME, Rosen NL, Kuihara T, et al. DARPP-32 development in the caudate nucleus is independent of afferent input from the substantia nigra[J]. *Dev Brain Res*, 1990,54:257~263.
- [15] Walaas SI, Greengard P. DARPP-32, a dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate- regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain region. I. Regional and cellular distribution in the rat brain[J]. *J Neurosci*, 1984,4:84~98.
- [16] Ouimet CC, Miller PE, Hemmings HC, et al. A dopamine- and adenosine 3':5'-monophosphate-regulated phosphoprotein enriched in dopamine-innervated brain region. III. Immunocyto-chemical localization[J]. *J Neurosci*, 1984,4:114~124.
- [17] Durstewitz D, Kroner S, Hemmings HC, et al. The dopaminergic innervation of the pigeon telencephalon: distribution of DARPP-32 and co-occurrence with glutamate decarboxylase and tyrosine hydroxylase[J]. *Neuroscience*, 1998,83:763~779.
- [18] Fienberg AA, Greengard P. The DARPP-32 knockout mouse [J]. *Brain Research Reviews*, 2000,31:313~319.
- [19] Hemmings HC, Greengard P, Tung YL, et al. DARPP-32, a dopamine-regulated phosphoprotein neuronal, is a potent inhibitor of protein phosphatase-1 Phosphoprotein[J]. *Nature*, 1984,310:503~505.
- [20] Murphy BJ, Rossie S, DeJongh KS, et al. Identification of the sites of selective phosphorylation and dephosphorylation of the rat brain Na⁺ channel subunit by cAMP-dependent protein kinase and phosphoprotein phosphatases [J]. *J Biol Chem*, 1997,17:8147~8155.
- [21] Greengard P, Allen PB, Nairn AC. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade [J]. *Neuron*, 1999,23:435~447.
- [22] Waddington JL, Deveney AM, Clifford J, et al. D₁-like dopamine receptors: regulation of psychomotor behaviour, D₁-like: D₂-like interactions and effects of D_{1A} targeted gene deletion [A]. In: dopamine receptor subtypes: From Basic Science to Clinic[C]. P. Jenner and R. Demirdamar (Eds.). IOS Press, Amsterdam. 1998. 45~63.
- [23] Waddington JL, Daly SA, Downes RP, et al. Behavioural pharmacology of 'D-1-like' dopamine receptors: further subtyping, new pharmacological probes and interactions with 'D-2-like' dopamine receptors[J]. *Prog Neuro-Psychopharmacol Biol Psychiat*, 1995,19:800~831.
- [24] Fienberg AA, Hiroi N, Mermelstein G, et al. DARPP-32: regulator of the efficacy of dopaminergic neurotransmission [J]. *Science*, 1998,281:838~842.
- [25] Quysner A, Blaustein JD. A dopamine antagonist blocks vaginocervical stimulation-induced neuronal responses in the rat forebrain[J]. *Brain Research*, 2001,921:173~182.
- [26] Absil P, Foidart A, Hemmings HC. Distribution of DARPP-32 immunoreactive structures in the quail brain: anatomical relationship with dopamine and aromatase [J]. *J Chemical Neuroanatomy*, 2001,21:23~39.
- [27] Tsou K, Snyder GL, Greengard P. Nitric oxidizer cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32, a dopamine-ang cAMP regulated phosphoprotein, in the substantia nigra [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993,90:3462~3465.
- [28] Yan Z, Hsieh-Wilson L, Feng J. et al. Protein phosphatase 1 modulation of neostriatal AMPA channels: regulation by DARPP-32 and spinophilin [J]. *Natural Neuroscience*, 1999, 2:13~17.
- [29] Rosenmund C, Carr DW, Bergeson SE. Anchoring of protein kinase A is required for modulation of AMPA/kainate receptors on hippocampal neurons[J]. *Nature*, 1994,368:853~856.
- [30] Blau S, Daly L, Fienberg A. et al. DARPP-32 promoter directs transgene expression to renal thick ascending limb of Henle[J]. *J Physiol*, 1995,269:564~570.

DARPP-32, DOPAMINERGIC PATHWAY AND NEURONAL INFORMATION INTEGRATING

WANG Xue-bin¹, JIANG Jin-chang², LI Dong-feng³

(1. Department of Life Science, Linyi Normal College, Linyi 276005, China; 2. Laboratory of Visual Information Processing, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; 3. School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: DARPP-32 is a kind of protein that is expressed in neostriatal and other nuclei. This protein is important in regulating and integrating many inputs. When Dopamine, glutamate or some other neurotransmitters binds to their receptors, the phosphorylation or dephosphorylation of DARPP-32 occur at 34-Thr or other three sites affects the activations of phospholipase 1 or 2B, hence all the signals accepted from any pathways can be integrated and the functions of the neuron and behaviors it controlled will be changed. The functions of DARPP-32 are related with many neurotransmitters and their receptors; and it can be studied using 'gene knockout' technique.

Key Words: DARPP-32; Dopamine; Neurotransmitters; Receptor; Signal transmitting and integrating