

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00578

G 蛋白偶联受体 3: 调控神经系统和卵泡发育的关键因子

张宝乐^{1,2}, 高殿帅¹, 徐银学²

1. 徐州医学院神经生物学教研室, 徐州 221002;
2. 南京农业大学动物科学技术学院, 南京 210095

摘要: G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是细胞表面最大的受体超家族, 参与调节多种生理和病理过程。G 蛋白偶联受体 3(G protein-coupled receptor 3, Gpr3)是一种新发现的鞘氨醇 1-磷酸受体, 它直接或者间接参与调节脊椎动物神经系统及卵泡的发育过程。作为潜在的治疗多种神经疾病和卵巢早衰的药物靶标, Gpr3 的生理功能及作用的分子机制等都值得进一步研究。文章主要就 Gpr3 及其介导的信号通路在脊椎动物神经系统发育及卵巢卵泡发育过程中的相关作用作一综述。

关键词: G 蛋白偶联受体; Gpr3; 神经系统; 卵泡发育; 减数分裂

G protein-coupled receptor 3: a key factor in the regulation of the nervous system and follicle development

ZHANG Bao-Le^{1,2}, GAO Dian-Shuai¹, XU Yin-Xue²

1. Department of Neurobiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002, China;
2. College of Animal Science and Technology, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: G protein-coupled receptors (GPCRs), the largest cell surface receptor superfamily, are involved in many physiological and pathological processes. G protein-coupled receptor 3 (Gpr3) is a newly discovered sphingosine 1-phosphate receptor, which directly or indirectly takes part in regulating the processes of nervous system and follicle development in the vertebrates. As a potential therapeutic drug target for a variety of neurological diseases and premature ovarian failure, its physiological function and biological mechanisms deserve further studies. In this paper, we reviewed the functions of Gpr3 in the processes of nervous system development and ovarian follicular development in the vertebrates.

Keywords: G protein-coupled receptors; Gpr3; nervous system; follicular development; meiosis

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是一类重要的细胞膜表面受体超家族, 能够转导激素、神经递质、脂类、核苷酸、药物、气味以及光线等多种化学和物理的细胞外信号至细胞内^[1],

收稿日期: 2012-08-27; 修回日期: 2012-09-26

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2006AA10Z136)资助

作者简介: 张宝乐, 讲师, 博士, 研究方向: 动物分子遗传学、神经生物学。Tel: 025-84395019; E-mail: zblpd@yahoo.com.cn

通讯作者: 徐银学, 教授, 研究方向: 动物分子遗传与现代育种。E-mail: xuyinxue@njau.edu.cn

网络出版时间: 2013-1-8 9:36:03

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130108.0936.001.html>

引起细胞内相应信号通路的改变, 最终完成对诸多细胞生理功能的调节, 如细胞生长、分化、凋亡、迁移以及肿瘤生长等^[2,3]。G 蛋白偶联受体 3(G protein-coupled receptor 3, Gpr3)是 GPCRs 超家族中的一员, 具有典型的 7 次跨膜螺旋结构域, 能够组成性的激活腺苷酸环化酶(Adenylate cyclase, AC)。在小鼠(*Mus musculus*)上的研究发现, Gpr3 能够通过 Gs 蛋白介导的信号通路调控神经系统发育^[4-7]和卵母细胞的减数分裂阻滞^[8], 并且敲除 *Gpr3* 基因能够引起雌性小鼠卵巢早衰而导致不育^[9]。以下就 Gpr3 的研究现状作一简要介绍。

1 *Gpr3* 基因及分子结构

Gpr3 基因的 mRNA 序列首次是利用简并引物通过聚合酶链反应技术(Polymerase chain reaction, PCR)从小鼠的脑组织 cDNA 文库中克隆出来的^[10], 起初命名为 *GPCR21*。之后, Iismaa 的研究小组^[11]利用相同的方法从人神经瘤细胞的 cDNA 文库中分离得到人类的 *Gpr3* 基因(Human Gpr3, *hGpr3*)。不久, Eggerickx 等^[12]通过低严格(Low-stringency)PCR 技术^[13]从人类基因组文库中也获得了 *hGpr3* 基因。*hGpr3* 是小鼠 *GPCR21* 的同源物, 由于其能够组成性的激活 AC 而被命名为 *hACCA*(Human adenylate cyclase constitutive activator), 后来统称为 *Gpr3* 基因。随后, *Gpr3* 基因又在大鼠(*Rattus norvegicus*)^[11]、牛(*Bos taurus*)^[14]和猪(*Sus scrofa*)^[15]等物种中相继被克隆和鉴定出来。

hGpr3 基因由两个外显子和一个内含子组成, 第一外显子在 5'非编码区, 第二外显子包含了整个编码区和 3'非编码区。氨基酸序列比对分析发现, *hGpr3* 与小鼠、猪以及短尾猴(Monodelphis)的同源性分别为 93.7%、95.2%和 83.7%, 说明 *Gpr3* 基因在进化过程中高度保守^[15]。Gpr3 蛋白约为 35.4 kDa, 包含一个 7 次跨膜螺旋结构域, 其氨基端含有一个 N 连接糖基化位点(N-linked glycosylation site), 羧基端含有若干个磷酸化位点, 在第三跨膜区和第二胞内环的交界处含有保守的 DRY(Asp-Arg-Tyr)基序^[10]。这些 N/C 端的修饰位点在 Gpr3 蛋白的结构或功能方面起着极为重要的作用。DRY 是 A 族 GPCRs (视紫红质/ β 肾上腺素受体样受体)特有的基序^[16]。研究表明, 它可以调节 GPCRs 的构象结构而使其处于低能

级状态, 若将其突变则可使受体表现出组成性活性(Constitutive activity)^[17]。此外, DRY 基序在受体活化、配基结合、受体磷酸化、受体表达和内化过程中也发挥重要作用。另外, 值得注意的是, 在 Gpr3 受体的第二个胞内环处并未发现保守的并且是多数 GPCRs 形成二硫键桥所必须的半胱氨酸残基^[12]。

2 *Gpr3* 的基因定位及组织分布

基因定位是遗传学研究中的重要环节, 基因位置的确定有助于了解基因的功能; 对一个基因的定位也有助于同染色体或同线组其他基因的进一步定位; 对医学领域遗传病基础的认识、动物生产中遗传标记辅助选择和经济性状遗传规律的掌握都起着重要作用。对 *Gpr3* 基因定位的研究要追溯到近 20 年前, 首先 Iismaa 等^[11]从人的神经细胞瘤 cDNA 文库中分离得到了 *hGpr3* 基因, 并将其定位在 1 号染色体短臂 34.3 位置上。同年, Song 等^[18]通过原位杂交技术并结合 Marchese 等^[19]的实验结果, 将 *hGpr3* 进一步定位在 1 号染色体短臂的 35~36.1 之间。随后, 小鼠和大鼠的 *Gpr3* 基因也相继被定位(表 1)。近来, 我们课题组通过克隆获得了猪 *Gpr3* 基因的全序列, 并通过与猪基因组的比对, 将其定位于第 6 号染色体上^[15]。

表 1 *Gpr3* 基因的定位

研究对象	定位	资料来源
人	1p36.1-35	文献 ^[18]
小鼠	4D3	NCBI
大鼠	5q36	NCBI

除了基因定位外, 前人亦对 *Gpr3* 的组织分布做了较为详尽的研究。首先, 利用 Northern 杂交和 RT-PCR 技术发现 *Gpr3* 基因在小鼠的神经系统中大量表达, 在睾丸中低水平表达, 而在其他部位(心、肝、脾、肺、肾和肠)未见表达^[10]。随后, Eggerickx 等^[12]利用核糖核酸酶保护测定法(RNase protection assays)再次检测了小鼠 *Gpr3*(起初命名为 *mACCA*)mRNA 的组织分布情况, 发现其在脑中大量表达, 在睾丸、卵巢和眼睛中低水平表达, 而在胃、肠、心、肝、脾、肺、肾、附睾、精囊、淋巴、大动脉、肾上腺、甲状腺、胸腺、骨髓、脂肪和皮肤中未见表达, 与 Sacki 等^[10]的结果一致。近来,

Mehlmann 等^[8]利用原位杂交技术研究了 *Gpr3* mRNA 在小鼠卵巢组织中的分布情况,发现 *Gpr3* 主要表达于卵泡卵母细胞,其表达量约是周围卵泡体细胞的 14 倍,这与我们利用 Real-time PCR 技术检测 *Gpr3* mRNA 在猪卵泡卵母细胞和卵泡体细胞中的分布情况相一致^[15]。随后,我们又利用免疫组织化学的方法进一步检测了 *Gpr3* 蛋白在猪卵巢组织中的分布情况,发现 *Gpr3* 蛋白主要表达于卵巢卵母细胞中,在颗粒细胞中微弱表达,与其 mRNA 的表达趋势相一致^[20]。最近, Tanaka 等^[21]利用 Real-time PCR 技术检测 *Gpr3* mRNA 在小鼠组织中的表达时发现,它除在脑组织和睾丸中大量表达外,在心脏、肾脏和骨骼肌中亦有微量的表达。另外,我们课题组对猪 *Gpr3* 基因组织分布的研究发现,它主要在中枢神经系统和卵巢卵母细胞中表达,在肺和肾脏等组织中低水平的表达^[15]。*Gpr3* 基因在物种间相似的组织分布规律,表明其在进化中较为保守,可能在物种间发挥相似的功能。

3 *Gpr3* 的配体

Gpr3 是孤儿 GPCRs 的家族成员之一,具有较高的组成性活性。在不添加任何配体的情况下,超表达 *Gpr3* 受体显著提高了多种细胞内的 cAMP 水平。然而,添加外源的激动剂,如 10 $\mu\text{mol/L}$ 福司柯林,能够进一步提高胞内的 cAMP 水平^[12],表明 *Gpr3* 仍然可被激动剂深度激活。鉴于此,前人开始了对 *Gpr3* 天然配体的探索之旅。

孤儿受体的配体探索大多是从分析相似受体的已知配体开始的,*Gpr3* 受体也不例外。经过比对发现,*Gpr3* 与大麻素受体、溶血磷脂酸(LPA)受体、鞘氨醇 1-磷酸(S1P)受体和黑皮素受体最为相似,由此推测它们之间可能存在相似的配体^[22]。于是,研究人员对已知的大麻素受体激动剂 CP55940 和 anandamide 进行了筛查,发现它们都不能显著改变稳定转染 *Gpr3* 细胞系内的 cAMP 水平^[12]。随后,研究人员再次分析了与 *Gpr3* 序列相近的受体,发现大都能被脂类激活,并且 *Gpr3* 自身在脂质丰富的脑组织中大量表达,由此推测 *Gpr3* 的激动剂可能存在于具有神经递质或调质功能的脂类中。由此,开始了大规模的脂质筛查,并且发现了两个有趣的脂质 LPA 和 S1P。它们都来源于细胞膜磷脂,是公认的重

要的细胞内信使和细胞外介质,能够影响细胞的增殖、分化、迁移和分泌等多种生物学反应^[23]。研究发现,h*Gpr3* 转染 HEK293 细胞后,添加 S1P 及其代谢产物 DHS1P 能够进一步的激活 *Gpr3*,并且 S1P 能够诱导 *Gpr3* 亚家族成员 *Gpr6* 受体的内化,表明 S1P 及其代谢产物可能是 *Gpr3* 的潜在配体^[24]。为了进一步确定 S1P 与 *Gpr3* 受体的关系,我们课题组进行了猪 *Gpr3* 受体转染 HEK293 细胞后 S1P 的激活实验,发现 S1P 亦能深度激活 *Gpr3*,并且诱导 *Gpr3* 受体的内化,再次证明了 S1P 可以作为 *Gpr3* 受体的潜在激动剂^[25]。Hinckley 等^[26]利用 GV 期卵母细胞 mRNAs 微阵列分析、EST 数据库搜索和针对 GPCR 跨膜区保守区域的变性引物的 RT-PCR 扩增 3 种独立的策略发现,*Gpr3*、*Gpr12* 和 *EDG3* 的表达密切相关,并且鞘氨醇及其代谢产物被鉴定为其潜在配体。将小鼠的卵母细胞在 *Gpr3/12* 潜在配体 SPC 和 S1P 中孵育,可以延迟卵母细胞的自发成熟。另外,在体外培养小鼠卵母细胞过程中,添加 100 或 500 nmol/L 的 S1P 有利于卵母细胞的成熟、受精及囊胚的形成^[27]。由此我们推测在卵丘细胞和卵母细胞之间的细胞膜区域可能存在激活 *Gpr3* 的 S1P 及其代谢产物。而对现有配体的进一步验证及新配体的筛选将是进一步研究的对象。

4 *Gpr3* 基因的功能

4.1 *Gpr3* 在神经系统中的作用

Gpr3 基因首次发现于小鼠的脑组织中。它广泛分布于中枢神经系统(大脑、小脑、脑干、丘脑、下丘脑和脊髓),但仅在大脑、小脑、丘脑和下丘脑中高度表达^[10]。在大脑中,*Gpr3* 的分布亦有所不同:它主要分布于大脑的缰内侧核,而大脑皮质、海马体、嗅球和纹状体中表达较弱。由于 *Gpr3* 在中枢神经系统中的广泛分布和特异的表达模式,故而前人推测 *Gpr3* 在神经系统的发育及调控过程中发挥了重要作用。

近几年的研究结果证实了前人的推测。首先,*Gpr3* 能够上调小脑颗粒神经元中 cAMP 的水平并促进神经突的生长^[21]。众所周知,神经元广泛存在于成年哺乳动物的中枢神经系统中。神经元依靠神经突传递信号,神经突是神经元发挥功能的必要元件。研究发现,神经突一旦受到损伤就不能再生^[28]。

尽管神经突有如此重要的作用,但是对其研究却不够深入,仅知道一定浓度的 cAMP 是神经突维持生长所必须的^[29],而调控其生长的机制至今仍然不是十分清楚。近年来发现, Gpr3 的表达与神经突的生长密切相关。Gpr3 在不同发育阶段的大鼠小脑颗粒神经元中一直保持着高度表达的状态。利用 siRNA 敲减内源性的 Gpr3,可以显著抑制神经突的生长;而与外源性的 Gpr3 共转染,则可使神经突恢复正常生长^[21]。另外,在颗粒神经元中超表达 Gpr12-Gpr3 亚家族的成员,可以克服髓磷脂相关糖蛋白对神经突生长的抑制作用,从而显著促进神经突的生长^[21]。

其次, Gpr3 能够调节神经元中 β 淀粉样肽的产生^[5]。 β 淀粉样肽是由 β 淀粉样前体蛋白在 α 、 β 和 γ 分泌酶连续的裂解作用下产生的,它在脑组织中的积累是导致阿尔茨海默病(Alzheimers disease, AD)的主要原因^[30]。在 HEK293 细胞中超表达 Gpr3 能够刺激 β 淀粉样肽的积累。在 AD 小鼠的海马处注射 Gpr3 腺病毒亦能刺激 β 淀粉样肽的积累,而 Gpr3 基因缺失小鼠的海马细胞中 β 淀粉样肽的积累受阻^[5]。再者, Gpr3 在人的海马、杏仁核、内嗅皮层和丘脑区域大量表达,并且定位于 1p36.1-p35^[11,18],这些区域与 AD 的发病机制密切相关^[31]。研究发现,AD 病人的大脑中 Gpr3 的表达量有所升高^[5]。另外,在缺失 Notch 信号的情况下, Gpr3 的表达导致了成熟 γ 分泌酶的形成及细胞表面定位的增多^[5]。

第三, Gpr3 在出生后啮齿类动物小脑发育过程中抑制小脑颗粒细胞的增殖^[4]。成年啮齿类动物的小脑是由多层特异的神经元细胞群所构成。这种精确定位格局的形成是由机体在出生后发育过程中,通过调控小脑细胞的增殖、分化和迁移而形成的。在新生期,小脑最外层的颗粒细胞层中已形成可以区分的颗粒细胞前体(Progenitor)^[32]。这些颗粒细胞前体由贝格曼(Bergmann)放射神经胶质纤维引导穿过分子层和普尔基涅(Purkinje)神经层最终迁移到内颗粒层,之后逐渐停止增殖而起始分化^[33]。以上整个过程在啮齿类动物出生后 3 周左右完成,但其调控机制知之甚少。有报道称, Hedgehog 信号通路能够调节前体颗粒细胞(CGP)的增殖^[34],特别是 Sonic hedgehog(Shh)分子。而且, Shh 分子能够对抗 cAMP 水平的升高,抑制 PKA 的活性^[35],其特点与小脑中大量表达的 Gpr3 的作用相反^[10,12]。由此,前人以大

鼠的小脑颗粒神经元为研究对象,探索 Gpr3 和 Shh 的相互作用,阐明了 Gpr3 与小脑发育之间的关系。研究发现,在大鼠的小脑颗粒神经元中表达外源性的 Gpr3 可以局部的对抗 Shh 的增殖作用,而利用 RNAi 敲减 Gpr3 后促进了 Shh 诱导的 CGP 的增殖^[4]。再者, p27/kip1 是调节颗粒细胞前体增殖的另一重要因子。它在发育的小脑中大量表达,能够促进 CGPs 退出细胞周期,对抗 Shh 的增殖作用^[36]。在 CGPs 中表达外源性的 Gpr3 可以增加 p27/kip 的表达,而敲减 Gpr3 则导致了 p27/kip 表达量的下降^[4]。由此进一步的说明了 Gpr3 具有抑制小脑颗粒细胞增殖的作用。由于体外实验往往与体内实验存在差异,为了进一步了解 Gpr3 基因在小鼠体内是否也发挥以上作用,研究人员利用同源重组技术生产了 Gpr3 缺失(Gpr3^{-/-})的转基因小鼠。研究发现,在野生型的小鼠中, Gpr3 的表达量随着出生后小脑的发育而增加,并且集中表达于小脑内颗粒层^[21];而 Gpr3^{-/-}小鼠的内颗粒层由于 CGPs 的过度增殖而显著宽于野生型小鼠^[4]。另外,细胞周期动力学检测证实,转染 Gpr3 的 DAOY 髓母细胞瘤细胞被阻抑在 G₀/G₁ 期^[4]。

第四, Gpr3 能够调控小鼠的情绪样(Emotional-like)行为^[6]。情绪行为主要由位于大脑缰部、海马、杏仁核、皮质及边缘系统中的情绪中枢控制, cAMP 信号通路的改变能够导致情绪行为的紊乱^[37]。如前所述, Gpr3 能够调节神经细胞内的 cAMP 水平,并且在的大脑的缰部、海马和皮质部大量表达^[11]。而这些部位恰恰与应激行为密切相关。行为分析发现,在无应激状态下, Gpr3 的缺失没有影响小鼠正常的运动和协调能力;而在应激条件下, Gpr3^{-/-}小鼠表现出了情绪的异常。它们不仅抵触陌生环境、焦虑不安,而且攻击性增加^[6];相反,野生型小鼠则能够耐受应激,并且主动地回避不良的环境。由此说明 Gpr3^{-/-}小鼠应对外界刺激的能力下降,情绪易波动。情绪反应往往受到下丘脑-垂体-肾上腺轴激素(如皮质酮)和单胺类神经递质传递的影响。单胺类递质的含量与分布往往由大脑的缰部调节,它是边缘前脑和中脑之间重要的中继站^[38]。Gpr3^{-/-}小鼠在应激条件下可以产生正常量的皮质酮,说明其情绪的异常与下丘脑-垂体-肾上腺轴的功能障碍无关。检测 Gpr3^{-/-}小鼠海马、下丘脑和额皮质中单胺类的含量发现,其与野生型小鼠的分布明显不同,特别是海

马等处的 5-羟色胺的含量较之于野生型显著下降^[6]。研究表明, 5-羟色胺系统的活性与动物的攻击行为呈负相关^[39]。另外, *Gpr3*^{-/-}小鼠体外培养的海马神经元中的 cAMP 浓度低于基础水平。由此证明了 *Gpr3* 介导的 cAMP 信号通路与前脑中单胺类的神经传递具有密切的联系, 它通过调节单胺类神经递质的传递来调控小鼠的情绪行为。另外, 最近的研究发现, *Gpr3* 的信号通路还参与了可卡因早期的成瘾过程^[40]。

最后, *Gpr3* 参与调节外周神经损伤导致的神经性疼痛及吗啡诱导的抗痛作用^[7]。神经性疼痛是指由中枢或外周神经系统原发性病变或功能障碍而引起的疼痛综合征, 可由外伤或疾病导致的神经或周围组织损伤而引发^[41]。周围神经损伤通常能够改变神经胶质细胞和星形细胞的形态, 增加 CD11b、Iba1 和 GFAP 等小神经胶质标记基因的表达, 并且激活神经小胶质细胞产生并释放一系列的致痛因子作用于神经元传递疼痛^[42,43]。近来的研究表明, *Gpr3* 能够调节外周神经损伤导致的神经性疼痛。较之野生型小鼠, *Gpr3*^{-/-}小鼠在外周神经损伤后, 对温热刺激出现过敏反应, 并且对吗啡抗痛作用的反应性降低, 但是没有影响其对机械性异常疼痛的反应以及坐骨神经损伤引起的脊髓炎症反应^[7]。当小鼠脊髓背侧角的神经结扎后, *Gpr3*^{-/-}和 *Gpr3*^{+/+}小鼠的小神经胶质细胞和星形细胞的形态未发现明显不同, 说明其疼痛的传递可能通过其他的途径进行。

4.2 *Gpr3* 在卵泡发育及卵母细胞成熟中的作用

减数分裂是二倍体的生殖细胞(卵原细胞和精原细胞)减少一半的染色体数目, 形成单倍体的精子和卵子的过程。哺乳动物卵母细胞减数分裂持续的时间很长, 它起始于胎儿期, 并在出生前后阻滞于第一次减数分裂前期的双线期。不同物种中, 阻滞的时间从数月数年到数年不等。伴随着卵母细胞生发泡的破裂(GVBD), 双线期阻滞解除。分裂原活化蛋白激酶(MAPK)激活中期纺锤体, 第一极体排出, 卵母细胞由 GV 期经过 MI 期后再次阻滞于 MII 期。卵母细胞完成第一次减数分裂, 伴随着胞质的改变, 进入 MII 期的过程叫做卵母细胞的成熟。它对后期的受精、胚胎发育及母体生殖力的维持至关重要, 并受到机体严格的调控, 但其调控机制至今仍不清楚。近年来, 研究人员对 *Gpr3* 及其介导的信号通

路进行了较为详尽的研究, 发现其对卵母细胞成熟及减数分裂前期阻滞具有重要作用, 具体研究结果综述如下。

最初, 研究人员发现, 在 CHO-K1、COS-7、NIH3T3 等细胞系中转染 *Gpr3* 的表达载体能够持续的激活 AC, 升高细胞内的 cAMP 水平^[12]。随后, Mehlmann 等^[44]发现卵母细胞中的 Gs G 蛋白是维持其减数分裂阻滞的关键因子。另外, 小鼠卵母细胞中 Gi 和 Gq 家族抑制性对比实验发现, Gi 和 Gq 都不能引发 GVBD^[45], 进一步说明了小鼠卵母细胞中 Gs 的活性是其维持减数分裂前期阻滞所必须的。在脱离卵泡的长足的卵母细胞中加入磷酸二酯酶的抑制剂次黄嘌呤仍可维持其减数分裂的阻滞, 表明若防止分离的卵母细胞中 cAMP 自身的水解, Gs 的活性足以使 cAMP 的水平维持在保持减数分裂阻滞的状态。

然而, Gs 具有很少的持续活性, 为了维持这种活性, 需要在卵母细胞膜上存在持续激活 Gs 的 GPCRs^[8]。这一受体应具有持续的组成活性, 或能够被周围卵泡体细胞产生的配体所激活。经过 EST 数据库的筛选, 研究人员在卵母细胞中发现了包括 *Gpr3* 在内的 15 条 EST 序列。其中引起大家注意的是 *Gpr3* 受体。它能够提高胞内的 cAMP 水平^[12], 推测其与 Gs 蛋白偶联, 维持卵母细胞减数分裂的阻滞。为了验证以上假设, 研究人员构建了 *Gpr3* 基因敲除小鼠(*Gpr3*^{-/-}), 并对其进行了系统性研究^[8]。个体水平研究发现: *Gpr3*^{-/-}小鼠和未敲除者(*Gpr3*^{+/+}) 在形态学、生长速度和活力上无明显区别。注射 hCG 13 h 后, 在 *Gpr3*^{-/-}小鼠的输卵管中收集到排出的卵子。可见 *Gpr3* 基因的缺失未造成小鼠生命体征和排卵的异常。卵巢组织切片观察发现: 两者的卵巢大小、各级卵泡分布以及周围体细胞结构也都非常相似, 但是各级卵泡中卵母细胞所处的状态却大不相同。其中差异最为突出的为处于有腔卵泡期的卵泡。*Gpr3*^{+/+}有腔卵泡中的卵母细胞都具有完整的细胞膜和细胞核, 且处于第一次减数分裂前期; 而 *Gpr3*^{-/-}有腔卵泡中大多数卵母细胞含有中期染色体, 甚至部分已排出第一极体, 说明缺失 *Gpr3* 基因使有腔卵泡中的卵母细胞提前恢复减数分裂。这种现象也同样存在于小腔卵泡中, 并且减数分裂恢复的比率随着卵泡直径的增大而升高, 但未见第一极体的排出。然而, 在腔前卵泡中, *Gpr3*^{+/+}和 *Gpr3*^{-/-}的卵

母细胞都处于第一次减数分裂前期, 未见明显的区别。这是因为, 此时期的卵母细胞主要是依靠其自身的固有因子以及低活性的细胞周期调节蛋白(Cyclin B 和 CDK1 等)来维持其前期阻滞的^[46], 只有当卵母细胞达到充足大小, 接近形成小腔卵泡的时候, 它的前期阻滞才开始依赖体细胞和 cAMP 水平^[47]。另外, 细胞水平的研究发现, 向 Gpr3^{-/-}卵母细胞中注射 Gpr3 RNA 可以显著下降卵母细胞减数分裂的恢复率^[8], 说明 Gpr3 是维持卵母细胞减数分裂的关键因子。由此提出了以下假说, 卵母细胞通过细胞膜上的 Gpr3 受体激活 Gs, 进而激活 AC 升高胞内的 cAMP 水平, 继而维持自身的减数分裂前期阻滞。

现今, 已有许多研究成果支持以上假说; (1)小鼠卵母细胞中具有产生 cAMP 所需的全部组分, 包括 Gs 蛋白^[44]、Gs 偶联受体 Gpr3^[8]和 AC^[47]。(2)在啮齿类动物卵母细胞中, 利用福司柯林提高胞内的 cAMP 水平, 导致了生发泡破裂的延迟^[48]。(3)向分离的小鼠卵母细胞中显微注射不同剂量的 GTP γ S 可以激活 Gs 蛋白, 并且出现了短暂的剂量依赖的减数分裂阻滞^[49]。(4)在含有磷酸二酯酶抑制剂-IBMX 或次黄嘌呤情况下, 分离的卵母细胞中高水平的 cAMP 可以维持减数分裂的阻滞^[50]。(5)霍乱毒素在分离的卵母细胞中不可逆的激活 Gs, 延迟了卵母细胞的成熟^[51]。(6)向卵泡包裹的小鼠卵母细胞中显微注射 Gsa 亚基的功能封闭性抗体, 能够维持减数分裂阻滞^[44,45]。(7)缺失 AC3 的小鼠卵母细胞在卵巢卵泡发育过程中引起自发的 GVBD^[47]。

以上研究证明了 Gpr3 介导的 Gs 途径能够维持小鼠卵母细胞的减数分裂阻滞, 相似的功能在非洲爪蟾和斑马鱼中也得到了验证^[45,52], 说明 Gpr3 介导的 Gs 途径是脊椎动物维持卵母细胞减数分裂前期阻滞过程中较为保守的机制。其作用的具体过程如图 1 所示, 首先 Gpr3 激活卵母细胞中的 Gs 蛋白, 使其作用于 AC 从而提高胞内的 cAMP 水平, 继而激活 cAMP 依赖的蛋白激酶 A(PKA), 通过磷酸化 Wee1/Myt1 和 CDC25B 等后续未完全了解的过程抑制 Cyclin B-CDK1 复合物的激活, 最终阻抑了前期到中期的转变^[53]。其中 Cyclin B-CDK1 复合物又名成熟促进因子(MPF), 是 Cdk/cyclin 复合物家族中最具特色的一员, 在细胞周期调控中起核心作用^[54]。它具有丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性, 是调节卵母细

胞成熟的中心环节。卵母细胞中高水平的 cAMP 使得 MPF 中 CDK1 的 Thr14 和 Tyr15 磷酸化, 而处在非活性状态^[55]。当 cAMP 水平下降时, CDK1 的 Thr14 和 Tyr15 去磷酸化, 激活 MPF 复合体, 使卵母细胞再次进入减数分裂。PKA 通过未知的途径调节 CDC25 和 Wee1/Myt1 激酶的活性^[46]。CDC25 磷酸酶是一种双特异性酪氨酸激酶(dsPTP), 它在真核生物细胞中通过激活 p34CDC2 而诱导细胞进入有丝分裂期(M 期), 它可以使 MPF 去磷酸化而活化^[55]。缺失 CDC25B 基因的小鼠卵母细胞不能激活 MPF, 从而不能经历减数分裂恢复, 由此说明了这个磷酸酶的重要性^[56]。而 Wee1/Myt1 蛋白激酶可以使 MPF 磷酸化而失活^[57], 但 Wee1/Myt1 的敲除试验至今还没有研究。另外, 还存在一种持续了很久的维持卵母细胞减数分裂阻滞的假说。众所周知, 卵泡体细胞和卵母细胞间存在着间隙连接(Gap junction)。卵泡体细胞产生的 cGMP、cAMP 和次黄嘌呤等小分子可以通过间隙连接扩散到卵母细胞中^[58]。高水平的 cGMP 和次黄嘌呤能够抑制 PDE3A 的活性, 防止水解卵母细胞中的 cAMP, 从而维持卵母细胞减数分裂的前期阻滞^[59](图 1)。但是卵母细胞中缺少特定的抑制间隙连接的抑制剂, 所以很难阐明它在维持减数分裂中可能的作用。

减数分裂的阻滞需要 Gpr3 受体, 而减数分裂的恢复需要排卵前的 LH 峰。然而 LH 触发卵母细胞减数分裂恢复的机制目前还不是很清楚。于是, 研究人员探索了 LH 峰与 Gpr3-Gs-AC 信号之间的关系, 发现 LH 峰并未终止卵母细胞中的 Gpr3-Gs-AC 信号, 表明 LH 诱导的减数分裂恢复不是通过 Gpr3 信号途径引发的^[60]。另外, 我们课题组对猪 Gpr3 蛋白在颗粒细胞中的表达规律的研究中发现, 其在腔前卵泡的颗粒细胞中微弱表达, 在有腔卵泡中随着卵泡腔直径的增大表达增多^[20]。这种特殊的表达模式显示, Gpr3 可能在颗粒细胞中发挥一定的功能。随后的实验证实了以上猜想。我们采用 RNA 干扰和过表达的方法在体外培养的颗粒细胞中敲减和超表达 Gpr3 基因, 发现 Gpr3 表达的异常直接影响颗粒细胞的增殖和凋亡, 这为今后 Gpr3 的研究拓展了新的方向。

4.3 Gpr3 在疾病治疗中的潜在作用

随着疾病分子机制研究的不断深入, 越来越多

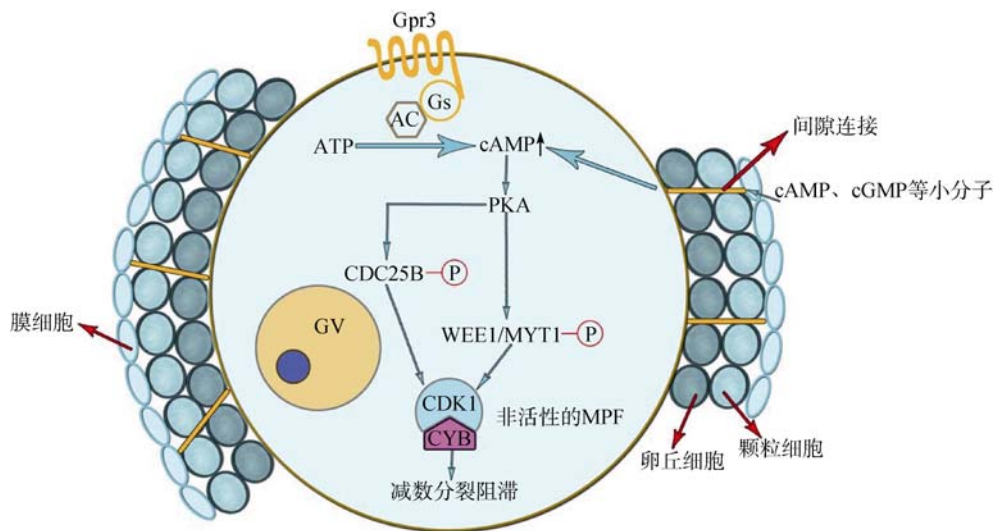


图 1 维持排卵前卵泡中卵母细胞减数分裂的前期阻滞模式图

的药物筛选靶标被人类所发掘。GPCRs 是目前最大也是研究最成功的一类蛋白质药靶, 近一半左右的药物通过它来发挥作用。药物靶标的筛选和 GPCRs 的功能密不可分, 由于 Gpr3 特殊的表达模式和对神经及卵巢发育的重要作用, 将其列为治疗神经和生殖系统相关疾病的潜在靶标。研究发现, Gpr3 能够调节神经元中 β 淀粉样肽的产生和淀粉样蛋白斑的形成^[51], 其在脑组织中的积累是导致阿尔茨海默病的主要原因^[30]。此外, 它还能够调节外周神经损伤导致的神经性疼痛及吗啡诱导的抗痛作用^[7]。由此推测 Gpr3 可以作为治疗阿尔茨海默病及神经性疼痛的潜在药物靶标。另外, 研究发现, 缺失 Gpr3 导致了小鼠卵巢早衰和生殖力的丧失^[9], 这为探索卵巢早衰机理、筛选治疗卵巢早衰的药物提供了良好的动物模型。

5 结语

Gpr3 这一视紫质受体超家族中新的 GPCRs 成员, 在神经系统和卵巢卵泡发育过程中发挥重要作用。Gpr3 在其他组织或细胞中的生理作用还有待进一步研究。随着研究的进一步深入, Gpr3 作用的分子机制将更加清晰, 其功能也将不断被认清, 也将为治疗阿尔茨海默病、神经疼痛及卵巢早衰等疾病新药物的发掘提供新的线索。

参考文献(References):

[1] Edson MA, Lin YN, Matzuk MM. Deletion of the novel

oocyte-enriched gene, Gpr149, leads to increased fertility in mice. *Endocrinology*, 2010, 151(1): 358–368. DOI

[2] Goldman RD. Drug-induced gynecomastia in children and adolescents. *Can Fam Physician*, 2010, 56(4): 344–345. DOI

[3] Islam SK, Hossain KJ, Kamal M, Ahsan M. Serum immunoglobulins and white blood cells status of drug addicts: influence of illicit drugs and sex habit. *Addict Biol*, 2004, 9(1): 27–33. DOI

[4] Tanaka S, Shaikh IM, Chiocca EA, Saeki Y. The Gs-linked receptor GPR3 inhibits the proliferation of cerebellar granule cells during postnatal development. *PLoS One*, 2009, 4(6): e5922. DOI

[5] Thathiah A, Spittaels K, Hoffmann M, Staes M, Cohen A, Horr  K, Vanbrabant M, Coun F, Baekelandt V, Delacourte A, Fischer DF, Pollet D, De Strooper B, Merchiers P. The orphan G protein-coupled receptor 3 modulates amyloid-beta peptide generation in neurons. *Science*, 2009, 323(5916): 946–951. DOI

[6] Valverde O, C lerier E, Baranyi M, Vanderhaeghen P, Maldonado R, Sperlagh B, Vassart G, Ledent C. GPR3 receptor, a novel actor in the emotional-like responses. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4704. DOI

[7] Ruiz-Medina J, Ledent C, Valverde O. GPR3 orphan receptor is involved in neuropathic pain after peripheral nerve injury and regulates morphine-induced antinociception. *Neuropharmacology*, 2011, 61(1–2): 43–50. DOI

[8] Mehlmann LM, Saeki Y, Tanaka S, Brennan TJ, Evisikov AV, Pendola FL, Knowles BB, Eppig JJ, Jaffe LA. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. *Science*, 2004, 306(5703): 1947–1950. DOI

[9] Ledent C, Demeestere I, Blum D, Petermans J, H m l inen T, Smits G, Vassart G. Premature ovarian aging in mice deficient for Gpr3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005,

- 102(25): 8922–8926. [DOI](#)
- [10] Saeki Y, Ueno S, Mizuno R, Nishimura T, Fujimura H, Nagai Y, Yanagihara T. Molecular cloning of a novel putative G protein-coupled receptor (GPCR21) which is expressed predominantly in mouse central nervous system. *FEBS Lett*, 1993, 336(2): 317–322. [DOI](#)
- [11] Iismaa TP, Kiefer J, Liu ML, Baker E, Sutherland GR, Shine J. Isolation and chromosomal localization of a novel human G-protein-coupled receptor (GPR3) expressed predominantly in the central nervous system. *Genomics*, 1994, 24(2): 391–394. [DOI](#)
- [12] Eggerickx D, Deneff JF, Labbe O, Hayashi Y, Refetoff S, Vassart G, Parmentier M, Libert F. Molecular cloning of an orphan G-protein-coupled receptor that constitutively activates adenylate cyclase. *Biochem J*, 1995, 309(Pt 3): 837–843. [DOI](#)
- [13] Libert F, Parmentier M, Lefort A, Dinsart C, Van Sande J, Maenhaut C, Simons MJ, Dumont JE, Vassart G. Selective amplification and cloning of four new members of the G protein-coupled receptor family. *Science*, 1989, 244(4904): 569–572. [DOI](#)
- [14] Zimin AV, Delcher AL, Florea L, Kelley DR, Schatz MC, Puiu D, Hanrahan F, Pertea G, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Marçais G, Roberts M, Subramanian P, Yorke JA, Salzberg SL. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biol*, 2009, 10(4): R42. [DOI](#)
- [15] Zhang BL, Ding JH, Li Y, Wang JJ, Zhao YY, Wang W, Shi S, Dong FL, Zhang ZJ, Shi FX, Xu YX. The porcine *Gpr3* gene: molecular cloning, characterization and expression level in tissues and cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(5): 5831–5839. [DOI](#)
- [16] Rovati GE, Capra V, Neubig RR. The highly conserved DRY motif of class A G protein-coupled receptors: beyond the ground state. *Mol Pharmacol*, 2007, 71(4): 959–964. [DOI](#)
- [17] Aizaki Y, Maruyama K, Nakano-Tetsuka M, Saito Y. Distinct roles of the DRY motif in rat melanin-concentrating hormone receptor 1 in signaling control. *Peptides*, 2009, 30(5): 974–981. [DOI](#)
- [18] Song ZH, Modi W, Bonner TI. Molecular cloning and chromosomal localization of human genes encoding three closely related G protein-coupled receptors. *Genomics*, 1995, 28(2): 347–349. [DOI](#)
- [19] Marchese A, Docherty JM, Nguyen T, Heiber M, Cheng R, Heng HHQ, Tsui LC, Shi XM, George SR, O'Dowd BF. Cloning of human genes encoding novel G protein-coupled receptors. *Genomics*, 1994, 23(3): 609–618. [DOI](#)
- [20] Zhang BL, Wei QW, Shi S, Dong FL, Shi FX, Xu YX. Immunolocalization and expression pattern of *gpr3* in the ovary and its effect on proliferation of ovarian granulosa cells in pigs. *J Reprod Dev*, 2012, 58(4): 410–419. [DOI](#)
- [21] Tanaka S, Ishii K, Kasai K, Yoon SO, Saeki Y. Neural expression of G protein-coupled receptors GPR3, GPR6, and GPR12 up-regulates cyclic AMP levels and promotes neurite outgrowth. *J Biol Chem*, 2007, 282(14): 10506–10515. [DOI](#)
- [22] Wittenberger T, Hellebrand S, Munck A, Kreienkamp HJ, Schaller HC, Hampe W. GPR99, a new G protein-coupled receptor with homology to a new subgroup of nucleotide receptors. *BMC Genomics*, 2002, 3: 17. [DOI](#)
- [23] Clemens JJ, Davis MD, Lynch KR, Macdonald TL. Synthesis of para-alkyl aryl amide analogues of sphingosine-1-phosphate: discovery of potent S1P receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13(20): 3401–3404. [DOI](#)
- [24] Uhlenbrock K, Gassenhuber H, Kostenis E. Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human *gpr3*, *gpr6* and *gpr12* family of constitutively active G protein-coupled receptors. *Cell Signal*, 2002, 14(11): 941–953. [DOI](#)
- [25] Zhang BL, Li Y, Ding JH, Dong FL, Hou YJ, Jiang BC, Shi FX, Xu YX. Sphingosine 1-phosphate acts as an activator for the porcine *Gpr3* of constitutively active G protein-coupled receptors. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2012, 13(7): 555–566. [DOI](#)
- [26] Hinckley M, Vaccari S, Horner K, Chen R, Conti M. The G-protein-coupled receptors GPR3 and GPR12 are involved in cAMP signaling and maintenance of meiotic arrest in rodent oocytes. *Dev Biol*, 2005, 287(2): 249–261. [DOI](#)
- [27] Jee BC, Jo JW, Suh CS, Kim SH. Dose-dependent effect of sphingosine-1-phosphate in mouse oocyte maturation medium on subsequent embryo development. *Gynecol Obstet Invest*, 2011, 72(1): 32–36. [DOI](#)
- [28] Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5(2): 146–156. [DOI](#)
- [29] Meyer-Franke A, Kaplan MR, Pfrieger FW, Barres BA. Characterization of the signaling interactions that promote the survival and growth of developing retinal ganglion cells in culture. *Neuron*, 1995, 15(4): 805–819. [DOI](#)
- [30] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science*, 2002, 298(5594): 789–791. [DOI](#)
- [31] Blacker D, Bertram L, Saunders AJ, Moscarillo TJ, Albert MS, Wiener H, Perry RT, Collins JS, Harrell LE, Go RCP, Mahoney A, Beaty T, Fallin MD, Avramopoulos D, Chase GA, Folstein MF, McInnis MG, Bassett SS, Doheny KJ, Pugh EW, Tanzi RE. Results of a high-resolution genome screen of 437 Alzheimer's disease families. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(1): 23–32. [DOI](#)
- [32] Altman J, Bayer SA. Embryonic development of the rat cerebellum. I. Delineation of the cerebellar primordium and early cell movements. *J Comp Neurol*, 1985, 231(1): 1–26. [DOI](#)

- [33] Alder J, Cho NK, Hatten ME. Embryonic precursor cells from the rhombic lip are specified to a cerebellar granule neuron identity. *Neuron*, 1996, 17(3): 389–399. [DOI](#)
- [34] Pons S, Trejo JL, Martínez-Morales JR, Martí E. Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development*, 2001, 128(9): 1481–1492. [DOI](#)
- [35] Waschek JA, Diccico-Bloom E, Nicot A, Lelievre V. Hedgehog signaling: new targets for GPCRs coupled to cAMP and protein kinase A. *Ann NY Acad Sci*, 2006, 1070: 120–128. [DOI](#)
- [36] Miyazawa K, Himi T, Garcia V, Yamagishi H, Sato S, Ishizaki Y. A role for p27/Kip1 in the control of cerebellar granule cell precursor proliferation. *J Neurosci*, 2000, 20(15): 5756–5763. [DOI](#)
- [37] Blendy JA. The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiat*, 2006, 59(12): 1144–1150. [DOI](#)
- [38] Lecourtier L, Kelly PH. A conductor hidden in the orchestra? Role of the habenular complex in monoamine transmission and cognition. *Neurosci Biobehav Rev*, 2007, 31(5): 658–672. [DOI](#)
- [39] Chamberlain B, Ervin FR, Pihl RO, Young SN. The effect of raising or lowering tryptophan levels on aggression in vervet monkeys. *Pharmacol Biochem Behav*, 1987, 28(4): 503–510. [DOI](#)
- [40] Tourino C, Valjent E, Ruiz-Medina J, Herve D, Ledent C, Valverde O. The orphan receptor GPR3 modulates the early phases of cocaine reinforcement. *Br J Pharmacol*, 2012, 167(4): 892–904. [DOI](#)
- [41] 谢益宽. 慢性痛的发生机理. *科学通报*, 1999, 44(22): 2353–2362. [DOI](#)
- [42] Watkins LR, Maier SF. Glia: a novel drug discovery target for clinical pain. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, 2(12): 973–985. [DOI](#)
- [43] Bura SA, Nadal X, Ledent C, Maldonado R, Valverde O. A_{2A} adenosine receptor regulates glia proliferation and pain after peripheral nerve injury. *Pain*, 2008, 140(1): 95–103. [DOI](#)
- [44] Mehlmann LM, Jones TL, Jaffe LA. Meiotic arrest in the mouse follicle maintained by a G_s protein in the oocyte. *Science*, 2002, 297(5585): 1343–1345. [DOI](#)
- [45] Kalinowski RR, Berlot CH, Jones TLZ, Ross LF, Jaffe LA, Mehlmann LM. Maintenance of meiotic prophase arrest in vertebrate oocytes by a G_s protein-mediated pathway. *Dev Biol*, 2004, 267(1): 1–13. [DOI](#)
- [46] Eppig JJ, Viveiros MM, Bivens CM, Fuente RDL. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: *The Ovary*. New York: Raven Press, 2004: 113–129.
- [47] Horner K, Livera G, Hinckley M, Trinh K, Storm D, Conti M. Rodent oocytes express an active adenylyl cyclase required for meiotic arrest. *Dev Biol*, 2003, 258(2): 385–396. [DOI](#)
- [48] Bornslaeger EA, Schultz RM. Adenylyl cyclase activity in zona-free mouse oocytes. *Exp Cell Res*, 1985, 156(1): 277–281. [DOI](#)
- [49] Downs SM, Buccione R, Eppig JJ. Modulation of meiotic arrest in mouse oocytes by guanyl nucleotides and modifiers of G-proteins. *J Exp Zool*, 1992, 262(4): 391–404. [DOI](#)
- [50] Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carroll J. Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Dev Biol*, 2002, 246(2): 441–454. [DOI](#)
- [51] De Haan L, Hirst TR. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms (Review). *Mol Membr Biol*, 2004, 21(2): 77–92. [DOI](#)
- [52] Gallo CJ, Hand AR, Jones TL, Jaffe LA. Stimulation of *Xenopus* oocyte maturation by inhibition of the G-protein alpha S subunit, a component of the plasma membrane and yolk platelet membranes. *J Cell Biol*, 1995, 130(2): 275–284. [DOI](#)
- [53] Pirino G, Wescott MP, Donovan PJ. Protein kinase A regulates resumption of meiosis by phosphorylation of Cdc25B in mammalian oocytes. *Cell Cycle*, 2009, 8(4): 665–670. [DOI](#)
- [54] Li ZQ, Zhang JB. Cell cycle regulation and tumor. *Oncology Progress*, 2004, 2(2): 146–150. [DOI](#)
- [55] Duckworth BC, Weaver JS, Ruderman JV. G₂ arrest in *Xenopus* oocytes depends on phosphorylation of cdc25 by protein kinase A. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26): 16794–16799. [DOI](#)
- [56] Lincoln AJ, Wickramasinghe D, Stein P, Schultz RM, Palko ME, De Miguel MP, Tessarollo L, Donovan PJ. Cdc25b phosphatase is required for resumption of meiosis during oocyte maturation. *Nat Genet*, 2002, 30(4): 446–449. [DOI](#)
- [57] Stanford JS, Ruderman JV. Changes in regulatory phosphorylation of Cdc25C Ser287 and Wee1 Ser549 during normal cell cycle progression and checkpoint arrests. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(12): 5749–5760. [DOI](#)
- [58] Anderson E, Albertini DF. Gap junctions between the oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. *J Cell Biol*, 1976, 71(2): 680–686. [DOI](#)
- [59] Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, Wang H, Ke H, Nikolaev VO, Jaffe LA. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*, 2009, 136(11): 1869–1878. [DOI](#)
- [60] Norris RP, Freudzon L, Freudzon M, Hand AR, Mehlmann LM, Jaffe LA. A G_s-linked receptor maintains meiotic arrest in mouse oocytes, but luteinizing hormone does not cause meiotic resumption by terminating receptor-G_s signaling. *Dev Biol*, 2007, 310(2): 240–249. [DOI](#)