

PDE4 与 cAMP 信号区域化

王正朝 石放雄*

(南京农业大学动物科技学院, 南京 210095. * 联系人, E-mail: fxshi@njau.edu.cn)

摘要 第二信使 cAMP 在细胞信号转导中起着重要作用, 但为什么相同的 cAMP 信号可以诱导不同的生理反应. 20 年前, cAMP 信号区域化的提出, 似乎解答了这一疑惑. cAMP 区域化使得空间上不同的蛋白激酶 A (PKA) 池能够被不同地活化. 同时也使得人们对 cAMP 通路复杂性和重要性有了新的认识, 使其再度成为生命科学的研究热点. cAMP/PKA 信号转导区域化是由蛋白激酶 A 锚定蛋白(AKAPs)和磷酸二酯酶(PDEs)来维持的, 前者可以结合 PKA 和其他的信号转导蛋白; 后者可以水解 cAMP, 终止 PKA 活性. PDE4 是 PDEs 同工酶超家族的成员之一, 不仅参与区域化的 cAMP 信号通路的调控, 而且还在整合与其他主要信号转导通路的反应网络中起重要作用. 本文对 PDE4 的分类、基因表达与调控、作用的系统与区域进行了回顾, 重点对 PDE4 作用的具体分子与机理以及 PDE4 发挥功能的调控方式进行了总结, 并结合本室的研究对 PDE4 在大鼠颗粒细胞成熟及 cAMP 信号区域化中的作用进行了综述.

关键词 PDE4 磷酸二酯酶(PDE) cAMP 信号通路 信号区域化 颗粒细胞

在过去的半个世纪里, 人们已经确定第二信使 cAMP 及其通路的绝大多数组分参与了信号转导, 这使得我们能够在分子和原子水平上理解它们的功能^[1]. 但令人感到迷茫的是, 为什么相同的 cAMP 信号可以诱导不同的生理反应^[2]. cAMP 是普遍存在的第二信使, 通过腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)的作用而产生于质膜的胞质面, 主要通过蛋白激酶 A (protein kinase A, PKA)发挥作用, 控制细胞的许多事件, 如运动、生长、代谢、收缩和突触可塑性等^[3-7]. cAMP 一旦产生, 使其失活的惟一途径是通过磷酸二酯酶(PDEs)的作用将其降解为 5'-AMP^[3-7]. 因此, 在特定细胞中所表达的不同 PDEs 对 cAMP 信号通路具有重要的调节作用^[2,7].

20 年前, Buxton 和 Brunton 对心肌细胞进行一系列研究时就已认识到 cAMP 信号转导是区域化的^[4]. 现在研究人员已经将其拓展到许多其他类型的细胞^[5]. cAMP 信号区域化概念的出现, 使得研究胞内 cAMP 的时空动力学成为必然. 最近, Houslay 和 Adams^[7]利用荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)和 cAMP 门控离子通道(cAMP-gated ion channels, CNG)等方法对活细胞进行监测, 发现胞内 cAMP 浓度在空间和时间上都存在梯度. 这种 cAMP 区域化差异使得空间上不同的 PKA 池能够被不同地活化. 尽管 cAMP/PKA 信号转导通路可被多种刺激所激活, 但细胞反应的特异性主要依赖于信号复合体的形成以及被定位到不同位

点(区域化)^[8]. 这种特异性可以通过信号转导分子在亚细胞结构域的特定定位获得^[9]. cAMP/PKA 信号转导区域化是由蛋白激酶 A 锚定蛋白(A-kinase anchoring proteins, AKAPs)和 PDEs 来维持的, 前者可以结合 PKA 和其他的信号转导蛋白; 后者可以水解 cAMP, 限制其扩散, 终止 PKA 活性^[8]. 各种 PKA 同工酶通过 AKAPs 被锚定于胞内特定定位点, 而 AKAPs 的表达又是呈细胞特异性方式. 因此, AKAPs 在胞内的不同分布允许不同的 PKA 同工酶对胞内 cAMP 梯度进行识别和反应, 并修饰局部的目标蛋白, 这样就获得了区域化的作用. 信号转导酶区域化是细胞信号转导特异性的重要机制, 它们可以与骨架蛋白和锚定蛋白互作^[10]. 目前已经发现 AKAPs 能够整合由蛋白激酶、磷酸化酶、信号通路酶和其他调节蛋白组成的整个信号通路复合体^[10], 而且也已经确定 PKA 的定位受 AKAPs 调控, 所以其也调控 PDEs 在胞内的分布. cAMP 的这种梯度依赖于 ACs 和 cAMP-PDEs 的活化与定位^[3]. 大量的研究表明, ACs 及受体是不均匀地分布于质膜的表面^[5], 且 PDEs 定位于不同的胞内位点是为了适应 cAMP 的降解^[3]. 研究结果还表明, 区域化诱导产生具有生物学作用的胞内和膜功能蛋白是呈底物特异性的^[11,12]. 另外, 人们已经发现, PDEs 活化不仅存在于胞质, 而且也存在于各种膜、核及细胞骨架^[3,12]. 因此, cAMP 在时空上呈现的梯度依赖于锚定的 PDE 蛋白^[7,12]. 事实上, 局部 PDEs 活化决定了胞内 cAMP 不均匀的梯度, 随后被与 AKAP

结合的 PKA 分子所“阅读”,巩固了 cAMP 信号转导的区域化。

PDEs有 11 个不同的家族,其中 8 个家族能产生 30 多种同工酶,水解cAMP^[3,13,14]。这种成员的多样性表明了其功能的复杂性,具体表现在以下两个方面:一是与胞内定位有关,即特定的PDE同工酶调控特定的胞内过程;二是特定的同工酶能被其他信号转导通路所调控。因此,PDEs在控制cAMP信号转导空间上的完整性及整合各种胞内其他信号转导系统与cAMP及cGMP信号转导系统之间的信息传递过程中具有非常重要的作用^[7]。PDE4 就是个典型的例子,它是PDE蛋白酶超家族的成员之一,专门水解cAMP。最近,PDE4 催化单元结构的阐明使得我们可以从分子水平上了解其催化作用的方式,如底物和抑制剂的选择性与特异性。PDE4 由 4 个不同的基因编码,至少可以产生 16 种同工酶,每个同工酶又具有特异的N端结构域。PDE4 通过其胞内特异性定位对不同功能和空间的cAMP池进行控制。PDE4 位于一个十字路口,可以整合在空间上位于不同区域的各种cAMP信号通路^[7]。本文将对PDE4 的分类、基因表达与调控、作用的系统与区域进行回顾,重点对PDE4 作用的具体分子与机理、PDE4 发挥功能的调控方式及其在cAMP信号通路区域化和颗粒细胞成熟中的作用进行总结。

1 PDE4 的分类

PDE4 是 PDEs 同工酶超家族的成员之一,由 4 个不同的基因所表达,其中许多同工酶是功能特异的,在不同组织中表达,参与不同的信号传递通路,调节特异的生理和病理过程。一般情况下,PDEs 可通过离子交换层析分离,并根据氨基酸序列、酶动力学特征、催化和调节特征、底物特异性、细胞分布和对抑制剂的敏感性等进行分类。除酵母 PDEs 外(它们属于不同的家族),所有 PDEs 的羧基端均含有一个保守的催化结构域(约 270 个氨基酸)^[13,14]。PDE4 羟基端结构域与二聚化作用相关,起调节结构域的作用,是磷酸化的靶点。催化结构域侧面的调节结构域是细胞内信号感受器,当其接收到信号后 PDEs 便会改变构象,以致于抑制结构域不再对催化作用产生抑制作用。成对的调节区域,紧位于催化位点的 N 端,是绝大部分已知PDE家族的重要特征^[1,7]。例如,PDE4 具有两个独特的模块(UCR1 和 UCR2),对催化活性

起调节作用。功能性 PDE4 同工酶可以分为 3 大类,即长链的、短链的和超短链的^[15]。长链同工酶以两个模块为特征,它们在 4 个 PDE4 亚家族中都是保守的,且位于催化结构域的 N'端,被命名为上游保守区域 1 和 2 (upstream conserved regions 1 and 2, UCR1 和 UCR2)。与长链同工酶相比,短链同工酶缺少 UCR1,而超短链同工酶不仅缺少 UCR1,而且 UCR2 也被剪切过。PDE4 蛋白酶的命名是采用 1995 年建立的 PDEs 蛋白酶超家族官方命名方法,用阿拉伯数字表示 PDE 家族,紧接着用一个大写的字母表示家族中的基因,随后一个阿拉伯数字表示来自于同一个基因的剪切体^[7,16],如PDE4D3 表示PDE第 4 家族D基因剪切体 3。

2 PDE4 基因的表达与调控

PDE4 又称为 cAMP 特异性 PDEs, 咯利普兰(Rolipram)敏感性 PDEs 或 PDE 等,是果蝇 *dunce* 基因的同源基因。在哺乳动物基因组中,4 个 PDE4 基因存在于不同的染色体上^[17]。研究还发现,果蝇和哺乳动物 PDE4 基因是由多个转录单元和多个启动子组成的^[18]。例如,人类 PDE4D 等位基因位于 5q12,长 150 kb,至少有 4 个转录单元。作为启动子的内含子一般不到 20 kb。其他的 PDE4 基因也具有类似的复杂性,只有一些较小的差异。这种精细结构使得不同的 PDE4 基因有多个转录产物,如 PDE4A 有 4~5 个转录产物,PDE4B 有 4 个,PDE4C 有 3 个,PDE4D 有 5 个或更多。总的来说,人类 PDE4 基因至少有 16 个可读框(ORF)。毫无疑问,多启动子的存在是组织发育特异性表达所必需的,如同胞外不同刺激产生的调节作用^[1~3]。

在哺乳动物细胞中已经确定有 16~18 种不同的 PDE4 同工酶或剪切体的表达^[18],这些剪切体在结构上由位于调节结构域侧面的高度保守的催化结构域所组成,其特征性结构域位于其 N'端及 C'端。现在已经在原子水平上确定了 PDE4B 催化结构域的结构,为其他 PDE4,甚至其他 PDE 家庭成员的催化结构域的建模铺平了道路。PDE4 中 UCR1/UCR2 结构主要起调节结构域的功能,控制着催化结构域的构象。UCR1 由约 60 个氨基酸组成,UCR2 由约 80 个氨基酸组成。这两个模块通过连接区域 1 (LR1)连接在一起的。LR1 由约 24 个氨基酸组成,在 4 个 PDE4 亚家族中是不同的。UCR1 通过 LR2 与催化单元连在一起,

它的组成和大小(10~28个氨基酸)在4个PDE4亚家族中也不同。催化单元由约315个氨基酸组成,形成3个不同的亚结构域。然而,C端区是每一个亚家族特有的,其作用目前还不清楚^[1,17]。

翻译后修饰是许多蛋白酶的调控方式之一,PDE4也不例外。PDE4可以在转录后发生磷酸化作用,只不过其磷酸化作用发生于PDE4蛋白酶氨基端的调节结构域。当PDE4中UCR1发生磷酸化时,引起酶构象的改变,从而影响其活性。PKA,PKB,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和Ca²⁺/CaM依赖性蛋白激酶(CaM kinase, CaMK)等激酶都可以催化这些磷酸化,发挥调节作用^[2]。

除了翻译后修饰形成短链PDE4同工酶的调节外,PDE4的表达在转录水平也可被调节。现已证明,在PDE4B和PDE4D基因中存在cAMP调控的内源启动子,可以使PDE4B和PDE4D mRNA及相应的短同工酶大量增加^[1-3]。另外,mRNA的稳定性也可以导致PDE4D和PDE4B mRNA的整体水平上升。存在于PDE4基因中的其他启动子也可能被cAMP所调节,如最近研究发现PDE4D3和PDE4D5 mRNA的增加在cAMP持续升高之后^[2]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对PDE4B2的诱导作用是一个正反馈调节,是去除cAMP约束作用所必需的,如在M期或单核细胞系中LPS刺激引起PDE4B2 mRNA和蛋白大量增加。但在缺失PDE4B的小鼠中,这种调节作用不存在,由LPS刺激产生的肿瘤坏死因子 α (TNF α)减少了90%^[1-3]。Toll受体相关信号通路的激活也可以诱导短链PDE4B2同工酶的表达。事实上已经发现细胞因子的产生和炎症细胞的活化是受cAMP负反馈调节控制,起到了一个门控通路的作用。

细胞中绝大多数cAMP是由PDE4家族酶负责水解的^[1,17,18]。PDE4同工酶成员具有不同的调节结构域,这就是为什么PDE4家族存在如此多的同工酶的原因。细胞通过不同的PDE4同工酶成员来适应它所接触到的大量信号,控制不同亚细胞区域内环核苷酸的累积并整合不同的信号通路。那么,为什么在同一家族内又存在多个基因,相应蛋白质的特性和调节作用又有多大程度的重叠呢?最近的研究发现,小鼠4个PDE4基因中只要有一个失活便可以产生意想不到的表型,说明不同PDE基因的功能是不重复的^[19,20]。另外,大脑中PDE mRNA的原位表达研究发现同一个家族的基因呈特异性表达。例如,PDE4B在

小脑的粒状层中表达,而PDE4D在小脑柏金氏细胞中表达^[19-20]。因此,PDE4的表达调控方式是呈组织和发育阶段特异性的。

3 PDE4作用的系统与区域

PDE4在许多组织中都有表达,如肾、心、肺、骨骼肌、血管和内脏平滑肌等,也包括卵巢颗粒细胞。在不同的组织表达不同的PDE4同工酶,并且在组织的不同区域和亚细胞区域中呈特异性分布。PDE4的N端主要功能是将胞内特异的PDE4同工酶定位到特定的信号复合体中或特定的位置,如PDE4A1的N端有两个特征性的螺旋结构^[21]。PDE4D基因编码5个特征明显的剪切体。这些剪切体是通过选择性剪切和/或运用不同的启动子产生的,而且这些剪切体具有不同的调节功能,定位于不同的亚细胞区域。PDE4D的5个剪切体的氨基端有一个结构域,可以与RACK1互作,RACK1是骨架蛋白,可以与活化的PKC结合;PDE4A和PDE4D剪切体具有SH3互作结构域^[19,20]。现有研究认为,骨架蛋白可以锚定PDE4D到PKAs附近的高尔基体和中心粒结构上^[19,20]。尽管这种不同定位的生理学作用目前还不是很清楚,但这些研究结果表明,PDE4亚细胞定位在信号区域化中具有重要的作用^[19-22](图1)。

PDE4同工酶的重要特性是它们能够定位于胞内特定的位点^[2]。PDE4通过胞内特异性的定位对功能和空间不同的cAMP池的控制具有极重要的作用。通常PDE4通过与特定蛋白结合而发生定位(图1),如一些长PDE4同工酶含有一个多聚脯氨酸基序,可以与Fyn/Lyn激酶的SH3结构域互作,是定位于膜上特定部位和核周边区域所必需的;PDE4D5可以通过其特定的氨基末端区域与RACK1互作;PDE4D3可以与myomegalin(一个大的骨架蛋白260 kD)结合并定位于高尔基体和中心粒区域;PDE4可以与 β -arrestin发生互作并定位于质膜G蛋白偶联受体(G-protein coupled receptors, GPCRs)附近,具有双重功能,即调整信号分子和受体移动^[23,24](图1)。在过表达 β -肾上腺素受体的细胞中, β -arrestin和PDE4被转运到膜上,而这种易位在胎鼠成纤维细胞(murine embryonic fibroblasts, MEF)中不存在,因为MEF细胞缺失 β -arrestin 1和2;GPCR-arrestin-PDE4复合体对受体信号通路和脱敏性具有非常重要的影响。 β -arrestin募集到磷酸化的受体并使PDEs进入复合体,从而终止信号,阻止复合体进一步进行cAMP信号转导^[23,24]。

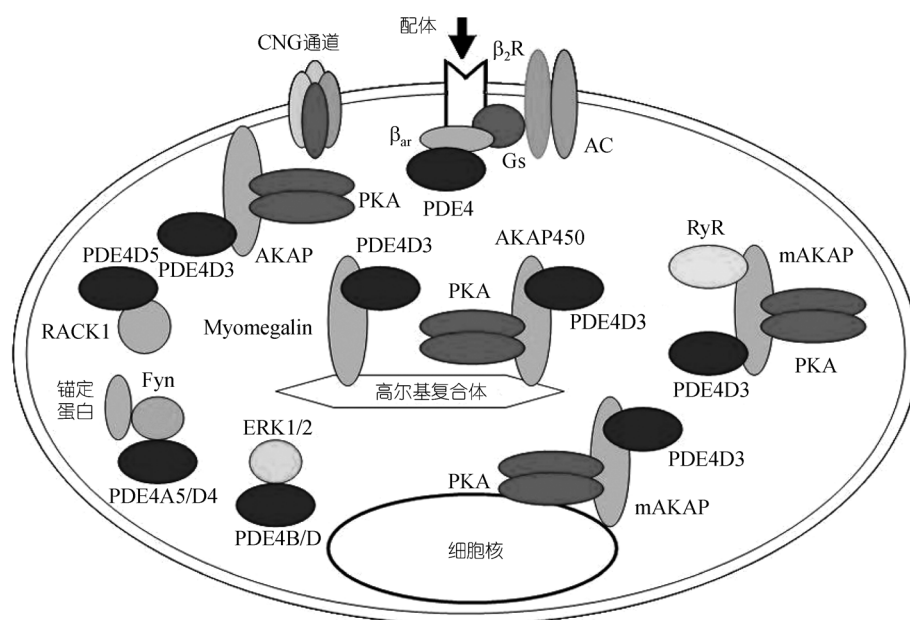


图1 PDE4的亚细胞定位及调控^[1,2,10,22~26]

细胞是假设的用来表示已知的大分子 PDE4 复合体及其亚细胞定位。修饰的 CNG 通道用跨膜结构域束表示，作为 cAMP 生物传感器；PDE4 在 EP2 附近的定位是用这个生物传感器的研究推断出来的。 β_{ar} 示 β -arrestin； β_2R 表示肾上腺素受体；Gs 示异三聚鸟苷结合蛋白

因而它们可以形成局部空间上被限制的信号转导模块，起监视胞内 cAMP 梯度，整合其他信号转导系统的作用。

如上所述，PDE4 除了不同亚细胞分布外，还可以与 AKAP 等许多伴侣蛋白相互作用，参与 PDE4 的胞内定位。PDE4 定位的改变与细胞刺激有关，可以调整细胞内信号转导。例如，在血管平滑肌细胞中，PKA 和 PKC-Raf-MEK-Erk 通路的同时活化使得 PDE4D3 的活化受到调整，并且膜 PDE4D3 被定位到这些细胞的胞质中。在 T 细胞激活过程中 PDE4 被特异性的募集到脂筏上，终止 cAMP 的负反馈调节作用，从而使 T 细胞的免疫能力增强^[27]。在心肌细胞中， β -arrestin 能够募集 PDE4，以调节 β -肾上腺素受体从 Gs 转变为 Gi。在骨骼和心脏组织中，密啶噻啉可以募集 PDE4 于高尔基体和中心粒区域，与 PKA 和 mAKAP 结合以调控 PKA 的活化状态。另外，在细胞凋亡过程中，caspase-3 能够剪切 PDE4A5 的 N 端区域，抑制其 SH3 互作结构域，改变其胞内定位及其催化活性。总之，不同 PDE4 同工酶的生化特性、定位、及其协调而复杂的调控使得 PDE4 成为 cAMP 信号通路的重要元件^[16]。

4 PDE4 作用的具体分子与机理

胞外信使与细胞膜上的受体结合通过 ACs 产生

第二信使开始信号转导。像 cAMP 这样的小分子可以迅速合成，并扩散到胞质，从而激活下游的效应器蛋白，如 CNG 离子通道、EPACs 和 PKA^[12]。这个过程使得胞外刺激能够影响胞内多种生化过程。相反，信号的终止是由于 PDE 超家族成员降解局部 cAMP。ACs 和 PDEs 的互作平衡产生 cAMP 梯度，AKAPs 通过 PKA 定位决定 cAMP 信号转导的特异性，这使得 cAMP 在特定的亚细胞区域内和有限的时间间隔中调节细胞对外在刺激的反应^[25,28]。直到 20 世纪 70~80 年代，第二代抑制剂的合成才把具有特异性功能的 PDE4 从其他 PDEs 中区别开来。一般来说，用 PDE4 选择性抑制剂处理可以引起细胞内 cAMP 水平的升高，从而增强或抑制远端效应，这取决于细胞内环境。然而，现在还不清楚 PDE4 抑制后的功能变化是否是由于 cAMP“稳态”的改变。由于 PDE4 参与反馈调节作用，与细胞脱敏、适应、信号偶联和 cAMP 信号区域化相关，所以 PDE4 被认为是 cAMP 自我平衡的重要调节因子^[2,3]。

cAMP 是一个小分子，只需要百万分之一秒就可以在整个细胞内达到平衡，但第二信使的扩散可以被生理障碍和 PDEs 的降解作用所阻断^[2]。Jrevicius 和 Fishmeister 检测 β 肾上腺素对 L 型通道的活化作用时发现，cAMP 的扩散是有限的，可以被 PDE4 所阻断。

Cooper^[29]研究发现, ACs不能到达经离子载体进入的Ca²⁺至少有两种可能性: 一是Ca²⁺没有进入ACs附近的细胞, 表明微结构域存在于环化酶周围, 使人们想起位于库容性Ca²⁺内流(capacitative Ca²⁺ entry, CCE)通道周围的微结构域; 二是离子载体调节的Ca²⁺升高不能模仿与离子通道开关相关的Ca²⁺转运, 表明一个动力学微结构域以多种形式Ca²⁺瞬时现象存在于通道附近, 在更远的距离上可以被缓冲或稀释^[29]. 检测cAMP微结构域的最直接手段是测量紧靠AC附近的cAMP. Karpen与其合作者为了研究胞内cAMP的局部浓度与扩散, 建立了一种cAMP生物传感器(一种修饰过的CNG离子通道), 可以检测到微摩尔的cAMP. 运用这种方法检测胞内cAMP调控的Ca²⁺流时发现, 质膜内cAMP池不能在整个胞质内迅速平衡. 更重要的是, 他们发现当GPCR与配体结合时PDE4 就被迅速激活, 从而调节这种“微结构域”中cAMP的浓度^[1-3]. 因而, PDE4 参与调控cAMP到达质膜附近的效应器.

对心肌细胞的研究也发现了类似的cAMP微结构域效应。例如,用 β 肾上腺素处理心肌细胞,发现在Z带和T管重叠的区域更易于累积cAMP,而这种累积作用可以被PDE4所阻断/清除,因为密啉噻啉是PDE4互作蛋白,可以锚定长PDE4同工酶于L型通道附近的Z带,RyR和PKA。在HEK293细胞系中药理学和选择性siRNA实验发现,AC附近的AKAP,gravin和PKA可以迅速活化PDE4,产生瞬时cAMP反应,避免PDE4的cAMP在胞液中慢慢累积^[29](图2)。在静息的HEK293细胞中,PDE4的活化可以通过cAMP基础水平的波动来保护GRK2(G-protein receptor kinase 2)不受PKA不恰当的磷酸化作用^[30]。用

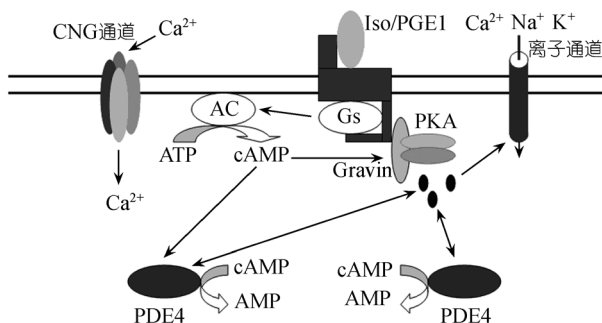


图2 HEK-293 细胞中cAMP动力学调控因子^[6,13,19,20,29,32]

Gravin 与质膜结合, 可以锚定 PKA, 调节质膜附近的 PDE4 的活性, 产生一种不同于胞质内传统方法检测到的 cAMP 浓度形式。Iso, 去甲肾上腺素; PGE1, 前列腺素 E1; CNG 通道是修饰过的 CNG 离子通道, 作为生物传感器

前列腺素E1 处理HEK293 细胞可以观察到cAMP水平的瞬时升高, 若用PDE4, PKA或AKAP的抑制剂进行预处理便阻断了质膜下cAMP浓度恢复到基础水平。Gravlin (AKAP250)相关联的PDE4D提供了一个终止质膜内cAMP信号的途径, 同时伴有局部离子通道或酶的活化^[31].

在心肌细胞中, PDE4D3 磷酸化作用将导致 cAMP 动态平衡与 cAMP 瞬时反应. 若 PDE4D3 磷酸化作用被抑制, 则 TSH 诱导 cAMP 的瞬时反应增加; 反过来, 又活化了 PDE4D3, 降低 cAMP 水平, 达到一种动态平衡^[2,3]. 这种反馈调节不可能通过测量细胞内总 cAMP 浓度来发现. PDE4D3 和 PKA 存在于 AKAPs 复合体中, 这些 AKAP-PKA-PDE4D 复合体存在的功能是通过 PKA 磷酸化 PDE4D3, 产生反馈调节作用, 控制 cAMP 以到达锚定的 PKA. 因为 cAMP 的升高可以激活 PKA, 活化的 PKA 可以磷酸化 PDE4D3 等底物, 从而激活 PDE4, 导致局部 cAMP 降低, 使 PKA 恢复到基本活性状态. 别的信号通路成分很可能也存在于 AKAP-PKA-PDE 复合体中, 因为 AKAP450 和它的剪切体 Yotiao 可以与蛋白磷酸酶 1 (protein phosphatase 1, PP1) 和 PP2A 结合. 最近的研究也表明, 在心肌细胞中 PDE4D3 是复合体的一部分, 其中包括 Ca^{2+} 通道 RyR, PKA, mAKAP 和 PP1.

AKAPs的一个重要特性是其不但可以与PKA互作，而且还可以与其他的信号转导蛋白互作。这些复合体含有信号终止酶(如PDEs)和信号转导酶(如激酶)。因此，这些蛋白酶既能够上调，也能够下调特异性的信号转导通路^[25]。目前，AKAP研究的热点是鉴定与AKAPs相关联的蛋白。这可以提供候选蛋白替代PKA，有利于我们进一步理解这些AKAP复合体是如何调控下游生物反应的。在心脏功能的调控中，AKAP通过募集PKA和其他的效应器蛋白到胞内特定区域，控制cAMP信号转导的特异性。通过cAMP活化的每个效应器都具有不同的门槛。心脏中mAKAP复合体协调3种酶(PKA, PDE4D3和Epac1)，以便依据局部cAMP水平在升高或降低时产生恰当的反应。最近，不断增加的AKAPs也被PDE锚定到复合体中，使得微结构域中cAMP梯度得到了更好地协调。这使得cAMP变化的时空调控变得更加复杂^[33]。

5 PDE4 发挥功能的调控方式

细胞中存在多种控制环核苷酸水解的机制, 现在已经不再认为细胞中的 PDEs 是看家酶, PDE4 发挥

功能的调控除了组织特异性表达和亚细胞定位外,主要体现在多种不同的活性调节方式^[19,20]。随着PDE4B催化单元晶体结构的确定,使得我们可以在分子水平上理解酶活性的调控机制。

5.1 分子内互作

长链PDE4s可以通过UCR1 N'端位点的磷酸化作用来增加酶的活性。进一步研究发现,若将PDE4D的UCR1和UCR2从催化结构域中剪切掉,结果导致其活性增加^[34]。另外,UCR2与抗体结合可以增加酶的反应速度^[17],所以我们认为UCR1的磷酸化作用是通过调节UCR2与催化结构域的互作,从而改变PDE4构象与活性。利用酵母双杂交进行进一步分析发现,UCR1和UCR2之间彼此互作^[15,34],这种分子内的互作很可能与酶的磷酸化活化机制相关^[15,34]。UCR1/UCR2结构域在PDE4四级结构中具有重要作用,即同时含有两个结构域的剪切体是二聚体,若缺失一个UCR的剪切体是单体。这种二聚化最重要的作用是把N'端的构象改变传递到催化结构域,从而引起相应的构象改变。因此,UCR1/UCR2结构域是决定催化结构域多种构象的主要因素。最近研究表明,UCR1亲水性C端能与UCR2亲水性N端发生互作。这种互作实际上是UCR1中两个精氨酸(PDE4D3中是Arg98和Arg100)与UCR2中一簇负电荷残基(Glu146, Glu147和Asp149)的互作,同时表明UCR1/2模块与催化单元的互作是通过UCR2接触的^[34]。最初的N端删除研究发现,去除UCR2,尤其是其N端部分,将导致PDE4活性增加,说明UCR2对PDE4催化单元的活性有持续抑制作用。

5.2 磷酸化作用

PKA磷酸化作用能够通过UCR1的N端单个丝氨酸残基活化4个PDE4亚家族产生的所有长链同工酶^[35](图3)。在哺乳动物细胞中这种磷酸化作用可以增加PDE4活性约60%以上,而PDE4D3和PDE4A4有更大活性(2~3倍),可能与其N端的调节作用有关或它们还受别的修饰作用所控制。PKA对长链PDE4同工酶的活化是通过相邻丝氨酸残基的磷酸化作用破坏离子键的结果。PKA对UCR1的磷酸化作用也被认为通过构象改变破坏了UCR1和UCR2之间的互作,这与活化构象改变不同。PKA磷酸化也增强了PDE4D3和PDE4A4对 Mg^{2+} 刺激作用的敏感性^[34],这是PDE4活性所必需的。因为PDE4催化结构域结构紧密,由17个 α 螺旋组成,分为3个亚结构域,其中6~13螺旋含有能结合两个金属离子的重要残基。螺旋1-7, 8-11和12-16螺旋形成亚结构域,使得催化中心有不同构象^[1,17]。在甲状腺细胞系中,TSH可以使PKA迅速磷酸化PDE4D3在丝氨酸位点(Ser54),导致活性增加^[2]。在PDE4D3中发现的丝氨酸残基及其周围的残基不仅存在于所有哺乳动物长链PDE4同工酶中,而且在从线虫到人类的进化过程中都是保守的,表明这个结构域具有重要的功能。在过表达体系中,这个位点的磷酸化作用也引起其他长链PDE4同工酶活性的增加^[1~3]。在血管平滑肌和淋巴细胞系中已经发现天然的PDE4D3和PDE4D5可以通过磷酸化作用被活化。

昆虫细胞的重组表达实验发现,PDE4B2蛋白羧基端SPS基序中丝氨酸可以被MAPK磷酸化。进一步研究发现,哺乳动物细胞中过表达PDE4D3中相似基序也可以被MAPK磷酸化,导致催化活性被抑制。

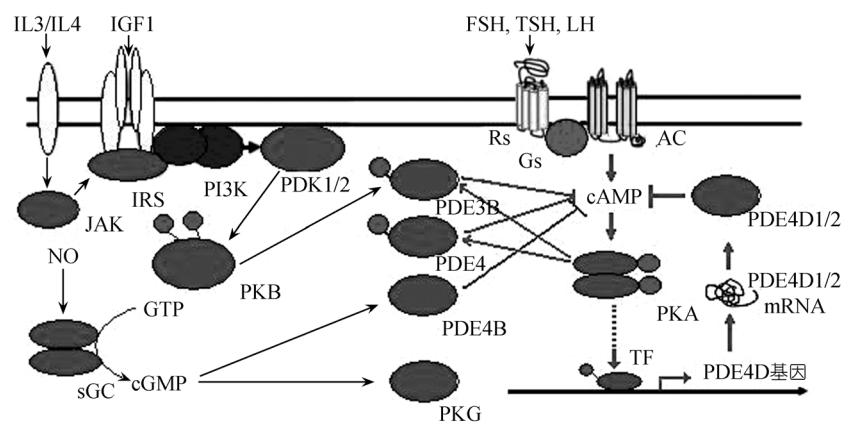


图3 PDE4s在信号通路中的位置及其活性调控^[6,13,19,20,29,36~39]

PDE蛋白酶在整个网状信号转导图中处于十字路口,具有重要的作用,可以整合各种其他的信号转导通路与cAMP和cGMP信号转导通路,PDE4就是其中最具有代表性的酶,图中仅列出了其主要的调节方式。但需注意的是,最近对肺动脉平滑肌细胞的研究发现NO可以诱导PDE4B的表达;对卵巢卵泡发育的研究发现卵母细胞分泌的PDE3B与颗粒细胞分泌的PDE4D有协同作用。

因而现在认为, PDE4D和其他长链PDE4同工酶可以通过MAPK作用形成负反馈调节机制. PDE4活性的抑制是通过Raf磷酸化作用诱导的cAMP级联反应所产生的^[2].

5.3 自我调节

用cAMP类似物处理肝实质细胞发现, 在这些细胞中存在快速反馈控制cAMP的机制. 最近, 甲状腺细胞中的研究也表明, PDE4可以通过激素被活化, 这些激素通过依赖PKA机制升高cAMP^[19,20]. 若用PKA抑制剂阻断PDE4D3磷酸化/活化, 则引起cAMP信号转导作用增强, 从而确认在完整的细胞中存在PKA-PDE4D反馈环^[40](图3). 在表达PDE4D3的稳定细胞系中TSH的刺激使得cAMP累积产生一个较大的变化, 而在缺失磷酸化作用的PDE4D3细胞系中反应正常. 这种反馈调节的失活主要影响cAMP信号的强度, 对信号的持久性没有影响^[40].

一些激素的刺激使得胞内cAMP升高, 引起PDE4 mRNA增加和PDE4蛋白的合成, 这对PDE4D/A基因最明显. 如若FSH长时间刺激足细胞将引起PDE4 mRNA和PDEA1/D2剪切体增加100倍, PDE活性增加10倍. 这种诱导机制存在于绝大多数的细胞中, 表明cAMP普遍存在反馈调节(图3). PDE对cAMP信号转导的反馈作用源于对PDE4D敲除小鼠的研究^[41]. 缺失PDE4D小鼠在青春期生长速度降低了30%~40%, 成年小鼠通常比同窝出生的要小些. 生长速度的减慢与IGF-1水平的降低有关, 表明GH-IGF1轴被破坏了. 另外, PDE4D-/-母鼠的受胎力下降, 且同窝小鼠的大小约为正常的三分之一. 与野生型同窝小鼠比较, 这种受精力的降低与排卵率减少70%~80%相关^[41], 而且PDE4D-/-小鼠的颗粒细胞对促性腺激素hCG的反应敏感性也降低.

破坏PDE4D表达也影响呼吸道中毒蕈碱类胆碱的反应^[42]. 缺失PDE4D的小鼠对乙酰胆碱没有反应, 除了毒蕈碱类胆碱受体的正常补偿以外, 呼吸道抵抗力增加. 另外, PDE4可能在M3毒蕈碱受体信号转导中直接起作用, 使其可以调节乙酰胆碱的收缩反应^[42], 再一次表明PDE4D作为信号转导的自我调节者的作用. 在cAMP累积被解除管制的病理条件下, PDE4反馈环可能有更重要的作用.

5.4 其他调节方式

PDE4的活性调节除了以上几种方式外, 还有一些其他的调节方式, 如蛋白互作、构象调节及通过负

电荷磷脂和细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated kinase, ERK)调节等方式. 20世纪70年代, 人们就已经发现PDE可以通过环核苷酸构象改变来进行调节. 关于PDE4构象的改变主要是通过UCR2的作用, 然后通过二聚体把UCR2的构象改变传递到催化结构域, 从而引起PDE4活性的构象调节. 磷脂酸(PA)是重要的信号转导分子, 但其与转导蛋白互作却知之甚少. 许多研究表明, PA可以增加PDE4活性^[7]. PA可以引起各种长链PDE4同工酶显著活化(0.7~3倍), 但对短及超短同工酶没有影响. 所有PDE4亚家族催化单元(除PDE4A)的第3个亚结构域都含有一个ERK基序(Pro-Xan-Ser-Pro). 在体外和体内这个丝氨酸残基可以通过ERK被磷酸化^[43]. 在丝氨酸靶点是惟一被磷酸化的残基时, ERK对长链PDE4同工酶的磷酸化可以产生抑制作用^[43]. 与此相一致的是, ERK作用的丝氨酸残基突变为天门冬氨酸时, 酶的活性降低, 类似于ERK磷酸化过程的野生型的酶(约60%被抑制). 在完整的细胞中, ERK对长链PDE4同工酶磷酸化的抑制作用能引起局部cAMP水平升高, 从而活化PKA, 引起长链PDE4同工酶的UCR1中目标丝氨酸残基的磷酸化作用, 导致ERK磷酸化作用对长链PDE4同工酶的抑制作用解除^[43,44]. 因此, ERK对PDE4抑制性调节作用的重要特征是短暂性, 因为它可以通过随后的PKA作用迅速逆转过来^[45]. cAMP是通过同工酶Raf-1抑制ERK活化, 并通过同工酶Raf-B活化ERK^[44]. 在特定类型的细胞中通过选择性表达不同的PDE4和Raf同工酶可以获得cAMP与ERK信号转导^[44], 如在人的大动脉平滑肌细胞中ERK的活化对长链同工酶PDR4D5的活性调节是很显著的. 但是许多细胞同时表达这两套PDE4和Raf同工酶, 导致不同的信号转导模式, 控制空间上不同的ERK.

6 PDE4在颗粒细胞成熟中的作用

颗粒细胞的发育/成熟是卵泡发育的关键. cAMP在颗粒细胞成熟中起重要作用, 而颗粒细胞中环核苷酸信号的失活依赖于cAMP-PDEs. 据报道, PDE4是大鼠颗粒细胞中主要类型的PDE蛋白^[46]. 在卵巢中, 卵泡的生长与成熟依赖于垂体促性腺激素(FSH和LH)的协同作用. 这两种促性腺激素主要通过cAMP信号转导发挥作用. 卵巢中cAMP-PDE水平/活性的改变将导致cAMP和E₂水平的改变, 从而调节卵巢的功能. 颗粒细胞是研究细胞内信号转导的最好模型, 我们实验室围绕颗粒细胞的成熟展开了

一系列的研究, 主要集中于 cAMP-PDE4, AC, FOXO 和 CNG 离子通道等, 并提出了卵巢颗粒细胞中主要信使途径模型^[46-51](图 4).

在颗粒细胞中, PDE4D 是促性腺激素调控的基因. 我们在颗粒细胞培养实验中发现, FSH 诱导 PDE4D 蛋白水平呈短暂的、时间依赖性的增加, 与检测到的 PDE4 活性变化相一致, 表明 FSH 对 PDE4 活性的刺激作用与 PDE4D 蛋白合成有关, 而不是存在蛋白的功能性活化. 超排实验研究发现, PMSG 可以诱导卵巢中 PDE4D mRNA 的含量升高^[46]. 进一步研究发现, 用 hCG 处理成熟的颗粒细胞也可以产生类似的诱导作用. 用 RNase 保护法研究促性腺激素对 PDE4D mRNA 表达及调控时还发现这种诱导作用主要是由于短链同工酶 PDE4D1 和 PDE4D2 mRNA 的累积. PDE4D mRNA 稳定性可以增加卵巢总 PDE 活性. 用 PDE4 特异性抑制剂 rolipram 处理之后, hCG 的作用不再明显, 表明只有 PDE4 被活化, 其他 PDE 不受促性腺激素刺激作用的影响. 用 PDE4D 特异性抗体进行蛋白印迹分析进一步表明 hCG 能够刺激颗粒细胞产生 PDE4D1/D2. 因此, 如同其他的内分泌细胞, 在颗粒细胞中 cAMP/PDE4D 负反馈调节也具有非常重要的作用.

PDE4D 基因敲除引起排卵率下降 75%, 并且受胎力降低. 为了研究排卵率大幅度降低的原因, Park 等人对 *PDE4D*^{-/-} 小鼠卵巢卵泡的发育进行了研究. 结果表明, 从 10 日龄小鼠中取得的未成熟卵巢基本上是正常的, 表明缺失 *PDE4D* 不影响早期卵泡的发育. 但未成熟小鼠(20~30 日龄)的超排实验发现卵泡不能

够发育至成熟. 组织学观察发现 PMSG 处理 *PDE4D*^{-/-} 小鼠 48 h 后卵巢上只存在一些正常的排卵前卵泡, 和许多结构类似黄体化的卵泡. 进一步研究发现 *PDE4D*^{-/-} 小鼠的颗粒细胞的 cAMP 反应性发生了改变^[46]. 用排卵剂量的 hCG 处理野生型和 *PDE4D*^{-/-} 小鼠时发现, 野生型小鼠卵巢中 cAMP 水平迅速升高(30 min)并随后下降, 与 *PDE4D* 的诱导合成相一致. *PDE4D*^{-/-} 小鼠卵巢中 cAMP 浓度在 1 h 时达到最高, 然后保持不变, 表明 *PDE4D* 的缺失阻止了第二信使的快速失活. 更重要的是, 卵泡成熟和排卵所需要的基因表达模式被破坏, 表明 *PDE4D* 负反馈调节对 cAMP 信息通路和细胞分化是至关重要的^[53]. 有研究表明, 在 *PDE4D*^{-/-} 颗粒细胞中与黄体化相关的基因可以被 LH/hCG 正常激活, 与 *PDE4D*^{-/-} 小鼠卵巢颗粒细胞黄体化的形态相一致. 在黄体化时, LH 峰激活了卵母细胞和排卵相关基因的表达程序. 孕酮受体(PR)的表达在这个程序中是关键, 因为 *PR*^{-/-} 卵泡不排卵. 现在普遍认为孕酮及其受体是下游基因表达所必需的. 为了研究 PR 基因表达是否在 *PDE4D*^{-/-} 卵巢中被激活, PR mRNA 在 hCG 处理后不同时期的检测结果发现在野生型和杂合子卵巢中表达 PR mRNA, 且在 hCG 处理后 1~3 h 迅速达到最大值. 但在 *PDE4D*^{-/-} 卵巢中没有检测到 PR mRNA. 进一步研究表明, *PDE4D* 的失活影响了与排卵相关的基因表达^[46]. 因此, 在颗粒细胞中 *PDE4D* 在决定 cAMP 信号转导的特异性和远端输出中起着非常重要的作用.

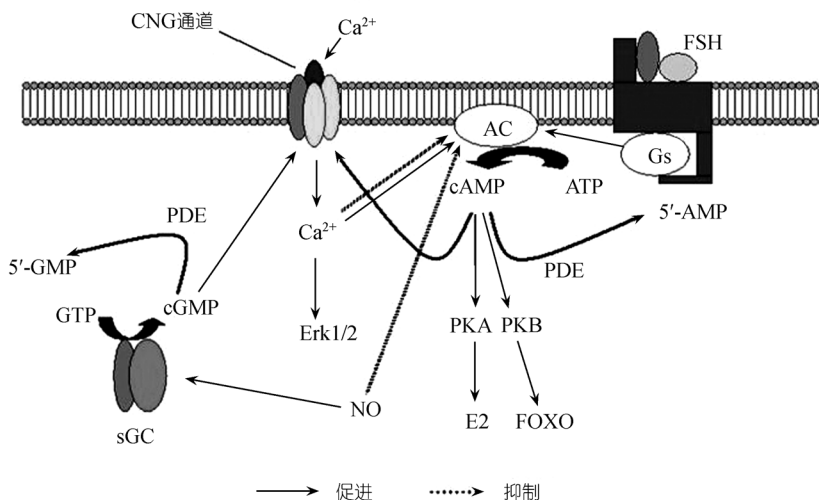


图 4 卵巢颗粒细胞中假设的主要信使途径^[46-52]

PDE4 蛋白酶在整个网状信号转导图中处于非常重要的位置, 直接调控着第二信使 cAMP 和 cGMP 的浓度. 除了 PDE4 外, CNG 离子通道, sGC, NO, AC, FSH 和 Ca^{2+} 等也都直接调控颗粒细胞内第二信使的水平. cAMP 在颗粒细胞成熟中起重要作用, 而颗粒细胞中环核苷酸信号的失活依赖于 cAMP-PDEs. Willoughby 等人^[31] 研究发现, 细胞内 cAMP 波动是由 Ca^{2+} 调节的 AC 同工酶和 PDE4 活性所驱动的. FSH 和 Ca^{2+} 可以促进颗粒细胞的成熟, NO 和 cGMP 也参与调节颗粒细胞的成熟. 最近研究发现 CNG 离子通道和转录因子 FOXO 也参与颗粒细胞的成熟

垂体激素的分泌可能是PDE4操纵的另一个位点。下丘脑-垂体-肾上腺轴对PDE4抑制剂登布茶碱(Dembuphyllin)非常敏感。口服或腹腔注射这种抑制剂后血清中肾上腺皮质酮明显升高;这些抑制剂还可以刺激LH的释放,所以可以用这种策略来操纵体内垂体激素分泌。由于它们与cAMP信号转导激素有明显的合作作用,所以可以用PDE4抑制剂来放大激素的刺激作用。GT1 GnRH细胞系实验表明,cAMP信号转导通路在调节这些细胞的兴奋性上起着核心作用。GT1细胞系可以通过持续表达有活性的PDE4D1来降低cAMP水平,从而抑制自发的Ca²⁺波动和在有规律的GnRH分泌^[54]。

7 结论与展望

cAMP是细胞中普遍存在的信号分子,能够调节许多细胞反应。第二信使作用的多样性主要由于cAMP在不同亚细胞区域内产生、作用和降解;而信号转导的特异性是通过细胞调节这些cAMP信号的频率和影响范围的能力而获得的。在细胞的整个信号转导网络中,PDE4位于重要的十字路口,不仅参与区域化的cAMP信号通路的调控,而且还在整合与其他主要信号转导通路的反应网络中起重要作用。关于PDE4酶家族的复杂性,还有大量工作需做。单个PDE4同工酶作用仅能从它们一级结构序列和种间启动子结构的高度保守性推断出来,但仍有许多关键性问题有待解决,如特异性PDE4同工酶在特定细胞中的功能、与伴侣蛋白相互作用的程度,以及N端调节区域调节作用的结构基础。

目前,PDE4酶引起了人们的广泛关注和重视,尤其是在许多重大疾病领域,可以利用这些酶的选择性抑制剂作为治疗试剂。正确评价这个蛋白酶家族对进一步理解胞内信号转导过程有重要作用,如辅助开发更有效的治疗试剂和阐明特定疾病状态的分子药理学。此外我们还应该注意到其在生殖生理中的作用,卵巢功能的丧失是女性不孕的主要原因,在不孕妇女中黄体化不破裂卵泡症是相对普遍的现象。PDE4D KO小鼠的表型表明PDE4D等位基因的失活可能是引起人类排卵率与生育能力下降的原因。与此同时,人们已经注意到用PDE4抑制剂处理卵巢可以引起卵母细胞成熟和排卵,与LH的作用相似^[53~55],因而可以用这些抑制剂来加强促性腺激素在卵巢中作用;相反,用PDE3抑制剂处理可以阻断卵母细胞的成熟而不影响颗粒细胞^[53~55],因而提供了

一种避孕的新策略。所以,对卵巢细胞中PDEs进一步研究将推动生殖生理继续向前发展,尤其是PDEs在卵泡发育过程中分子作用机制的研究和特异性PDEs抑制剂的合成。

致谢 由于篇幅所限,有些重要的原始研究文献未能列出,对有关作者表示抱歉,并以致谢。本工作为国家自然科学基金(批准号:30571335)和江苏省研究生培养创新工程资助项目。

参 考 文 献

- 1 Houslay M D, Schafer P, Zhang K Y. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today*, 2005, 10(22): 1503—1519[DOI]
- 2 Conti M, Richter W, Mehats C, et al. Cyclic AMP-specific PDE4 phosphodiesterases as critical components of cyclic AMP signaling. *J Biol Chem*, 2003, 278(8): 5493—5496[DOI]
- 3 Houslay M D, Milligan G. Tailoring cAMP signalling responses through isoform multiplicity. *Trends Biochem Sci*, 1997, 22: 217—224[DOI]
- 4 Buxton I L, Brunton L L. Compartments of cyclic AMP and protein kinase in mammalian cardiomyocytes. *J Biol Chem*, 1983, 258(17): 10233—10239
- 5 Beavo J A, Brunton L L. Cyclic nucleotide research—still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3: 710—718[DOI]
- 6 Evellin S, Mongillo M, Terrin A, et al. Measuring dynamic changes in cAMP using fluorescence resonance energy transfer. *Methods Mol Biol*, 2004, 284: 259—270
- 7 Houslay M D, Adams D R. PDE4 cAMP phosphodiesterases: Modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J*, 2003, 370(Pt 1): 1—18[DOI]
- 8 Henn V, Stefan E, Baillie G S, et al. Compartmentalized cAMP signalling regulates vasopressin-mediated water reabsorption by controlling aquaporin-2. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(Pt 6): 1316—1318[DOI]
- 9 Huang T, McDonough C B, Abel T. Compartmentalized PKA signaling events are required for synaptic tagging and capture during hippocampal late-phase long-term potentiation. *Eur J Cell Biol*, 2006, 85(7): 635—642[DOI]
- 10 Alto N M, Scott J D. The role of A-kinase anchoring proteins in cAMP-mediated signal transduction pathways. *Cell Biochem Biophys*, 2004, 40(3 Suppl): 201—208[DOI]
- 11 Levine C G, Mitra D, Sharma A, et al. The efficiency of protein compartmentalization into the secretory pathway. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(1): 279—291[DOI]
- 12 王正朝, 黄瑞华, 潘玲梅, 等. 环核苷酸门控离子通道的结构、功能及活性调节. *中国生物化学与分子生物学报*, 2006, 22(4): 282—288
- 13 Dousa T P. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney Int*, 1999, 55(1): 29—62[DOI]
- 14 Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Phosphodiesterases in the vascular system. *J Smooth Muscle Res*, 2003, 39(4): 67—86[DOI]
- 15 Beard M B, Olsen A E, Jones R E, et al. UCR1 and UCR2 domains unique to the cAMP-specific phosphodiesterase family form a discrete module via electrostatic interactions. *J Biol Chem*, 2000, 275: 10349—10358[DOI]

- 16 Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Therapeut*, 2006, 109: 366—398[DOI]
- 17 Torphy T J. Phosphodiesterase isozymes: Molecular targets for novel antiasthma agents. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 157(2): 351—370
- 18 Conti M, Jin S L. The molecular biology of cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1999, 63: 1—38
- 19 Conti M. Phosphodiesterases and cyclic nucleotide signaling in endocrine cells. *Mol Endocrinol*, 2000, 14(9): 1317—1327[DOI]
- 20 Mehats C, Andersen C B, Filipanti M, et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in endocrine cell signaling. *Trends Endocrinol Metab*, 2002, 13(1): 29—35[DOI]
- 21 Huston E, Houslay T M, Baillie G S, et al. cAMP phosphodiesterase-4A1 (PDE4A1) has provided the paradigm for the intracellular targeting of phosphodiesterases, a process that underpins compartmentalized cAMP signalling. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 4): 504—509[DOI]
- 22 Jin S L, Bushnik T, Lan L, et al. Subcellular localization of rolipram-sensitive, cAMP-specific phosphodiesterases. Differential targeting and activation of the splicing variants derived from the PDE4D gene. *J Biol Chem*, 1998, 273(31): 19672—19678[DOI]
- 23 Perry S J, Baillie G, Kohout T A, et al. Targeting of cyclic AMP degradation to beta 2-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science*, 2002, 298: 834—836[DOI]
- 24 Baillie G S, Houslay M D. Arrestin times for compartmentalised cAMP signalling and phosphodiesterase-4 enzymes. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(2): 129—134[DOI]
- 25 Wong W, Scott J D. AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(12): 959—970[DOI]
- 26 Bolger G B, Baillie G S, Li X, et al. Scanning peptide array analyses identify overlapping binding sites for the signalling scaffold proteins, beta-arrestin and RACK1, in cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D5. *Biochem J*, 2006, 398(1): 23—36[DOI]
- 27 Tasken K, Stokka A J. The molecular machinery for cAMP-dependent immunomodulation in T-cells. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 4): 476—479
- 28 Tasken K, Aandahl E M. Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev*, 2004, 84: 137—167[DOI]
- 29 Cooper D M. Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33(Pt 6): 1319—1322[DOI]
- 30 Houslay M D, Baillie G S. Phosphodiesterase-4 gates the ability of protein kinase A to phosphorylate G-protein receptor kinase-2 and influence its translocation. *Biochem Soc Trans*, 2006, 34(Pt 4): 474—475
- 31 Willoughby D, Wong W, Schaack J, et al. An anchored PKA and PDE4 complex regulates subplasmalemmal cAMP dynamics. *EMBO J*, 2006, 25(10): 2051—2061[DOI]
- 32 季今朝, 张雪寒, 李葆明. 大鼠海马CA1区 β 受体参与长时程增强和空间学习. *中国科学, C辑, 生命科学*, 2003, 33(4): 354—361
- 33 McConnachie G, Langeberg L K, Scott J D. AKAP signaling complexes: Getting to the heart of the matter. *Trends Mol Med*, 2006, 12(7): 317—323[DOI]
- 34 Lim J, Pahlke G, Conti M. Activation of the cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D3 by phosphorylation. Identification and function of an inhibitory domain. *J Biol Chem*, 1999, 274: 19677—19685[DOI]
- 35 Hoffmann R, Wilkinson I R, McCallum J F, et al. cAMP-specific phosphodiesterase HSPDE4D3 mutants which mimic activation and changes in rolipram inhibition triggered by protein kinase A phosphorylation of Ser-54: Generation of a molecular model. *Biochem J*, 1998, 333: 139—149
- 36 Busch C J, Liu H, Graveline A R, et al. Nitric oxide induces phosphodiesterase 4B expression in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(4): L747—L753[DOI]
- 37 田哲贤, 毛贤军, 苏玮, 等. 苜蓿根瘤菌 1021 外源cAMP上调 gln 及 $glnK-amtB$ 的表达. *科学通报*, 2006, 51(14): 1671—1674
- 38 李萍, 王宗文, 严进, 等. CNTF非经典信号传导途径的神经保护作用. *科学通报*, 2006, 51(2): 161—165
- 39 李稚婷, 孙义成, 毛贤军, 等. 碳代谢总体调控蛋白CRP对肺炎克氏杆菌 nif 启动子的抑制作用. *科学通报*, 2002, 47(15): 1133—1139
- 40 Oki N, Takahashi S I, Hidaka H, et al. Short term feedback regulation of cAMP in FRTL-5 thyroid cells. Role of PDE4D3 phosphodiesterase activation. *J Biol Chem*, 2000, 275: 10831—10837[DOI]
- 41 Jin S L, Richard F J, Kuo W P, et al. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 11998—12003[DOI]
- 42 Hansen G, Jin S, Umetsu D, et al. Absence of muscarinic cholinergic airway responses in mice deficient in the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 6751—6756[DOI]
- 43 Hoffmann R, Baillie G S, MacKenzie S J, et al. The MAP kinase ERK2 inhibits the cAMP-specific phosphodiesterase, HSPDE4D3 by phosphorylating it at Ser579. *EMBO J*, 1999, 18: 893—903[DOI]
- 44 Houslay M D, Kolch W. Cell-type specific integration of cross-talk between extracellular signal-regulated kinase and cAMP signaling. *Mol Pharmacol*, 2000, 58: 659—668
- 45 Dodge-Kafka K L, Soughayer J, Pare G C, et al. The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature*, 2005, 437: 574—578[DOI]
- 46 Park J Y, Richard F, Chun S Y, et al. Phosphodiesterase regulation is critical for the differentiation and pattern of gene expression in granulosa cells of the ovarian follicle. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(6): 1117—1130[DOI]
- 47 Shi F, Perez E, Wang T, et al. Stage and cell-specific expression of soluble guanylyl cyclase alpha and beta subunits, cGMP-Dependent protein kinase α - and β -, cyclic nucleotide-gated channel subunit-1 in the rat testis. *J Androl*, 2005, 26(2): 258—263
- 48 Shi F, Stewart R L, Pere E, et al. Cell-specific expression and regulation of soluble guanylyl cyclase alpha and beta subunit in the rat ovary. *Bio Reprod*, 2004, 70: 1552—1561[DOI]
- 49 Shi F, LaPolt P S. Relationship between FoxO1 protein levels and follicular development, atresia, and luteinization. *J Endocr*, 2003, 179: 195—203[DOI]
- 50 Li X, Jiang Y, Wang Z, et al. Regulation of FoxO1 transcription factor by nitric oxide and cyclic GMP in cultured rat granulosa cells. *Zoolog Sci*, 2005, 22: 1339—1346[DOI]
- 51 李学斌, 谢庄, 石放雄. FOXO 蛋白的修饰与细胞凋亡和癌变. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(7): 600—606
- 52 沈政, 赵兴绪, 曹宇静, 等. cGMP参与NO对小鼠胚泡黏附扩展及MMP-2分泌的调节. *科学通报*, 2004, 49(8): 769—772
- 53 Conti M, Andersen C B, Richard F, et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol*, 2002, 187(1-2): 153—159[DOI]
- 54 Paruthiyil S, Majdoubi M E, Conti M, et al. Phosphodiesterase expression targeted to gonadotropin-releasing hormone neurons inhibits luteinizing hormone pulses in transgenic rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(26): 17191—17196[DOI]
- 55 Sadler S E. Type phosphodiesterase plays a necessary role in the growth-promoting actions of insulin, insulin-like growth factor-I, and Ha p21ras in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Endocrinol*, 1991, 5: 1939—1946

(2006-08-16 收稿, 2006-10-12 接受)