

理阿诺碱受体 1 与骨骼肌病

吴士文, 马维娅

[关键词] 理阿诺碱受体 1 (RyR1); 骨骼肌病; 基因突变; 综述

中图分类号: R746.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2006)03-0230-02

[本文著录格式] 吴士文, 马维娅. 理阿诺碱受体 1 与骨骼肌病[J]. 中国康复理论与实践, 2006, 12(3): 230-231.

理阿诺碱受体 1 (Ryanodine receptors 1, RyR1) 作为一种钙离子通道蛋白, 在肌细胞终末池钙离子释放, 促发肌细胞收缩中起着关键性的作用。突变的 RyR1 可产生多种疾病, 如恶性高热 (malignant hyperthermia, MH)、中央轴空肌病 (central core disease, CCD)、多微小轴空病 (multiminicore disease, MmD) 及轴空/杆状体病 (core/rod disease, CRD)。随着细胞生物学、分子生物学等技术的进步, 对 RyR1 的结构、功能及其突变致病机制的认识上有了许多新的进展。

1 RyR1 通道的结构与生理功能

RyR1 通道为一种同型四聚体 (homotetramer) 蛋白, 主要分布于骨骼肌细胞。RyR1 分子包含有 2 个功能区域: N 端的胞浆区域, 由大约 4000 个氨基酸组成; C 端的胞浆网膜上区域, 由大约 1000 个氨基酸组成。C 端部分又可以分为 4 个小的跨膜区域 (称为 M1、M2、M3、M4)^[1], 或分为 12 个小的跨膜区域^[2]。N 端的胞浆部分起着调节通道活性的作用, 而 C 端的跨膜区域直接形成通道。从突变分析的实验来看, 连接 M3 与 M4 之间节段是形成通道孔的关键部位, 特别是保守序列 GXRXGGGXGD 代表着通道电生理特征^[3]。

RyR1 通道通过兴奋收缩耦联的机制开放, 主要过程包括: 细胞的兴奋通过 T 管传向肌细胞深处, 电信号传递给位于胞浆网膜上的 L 型二氢吡啶受体通道 (dihydropyridine-sensitive L-type Ca^{2+} channels, DHPRs), 并引起了 DHPRs 构型上的改变; 而这种 DHPRs 的构型上的改变则通过生理机制又传递给了 RyR1, 引起 RyR1 的形态构象上的改变, 从而开放通道, 使大量的钙离子释放, 触发肌细胞收缩; 此后, 分别通过位于胞浆及胞膜上的胞浆网钙 ATP 酶泵、胞浆膜 ATP 酶泵、钠钙交换及线粒体的钙摄入等机制, 分别将胞浆内的钙泵回胞浆网、细胞外及线粒体内, 使胞浆内钙离子浓度恢复正常, 而胞浆网内钙离子达到高浓度, 为下次钙离子释放, 肌细胞收缩作好了准备。

在这一生理过程中, RyR1 与 DHPR 间的作用是双向的: DHPR 触发 RyR1 释放钙离子被称为正向调节, 而 RyR1 同样促进 DHPR 的开放的能力被称为反向调节。在 DHPR 的结构上有多个 RyR1 结合区域, 有的为蛋白结构连接区, 有的为功能上的耦联区。DHPR $\alpha 1$ 亚单位 (DHPR1 α) 在分子结构上分为 4 个结构相似的小的区域, 连接区域 II 与 III、III 与 IV 之间的环, 在肌细胞兴奋收缩耦联的生理过程中, 是信息从 DHPR 传递给 RyR1 的关键。细胞物理学实验表明, 影响这两个部位的突变, 可产生肌细胞兴奋收缩失耦联。已发现致 MH 的 DHPR1 α 的编码基因的突变 R1086H、R1086C 位于 III 与 IV 区域之间的部

位^[4]。Vainzof 等曾检查了 5 例 CCD 患者, 没有发现在 MH 中发现的 DHPR1 α 编码基因的 c3333A>G 突变^[5]。

2 FK506 结合蛋白对 RyR1 的调节

FK506 结合蛋白 (FK506 binding protein; FKBP12) 是另外一个重要的 RyR1 调节蛋白。FKBP 家族中包含超过 20 种蛋白, 分别按其分子的大小来命名, 如 FKBP12、FKBP12.5、FKBP23、FKBP25 等, 其中 FKBP12 特异性地与 RyR1 结合, 而 FKBP12.5 则与 RyR2 结合^[6,8]。1 个 FKBP12 分子与 1 个 RyR1 亚单位相结合, 促进 RyR1 亚单位间的相互作用, 稳定 RyR1 通道的结构^[6]。最近的 FKBP12、FKBP12.5 基因敲除鼠实验阐明了这些蛋白的作用, FKBP12 缺失鼠发展为心脏疾病, 表现为扩张性心肌病, 但是骨骼肌无异常发现^[7]; 而 FKBP12.5 缺失鼠, 则表现为 RyR2 通道的缺陷, 通道开放的时间延长, 钙离子释放增多。细胞生物学研究发现, FKBP12 的突变同样可以影响细胞兴奋收缩耦联, 产生类似于 RyR1 突变所致的兴奋收缩失耦联的改变, 包括减少最大的电压门控的钙离子释放, 虽没有静息状态下钙离子浓度的增高, 但是也表现出咖啡因明显增强通道对钙离子的释放功能^[8]。因此有人怀疑 FKBP12 同样可能是 CCD 的致病基因, 然而 Wu 最近在对一组 27 例 CCD 患者的研究中, 未能发现 FKBP12 编码基因的突变^[9]。

此外, RyR1 的磷酸化调节亦受到越来越多的重视。蛋白酶、磷酸化酶可以使许多胞浆网蛋白 (包括 RyR 蛋白) 磷酸化或去磷酸化。RyR1 含有多个潜在的蛋白酶 C、蛋白酶 A、蛋白酶 G 以及钙调蛋白依赖性蛋白酶 II 的磷酸化位点^[10,12]。RyR1 及 RyR2 的磷酸化, 可直接导致 FKBP12、FKBP12.5 从已结合 RyRs 上分离, 从而活化了通道的通透性^[13]。胞浆网蛋白的磷酸化或去磷酸化, 直接影响其对 RyRs 的调节功能, 从而间接引起通道通透功能。

3 RyR1 基因突变产生骨骼肌病的概况

自从 1993 年 Zhang^[14] 报道 RyR1 为 CCD 的致病基因后, 到目前为止, 已有 44 种 RyR1 突变报道与 CCD 相关^[3], 包括 39 个错义突变和 5 个缺失突变, 大多为常染色体显性遗传或散发病例, 仅有 4 个家系经基因证实的常染色体隐性遗传。MH 及 CCD 的 RyR1 突变主要丛集于 RyR1 蛋白的 3 个特定“MH/CCD 热点区域” (hot spots): N 端区域 (氨基酸残基 1~614)、中央区域 (氨基酸残基 2162~2458) 和 C 端区域 (氨基酸残基 4136~4973)。C 端区域是 RyR1 蛋白的跨膜及通道小孔形成区域, 此部位的突变将直接影响通道的通透性和选择性, 大多 CCD 的突变集中在这个区域。由于 RyR1 基因的特殊长度以及其复杂性, 很难完成全长 RyR1 基因编码序列筛查。在过去对 CCD 的研究中, 大多只对热点区或只对 C 端的热点进行突变筛查分析, 仅发现 47%~67% 的 CCD 患者伴有 RyR1 突变^[15-17]。在最新的一组对 27 例 CCD 患者全长 RyR1 基因突变

筛查发现,90%以上的 CCD 均由 RyR1 基因突变所致,所以有人提出对于 CCD,可能与 MH 一样,除 RyR1 基因外,亦可能存在其他的致病基因。以上这份研究同样也表明,如局限于 3 个热点区域进行 RyR1 基因突变筛查,将有许多突变被遗漏^[9]。

RyR1 同样也是 MmD 的致病基因,至今仅有数例报道,极为少见^[18-19]。但 Ferreira 报道 1 个 CCD 家系的 3 例患者,在早期肌肉病理上表现为多微小轴空改变,在成年时第 2 次肌肉活检时显示为典型的中央轴空结构^[20]。这种重叠的临床及病理改变,共同的致病基因,给 CCD 与 MmD 的鉴别诊断带来了新的困难。

CRD 指的是在轴空病的肌肉病理中,10%以上的肌纤维中同时出现杆状体。近来,不同的 RyR1 基因突变已在不相关的 CRD 的家系中被确定^[21-22],这表明杆状体可能只是某些 CCD 的继发性病理改变。有趣的是,轴空结构同样是 ACTA1 基因突变所致杆状体肌病的继发病理改变,但在这些病例中,轴空结构主要分布于 2 型肌纤维,这一点与 CCD 及 CRD 明显不同。

4 RyR1 基因突变产生骨骼肌病的机制

RyR1 基因突变产生 CCD 的机制,目前主要有两种假说,渗漏通道学说和兴奋收缩失耦联学说。Zhang 等最早于 1993 年提出渗漏通道学说:RyR1 突变致通道的通透性增强,导致即使在非收缩状态下,胞浆网仍有大量钙离子渗漏,而这种渗漏已超过了胞浆钙 ATP 酶把钙离子泵回胞浆网的代偿能力,最终产生静息状态下胞浆内钙离子浓度增高,而肌浆网内钙离子缺乏,在肌细胞兴奋时不能释放出的足量的钙离子,产生肌无力^[14]。同年,Quane 等提出了兴奋收缩失耦联学说:RyR1 突变直接影响离子通道孔的开放功能,在肌细胞兴奋时,通道孔不能正常开放释放钙离子,不能产生正常的肌肉收缩;但此时胞浆网内的钙离子浓度无变化,RyR1 自身对于 DHPR 激活的敏感性亦无改变^[23]。这两种假说也是相互联系的,不能绝对分开。最近的一份研究表明,在兴奋收缩失耦联学说的代表突变 I4898T 研究中发现,其静息状态下的胞浆钙离子的浓度亦显著增高,虽然胞浆网内的钙离子浓度没有减少,说明也可能存在渗漏,只是可能渗漏程度较轻,胞浆钙 ATP 酶可以代偿^[24]。渗漏通道的突变多位于热点区域的 N 端和中央区域(如: Tyr523Ser、Arg2163His、Arg2435Leu),而兴奋收缩失耦联的突变多位于热点的 C 端(如: Gly4890Arg、Arg4892Trp、Ile4897Thr、Gly4898Glu、Gly4898Arg、Ala4905Val、Arg4913Gly)。然而 C 端的 Ile4795Cys 突变产生的却是渗漏通道。

5 结论

近 10 年来,随着分子生物学技术的发展和运用,对于 RyR1 突变与 CCD 的关系已经有了许多的认识。大多 CCD 的突变丛集于 RyR1 蛋白的 C 端,并提出了两种假说来解释突变产生 CCD 的机制。但是由于 RyR1 分子的长度及结构的特殊性,仍在着许多有待于解决的问题,如:是否 RyR1 为 CCD 的唯一致病基因? RyR1 突变与轴空形成的关系? 为何部份突变可形成 MmD 或 CRD 而不是单纯的 CCD? 相同的突变为何可产生不同的临床及病理的表现型? 这可能将是下一步 RyR1 研究的方向和热点。

[参考文献]

- [1] Takeshima H, Nishimura S, Matsumoto T, et al. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor[J]. Nature, 1989, 339: 439 - 445.
- [2] Zorzato F, Fujii J, Otsu K, et al. Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca^{2+} release channel (ryanodine

receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 1990, 265: 2244 - 2256.

- [3] Zhao M, Li P, Li X, et al. Molecular identification of the ryanodine receptor pore-forming segment[J]. Biol Chem, 1999, 274: 25971 - 25974.
- [4] Monnier N, Procaccio V, Stieglitz P, et al. Malignant hyperthermia susceptibility is associated with a mutation of the α -subunit of the human dihydropyridine-sensitive L-type voltage-dependent calcium-channel receptor in skeletal muscle[J]. Am J Hum Genet, 1997, 60: 1316 - 1325.
- [5] Vainzof M, Muniz VP, Tsanaclis AM, et al. Does the A3333G mutation in the CACNL1A3 gene, detected in malignant hyperthermia, also occur in central core disease[J]? Genet Test, 2000, 4: 383 - 386.
- [6] Timmerman AP, Jayaraman T, Wiederrecht G, et al. The ryanodine receptor from canine heart sarcoplasmic reticulum is associated with a novel FK-506 binding protein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994, 198: 701 - 706.
- [7] Brillantes AB, Ondrias K, Scott A, et al. Stabilization of calcium release channel (ryanodine receptor) function by FK506-binding protein[J]. Cell, 1994, 77: 513 - 523.
- [8] Avila G, Lee E, Perez CF, et al. FKBP12 binding to RyR1 modulates excitation-contraction coupling in mouse skeletal myotubes[J]. Biol Chem, 2003, 278: 22600 - 22608.
- [9] Wu S, Carlos AIM, Christine M, et al. Central core disease is due to RyR1 mutations in more than 90% of patients[J]. Brain, 2006, in press.
- [10] Fill M, Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels[J]. Physiol Rev, 2002, 82: 894 - 922.
- [11] Rossi D, Sorrentino V. Molecular genetics of ryanodine receptors Ca^{2+} -release channels[J]. Cell Calcium, 2002, 32: 307 - 319.
- [12] Wehrens XH T, Marks AR. Altered function and regulation of cardiac ryanodine receptors in cardiac disease[J]. Tibs, 2003, 28: 671 - 678.
- [13] Marks AR, Marx SO, Reiken S. Regulation of ryanodine receptors via macromolecular complexes: a novel role for leucine/isoleucine zippers[J]. Trends Cardiovasc Med, 2002, 12: 166 - 170.
- [14] Zhang Y, Chen HS, Khanna VK, et al. A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central core disease[J]. Nat Genet, 1993, 5: 46 - 50.
- [15] Monnier N, Romero NB, Lerale J, et al. Familial and sporadic forms of central core disease are associated with mutations in the C-terminal domain of the skeletal muscle ryanodine receptor[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10: 2581 - 2592.
- [16] Davis MR, Haan E, Jungbluth H, et al. Principal mutation hotspot for central core disease and related myopathies in the C-terminal transmembrane region of the RyR1 gene[J]. Neuromuscul Disord, 2003, 13: 151 - 157.
- [17] Shepherd S, Ellis F, Halsall J, et al. RyR1 mutations in UK central core disease patients: more than just the C-terminal transmembrane region of the RyR1 gene[J]. J Med Genet, 2004, 41: e33.
- [18] Scacheri PC, Hoffman EP, Fratkin JD, et al. A novel ryanodine receptor gene mutation causing both cores and rods in congenital myopathy[J]. Neurology, 2000, 55: 1689 - 1696.
- [19] Wu S, Ibarra MCA, Murayama K, et al. Screening the entire ryanodine receptor 1 gene in 28 Japanese central core disease patients and 12 multiminicore disease patients: almost all central core disease patients are due to ryanodine receptor 1 gene mutation[J]. Neuromuscular Disorders, 2005, 15: 679.
- [20] Ferreira A, Monnier N, Romero NB, et al. A recessive form of central core disease, transiently presenting as multiminicore disease, is associated with a homozygous mutation in the ryanodine receptor type 1 gene[J]. Ann Neurol, 2002, 51: 750 - 759.
- [21] Scacheri PC, Hoffman EP, Fratkin JD, et al. A novel ryanodine receptor gene mutation causing both cores and rods in congenital myopathy[J]. Neurology, 2000, 55: 1689 - 1696.
- [22] Gommans IM, Davis M, Saar K, et al. A locus on chromosome 15q for a dominantly inherited nemaline myopathy with core-like lesions[J]. Brain, 2003, 26: 1545 - 1551.
- [23] Quane KA, Healy JM, Keating KE, et al. Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia[J]. Nat Genet, 1993, 5: 51 - 55.
- [24] Brini M, Manni S, Pierobon N, et al. Ca^{2+} signaling in HEK-293 and skeletal muscle cells expressing recombinant ryanodine receptors harboring malignant hyperthermia and central core disease mutations[J]. J Biol Chem, 2005, 280: 15380 - 15389.

(收稿日期:2006-01-23)