

阿诺碱受体及其亚型 2 调控因子研究进展 *

李玉明¹⁾ 姬广聚^{2)**}

¹⁾首都医科大学燕京医学院生理学与病理生理学教研室, 北京 101300;

²⁾中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室, 北京 100101

摘要 阿诺碱受体(RyR)是心肌细胞等可兴奋细胞中重要的 Ca^{2+} 释放受体, 在维持细胞的兴奋性和生理功能方面起重要作用. 研究发现, RyR 存在 3 个亚型, 每个亚型都是由 4 个单体组成的四聚体, 后者构成 Ca^{2+} 释放通道. RyR 的结构中有调控因子的结合位点, 一些内源性调控因子可影响 RyR 的构型和 Ca^{2+} 释放. 结合作者的研究, 就 RyR 的结构功能、RyR2 的一些重要内源性调控因子及其调控机制做一简要综述.

关键词 阿诺碱受体, 环腺苷二磷酸核糖, FK506 结合蛋白, 烟碱腺嘌呤二核苷酸, 钙释放

学科分类号 Q6, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00518

阿诺碱受体(ryanodine receptors, RyR)是可兴奋细胞如心肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞和神经细胞以及非兴奋细胞如胰岛细胞中重要的 Ca^{2+} 释放受体, 在维持细胞的兴奋性和生理功能方面起重要作用^[1]. 迄今, RyR 已被发现存在 3 个亚型, 即 RyR1、RyR2 和 RyR3. 每种 RyR 亚型都有 4 个单体组成, 这 4 个单体组成的四聚体构成一个 Ca^{2+} 释放通道^[2]. 环腺苷二磷酸核糖(cyclic adenosine diphosphate ribose, cADPR)和免疫抑制药物 FK506 结合蛋白(可以和免疫抑制药物 FK506 结合的一组蛋白质, FK 506 binding proteins, FKBP)分别为 RyR 的内源性正、负调控因子^[3]. cADPR 是由环腺苷二磷酸核糖环化酶(ADPR 环化酶, adenosine diphosphate ribosyl cyclase, ADPRcyclase)催化烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)分解过程中合成的一种细胞内信号分子. cADPR 广泛存在于各种生物系统中, 通过改变 RyR 构型调节钙动员活性, 促进 Ca^{2+} 释放, 而 FKBP 与 RyR 结合则对 RyR 通道有着稳定作用, cADPR 与 FKBP 构成 RyR Ca^{2+} 释放功能的重要调控机制^[3]. 大量研究结果表明, FKBP12.6(是通过和 RyR2 免疫共沉淀的方法鉴定出来的一种分子质量为 12.6 ku 的蛋白质)在调节可兴奋细胞和非兴奋细胞 RyR Ca^{2+} 释放中起重要的负性调控作用^[1-3].

1 RyR 的分类及特点

RyR 是存在于内质网上的一种钙离子释放通道, 由于它可以和阿诺碱(ryanodine, 一种植物碱)发生特异性结合, 而且亲和力很高, 故得名. 在人类, RyR 为一个基因家族, 目前认为主要包括 3 个亚型, 即 RyR1、RyR2 和 RyR3. RyR1 主要存在于骨骼肌, 其次也在非肌肉组织如中央神经系统等中表达. RyR2 主要在心肌和平滑肌细胞中表达, 但也存在于中央神经系统等非肌肉组织^[4-5]. 在心肌细胞, RyR2 主要存在于肌质网上, 且大多数分布于肌质网的膜区, 该膜区与心肌细胞膜上的 T 管内陷部分靠近, 有利于其上的 L 型电压依赖性 Ca^{2+} 通道行使其功能^[6]. RyR2 的细胞质结构域含有一段高度保守的亮氨酸 / 异亮氨酸拉链结构(leucine/ isoleucine zippers, LIZ), 为一个含有 7 个亮氨酸 / 异亮氨酸残基的 α 螺旋重复结构, 作为调

* 北京市教育委员会科技计划(KM201010025014), 首都医科大学科技计划(108010)和北京市属高等学校人才强教深化计划(中青年骨干人才)(PHR201008409)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64846720, E-mail: gj28@ibp.ac.cn

收稿日期: 2010-10-08, 接受日期: 2011-01-28

节位点对通道蛋白功能的正常发挥起重要作用^[6]. 此外, 在 RyR2 的结构中, 每个 RyR2 单体还结合一个调节蛋白 FKBP12.6(调节 RyR1 的为 FKBP 12). FKBP12.6 又称为 calstabin 2, 是通过和 RyR2 免疫共沉淀的方法鉴定出来的一种分子质量为 12.6 ku 的蛋白质, 由于它可以和免疫抑制药物 FK506 结合, 故命名为 FK506 结合蛋白, FKBP12.6 对于 RyR2 具有重要的调节作用, 通过和 RyR2 结合调节 Ca^{2+} 释放通道的开放^[5]. 遗传学的证据表明, RyR2 通道蛋白在膀胱肌细胞肌浆网 Ca^{2+} 释放中起主导作用, 这和在心肌细胞上钙诱导的钙释放 (calcium-induced calcium release, CICR) 过程相似^[4]. 在平滑肌细胞, CICR 起始于一系列不连续的部位, 以依赖于 Ca^{2+} 向胞浆流动的变化延迟形式产生释放反应, 是一种逐级的非强制性过程, 这一过程要求足够的 Ca^{2+} 内流来激活 Ca^{2+} 释放, 这与心肌细胞上 CICR 呈高度放大的和空间排列的过程不同^[7]. 平滑肌细胞肌膜与肌浆网 Ca^{2+} 通道活性之间存在“环路耦联”, 即 RyR2 门控与升高细胞浆 Ca^{2+} 的通道活性相耦联^[8], 这与心肌的 RyR2 通道感受 L-型 Ca^{2+} 通道区域的 Ca^{2+} 浓度不同. RyR2 通过产生自发 Ca^{2+} 火花, CICR 和肌肉拉伸诱导的钙释放(SICR)参与平滑肌细胞的 Ca^{2+} 动员, 这与心肌细胞上 RyR2 主要通过 CICR 起的作用不同^[8-9]. RyR3 主要存在于一些特定的肌肉以及大脑等非肌肉组织. 研究发现, 在血管平滑肌细胞 Ca^{2+} 释放与 RyR3 无关, 但 RyR1 和 RyR2 是必需的. 然而, 最近在 RyR3 缺乏的小鼠脑细胞上的 Ca^{2+} 火花和自发瞬间外向电流 (spontaneous transient outward currents, STOC) 的研究, 显示一种 Ca^{2+} 火花频率升高和肌源性节奏降低^[10]. Ji 等^[4]报道了 FKBP12.6 敲除小鼠肌细胞自发 Ca^{2+} 火花和内向电流出现明显变化, 而 RyR3 缺乏的小鼠在 Ca^{2+} 火花的幅度、动力学和频率方面没有出现可观察的变化, 提示 RyR3 对于钙波传播并不重要, RyR2 在平滑肌 Ca^{2+} 释放中起中心作用.

由于不同亚型的 RyR 表达具有组织特异性, 因此它们在功能上与其存在相应组织的生理功能一致^[6]. 不同亚型 RyR 基因家族之间在氨基酸序列上有 65% 的同源性. 每个 RyR 通道蛋白都由 4 个 RyR 单体构成, 每一个单体的分子质量在 560 ku 左右, 这 4 个 RyR 单体形成了一个对称的同源四聚体结构, 其中部形成钙离子通道, 一个完整的通道蛋白分子质量大于 2 300 ku. RyR 的细胞质域非

常大, 它上面含有多种通道调节因子, 如胞内 Ca^{2+} 、ATP、 Mg^{2+} 、特异性抗体、钆红、cADPR、免疫抑制药物 FK 506 和 rapamycin 等的结合位点, 通过和这些调节因子的结合与解离调控通道的开闭^[4, 6].

2 RyR2 的调节方式

RyR2 的细胞质域(大约占总长度的 10%)是调节蛋白与之结合的骨架, 能够与该片段结合的调节物质包括一个蛋白激酶 A(PKA), 两个蛋白磷酸酶 (PP1 和 PP2A) 以及一个锚定蛋白(mAKAP), 此外还有 sorcin、钙调素(CaM)以及其他一些调节蛋白. 在心肌细胞, 钙由细胞内钙池向细胞浆释放由 RyR2 控制. 心肌 RyR2 的激活和失活除受 CaM、PKA, 以及 Ca^{2+} /CaM 依赖激酶 (Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase, CaMK) 调节外, 还受 FKBP12、FKBP12.6 等调节蛋白的调控^[11, 11]. 体内 FKBP 有多种, 通常根据分子质量大小的不同来分类, 常见的有 FKBP12、FKBP12.6、FKBP13、FKBP25、FKBP52、FKBP65 等. FKBP 是一类高度同源的受体类结合蛋白, 广泛存在于从原核生物到真核生物的各种细胞中, 表达量丰富. 它们的共同特征是, 所有的 FKBP 家族成员都具有肽基-脯氨酰基-顺反异构酶(peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, PPIase)活性, 均可催化多肽或蛋白质底物中脯氨酸残基 N 端肽键由顺式转为反式, FKBP 的这种酶活性可以被 FK506 或雷帕霉素抑制, 因此, 它们的功能与大环内酯类免疫抑制剂联系密切^[11-12]. 不同 FKBP 的 PPIase 活性不同, 并具有特定的底物选择性. 不同种属不同细胞内同一种 FKBP 成员的基因序列同源性较高, 不同分子质量的 FKBP 家族成员之间的同源性也很显著. 不同种属来源的 FKBP 的等电点不同, 低等生物中的 FKBP 大多为酸性, 而高等生物尤其是哺乳动物中的 FKBP 大多呈碱性, 提示 FKBP 在高等哺乳动物和低等生物中可能具有不同的作用. FKBP25 的 C 端氨基酸序列与 FKBP12 有 43% 同源性, 以核内分布为主, 能够与 DNA 结合, 还可通过酪蛋白激酶 (casein kinase) 使某些与细胞生长有关的蛋白质磷酸化, 调控细胞生长发育^[12]. 在 FKBP 的家族成员中, FKBP12 和 FKBP12.6 在哺乳动物的心室肌细胞中表达, 但表达的量 and 作用不同^[12-13]. 尽管 FKBP12 的细胞浆浓度比 FKBP12.6 高近 10 倍, 但其与 RyR2 的亲合力却比 FKBP12.6 低得多, 如在犬科类动物的心脏中

FKBP12 与 RyR2 的亲和力比 FKBP12.6 低 500 倍，因此在这些动物的心脏生理情况下以 FKBP12.6 对 RyR2 的作用为主。但在家兔和人的心肌细胞，FKBP12 与 RyR2 的亲和力比 FKBP12.6 仅低 7 倍，FKBP12 可能同样具有调控 RyR2 的作用。FKBP12 缺乏的小鼠表现出 RyR2 功能障碍，可能因 RyR2 缺乏 FKBP12 的结合直接所致，或继发了 RyR2 发育的异常。FKBP12.6 缺乏的小鼠不表现发育方面的缺陷，支持 FKBP12 是正常心脏发育所必需的观点^[12-13]。Seidler 等^[13]利用腺病毒介导的 FKBP12 基因导入使家兔心室肌细胞过表达 FKBP12，观察到 RyR2 对 Ca²⁺ 的敏感性降低，而且这一效果与 FKBP12.6 过表达的结果明显不同，提示 FKBP12-RyR2 相互作用也参与调控兴奋-收缩耦联。许多内、外因素可影响 RyR2 的活性，如 Ca²⁺、钙调素、巯基的氧化/还原状态、亚硝基化和蛋白质的磷酸化，其中 PKA 介导的通道蛋白磷酸化是主要的修饰方式^[11]。RyR2 的磷酸化主要由蛋白激酶和磷酸酶催化完成，磷酸化程度决定 RyR2 的功能状态。适当的磷酸化是 RyR2 活性调节所必需的，而过度的磷酸化则影响通道的功能。在 CaM 存在下，Ca²⁺ 激活 PKA，后者将 RyR2 磷酸化，磷酸化的 RyR2 与调节蛋白 FKBP12.6 解离，Ca²⁺ 通道开放；RyR2 的磷酸又可被磷酸酶水解下来，使 FKBP12.6 重新与 RyR2 结合，通道关闭(图 1)。然而，近年来 RyR2 磷酸化影响 FKBP12.6 与 RyR2 结合调控 RyR2 活性的观点，受到新的实验证据的挑战，如小鼠心肌细胞中 PKA 介导的 Ca²⁺ 火花频率的升高是由于受磷蛋白(phospholymban, PLB)的磷酸化而不是 RyR2 的磷酸化所介导，心肌微粒体膜在 PKA 处理后未观察到 FKBP12.6 和 RyR2 的分

离^[3]。Stange 等^[14]用天冬氨酸或丙氨酸定向替代 RyR2 中的 Ser-2809，结果表明，FKBP12.6 的结合既不消除也不明显改变突变 RyR2 通道的功能特性。Xiao 等^[15]发现，FKBP12.6 可以与磷酸化的和非磷酸化的 RyR2 上 Ser-2809 相结合，而且 S2809D 位置的模拟磷酸突变仍然使 RyR2 保持与 FKBP12.6 结合的能力。此外，外源性 PKA 对 Ser-2809 位点的完全磷酸化不能破坏 FKBP12.6-RyR2 复合物。对 Ser 2030 和 Ser 2809 的 PKA 位点三维定位研究表明，PKA 位点并非位于 FKBP12.6-RyR2 结合位点附近。因此，在心肌细胞 PKA 磷酸化引起 FKBP12.6 从 RyR2 复合物解离的理论仍存争议。

最近的研究表明，敲除 FKBP12.6 基因后，PKA 磷酸化仍可促进 RyR2 Ca²⁺ 释放，进一步提示 PKA-FKBP12.6 通路不是唯一的，RyR 除了受 PKA 磷酸化的调控外，还受内源性 cADPR 的调节，后者可以促进 RyR Ca²⁺ 释放^[3, 16]。Zhang 等^[3]用 FKBP12.6 基因敲除的小鼠直接检测 FKBP12.6 与 RyR2 复合物分离介导钙火花的程度，结果显示，在 FKBP12.6 基因敲除的心肌细胞，β-肾上腺素受体激活升高了钙火花的频率，并明显改变了钙火花的动力，表明，RyR2 Ca²⁺ 释放并非通过 PKA 磷酸化 RyR2 使 FKBP12.6 与 RyR2 复合物分离而引起，其机制与 cADPR 的作用有关。进一步的研究表明，由异丙肾上腺素诱导的钙火花特性可以被 PLB 抗体所阻断，表明 PKA 磷酸化引起钙释放的调节是由影响 PLB 和肌浆网 Ca²⁺ 泵的功能引起的^[3]。此外，RyR2 也存在结构上的自我调控。研究表明，RyR2 的跨膜区和细胞质结构域 3 722~4 610 间的氨基酸存在相互作用，对胞内 Ca²⁺ 循环和调节 RyR2 对激活剂的敏感性具有重要作用^[5, 7]。

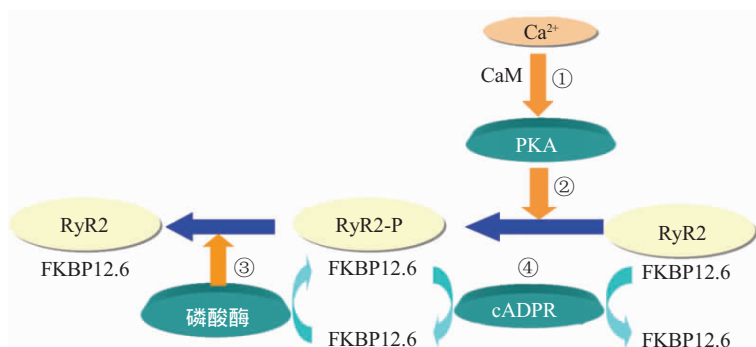


Fig. 1 The regulation of RyR2 by some channel modulators

图 1 RyR2 的调节方式

①被钙离子饱和的钙调素激活 PKA；②活化的 PKA 使 RyR2 磷酸化并与 FKBP12.6 分离，通道开放；③磷酸酶使磷酸化的 RyR2 脱磷酸，重新结合 FKBP12.6，通道关闭；④cADPR 使 RyR2 或磷酸化的 RyR2 与 FKBP12.6 分离，通道开放。

3 FKBP 及其对 RyR2 的调节

3.1 FK506 与 FKBP 结合蛋白

FK506 是广泛用于临床器官移植后防止免疫排斥反应的一种高效免疫抑制剂。在 FK506 的最初临床研究阶段, 研究者就提出在体内可能存在这一免疫抑制剂的受体, 即存在一种能够与 FK506 特异结合的亲免疫蛋白。这一推断导致了体内一种新的亲免疫蛋白——FK506 结合蛋白(FKBP)的发现。核磁共振和分子动力学的研究表明, FKBP 含有一个内凹的由 5 个链型 β 折叠组成的空穴结构, 其上被 α 螺旋片段所覆盖, FK506 即结合于此部位^[12]。研究发现, FKBP 在体内通过其 PPIases 活性帮助蛋白质重新折叠改变蛋白质的立体结构, 调节蛋白质的跨膜运输功能^[12]。当 FK506 与 FKBP 结合后, 其特有的立体化学结构就会抑制 FKBP 的 PPIases 活性, 进而发挥其免疫抑制效应。FKBP 最早从人类 T 细胞中被分离克隆, FK506-FKBP 复合体在体内能有效地抑制钙 / 钙调蛋白依赖的蛋白磷酸酶 calcineurin, 进而阻止 T 细胞激活所需的 IL-2 的基因转录过程^[12]。除了作为一种亲免疫蛋白参与机体免疫系统调控外, FKBP 广泛表达于其他多种组织细胞, 对钙释放通道的功能调控具有重要作用。

3.2 FKBP 对钙释放通道的调控

研究表明, 亲免疫蛋白 FKBP 与 RyR 钙释放通道在体内以紧密的复合体形式存在, 提示 FKBP 可能通过某种机制参与对钙释放通道的功能调控^[12, 17]。FKBP12 是在兔骨骼肌上发现一种分子质量为 12 ku 的 FKBP, 它与 RyR1 在体内以紧密相连的复合体形式存在, 且这种复合体仅存在于肌浆网系终池处^[12]。FKBP12 与钙释放通道在数量上有着 4:1 的对应关系, 即组成钙释放通道四聚体的每个 RyR1 单体各结合一个 FKBP12。在亚细胞结构水平, FKBP12 与 RyR1 的胞浆部结合, FKBP12 所在的位置与围成通道中心的 4 个单体跨膜区段相距约 10 nm^[12, 18]。对于不同亚型的 RyR, 存在着不同类型的 FKBP 与之特异结合。如在心肌细胞中发现的分子质量为 12.6 ku 的 FKBP(FKBP12.6), 它特异性地与 RyR2 结合, 共同存在于心肌肌浆网系^[12, 17-18]。由于 IP₃R 与 RyR 在结构和功能上非常相似, 在体内 IP₃R 也与 FKBP 形成紧密相连的复合体, 参与对 IP₃R 的功能调控^[1, 12]。

FKBP 对钙释放通道的调控主要通过以下三个方面完成。a. FKBP 与 RyR 结合使后者构型趋于

稳定。FKBP 的这一作用直接关系到钙释放通道所处的状态, 研究发现, FKBP 缺失的兔骨骼肌肌浆网系与对照组相比, RyR 钙释放通道的开放几率增大、平均开放时间延长^[12, 19]。源于缺失 FKBP 大鼠小脑神经元细胞的 IP₃R 也表现出类似的特性^[19-20]。这提示, 在体内 FKBP 可能对钙释放通道的关闭状态起着蛋白质构象上的稳定作用。Timerman 等^[19]发现, 缺失 FKBP 的骨骼肌肌浆网系终末池存在钙渗漏现象, 重新摄取钙的速率亦明显降低。如果将 FKBP 重新组合到缺失 FKBP 的肌浆网系终末池内, 其摄钙速率则明显恢复, 说明缺失 FKBP 的钙释放通道具有钙通透性, 进一步证实 FKBP 对关闭状态的钙释放通道具有稳定作用^[19]。在缺失 FKBP12 的海胆卵母细胞中, RyR1 表现出多个亚电导特性; 当引入 FKBP12 后, 处于亚电导状态的通道数量迅速减少^[20]。提示, FKBP 能够增强通道蛋白 4 个亚基的协同效应, 限制钙释放通道的部分开放, 使之稳定于关闭或完全开放状态^[20-21]。丧失 FKBP12.6 对 RyR2 通道的稳定性作用后, FKBP12.6 缺乏小鼠心肌细胞钙释放的阈值降低, 上升时间缩短和传播速度提高。这与 Ji 等^[4]在 FKBP12.6 缺乏小鼠膀胱肌细胞观察到的自发性 Ca²⁺ 火花频率的升高相一致。FKBP12.6 缺乏小鼠膀胱肌细胞 Ca²⁺ 释放之间的延迟明显缩短, 表明 FKBP12.6 和 RyR2 结合降低了后者对细胞浆 Ca²⁺ 浓度升高门控的敏感性。Ji 等^[5]的研究显示, FKBP12.6 在膀胱平滑肌 RyR2 介导的 Ca²⁺ 释放中起重要作用。FKBP12.6 与 RyR2, 而不是 RyR1 或 RyR3 之间存在特异性的关系^[12, 21]。而且, FKBP12.6 敲除对平滑肌细胞 Ca²⁺ 火花特性的影响和对心肌细胞的影响相一致^[22]。b. FKBP 对钙释放通道具有整流作用。双层脂膜单通道记录的实验研究表明, RyR1-FKBP 结合状态下的通道电流表现为由肌浆网腔向胞浆的单向传导特性, 反向电流迅速消失^[23]。FKBP 对 RyR1 的整流作用还与细胞膜电位的变化有关。研究表明, FKBP 可能通过改变构成钙释放通道各亚基的构象实现对通道的整流调控, 这种整流调控作用能有效避免骨骼肌肌浆网系快速释放钙过程中出现的反向电流^[24-25]。尽管 FKBP 对 RyR 和 IP₃R 均具有整流作用, 但由于 RyR 和 IP₃R 在通道特性上存在较大差异, FKBP 对两类钙释放通道可能存在不同的整流调控机制。c. FKBP 可通过调控 calcineurin 对钙释放通道的去磷酸化作用实现对 RyR 的调节。Calcineurin 是广泛存在于各种细胞内的一种钙 / 钙调蛋白依赖的

蛋白磷酸酶, FK506-FKBP 复合体在体内能有效地抑制 calcineurin 的活性^[26]. FKBP 通过使 calcineurin 特异性地定位于钙释放通道, 增强 calcineurin 对钙释放通道的去磷酸化作用^[12]. 已知 PKA 等多种蛋白激酶介导的蛋白质磷酸化调控钙释放通道的活性, 与 FKBP/ 钙释放通道相连的 calcineurin 可能通过蛋白质磷酸化 / 去磷酸化效应实现对钙释放通道的调控^[12, 19, 27]. 目前, 有关 FKBP 对钙释放通道的调控机制还不十分清楚. 早期研究曾推测, FKBP 可能是通过其本身具有的 PPIase 活力实现对钙释放通道的蛋白质构象调控, 但是, Timerman 等^[19]发现突变缺失 PPIase 活力的 FKBP 同样具有调控钙释放通道的能力, 提示 FKBP 可通过非 PPIase 机制实现对钙释放通道的调控.

4 cADPR 及其对 RyR 的调节

4.1 cADPR 的结构及分布

人们最初发现吡啶核苷酸的代谢产物可刺激海胆卵微粒体 Ca^{2+} 释放^[28], 后来通过高效液相、核磁共振及放射性物质标记等方法证明, 这种能够促进 Ca^{2+} 释放的物质就是 cADPR^[28]. 现已证实 cADPR 为一环状结构:核糖的一端与腺嘌呤 N-1 位以 β -糖苷键相连, 构成一个环状结构. 在酸性条件下, cADPR 容易被水解, 失去环状结构, 形成 ADPR. 与 cAMP 相类似, cADPR 作为一种内源性活性物质, 广泛存在于从低等的无脊椎动物到哺乳动物的细胞中, 被认为是体内的另一种第二信使, 通过影响细胞器功能变化发挥调控作用^[28].

4.2 cADPR 的合成与代谢

内源性的 cADPR 是由尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)在 ADPR 环化酶(adenosine diphosphate ribosyl cyclase, ADP-ribose cyclase, ADPRclase)催化下环化而成^[29]. ADPRclase 种类繁多, 具有种属特异性, 不同种属的动物表达的 ADPRclase 不同. 目前, 对海胆卵、海螺卵辜体及哺乳动物 CD38 的 ADPRclase 研究较多. 海胆卵细胞表达两种亚型的 ADPRclase: 一种为可溶性的, 对 cGMP 敏感, 约占海胆卵中 ADPRclase 总活性的 5%左右, cGMP 可提高其活性约 2~6 倍; 另一种为非可溶性的, 与细胞膜相连, 对 cGMP 不敏感. 由于海胆卵细胞膜上还存在着 cADPR 水解酶, 因此有人推测, 细胞内的 ADPRclase 主要参与介导 cADPR 的信使功能, 而膜上的 ADPRclase 及水解酶主要维持细胞内 Ca^{2+}

库周围相对稳定的低浓度 cADPR, 调节 CICR 机制^[30]. 海洋软体动物 *Aplysia kurodai* 体内的 ADPRclase, 分子质量 29 ku, 含有 258 个氨基酸, 其氨基酸序列有 86% 与 *Aplysia californica* 体内的 ADPRclase 相同, 有 31%~32% 与人、大鼠和小鼠的 CD38 相同. 尽管哺乳动物的 CD38 编码的基因在多种组织中表达, 但 *Aplysia* 体内 ADPRclase 特异性地在卵辜体中表达. 编码 *Aplysia kurodai* 体内 ADPRclase 的基因长约 7 kb, 含有 8 个外显子和 7 个内含子, 转录起始点位于 TATA 盒下游 28 bp 处^[31-32]. Prasad 等利用 X 射线衍射法测定了海螺 ADPRclase 的空间结构, 证实海螺 ADPRclase 是由两个单体构成的二聚体. 每个单体含有两个结构域, N 端的结构域多由 α 螺旋构成; C 端的结构域主要由 β 片层组成. 每个单体含有 10 个半胱氨酸, 形成 5 个二硫键, 3 个位于 N 端, 2 个位于 C 端^[33].

在人和哺乳动物, ADPRclase 的催化活性由 CD38 分子来执行. CD38 是一类进化上保守的酶家族, 在机体的多数组织中表达, 其分解 NAD^+ 和 NADP^+ , 产生环腺苷酸二磷酸核糖(cyclic ADP ribose, cADPR), 烟碱酸腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP)和 ADPR, 这些催化产物对于细胞内钙调控和信号转导至关重要^[28]. CD38 酶家族控制着细胞内复杂的生命过程, 包括卵细胞的受精、细胞的激活、增殖、肌肉的收缩、激素的分泌和免疫反应等. CD38 功能丧失可导致小鼠免疫反应受损、代谢紊乱和行为改变^[28]. 人类的 CD38 分子最早作为一种淋巴细胞抗原被发现, 是一种双功能酶, 具有 ADPRclase 活性, 可催化 NAD^+ 和 NADP^+ 降解合成 cADPR, 同时 CD38 又具有水解酶活性, 可催化降解 cADPR. 编码人 CD38 的基因位于染色体 4p15 上. 人类 CD38 分子的氨基酸序列与低等生物的 ADPRclase 氨基酸序列有很强的同源性, 如海螺 ADPRclase 由 258 个氨基酸构成, 其中 79 个与人类的 CD38 相同, 二者同源率达 68%, 同时氨基酸的位置也有极强的相似性, 构成 CD38 的 12 个半胱氨酸中有 10 个与海螺 ADPRclase 分子中半胱氨酸的位置完全相同^[33]. 研究发现, CD38 的双功能酶活性与其结构中的两个非保守半胱氨酸残基有关. 定位突变分析研究表明, 如果用海螺 ADPRclase 中相应的氨基酸替代 CD38 分子中这两个半胱氨酸中的一个, 则 CD38 便失去水解

cADPR 的功能, 只保留催化 cADPR 合成功能; 相反, 如果将海螺 ADPRclase 序列中相应位置的氨基酸由半胱氨酸代替, 则海螺 ADPRclase 也能水解 cADPR N-1 位的糖苷键, 获得与 CD38 类似的双功能酶活性. 进一步的研究表明, 与海螺 ADPRclase 分子结构明显不同的是, CD38 分子中的两个非保守半胱氨酸能形成二硫键, 后者容许更多的水分子进入 CD38 分子的活性中心, 使 CD38 获得双功能酶活性^[32-33]. 细胞内的一些二价阳离子, 如 Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 等可影响 CD38 分子的构型, 使 CD38 的酶活性发生变化. 研究表明, 在极低浓度时, Zn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 等可增强 CD38 的 cADPR 合成功能, 而抑制其水解活性^[28, 32-34]. 目前, CD38 与血液系统疾病之间关系的研究日益受到重视. 研究发现, CD38 是人类白血病、骨髓瘤等疾病特异性较强的标记物, 该分子与人类免疫缺陷病毒感染和慢性淋巴系统白血病的发病机制和预后密切相关. CD38 还控制胰岛素释放, 影响糖尿病的发生、发展^[28].

4.3 cADPR 的生理功能

cADPR 在细胞内起第二信使的作用, 外界信号引起细胞外 Ca^{2+} 内流, cADPR 调节 RyR 的活性, 通过 CICR 机制促进钙库内 Ca^{2+} 的释放, 而且 cADPR 可将这种 Ca^{2+} 释放信号从细胞周围向细胞中央迅速传递^[35]. 研究发现, 在钙调素(CaM)存在下, 两分子的 cADPR 与受体结合后才能发挥生理作用^[36-37]. CaM 可提高 CICR 对 Ca^{2+} 的敏感性. cADPR 与受体结合, 连同 CaM 一起, 通过 RyR 实现 CICR 机制. 当 Ca^{2+} 内流或钙库释放 Ca^{2+} 引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高达到生理范围($0.1 \sim 0.2 \mu\text{mol/L}$)时, CaM 激活 RyR 通道的活性, 促使 cADPR 引起钙库通过 CICR 机制释放更多的 Ca^{2+} . 在海胆卵, CaM 可直接与微粒体结合, 调节 cADPR 的功能, 但在胰腺 β 细胞中, CaM 是通过钙调素依赖性蛋白激酶 (CaMPK) 来调节 cADPR 的功能^[36-37].

在多种不同的组织和细胞, cADPR 通过激活 RyR 诱导肌浆网钙释放^[38-39]. 研究表明, 在胰岛的 β 细胞、平滑肌细胞和血管内皮细胞, cADPR 通过引起 FKBP12.6 与 RyR2 复合体的分离诱导钙释放. 然而, cADPR 介导的心肌细胞钙释放却颇具争议性. cADPR 诱导的肌浆网钙释放既通过 RyR 通道又通过非依赖 RyR 的通道^[40]. Lukyanenko 等^[39]也证实 cADPR 诱导钙火花的增强是通过增加

肌浆网钙积聚和随后的 RyR 激活间接介导的. Zhang 等^[3]发现, cADPR 改变了野生型小鼠心肌细胞钙火花的特性, 而对 FKBP12.6 敲除的小鼠心肌细胞钙火花特性无明显影响. 而且, cADPR 对钙火花特性的影响不被 PLB 抗体所阻断, 表明在小鼠心肌细胞上, cADPR 对 Ca^{2+} 火花特性的作用与 FKBP12.6 蛋白和 RyR2 复合体的分离有关, 而与 PLB 的磷酸化无关. 心肌细胞电压钳实验证实, cADPR 引起渗漏的钙并不影响钙火花的上升时间和半衰期, 表明 cADPR 对钙火花特性的影响并非通过增强肌浆网 Ca^{2+} 泵(SR Ca^{2+} pump, SERCA)活性所介导, 这与 Lukyanenko 等的报道不同^[39].

在平滑肌细胞, Ca^{2+} 经 RyR2 从细胞内钙库向细胞浆释放也受 cADPR 的控制. 尽管 cADPR 可以升高肺动脉、血管和气管平滑肌细胞 Ca^{2+} 释放, 但 cADPR 对其他类型平滑肌细胞, 包括大动脉、输精管、冠状动脉、支气管、脑血管和小肠平滑肌的 Ca^{2+} 释放无明显影响^[41]. 肌浆网 SERCA 活性可能与 cADPR 对平滑肌细胞 Ca^{2+} 释放的作用有关^[38].

在最新的研究中, Zheng 等^[16]采用 FKBP12.6 敲除小鼠直接检测 cADPR 对 Ca^{2+} 火花的作用, 研究了 cADPR 对小鼠膀胱平滑肌细胞 Ca^{2+} 释放的影响和机制. 结果发现, 在小鼠膀胱平滑肌细胞, cADPR 明显地改变了 STOC 和 Ca^{2+} 火花的特性, 并进一步揭示 cADPR 作用的机制与 FKBP12.6 蛋白从 RyR2 复合体上解离有关.

此外, 也有证据显示, FKBP12.6 从 RyR 解离并非 cADPR 调控肌浆网释放 Ca^{2+} 的唯一机制. cADPR 通过 RyR 和经一种不依赖于 RyR 的机制诱导肌浆网 Ca^{2+} 释放^[42]. Lukyanenko 等^[39]报道, 心肌细胞 cADPR 的主要靶点是肌浆网 SERCA, cADPR 诱导的 Ca^{2+} 释放是通过增加肌浆网 Ca^{2+} 积聚介导的. 但最新的研究结果显示, SERCA 抑制剂, 对 cADPR 诱导 Ca^{2+} 火花特性的作用无明显影响, 提示在平滑肌细胞上增强肌浆网 Ca^{2+} 摄取在 cADPR 调控的肌浆网 Ca^{2+} 释放中不起重要作用^[43].

在 cADPR 发挥调控作用的过程中, cADPR 必须首先与受体结合, 进而与受体发生作用后, 才能引起 Ca^{2+} 释放. cADPR 的竞争性拮抗剂 8-氨基-cADPR 能有效地与 cADPR 受体结合, 但不能激活 Ca^{2+} 释放机制^[44]. 可见, cADPR 与受体结合后, 腺嘌呤环 8 位置与受体的相互作用是 cADPR 激活 Ca^{2+} 释放机制的基础^[45]. 对 cADPR 调控作用的最

新机制研究提示, cADPR 需通过 FKBP12.6 发挥作用^[16]. 研究表明, cADPR 明显升高野生型小鼠膀胱平滑肌细胞 STOC 的振幅和频率, 这一效应可以被 RyR 复合体稳定剂 JTV-519 所消除^[16]. cADPR 升高野生型膀胱平滑肌细胞 Ca^{2+} 火花特性的效应与 FK506 介导效应相类似^[12]. 作为 FKBP12.6 蛋白的配体, FK506 使 FKBP12.6 与 RyR2 解离并导致肌浆网释放 Ca^{2+} ^[12]. 同时, cADPR 不能引起 FKBP12.6 敲除的细胞 STOC 的明显变化, 提示, 在小鼠膀胱平滑肌细胞, cADPR 调控肌浆网 Ca^{2+} 释放是由 FKBP12.6 蛋白介导的^[16]. FKBP12.6 蛋白对于 cADPR 调控肌浆网释放 Ca^{2+} 是必需的, 这与以前关于 cADPR 直接与 RyR 结合并激活 RyR 的报道形成明显对照^[28].

5 NAADP 研究进展及其与 RyR 的关系

烟碱腺嘌呤二核苷酸(nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, NAADP)是体内 3 种已知钙动员分子中活性较强的一个. NAADP 最早在海胆卵中被证实具有激活细胞内钙库钙释放的作用^[46]. NAADP 首先引起溶酶体相关细胞器 Ca^{2+} 释放, 继而诱发内质网 CICR 发挥钙动员活性^[46]. 最近有报道认为, NAADP 通过双孔通道(two-pore channels, TPC)机制启动内质网-溶酶体钙库 Ca^{2+} 释放, 为 NAADP 及其介导的信号通路研究领域注入了生机^[47]. 基因组分析证明, 在哺乳动物存在 3 个 TPC 家族成员(TPC1~3)^[48]. TPC1 被证明在 HEK293 内涵体膜上表达, TPC2 在溶酶体膜上表达, TPC3 可能作为一种假遗传因子或假基因存在于灵长类动物中^[48]. 富含 TPC2 的生物膜表现出对 NAADP 的高度亲和特性, TPC2 可明显增强 NAADP 诱导的溶酶体钙库的钙释放. 尽管 TPC 主要位于酸性细胞器, 但已经发现, 由这些通道引起的钙释放能够触发进一步的经内质网 IP3Rs 介导的 CICR. 细胞内酸性细胞器的局部钙释放对于内涵体或溶酶体的细胞内功能调控, 如细胞的自我吞噬等可能起非常重要的作用. 此外, 内质网/肌浆网膜亦证实具有 NAADP 敏感性, 由于内质网/肌浆网膜上存在 RyR, 因而提示 NAADP 可能对 RyR 具有直接的激活作用^[49-50]. NAADP 作用于高度纯化的 RyR1 使通道开放的研究报道为 RyR1 直接作为 NAADP 敏感的 Ca^{2+} 通道提供了证据^[49-50]. 作为一种第二信使, 内源性 NAADP 的水平受到外部刺激因素的影响, 目前已经证实, NAADP 水平与多种

刺激和细胞表面受体的激活密切相关^[49-51], 如海胆卵受精时精子与卵胶膜作用的产物使 NAADP 显著升高^[46]. 在哺乳动物, 葡萄糖和胰高血糖素类似肽 1 可刺激胰岛 β 细胞 NAADP 水平升高, 胆囊收缩素(CCK)刺激下的胰岛腺泡细胞、内皮素 1 刺激下的肺动脉平滑肌细胞、组胺作用下的人子宫平滑肌细胞, 以及神经元对谷氨酸盐的反应中, 细胞内 NAADP 水平均升高^[46, 50]. 尽管纯化的 CD38 和软体动物 *Aplysia* 的 ADPRclase 已经被证明具有体外催化 NAADP 合成的功能, 并提示 ADPRclase 家族可能与 NAADP 合成有关, 但内源性 NAADP 合成的过程及涉及的酶类尚缺乏直接的实验证据^[46, 49]. 作为一种广泛表达于哺乳动物细胞膜的酶蛋白分子, CD38 的功能涉及诸如细胞分化、分裂增殖和社会行为等生命的多个方面^[50]. 体外实验表明, CD38 在特定的 pH 值环境下催化相应的底物如 NAD^+ 和 NADP^+ 合成 NAADP 和 cADPR^[46, 50]. 在此反应中, NAD 的烟碱部分和烟碱酸在 pH 4~5 的适宜条件下互换碱基后产生 NAADP. 目前认为, 内源性 NAADP 的产生与 ADPRclase 家族成员密切相关, NAADP 在某些激动剂诱导的功能活动中起至关重要的作用. 在哺乳动物和人的胰腺腺泡细胞, 胆囊收缩素和乙酰胆碱是两种重要的促分泌剂, 二者通过诱导特殊钙信号刺激消化酶和液体分泌^[47, 49]. 研究发现, 这些激动剂通过 NAADP 等钙动员分子发挥促分泌作用^[47, 51]. IP_3 、cADPR 和 NAADP 三种钙动员分子均已经被证明在胰腺腺泡细胞的刺激性分泌中起作用, 但三者在不同激动剂诱发的分泌中发挥作用的程度不同. 在小鼠的胰腺腺泡细胞, 尽管低浓度的 CCK 与 ACh 一样刺激 cADPR 的合成, 但生理性低浓度时 CCK 主要激活高亲和性的 CCK 受体, 通过 NAADP 信号通路发挥促分泌作用^[46-47, 49]. 而毒蕈碱受体和低亲和性的 CCK 受体介导的信号通路中主要由 IP_3 发挥钙动员作用. 在缺乏 CD38 的小鼠胰腺腺泡细胞和胰腺 AR42J 细胞上进行的研究证实, 在 CCK/NAADP 介导的钙信号中 CD38 是必需的, CCK 受体激活与 NAADP 介导的溶酶体 Ca^{2+} 动员密切相关^[46-52]. 进一步的研究提示, CCK 可增强膜 CD38 分子内吞进入内涵囊泡, 从而为 NAADP 的细胞内合成创造了条件^[49, 52]. 总之, 在哺乳动物细胞中, NAADP 与 cADPR 一样由 CD38 催化底物降解而合成, 并在 NAADP 依赖的钙释放受体激活中起重要作用.

6 结 语

RyR 控制 Ca^{2+} 由细胞内钙池向细胞浆释放. RyR 的激活和失活由一系列的调控因子如 FKBP、钙调素、PKA, 以及 Ca^{2+} /钙调素依赖激酶等所调控. 在心肌和平滑肌细胞, FKBP12.6 能够特异性地与 RyR2 相结合并调控其功能. PKA 对 RyR2 磷酸化引起 FKBP12.6 的解离并影响通道的开放. 在心肌和平滑肌细胞, Ca^{2+} 的释放受 RyR2 的控制, 并且以 CICR 形式进行. FKBP12.6 可以稳定关闭状态的 RyR2, 在调控肌浆网钙释放方面是至关重要的, 其机制可能是通过其与 RyR2 的结合稳定 RyR2. 作为一种 Ca^{2+} 动员剂, cADPR 是调控 RyR 的因子之一. cADPR 特异性地与 FKBP12.6 结合, 使 FKBP12.6 蛋白从 RyR2 复合体上解离而调控 Ca^{2+} 释放. 目前, 尽管经过科学家多年不懈的努力, 对一些可兴奋细胞如心肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞和神经细胞以及非兴奋细胞如胰岛细胞 RyR Ca^{2+} 释放调控的作用研究已取得很大进步, 但是迄今为止, 人们对颌下腺细胞以及其他一些重要组织细胞 RyR Ca^{2+} 释放调控的作用与机制还了解很少, 有关 RyR 及其 Ca^{2+} 释放调控的机制研究还有待于进一步深入.

参 考 文 献

- [1] Jones J L, Reynolds D F, Lai F A, *et al.* Ryanodine receptor binding to FKBP12 is modulated by channel activation state. *J Cell Sci*, 2005, **118** (Pt 20): 4613-4619
- [2] Thomas N L, Lai F A, George C H. Differential Ca^{2+} sensitivity of RyR2 mutations reveals distinct mechanisms of channel dysfunction in sudden cardiac death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **331** (1): 231-238
- [3] Zhang X, Tallini Y N, Chen Z, *et al.* Dissociation of FKBP12.6 from ryanodine receptor type 2 is regulated by cyclic ADP-ribose but not beta-adrenergic stimulation in mouse cardiomyocytes. *Cardiovasc Res*, 2009, **84** (2): 253-262
- [4] Ji G, Feldman M E, Greene K S, *et al.* RYR2 proteins contribute to the formation of Ca^{2+} sparks in smooth muscle. *J Gen Physiol*, 2004, **123**(4): 377-386
- [5] Ji G, Feldman M, Doran R, *et al.* Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release through localized Ca^{2+} uncaging in smooth muscle. *J Gen Physiol*, 2006, **127**(3): 225-235
- [6] Yin C C, D'Cruz L G, Lai F A. Ryanodine receptor arrays: not just a pretty pattern?. *Trends Cell Biol*, 2008, **18**(4): 149-156
- [7] Ji G, Feldman M, Deng F Y, *et al.* Ca^{2+} -sensing transgenic mice: postsynaptic signaling in smooth muscle. *J Biol Chem*, 2004, **279**(20): 21461-21468
- [8] Collier M L, Ji G, Wang Y, *et al.* Calcium-induced calcium release in smooth muscle: loose coupling between the action potential and calcium release. *J Gen Physiol*, 2000, **115**(5): 653-662
- [9] Ji G, Barsotti R J, Feldman M E, *et al.* Stretch induced calcium release in smooth muscle. *J Gen Physiol*, 2002, **119**(6): 533-544
- [10] Lohn M, Jessner W, Furstenau M, *et al.* Regulation of calcium sparks and spontaneous transient outward currents by RyR3 in arterial vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, 2001, **89** (11): 1051-1057
- [11] Morimoto S, O-Uchi J, Kawai M, *et al.* Protein kinase A-dependent phosphorylation of ryanodine receptors increases Ca^{2+} leak in mouse heart. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, **390**(1): 87-92
- [12] Kang C B, Hong Y, Dhe-Paganon S, *et al.* FKBP family proteins: immunophilins with versatile biological functions. *Neurosignals*, 2008, **16**(4): 318-325
- [13] Seidler T, Loughrey C M, Zibrova D, *et al.* Overexpression of FK-506 binding protein 12.0 modulates excitation contraction coupling in adult rabbit ventricular cardiomyocytes. *Circ Res*, 2007, **101**(10): 1020-1029
- [14] Stange M, Xu L, Balshaw D, *et al.* Characterization of recombinant skeletal muscle (Ser-2843) and cardiac muscle (Ser-2809) ryanodine receptor phosphorylation mutants. *J Biol Chem*, 2003, **278**(51): 51693-51702
- [15] Xiao B, Sutherland C, Walsh M P, *et al.* Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca^{2+} -release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res*, 2004, **94**(4): 487-495
- [16] Zheng J, Wenzhi B, Miao L, *et al.* Ca^{2+} release induced by cADP-ribose is mediated by FKBP12.6 proteins in mouse bladder smooth muscle. *Cell Calcium*, 2010, **47**(5): 449-457
- [17] Guo T, Cornea R L, Huke S, *et al.* Kinetics of FKBP12.6 binding to ryanodine receptors in permeabilized cardiac myocytes and effects on Ca sparks. *Circ Res*, 2010, **106**(11): 1743-1752
- [18] Samsó M, Shen X, Allen P D. Structural characterization of the RyR1-FKBP12 interaction. *J Mol Biol*, 2006, **356**(4): 917-927
- [19] Timerman A P, Wiederrecht G, Marcy A, *et al.* Characterization of an exchange reaction between soluble FKBP12 and the FKBP-ryanodine receptor complex. Modulation by FKBP mutants deficient in peptidyl-prolyl isomerase activity. *J Biol Chem*, 1995, **270**(6): 2451-2459
- [20] Chelu M G, Danila C I, Gilman C P, *et al.* Regulation of ryanodine receptors by FK506 binding proteins. *Trends Cardiovasc Med*, 2004, **14**(6): 227-234
- [21] Zalk R, Lehnart S E, Marks A R. Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium. *Annu Rev Biochem*, 2007, **76**: 367-385
- [22] Xin H B, Senbonmatsu T, Cheng D S, *et al.* Oestrogen protects FKBP12.6 null mice from cardiac hypertrophy. *Nature*, 2002, **416**(6878): 334-338
- [23] Kihira T, Utunomiya H, Kondo T. Expression of FKBP12 and ryanodine receptors in the spinal cord of MND patients. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord*, 2005, **6**(2): 94-99

- [24] Thomas N L, George C H, Williams A J, *et al.* Ryanodine receptor mutations in arrhythmias: advances in understanding the mechanisms of channel dysfunction. *Biochem Soc Trans*, 2007, **35**(Pt5): 946-951
- [25] Bellinger A M, Mongillo M, Marks A R. Stressed out: the skeletal muscle ryanodine receptor as a target of stress. *J Clin Invest*, 2008, **118**(2): 445-453
- [26] Weiwad M, Edlich F, Kilka S, *et al.* Comparative analysis of calcineurin inhibition by complexes of immunosuppressive drugs with human FK506 binding proteins. *Biochemistry*, 2006, **45**(51): 15776-15784
- [27] Xiao B, Tian X, Xie W, *et al.* Functional consequence of protein kinase A-dependent phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: sensitization of store overload-induced Ca²⁺ release. *J Biol Chem*, 2007, **282**(41): 30256-30264
- [28] Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, *et al.* Evolution and function of the ADP-ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev*, 2008, **88**(3): 841-886
- [29] Hachisuka J, Soga-Sakakibara S, Kubota M, *et al.* Enhancement of Ca²⁺-induced Ca²⁺ release by cyclic ADP-ribose in frog motor nerve terminals. *Neuroscience*, 2007, **146**(1): 123-134
- [30] Franco L, Graeff R M, Lee H C. Two different forms of ADP-ribosyl cyclase are present in sea urchin eggs (Abstract). *Pharmacologist*, 1997, **39**: 96
- [31] Nata K, Sugimoto T, Tohgota A, *et al.* The structure of the *Aplysia* Kurodai gene encoding ADP-ribosyl cyclase, a second-messenger enzyme. *Gene*, 1995, **158**(2): 213-218
- [32] Churamani D, Boulware M J, Geach T J, *et al.* Molecular characterization of a novel intracellular ADP-ribosyl cyclase. *PLoS ONE*, 2007, **2**(8): e797
- [33] Prasad G S, McRee D E, Stura E A, *et al.* Crystal structure of *Aplysia* ADP-ribosyl cyclase, a homology of the bifunctional enzyme CD38. *Nat Struct Biol*, 1996, **3**(11): 957-964
- [34] Cakir-Kiefer C, Muller-Steffner H, Oppenheimer N, *et al.* Kinetic competence of the cADP-ribose-CD38 complex as an intermediate in the CD38/NAD⁺ glycohydrolase-catalysed reactions: implication for CD38 signalling. *Biochem J*, 2001, **358**(Pt2): 399-406
- [35] Thompson M, White T, Chini E N. Modulation of store-operated Ca²⁺ entry by cyclic-ADP-ribose. *Braz J Med Biol Res*, 2006, **39**(6): 739-748
- [36] Teggatz E G, Zhang G, Zhang A Y, *et al.* Role of cyclic ADP-ribose in Ca²⁺-induced Ca²⁺ release and vasoconstriction in small renal arteries. *Microvasc Res*, 2005, **70**(1-2): 65-75
- [37] Bradley K N, Currie S, MacMillan D, *et al.* Cyclic ADP-ribose increases Ca²⁺ removal in smooth muscle. *J Cell Sci*, 2003, **116**(Pt21): 4291-306
- [38] Jude J A, Wylam M E, Walseth T F, *et al.* Calcium signaling in airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc*, 2008, **5**(1): 15-22
- [39] Lukyanenko V, Gyorke I, Wiesner T F, *et al.* Potentiation of Ca²⁺ release by cADPR-ribose in the heart is mediated by enhanced SR Ca²⁺ uptake into the sarcoplasmic reticulum. *Circ Res*, 2001, **89**(7): 614-622
- [40] Wang Y X, Zheng Y M, Mei Q B, *et al.* FKBP12.6 and cADPR regulation of Ca²⁺ release in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, **286**(3): C538-546
- [41] McCarron J G, Chalmers S, Bradley K N, *et al.* Ca²⁺ microdomains in smooth muscle. *Cell Calcium*, 2006, **40**(5-6): 461-493
- [42] Li P L, Tang W X, Valdivia H H, *et al.* cADP-ribose activates reconstituted ryanodine receptors from coronary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, **280**(1): H208-H215
- [43] Morita K, Kitayama T, Kitayama S, *et al.* Cyclic ADP-ribose requires FK506-binding protein to regulate intracellular Ca²⁺ dynamics and catecholamine release in acetylcholine-stimulated bovine adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Sci*, 2006, **101**(1): 40-51
- [44] Zhang J, Liu Z, Masumiya H, *et al.* Three-dimensional localization of divergent region 3 of the ryanodine receptor to the clamp-shaped structures adjacent to the FKBP binding sites. *J Biol Chem*, 2003, **278**(16): 14211-14218
- [45] MacMillan D, Currie S, Bradley K N, *et al.* In smooth muscle, FK506-binding protein modulates IP₃ receptor-evoked Ca²⁺ release by mTOR and calcineurin. *J Cell Sci*, 2005, **118**(Pt23): 5443-5451
- [46] Cosker F, Cheviron N, Yamasaki M, *et al.* The ecto-enzyme CD38 is a nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) synthase that couples receptor activation to Ca²⁺ mobilization from lysosomes in pancreatic acinar cells. *J Biol Chem*, 2010, **285**(49): 38251-38259
- [47] Patel S, Marchant J S, Brailoiu E. Two-pore channels: Regulation by NAADP and customized roles in triggering calcium signals. *Cell Calcium*, 2010, **47**(6): 480-490
- [48] Brailoiu E, Hooper R, Cai X, *et al.* An ancestral deuterostome family of two-pore channels mediates nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate-dependent calcium release from acidic organelles. *J Biol Chem*, 2010, **285**(5): 2897-2901
- [49] Sammels E, Parys J B, Missiaen L, *et al.* Intracellular Ca²⁺ storage in health and disease: a dynamic equilibrium. *Cell Calcium*, 2010, **47**(4): 297-314
- [50] Guse A H. Second messenger signaling: multiple receptors for NAADP. *Curr Biol*, 2009, **19**(13): R521-R523
- [51] Pandey V, Chuang C C, Lewis A M, *et al.* Recruitment of NAADP-sensitive acidic Ca²⁺ stores by glutamate. *Biochem J*, 2009, **422**(3): 503-512
- [52] Rah S Y, Mushtaq M, Nam T S, *et al.* Generation of cyclic ADP-ribose and nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate by CD38 for Ca²⁺ signaling in interleukin-8-treated lymphokine-activated killer cells. *J Biol Chem*, 2010, **285**(28): 21877-21887

Evolution in Research of Ryanodine Receptors and Its Subtype 2 Regulators*

LI Yu-Ming¹⁾, JI Guang-Ju^{2)**}

¹⁾ Department of Physiology and Pathophysiology, Yanjing Medical College, Capital Medical University, Beijing 101300, China;

²⁾ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract Ryanodine receptors (RyR), as intracellular Ca²⁺ release channels, mediate Ca²⁺ release from intracellular stores in the sarcoplasmic reticulum and play essential roles in some excitable cells such as cardiac and skeletal cells. Cyclic adenosine diphosphate ribose (cADPR) and FK 506 binding proteins(FKBP) are tightly associated with RyR in these cells. A summary on latest research progress in RyR and some channel modulators for RyR2 was given based on authors' research.

Key words ryanodine receptors, cyclic adenosine diphosphate ribose, FK 506 binding proteins, nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate, extracellular Ca²⁺ release

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00518

* This work was supported by grants from Beijing Municipal Education Commission(KM201010025014), Capital Medical University(108010) and Funding Project for Academic Human Resources Development in Institutions of Higher Learning Under the Jurisdiction of Beijing Municipality (PHR201008409).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64846720, E-mail: gj28@ibp.ac.cn

Received: October 8, 2010 Accepted: January 28, 2011