DOI:10.16016/j.1000-5404.201409116

论著

突触囊泡融合蛋白 Munc18-1 在小鼠耳蜗内毛细胞的定位表达

宋 锐,顾 翔,陈知己,袁 伟 (400038 重庆,第三军医大学西南医院耳鼻咽喉-头颈外科)

[摘要] **目的** 研究突触囊泡融合蛋白 Munc18-1 在小鼠耳蜗内毛细胞的表达及定位。**方法** 应用激光共聚焦成像技术,通过免疫荧光单标法检测 Munc18-1 蛋白在小鼠耳蜗内毛细胞中的表达,免疫荧光双标法检测其与带状突触蛋白 CtBP2 的定位关系。**结果** 通过激光共聚焦成像技术检测发现,免疫荧光单标染色显示内毛细胞胞质中有高浓度的 Munc18-1 蛋白表达,免疫荧光双标染色结果显示 Munc18-1 蛋白聚集在 CtBP2 蛋白附近。**结论** Munc18-1 蛋白在耳蜗内毛细胞中有表达,聚集在突触蛋白 CtBP2 周围,可能与维持突触囊泡融合、胞吐功能紧密相关。

[关键词] Munc18-1 蛋白;CtBP2 蛋白;突触囊泡;内毛细胞
[中图法分类号] R322.923; R341; R394.3 [文献标志码] A

Expression and localization of Munc18-1 protein in inner hair cells of mouse cochlea

Song Rui, Gu Xiang, Chen Zhiji, Yuan Wei (Department of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of Munc18-1 protein in the inner hair cells of mouse cochlea and identify its location. **Methods** Thirty C57 mice (60 cochleae) were randomly detected with Munc18-1 antibody or CtBP2 + Munc18-1 double antibodies by immunofluorescence assay and confocal laser imaging technique to detect the expression and location of Munc18-1 protein in the cochlea inner hair cells. **Results** Laser scanning confocal imaging indicated that the Munc18-1 protein was highly expressed in the cytoplasm of the inner hair cells, and Munc18-1 protein was aggregated close to the synaptic protein CtBP2. **Conclusion** Munc18-1 protein exists in the mouse cochlea inner hair cells, and aggregates with synaptic protein CtBP2. It might be closely involved in the maintenance of synaptic vesicles fusion and exocytosis.

[**Key words**] munc18-1; CtBP2; synaptic vesicle; inner hair cells

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30973301, 81271080, 81470694) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BB5170). Corresponding author: Yuan Wei, E-mail:weiyuan175@sina.com

声音是通过耳蜗内毛细胞和听觉神经元之间的突触来编码的,具有高保真度和瞬息性,其功能有赖于内毛细胞特殊的突触结构,称为“带状”突触,是快速突触递质释放的核心区域,它的主要结构蛋白是 Ribeye/CtBP2[1]。而突触之间的信息传递需要突触囊泡与细胞膜融合,释放递质到突触间隙产生兴奋性突触后电位。参与膜融合的蛋白质包括 Munc18-1、SNARE、Syntaxin-1、囊泡相关膜蛋白(synaptobrevin/VAMP)和 SNAP-25。它们形成紧密的 SNARE 复合体,将囊泡和细胞膜绑定启动融合过程。其中 Munc18-1 是膜融合的关键调控蛋白[2-3],现有关于 Munc18-1 的研究集中在中枢神经系统和神经内分泌细胞的突触调控上,而在听觉信号突触囊泡循环中的功能作用方面尚少见报

[基金项目] 国家自然科学基金(30973301,81271080,81470694);重庆市自然科学基金(CSTC2009BB5170)
[通信作者] 袁 伟,E-mail:weiyuan175@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141224.1836.003.html(2014-12-24)

道。现有研究仅指出 Munc18 在耳蜗内毛细胞中有表达[4],但其具体的分布、定位,与内毛细胞带状突触 CtBP2 的关系及其作用机制尚不清楚。本研究通过免疫荧光标记、激光共聚焦成像技术对出生后 5 周 C_{57} 小鼠耳蜗基底膜内毛细胞 Munc18-1 蛋白的表达和分布进行初步研究,为进一步探讨该蛋白在内毛细胞突触囊泡融合的功能调控机制作前期铺垫。

1 材料与方法

1.1 实验动物

出生后 5 周的成年健康 C_{57} 小鼠 30 只(60 耳蜗),耳廓反射灵敏,雌雄不限,体质量 19 ~ 20 g,没有外耳或中耳疾病,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂

一抗:兔单克隆抗小鼠 Munc18-1 抗体(1∶100,EPR4849,Abcam 公司);羊抗小鼠 CtBP2 抗体(1∶50,E-16,SANTA CRUZ 公司)。二抗:红色标记驴抗兔 IgG(H + L)(1∶300,IFKine® #A24421);绿色标记驴抗羊 IgG(H + L)(1∶300,IFKine® #A24231);5% 正常驴血清(ImmunoReagents,SP-072-VX2);DAPI(4′,6-二脒基-2-苯基吲哚,Sigma);抗荧光淬灭封片剂(碧云天);Trition X-100(聚乙二醇辛基苯基醚,Amresco,Reagent Grade);5% 水合氯醛[成制字(2011)B06034]。

1.3 耳蜗基底膜取材

C_{57} 小鼠称体质量后 5% 水合氯醛(5 mL/kg)腹腔注射麻醉后,断颈处死,自枕骨大孔正中剪开颅骨,去除双侧脑组织,暴露双侧听泡并取出,置于盛有新鲜配置的 4% 多聚甲醛玻璃皿中,解剖显微镜(Olympus SZX9)下取出耳蜗,显微镊去除听小骨、镫骨底板及多余软组织,挑开圆窗膜,1 mL 注射器针尖窝顶处打孔。自蜗顶小孔、卵圆窗、圆窗缓慢注入 4% 多聚甲醛,反复多次直至耳蜗透明,后将耳蜗置于 4% 多聚甲醛液中固定,4 ℃冰箱过夜。次日,取出固定后的耳蜗标本置于盛有 0.01 mmol/L PBS 液的玻璃皿中,显微镜下解剖耳蜗并取出基底膜中间回,去除前庭膜和盖膜,备用。

1.4 免疫荧光染色

将取出的基底膜标本用0.01 mmol/L PBS 漂洗3 次,加入 5% 正常驴血清和 0.3% Trition X-100 混合的封闭液中,室温下孵育 1 h。吸净封闭液,加入一抗兔单克隆抗小鼠 Munc18-1 抗体(浓度 1∶100,PBS 液稀释)和羊抗小鼠 CtBP2 抗体(浓度 1∶50),4 ℃冰箱过夜。将孵育后的标本行 0.01 mol/L PBS 漂洗(3 次,每次 10 min),加入二抗红色标记驴抗兔 IgG(H + L,浓度 1∶300,PBS 稀释)室温,避光孵育 1 h。0.01 mmol/L PBS 漂洗(避光,3 次,每次 10 min),加入二抗绿色标记驴抗羊 IgG(H + L,浓度 1∶300)室温,避光孵育 1 h。0.01 mmol/L PBS 漂洗(避光,3 次,每次 10 min),加入 DAPI(浓度 1∶200)室温,避光孵育 10 min,0.01 mmol/L PBS 漂洗。暗室中取出标本平铺于载玻片上,滴加 2 滴抗荧光淬灭封片剂封片。标本直接在荧光显微镜下观察,检测特异性的一抗。空白对照为 PBS 液代替一抗,其余方法同上。

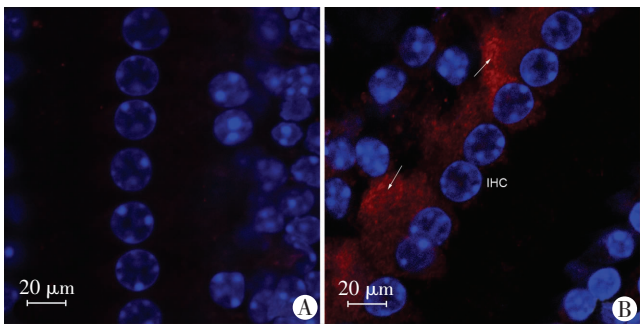
1.5 激光共聚焦荧光显微镜成像

激光共聚焦荧光显微镜采用 ZEISS LSM 700,由西南医院中心实验提供,以 400 倍观察。荧光激发波长分别是 561 nm 和 488 nm。对样本进行层扫,扫描层距设置为 0.12 μm。

2 结果

2.1 Munc18-1 蛋白在小鼠耳蜗内毛细胞中的免疫荧光染色

激光共聚焦荧光显微镜下观察,见 Munc18-1 蛋白在耳蜗内毛细胞的胞质和胞膜上均有高浓度表达,且在内毛细胞突触区域有明显浓聚。而用空白对照的所有耳蜗内毛细胞均未见荧光信号(图 1)。



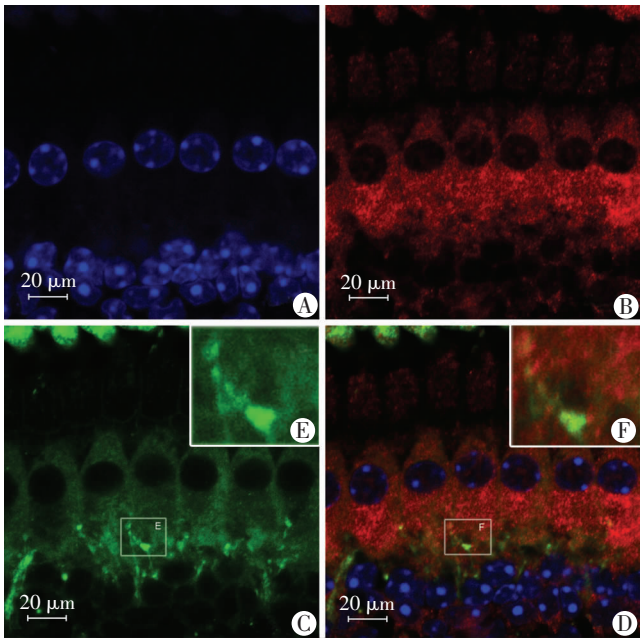
A:空白对照,细胞核周围未见荧光显色;B:Munc18-1 抗体染色,一抗 Munc18-1 蛋白荧光显色(箭头示);蓝色示细胞核,红色示 Munc18-1 蛋白

图 1 免疫荧光染色观察 Munc18-1 在小鼠耳蜗内毛细胞中的表达

2.2 Munc18-1 和 CtBP2 在小鼠耳蜗内毛细胞中的免疫荧光双标染色

免疫荧光双标 Munc18-1、CtBP2 染色,激光共聚焦成像技术检测显示 Munc18-1 蛋白集中在带状突

触 CtBP2 蛋白附近,有利于突触囊泡融合、胞吐的调控(图 2)。



A:DAPI 染色显示细胞核,可见内毛细胞整齐排列成一排,无缺失,下方为支持细胞核;B:红色荧光显示胞内的 Munc18-1 蛋白,多聚集在核下区;C、E:E 为 C 的放大图像,绿色荧光显示突触蛋白 Ribeye/CtBP2;D:Merge 合成图像;F:D 的放大图像,显示 Munc18-1 蛋白聚集在带状突触 CtBP2 附近

图 2 免疫荧光双标染色观察 Munc18-1 和 CtBP2 在小鼠耳蜗内毛细胞中的表达

3 讨论

以往关于内毛细胞突触蛋白组成的研究,曾经被认为使用与中枢神经系统谷氨酸能突触相同的突触蛋白。然而在 1999 年通过免疫组化和 RT-PCR 的研究,显示内毛细胞突触中不存在突触结合蛋白(synaptotagmins 1-3)、突触囊泡蛋白(synaptophysin)和突触蛋白(synapsin)[5]。随后的研究证实了内毛细胞突触中缺乏 complexins 蛋白[4],而改用其它蛋白参与胞吐的过程,比如 C_2-结构域蛋白 otoferlin[6]。有证据表明 otoferlin、L 型电压依赖性 Ca^{2+} 离子通道 $Ca_v1.3$ 和囊泡谷氨酸转运体亚型 3(Vglut3)蛋白的突变,会导致人类耳聋。而关于内毛细胞胞吐是否需要可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachmet protein receptors, SNARE)的参与还存在争议[7]。

Munc18-1 是 Sec1/Munc18(SM)蛋白家族成员之一,具有高度保守性,是(60 ~ 70) $\times 10^3$ 的多肽氨基酸,参与调控 SNARE 复合体的形成,是膜融合的必需调控蛋白[2-3]。在 Munc18-1 基因敲除小鼠中,神经递质的释放功能完全丧失,且出生后不久即死亡[8]。而 Munc18-1 蛋白表达水平的增加则引起更大的待释放囊泡池(RRP)的形成和突触效能的增加[9]。在癫痫和智力障碍的患者中发现 Munc18-1 基因突变,而且 Munc18-1 蛋白表达分布紊乱将导致疾病阿尔茨海默尔症和精神分裂症的发生[9-10]。在哺乳类动物中,Munc18 有 3 种亚型。最初是在中枢神经系统及神经内分泌细胞中检测发现 Munc18-1;Munc18-2 是除了在脑组织以外广泛表达;Munc18-3 的表达则无处不在[11]。从 Munc18-1 蛋白免疫荧光染色结果可以看出,Munc18-1 蛋白在成年小鼠耳蜗内毛细胞中有高浓度的表达,和 Uthaiah[4] 的研究相一致,这可能预示着 Munc18-1 参与内毛细胞的囊泡融合。

哺乳动物耳蜗内毛细胞的突触传递能够精确到亚毫秒级,突触囊泡具有空前的高频率释放和再补充特性。通过研究发现内毛细胞的突触呈“带状”,是一种纳米级蛋白质复合体,捆绑一圈囊泡在活化区域。活化区域是由特殊的蛋白分子构成,其主要的组成部分是 Ribeye/CtBP2,捆绑大约 70 ~ 200 个突触囊泡,每秒能够释放 12 至数百个囊泡至突触间隙,产生不同等级的感受器电位[12]。为了观察 Munc18-1 蛋白在内毛细胞的分布及其与带状突触的关系,我们对 Munc18-1 和 CtBP2 蛋白进行了免疫荧光双标、激光共聚焦显微镜观察,发现内毛细胞胞质中及胞膜上广泛高表达 Munc18-1 蛋白,且聚集在突触前活化区域。近期的研究表明内源性蛋白激酶 C(PKC)对 Munc18-1 蛋白有磷酸化的作用,并且影响其在中枢神经轴突-树突间的分布和运动[13-14]。Munc18-1 蛋白对耳蜗内毛细胞突触囊泡融合的调控及此蛋白的缺失或突变是否会对听觉突触传递造成影响,能否成为研究听力下降的新靶点,还有待于进一步工作证实。

参考文献:

[1] Rutherford M A, Pangrsic T. Molecular anatomy and physiology of exocytosis in sensory hair cells[J]. Cell Calcium, 2012, 52(3/4): 327 - 337.

[2] Ma C, Su L, Seven A B, *et al*. Reconstitution of the vital functions of Munc18 and Munc13 in neurotransmitter release [J]. Science, 2013, 339(6118): 421 - 425.

[3] Rizo J, Sudhof T C. The membrane fusion enigma: SNAREs, Sec1/Munc18 proteins, and their accomplices—guilty as charged? [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2012, 28: 279 - 308.

[4] Uthaiah R C, Hudspeth A J. Molecular anatomy of the hair cell's ribbon synapse[J]. J Neurosci, 2010, 30(37): 12387 - 12399.

[5] Safieddine S, Wenthold R J. SNARE complex at the ribbon synapses of cochlear hair cells: analysis of synaptic vesicle- and synaptic membrane-associated proteins[J]. Eur J Neurosci, 1999, 11(3): 803 - 812.

[6] Pangrsic T, Reisinger E, Moser T. Otoferlin: a multi-C2 domain protein essential for hearing[J]. Trends Neurosci, 2012, 35(11): 671 - 680.

[7] Nouvian R, Neef J, Bulankina A V, *et al*. Exocytosis at the hair

cell ribbon synapse apparently operates without neuronal SNARE proteins[J]. Nat Neurosci, 2011, 14(4): 411-413.
[8] Verhage M, Maia A S, Plomp J J, *et al*. Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion[J]. Science, 2000, 287(5454): 864-869.
[9] Uriguen L, Gil-Pisa I, Munarriz-Cuezva E, *et al*. Behavioral, neurochemical and morphological changes induced by the overexpression of munc18-1a in brain of mice: relevance to schizophrenia[J]. Transl Psychiatry, 2013, 3: e221.
[10] Vatta M, Tennison M B, Aylsworth A S, *et al*. A novel STXBP1 mutation causes focal seizures with neonatal onset [J]. J Child Neurol, 2012, 27(6): 811-814.
[11] Han G A, Malintan N T, Collins B M, *et al*. Munc18-1 as a key regulator of neurosecretion[J]. J Neurochem, 2010, 115(1): 1-10.
[12] Sheets L, Trapani J G, Mo W, *et al*. Ribeye is required for presynaptic Ca(V)1.3a channel localization and afferent innervation of sensory hair cells[J]. Development, 2011, 138(7): 1309-1319.
[13] Genc O, Kochubey O, Toonen R F, *et al*. Munc18-1 is a dynamically regulated PKC target during short-term enhancement of transmitter release[J]. Elife, 2014, 3: e01715.
[14] Cijsouw T, Weber J P, Broeke J H, *et al*. Munc18-1 redistributes in nerve terminals in an activity- and PKC-dependent manner[J]. J Cell Biol, 2014, 204(5): 759-775.

(收稿:2014-09-17;修回:2014-10-27)
(编辑 张 维)

(上接438页)

大鼠脑组织中的MMP-2、MMP-9含量。采用Mias图像处理系统,每组大鼠各取1张免疫组化切片,每张随机选取5个视野,分别测定MMP-2、MMP-9的光密度值,计算MMP-2、MMP-9阳性细胞的百分率,然后取平均值作为统计数据。

1.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 19.0统计软件行 t 检验。

2 结果

大鼠脑缺血6、12 h时,E组脑组织中MMP-2及MMP-9表达明显升高($P<0.05$)。在同一时间,与其他各组相比较,E组MMP-2及MMP-9的表达差异均有统计学意义($P<0.05$,表1、2)。

表1 各组大鼠不同缺血时间脑组织MMP-2的表达
($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	光密度		面密度	
	6 h	12 h	6 h	12 h
A组	214.5±4.4[a]	220.5±4.3[a]	10.5±1.3[a]	10.6±3.3[a]
B组	215.1±5.1[a]	219.5±5.1[a]	10.2±1.8[a]	10.5±4.3[a]
C组	165.5±5.5[a]	168.5±2.2[a]	39.7±4.8[a]	40.3±4.1[a]
D组	145.5±3.6[a]	148.5±5.4[a]	33.3±5.1[a]	33.7±4.1[a]
E组	105.5±5.5	105.8±6.2	50.7±4.6	50.3±4.7

a:$P<0.05$,与E组比较

表2 各组大鼠不同缺血时间脑组织MMP-9的表达
($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

组别	光密度		面密度	
	6 h	12 h	6 h	12 h
A组	214.3±4.4[a]	219.5±3.3[a]	10.5±3.3[a]	10.6±3.3[a]
B组	214.2±4.9[a]	219.6±4.9[a]	10.2±3.8[a]	10.5±4.3[a]
C组	165.4±5.5[a]	168.4±2.7[a]	39.3±4.2[a]	39.2±4.1[a]
D组	145.6±3.6[a]	148.3±5.2[a]	33.3±5.2[a]	33.7±4.3[a]
E组	105.4±5.5	105.3±4.2	50.7±4.6	50.3±4.7

a:$P<0.05$,与E组比较

3 讨论

异丙酚是临床常用麻醉药物之一,具有起效快、代谢快及副反应少等特点。应用异丙酚后,细胞内钙离子水平及血脑屏障的通透性均受到较大影响。本实验观察异丙酚对SD大鼠脑微血管内皮细胞紧密连接蛋白MMP-2、MMP-9表达的影响,探讨异丙酚对脑组织的保护机制。

本研究结果显示,与异丙酚预处理组、异丙酚治疗组及正常组、假手术组相比较,缺血再灌注组中MMP-2和MMP-9的表达显著升高,表明MMP-2、MMP-9在脑缺血性损伤后表达显著升高,参与脑缺血损伤的病理过程。而异丙酚各组中MMP-2和MMP-9的表达显著降低,说明异丙酚能够抑制大鼠在缺血脑组织中MMP-2和MMP-9的表达,能够保护血脑屏障通透性,证明异丙酚对缺血脑组织具有保护作用。MMP-2及MMP-9是基质金属蛋白酶家族的主要成员,也是脑微血管内皮细胞紧密连接蛋白,可间接体现脑微血管通透性的程度[3]。其中MMP-2被称为明胶酶A,活化的MMP-2能够降解血管周围细胞外基质;MMP-9被称为明胶酶B,具有广泛的生理作用,可调节其他蛋白酶及细胞因子活性,还可与CD44相互结合,并释放TGF-β1的效用。此外,MMP-9还可释放血管内皮生长因子,参与血管生成。

综上所述,异丙酚可以抑制大鼠脑缺血再灌注脑组织紧密连接蛋白MMP-2、MMP-9表达,进而对缺血脑组织进行保护。但本实验时间点较少,观察时间较短,对异丙酚的脑保护作用机制需进一步研究。

参考文献:

[1] Deli M A, Abraham C S, Kataoka Y, *et al*. Permeability studies on *in vitro* blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology [J]. Cell Mol Neurobiol, 2005, 25(1): 59-127.
[2] Narayanasamy A K, Ghori A. Emergence agitation after sevoflurane anaesthesia in children[J]. Br J Anaesth, 2013, 111(1): 121.
[3] Bauer A T, Burgers H F, Rabie T, *et al*. Matrix metallo proteinase-9 mediates hypoxia-induced vascular leakage in the brain *via* tight junction rearrangement[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(4): 837-848.

(收稿:2014-09-10;修回:2014-11-10)
(编辑 栾 嘉)