DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.031
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

文章编号:1000-5404(2004)03-0263-03

综述

神经突触前递质小泡胞吐作用的分子机制

Molecular mechanisms of exocytosis of the neurotransmitter vesicles in neuronal presynapse

刘祚周 (第三军医大学基础医学部生理学教研室,重庆 400038)

神经系统突触小泡的胞吐作用(exocytosis)关系到神经内分泌物质及神经递质的释放。其机制一直是神经科学界关注的问题之一。近年来由于分子生物学手段的进展对于此问题的研究取得了很大成就,分离出许多与此机能有关的蛋白质,它们参与小泡的胞吐过程。

现已证实,存在于小泡固有膜的一些蛋白和突触前膜胞浆内表面存在的一些蛋白,并与钙相联关的蛋白-蛋白互动作用(protein-protein interaction),将小泡的内容释放于突触间隙。

此过程的分子机制较为复杂,它包括许多成份各异的蛋白质,大致可分为两类,即小泡膜的固有蛋白及突触前膜内表面存在的位点。现已明确的有以下几种相关蛋白。

小泡膜蛋白:synapsin;synaptophysin;synaptobrevin;synaptotagmin;在果蝇还有 n-Syb、Syt、d-rab3 等;

突触前膜的结合蛋白:syntaxin 1A;syntaxin 1B;syntaxin 2;syntaxin 3;syntaxin 4;syntaxin 5;SNAP-2;在果蝇,SED5,PEP12,SEC1;另外还有一种蛋白 NSF(N-methylmaleimide-sensitive factor),它的溶解成份 SNAP(soluble NSF attachment protein)在胞吐过程中起作用。

NSF 是一种 ATP 酶,上面提到它以溶解的 SNAP 形式发挥作用,可促进小泡与靶成分之间的融合(fusion)。SNAP 不直接与膜结合,但它可与膜的特异受体(SNARE)接触发挥作用[1]。SNARE 有两种形式,一种存在于小泡膜,称为 v-SNARE,它可与 syaptobrevin 等结合形成复合体。另一种存在于突触前原浆膜,写作 t-SNARE,与 syntaxin 或 SNAP-25 结合,构成一种复合物,这两种复合物配对,可能就是小泡向突触前膜"入坞"(docking)或融合的可能机制之一。

1 Syntaxin

Syntaxin 是存在于神经元轴突末梢原浆膜上的一种有活性蛋白。首先是由 Rothman 实验室的 Bennett 等分离出来并定名的[2],现已被克隆出数种异构体,即 syntaxin 1A、1B 和 2、3、4、5 等,总称之为 syntaxin 家族。它们的氨基酸排列约有 80% 重复(表 1)。

Syntaxin 的分子量为 35×10^3,故 syntaxin1A 也称 P35A,syntaxin 1B 称 P35B。

它们在大鼠不同脑区分布亦有研究,其分布的密度见表 2。

表 1 Syntaxin 家族相同氨基酸序列(%)

	Syn 1A	Syn 1B	Syn 2	Syn 3	Syn 4	Syn 5
Syn 1A	—	84	63	64	46	23
Syn 1B	91	—	64	61	48	23
Syn 2	79	32	—	63	44	21
Syn 3	77	77	79	—	41	22
Syn 4	65	67	67	62	—	26
Syn 5	46	45	44	46	45	—

表 2 大鼠不同脑区 syntaxin 1A 和 1B 免疫反应密度

脑区	Syntaxin 1A	Syntaxin 1B
嗅球神经层	+ + + +	+
嗅球小球层	+ + + +	+ +
嗅球外丛状层	+	+ + + +
海马爱蒙氏角	+ + +	+ + + +
海马伞	+ + +	+
杏仁复合体	+ + + +	+ + +
大脑新皮层	+ + + + +	+ + +
丘脑内侧核群	+ + + +	+ +
丘脑外侧核群	+ + + +	+ +
脊髓灰质Ⅰ Ⅱ层	+ + + + +	+ +
垂体后叶	+ + +	+ + +

Syntaxin 1A 的免疫活性在大鼠海马的检出部位为起层、辐射层、分子层和 fimbria。syntaxin 1B 强的表达在苔状纤维(mossy fiber),锥体细胞层和齿状回的颗粒层细胞层则无明显的表达[3]。可见 syntaxin 主要存在于海马神经元突触前的一些传入纤维之中。

Smirnova 等[4]曾报道,syntaxin 参与海马 LTP 诱导突触可塑性,也提示海马 LTP 在联合学习中 syntaxin 可能是参与信息储存的形式之一。在大鼠的实验中观察到,在学习记忆建立过程中,基因编码的 syntaxin 1B 的表达在海马等脑区有明显的增加,作者认为 syntaxin 是对于在神经网络学习诱发的可塑性的一种强的分子标志物。

在海马苔状纤维的突触建立起 LTP 可增加 syntaxin 1B 水平。但利用 NMDA 受体拮抗剂,阻断 LTP 时 syntaxin 1B 的增加和谷氨酸的释放有所降低。又有证明在大鼠诱发的 LTP 可以改变齿状回 syntaxin 3 异构体的表达。LTP 诱导 6 h 后,syntaxin 1B 和 syntaxin 3AmRNA 水平明显增加,而 syntaxin 3BmRNA 很快降低。看来 syntaxin 3 的异构体在海马 LTP 时呈交互性变化[5]。

关于 syntaxin 家族,近来被发现的成员还有几种,被命名的有 syntaxin 11,它主要是在分子结构缺少一个 C 端的透膜区段[6]。Syntaxin 12 主要存在于红细胞浆质(Endosome)。在人体还发现 syntaxin 16 (Hsym16),其多肽编码有 307 个氨基酸,它分

作者简介:刘祚周(1922—2004),男,辽宁省辽阳市人,教授,主要从事痛觉调制基础方面的研究,发表论文 40 篇。电话:(023)68752254
收稿日期:2002-05-16;修回日期:2003-01-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

布并不广泛，只是在心脏和胰脏占优，它表达于高尔基器。又有证明 syntaxin 16 又有 ABC 3 种亚型，它们有不同的细胞内转运机制。

2 SNAP-25

存在于突触前膜原浆内表面的活性蛋白 SNAP-25 是带有 25×10^3 的突触体结合蛋白-25（synaptosome-associated protein-25）的缩写。据认为，SNAP-25 本身缺乏疏水区段，因而它不能直接透入膜内，它是在一些半胱氨酸（cysteine）残基上，通过软脂酸酯形成（palmitoylation）才能透入细胞膜内，在小泡入坞方面起一定作用。并认为 SNAP-25 的软脂酸酯形成区段在膜的锚定很稳定[7,8]。

在培养的大鼠小脑胶质细胞见到一种与 SNAP-25 类似物 SNAP-23 的表达。SNAP-23 和 Syntaxin 1 也表达于少突胶质细胞和小胶质细胞。作者认为这些蛋白呈现于胶质细胞，可能与其机能的分泌、吞噬作用和髓鞘生成等有关。

最近 Lazo 等[9]曾克隆全长的人类 cDNA 和 SNAP-23 基因，证明有 8 个外显子（exons）。人类 SNAP-23 可有两种信息类型，即全长信息 SNAP-23（SNAP-23A）和短信息 SNAP-23（SNAP-23B）。这两种异构体的呈现，作为结合蛋白与谷胱甘肽-S-转移酶（glutathion-S-transferase）相融合，并与 syrtaxin 6 发生相互作用，参与小泡的"入坞"。我们认为 SNAP-23 基因的变化，造成小泡-膜融合过程的缺陷，可能与某些神经性疾病的发生有关。动物前脑短时缺血（阻断双侧总颈动脉 5 min）可导致海马苔状纤维层 SNAP-23 免疫活性的增加。

3 Synprint 位点

在突触前膜细胞内表面存在的结合蛋白，如 syntaxin、SNAP-25 与钙通道结合的部位称之为 synprint site[10]。这可能就是所谓的 SNARE 的靶受体（t-SNARE）。经免疫化学研究表明，Syntaxin 等结合的部位在 N-型钙通道 α1B 亚型的原浆环 11 和 111（L11-L111）之间的大环。其全长的 synprint 位点占据 α1B 的氨基酸序列的位置是 718-963；大环的 N-端半段（781-859）和 C-端半段（832-963）分别与 Syntaxin 和 SNAP-25 发生相互作用，其中有 27 个氨基酸重叠。它们的作用与蛋白激酶 C（PKC）和钙/钙调蛋白激酶 11（CaMK11）的磷酸化相关[11]。

据证明，在 N-型钙通道的 synprint 位点的 PKC 和 CaMK11 磷酸化可导致突触传递的抑制[12]。在变异的 CaMK11 敲出的小鼠出现强直刺激的增强效应比原始鼠明显加强，提示 CaMK11 的基础活动的正常作用是递质释放的突触前抑制；这种效应于 CaMK11 对于 synprint site 结合蛋白的阻断作用。在小鼠 CaMK11 转基因编码结构性活动的表现，呈现长时抑制效应（LTD）的增强以及 LTP 的抑制。一般认为 synprint 位点即 SNARE 装配的复合物是递质释放的重要阶段。在突触前膜的结合蛋白 syntaxin 1A 和 SNAP—25 是形成这种复合物的中介物质。这种复合物最终导致与小泡膜固有的活性蛋白如 synaptobrevin 结合。经研究见到在 t-SNARE 蛋白结构有 4 个螺旋小束，而形成两个类似的 Syntaxin 和 SNAP-25 的 N-端和 C-端区段。在 t-SNARE 复合物的螺旋束的中间区域，呈现更加有柔韧性，这种性质可能更容易使 synaptobrevin 和 t-SNARE 复合物之间发生相互作用，促使小泡的融合[13]。

4 细菌毒素的作用

肉毒杆菌毒素是很强的神经毒之一。已明确它有 7 个类型，即 BoNT/A-G，它们都可阻断突触小泡的胞吐作用，而抑制递质的释放。其中 BoNT/A 和 BoNT/E 作用较强，它们对 Syntaxin 和 SNAP-25 产生破坏作用。据证明 BoNT/A 对 SNAP-25 的分子结构的劈开部位在 Gln 197 和 Arg 198 之间；而 BoNT/E 对 SNAP-25 的劈开部位在 Arg 180 和 Ile 181 之间的位置。

最近有报道认为 BoNT/A 比 BoNT/E 在神经系统有更长更强的麻痹作用。在培养的大鼠脊髓细胞见到，BoNT/A 对 SNAP-25 的毒性作用可延续 80 d 以上，而 BoNT/E 的毒性作用不超过 1 d[14]。

5 小泡膜蛋白 synaptotagmin

Synaptotagmin 是与胞吐作用密切相关的小泡膜蛋白之一，最早发现于 20 世纪 90 年代初。synaptotagmin 的分子量为 65×10^3，故也称 P65 膜蛋白。依其氨基酸的数量及排列次序，已证明有 5 个亚型，即 synaptotangmin I-V。

以蛋白激酶联合沉淀法研究证明，P65 磷酸化部位在氨基酸长链的苏氨酸残基（Thr-128），也就是近于透膜部位的原浆区段。Synaptotagmin 与膜结合有 5 个区段，在 C 端两个区段（C2）与钙相关，发生互动作用，在中枢神经突触传递起重要作用。

有研究表明，在纯合的 synaptotagmin 变异小鼠的培养的海马神经元，钙相关递质释放的快速成份明显降低；但是对于不同步的突触活动的 miniature current 无影响。作者认为至少在海马神经元，synaptotagmin 1 是低亲合钙敏感物（Ca^{2+} sensor）介导的递质释放。

6 Synaptobrevin

另一种重要的小泡膜蛋白 synaptobrevin（VAMP）是 Trimble 和 Baumert 等首先克隆并命名的。synaptobrevin 是一种 18×10^3 整合的膜蛋白，在其分子的 C 端有一个透膜区段，锚定于小泡膜，在哺乳动物神经系统它有两种异构体即 synaptobrevin 1 和 2，它们的分子序列有约 77% 氨基酸是重复的。

用在体的原位杂交法对 synaptobrevin 在大鼠不同脑区的表达证明，synaptobrevin 1 主要表达于某些中枢神经核团，调制躯体运动功能。synaptobrevin 2 则更好地表达于与自主神经系统和感觉系统的整合功能相关的一些核团。

在脊髓，synaptobrevin 1 和 2 在一些末梢共存，但是 synaptobrevin 1 的标记在前角神经末梢比后角末梢更多，而 synaptobrevin 2 在后角的标记更优于前角末梢。在运动终板仅含有 synaptobrevin 1[15]。

关于 synaptobrevin 在外周神经的情况也有研究。夹损大鼠的坐骨神经，在夹损部位的近中端，其 synaptobrevin 1 和 2 表达明显升高，在夹损的远端虽也有所增高，但不如近中端明显。作者认为，synaptobrevin 1 和 2 在快速轴突的传递是双向的，可以顺向传递，也可逆向传递（Li 等 1996）。

关于一些细菌的神经毒素对 synaptobrevin 的蛋白分解作用近来也有不少研究。主要关联到破伤风毒素（tetanus toxin）和某类型的肉毒杆菌毒素（BoNT）。据证明破伤风毒素和 BoNT/D，BoNT/F 对 synaptobrevin 1 有强的破坏作用。另有文章报道 BoNT/G 对 synaptobrevin 2 有劈开作用，其劈开的位置在 Ala 81 和 Ala 82 的位置。证明了一些毒素的 synaptobrevin 的切断部位如下：

BoNT/D	Lys 49-Ile 50
BoNT/F	Glu 48-Lys 49
破伤风毒	Gln 66-phe 67

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

7　突触前的相关蛋白与临床神经系统疾病的关系

有研究证明，syntaxin 1A 是一种与(早老素 1)presenilin-1 结合的蛋白，故认为它与 Alzheimer(AD)病的发生有关[16]。测定 AD 病人 4 个脑区(海马、内嗅皮层、尾核和枕叶皮层)的几种突触前蛋白(synaptorevin，synaptotagnin，SNAP-25 和 syntaxin 等)，结果证明小泡膜的两种蛋白在早期 AD 病人的海马比对照组明显降低，而两种突触前膜蛋白与对照组无明显差别。只有 synaptobrevin 在 4 个脑区都显示低落。结果提示，AD 患者的认知机能障碍可能与小泡膜的相关蛋白的欠缺有关。

在测定的精神分裂症患者死后颞叶皮层的突触小泡膜的 synaptotagimin 1，snaptobrevin 1 和 synaptobrevin 2 及原浆膜的 syntaxin 1A 及 SNAP-25 的表达呈现与患者的年龄成负相关(Sokolov 等 2000)[17]。可见，这些蛋白质的不足与精神分裂症的发生和发展有关。

有研究证明，SNAREs 蛋白可呈现于哺乳类的精子之中。它可能在受精过程中参与重要的膜融合作用。Synaptobrevin 为一种 v-SNARE，参与小泡膜的转送作用；而 syntaxin 1 为 t-SNARE，并为钙敏感。SNARE 抗体可抑制 acrosoma(精子顶体)反应及受精，阻止精子与卵子的结合[18]。

还有一些研究者证明，在视网膜的视觉细胞的兴奋传递和松果腺 melanosoma 的褪黑素的释放。肾上腺髓质细胞 adrenalin 和 noradrenalin 的分泌等也有这种机制的参与。

据证明铅中毒可抑制诱发的神经递质的释放，认为与神经细胞的 synaptotagimin 1 的改变相关[19]。

8　小结

在突触前存在的含有不同神经递质或内分泌物质的小泡，在某种因素的激发下(如神经冲动)，迅速向突触前膜内表面靠拢，以特殊的蛋白-蛋白互动作用，发生小泡与突触前膜固有的相关蛋白融合，形成复合体，并在前膜入坞。这种复合物与膜的 N-型钙通道(α1B 亚型)介导，而将递质释放于突触间隙。

在突触前末梢的原浆中固有的 NSF(N-methylmaleimide sensitive factor)需与 α-SNAP(α-soluble NSF attachment protein)共同与 syntaxin 形成复合物。SNAP-25 也与 syntaxin C 端透膜区段融合，形成 t-SNARE，再与小泡蛋白，如 synaptobrevin 配对，而发生小泡递质的释放。另外，ATP 可导致 SNARE 作用后的 syntaxin(图中以 * 表示)不再与 α-SANP，synaptobrevin 或 SNAP-25 相结合。

关键词：突触小泡；胞吐；膜蛋白

中图法分类号：**R**338.13　文献标识码：**A**

参考文献：

[1] Hanson P I, Otto H, Barton N, *et al*. The N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein and alpha SNAP induced a conformational change in syntaxin [J]. J Biol Chem, 1995, 270(28): 16955 - 16968.

[2] Bennett M K, Calakos N, Scheller R H. Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones[J]. Science, 1992, 257(1): 255 - 260.

[3] Ruiz-Montasell B, Aguado F, Majo G, *et al*. Differential distribution of syntaxin isoforms 1A and 1B in the rat central nervous system[J]. Eur J Neurosci, 1996, 8(12): 2544 - 2552.

[4] Smirnova T, Fossier P, Stinnakre P, *et al*. A syntaxin-related protein controls acetylcholine release by different mechanisms in Aplysia[J]. Neuroscience, 1995, 68(1): 125 - 133.

[5] Rodger J, Davis S, Laroche S, *et al*. Induction of long-term-potentiation *in vivo* regulates alternate splicing to alter syntaxin 3 isoform expression in rat dentate gyrus[J]. J Neurochem, 1998, 71(2): 666 - 675.

[6] Tang B L, Low D Y, Hong W. Syntaxin 11: a member of the syntaxin family without a carboxyl terminal transmembrane domain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 245(2): 627 - 632.

[7] Veit M, Becher A, Ahnert Hilger G. Synaptobrevin 2 is palmitoylated in synaptic vesicles prepared from adult, but not from embryonic brain[J]. Mol Cell Neurosci, 2000, 15(4): 408 - 416.

[8] Vogel K, Cabaniols J P, Roche P A, *et al*. Targeting of SNAP-25 to membranes is mediated by its association with the target SNARE syntaxin[J]. J Biol Chem, 2000, 275(4): 2959 - 2965.

[9] Lazo P A, Nadal M, Ferrer M, *et al*. Genomic organization, chromosomal localization, alternative splicing and isoforms of the human synaptosome-associated protein-23 gene implicated in vesicle-membrane fusion processes [J]. Hum Genet, 2001, 108(3): 211 - 215.

[10] Sheng Z H, Retfig J, Takahashi M, *et al*. Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels[J]. Neuron, 1994, 13(2): 1303 - 1313.

[11] Yokoyama C T, Sheng Z H, William A, *et al*. Phosphorylation of the synaptic protein interaction site on N-type calcium channels inhibits interactions with SNARE proteins[J]. J Neurosci, 1997, 17(18): 6929 - 6938.

[12] Mochida S, Sheng Z H, Baker C, *et al*. Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type calcium channels[J]. Neuron, 1996, 17(3): 781 - 788.

[13] Xiao W, Poirier M A, Bennett M K, *et al*. The neuronal t-SNARE complex is a parallel four-helix bundle[J]. Nat Struct Biol, 2001, 8(4): 308 - 311.

[14] Keller J E, Neale E A. The role of the synaptic protein SNAP-25 in the potency of botulinum neurotoxin type A[J]. J Biol Chem, 2001, 276 (16): 13476 - 13482.

[15] Li J Y, Edelmann L, Jahn R, *et al*. Axonal transport and distribution of synaptobrevin Ⅰ and Ⅱ in the rat peripheral nervous system[J]. J Neurosci, 1996, 16(1): 137 - 147.

[16] Smith S K, Anderson H A, Yu G, *et al*. Identification of syntaxin 1A as a novel binding protein for presenilin-1[J]. Brain Res Mol Brain Res, 2000, 78(1 - 2): 100 - 107.

[17] Sokolov B P, Tcherepanov A A, Haroutunian V, *et al*. Levels of mRNA encoding of synaptic vesicle and synaptic plasma membrane proteins in the temporal cortex of elderly schizophrenic patients[J]. Biol Psychiatry, 2000, 48(3): 184 - 196.

[18] Ramalho-Santos J, Moreno R D, Sutovsky P, *et al*. SNAREs in mammalian sperm: possible implication for fertilization[J]. Dev Biol, 2000, 223(1): 54 - 69.

[19] Bouton C M, Frelin L P, Forde C E, *et al*. Synaptotagmin I is a molecular target for lead[J]. J Neurochem, 2001, 76(6): 1724 - 1735.

(编辑　刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net