101－113.
[14] Muzio, M. et al., 1995, *Cell*, **85**: 817－827.
[15] Vojtek, A, B. et al., 1993, *Cell*, **74**: 205－214.
[16] Wu, Q. et al., 1997, *EMBO J*. **16**: 1656－1669.
[17] Aelst, SV. et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**: 6213.
[18] Gyuris, J. et al., 1993, *Cell*, **75**: 791.
[19] Chinnaiyan AM. et al., 1995, *Cell*, **81**: 505.
[20] Zervos AS. et al., 1993, *Cell*, **72**: 223.
[21] 文立民等，军事医学科学院院刊，1997，**21**(3)：197.
[22] 叶棋浓等，科学通报，1998，**43**(1)：59－63.

神经递质释放的胞吐过程膜融合机制的新观点

李 亚* 吴馥梅
（南京大学生物科学与技术系 南京 210093）

胞吐作用(exocytosis)是与胞吞作用(endocytosis)方向相反的细胞活动过程，前者是细胞将某种要释放或分泌的物质排到细胞外面，后者是物质进入细胞的过程。胞吐作用是真核细胞一种极复杂的机能活动，是某些物质从细胞中释放或分泌的共同途径。例如：胰腺消化酶原的分泌，胰岛素从β-细胞的分泌、多肽激素从垂体细胞的分泌以及神经递质从神经末梢的释放等，分泌颗粒或突触小泡都是通过可调节性的胞吐作用排出其内含物。触发胞吐作用的外部信号或胞内信使则因细胞类型不同而异。鉴于胞吐作用的普遍性与重要性，对其作用过程及分子机制的研究已成为多学科注意的一个热点问题，近若干年取得不少进展，从不同的角度已有专题综述[1-3]。本文着重介绍膜融合过程的几种作用方式及新提出的观点。

一、胞吐作用的基本过程

神经信息传递、酶的释放及激素分泌都涉及胞吐作用的高度精细调节的细胞活动过程。在所有真核细胞中，胞吐作用有结构性和调节性两类：结构性胞吐途径是连续不断进行的过程，小泡从高尔基网芽生出来并与质膜融合，向质膜提供新合成的脂质和蛋白，这也是分裂前细胞增大时质膜生长的一个途径，另外，一些释放出来的蛋白可扩散到细胞外液中，去营养其他细胞或给其他细胞以信号；调节性胞吐途径是细胞内产生大量的分泌小泡，它们包含一些特定物质如激素、粘液或消化酶等，小泡由高尔基网上芽生出来后在质膜处积累，当细胞受到细胞外刺激时，即释放其内含物；如当血糖增加时，β-细胞分泌胰岛素就是一个典型的事例。自从70年代以来，对突触小泡释放神经递质方式已有大量研究，确定了胞吐作用是其释放机制。Heuesr 和 Reese 等利用电生理方法与电子显微镜技术相结合，详细研究了胞吐作用释放神经递质过程的形态学变化，后来提出了突触小泡膜重复循环(recycling)的假说。根据对神经-肌肉接点上突触小泡变化的观察结果，Miller 和 Heuser 提出小泡膜循环可能有两种途径。后来，有人将突触小泡通过胞吐作用释放神经递质以及小泡膜循环的全过程分为贴靠(docking)、启动(priming)、融合(fusion)等9个步骤[4]。总之，在特定信号的触发下，突触小泡或分泌颗粒移向释放位点的质膜，通过胞吐作用将递质或分泌物排出。在这个过程中，融合是一个关键性步骤，长时间以来，普遍接受的观点是：在融合过程中小泡膜与细胞质膜完全掺合(incorporation)，然后质膜上多余的膜再通过胞吞作用进入胞内并逐步恢复成小泡。有人利用果蝇的神经-肌肉接点进行研究，其结果提示：突触小泡的胞吐作用及膜重复循环过程有两个明显不同的阶段，利用突变体的突触末梢

* 为吴馥梅教授研究室访问学者，工作单位：曲阜师范大学生物系生理教研室，山东曲阜，273165。

发现既有 Ca^{2+} 依赖性步骤又有非 Ca^{2+} 依赖性步骤参与这一过程[5]。两种步骤都与小泡膜上不同的泡融蛋白(synaptotagmin,SG)有关,它们通过对小泡和质膜的双重作用,促使小泡和质膜由半融合状态转变成完全融合状态[6]。

二、胞吐作用的分子基础

胞吐作用的分子机制是诸多学科关注的热点,虽已发现许多分子参与这一过程,但其关键分子尚不清楚。近年来有关神经递质释放的胞吐分子机制已取得一些重要研究进展,尤其是突触小泡膜蛋白及突触前末梢质膜蛋白的分离纯化、鉴定以及对其功能作用的研究获得了许多有意义的资料。例如,SNARE 学说的提出使得神经递质释放及细胞分泌作用机制的研究有了突破点。所谓 SNARE 是 SNAP 受体的简写,而 SNAP 则是 NSF 附着蛋白(NSF-attachment protein),NSF(NEM Sensitine Factor,NSF)为一种细胞膜融合机器(Fusion machine)。它含有 ATP 结合区及具有 ATP 酶活性,只有与 SNAP 相结合才发挥作用。但是,SNAP 首先与膜上的 SNAP 受体(即 SNARE)结合以后才与 NSF 相结合,SNARE 相当于识别分子。SNARE 学说认为:突触小泡或分泌小泡的融合过程与 SNARE 有关,在小泡膜上有 v-SNARE,在神经末梢质膜上有 t-SNARE,而 SB 蛋白(synaptobrevin,SB,即突触小泡连接膜蛋白 VAMPs)相当于是 v-SNARE,syntaxin(质膜上一种固着蛋白)相当于 t-SNARE,Syntaxin 与 SNAP-25(一种质膜固着蛋白)紧密结合,形成与 SB 高亲和力结合位点,随后三者形成稳定的核心复合物(图 1)。此复合物形成后成为 NSF 和 SNAP 的受体。需要指出,SB、Syntaxin 和 SNAP-25 单独不与 SNAP 结合,形成复合物后才成为后者高亲合力受体[7]。可以肯定,几种蛋白相互结合形成 NSF-SNAP-SNAREs 复合体,是膜融合的核心组分,参与膜融合的机制[8,9]。但是,目前认为 SB/SNAP/NSF 三者形成稳定的核心复合物直接参与融合过程,并在贴靠与融合之间的某个环节中起关键作用[10,11]。总之,在真核细胞中,所有类型的分泌小泡对胞内细胞器膜和细胞质膜的定位融合,依赖于一族 SNARE 的跨膜蛋白。在小泡膜上的 v-SNARE 被在靶膜胞质面的 t-SNARE 专一地识别。可以确信,每一个靶膜和每一类型运输小泡都带有独特的 SNARE,而且与互补 SNARE 之间的相互作用保证了小泡只和正确的膜融合。

其实,近年来许多研究资料都说明胞吐作用的膜融合过程非常复杂。有人将膜融合过程归纳为:小泡贴靠—两膜接触—膜蛋白和膜脂融合—融合孔开放—融合孔扩大—小泡排放内含物 6 个步骤。同时,关于融合孔(Fusion pore)的本质也有三种说法:1)蛋白质介导的缝隙连接(gap junction)样的孔道;2)蛋白质与脂质构成的小孔;3)单纯的脂肪性小孔。有很多蛋白质分子参与融合过程,但很难区分介导贴靠和介导融合的蛋白质成分[12]。对神经递质释放而言,有多种突触蛋白参与胞吐作用的局部自主调节过程。这些蛋白包括突触素(synapsin)、SY 蛋白(synaptophysin)、SO 蛋白(synaptoporin),SG 蛋白等等,这些蛋白质的可能作用已有专题综述[13],这里不作介绍。具有分泌功能的松果腺细胞(pinealocytes)含有突触小泡样的微泡(microvesicles),鉴于突触小泡的几种膜蛋白(如 SG 蛋白、SB 蛋白等)是参与胞吐作用的重要分子,所以 Redecker 分析了松果腺细胞中微泡的分子组成。其结果表明:大鼠和沙土鼠(gerbil)松果腺细胞的微泡也含有突触小泡的某些膜蛋白[14]。这一结果说明,激素分泌与神经递质释放的胞吐作用有共同的分子基础。

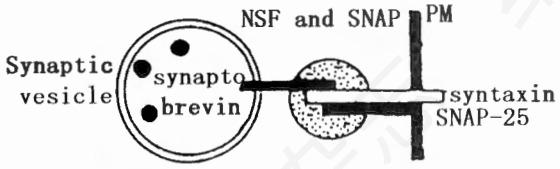

图 1 小泡贴靠及核心复合物的形成

三、胞吐过程中膜融合方式的不同观点

前面已经提到，长时间以来普遍接受的观点是小泡膜与质膜完全融合(total fusion)(图2A)，质膜上多余的膜经过胞吞作用进入胞内，再恢复成小泡。然而，近年来有人根据“原子力显微术”(atomic force microscopy)观察胰腺腺泡细胞(acinar cell)得到高分辨率图像提出重新考虑胞吐作用的膜融合过程[15]。认为小泡膜与质膜是一种瞬变式融合(transient fusion)(图2B)。这一现象在神经细胞释放神经递质与外分泌和内分泌腺细胞释放分泌物是相类似的。从生物学观点来看，经过长期生物进化过程使生命活动形成了高度精确可靠而又经济有效的运转机制，对胞吐的膜融合过程来说，为什么通过两膜完全融合以消耗更多的能量去释放小泡内含物而不通过瞬变式融合去达到同样的目的呢？后一种方式不是对细胞更有利吗？这个问题的提出显然是很有意义的[16]。Neher在一篇评论中曾经指出：激素分泌和神经递质释放时两膜合并再以循环的方式经过一定时间以后恢复，看起来这是极高的浪费[17]。总的看来，支持完全融合与支持瞬变式融合的观点都各有实验证据。有关膜融合方式的具体说法也很多，例如有人用“半融合机制”(hemifusion mechanism)来解释胞吐融合孔的形成，某些蛋白质支架(protein scaffold)对融合孔起调节作用，GTP结合蛋白可以激活蛋白质支架的组装，引起小凹穴形成[1]。又如，有人认为胞吐作用中小泡膜的恢复有慢速与快速之分，前者是通过重复循环的方式，后者则通过“吻合并离去”(kiss and run)的方式[2]。还有人认为，神经递质的快速释放以后，小泡膜通过胞吞作用进行快速循环，并且认为笼形蛋白(clathrin)、动力蛋白(dynamin)以及新发现的一种神经末梢蛋白质synaptojanin起着重要的作用[18]。

细胞质膜电容量大小与膜表面积成比例的变化，分泌细胞质膜电容量的阶梯式变化过去一直作为解释胞吐作用以后小泡膜完全并入质

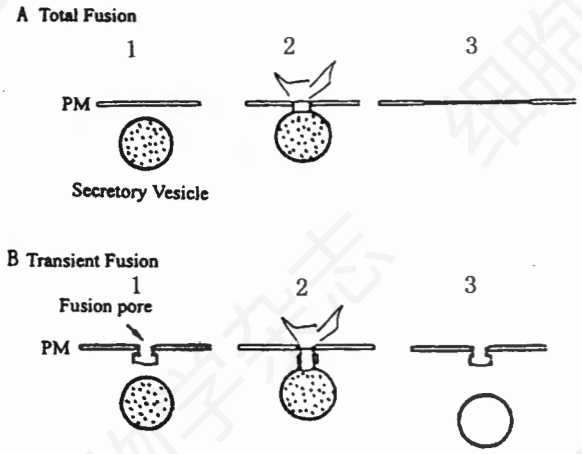

图2 A完全融合 分泌小泡膜与细胞质膜完全合并
B瞬变融合 分泌小泡膜在细胞质膜的特定位置，释放小泡内容物

膜的证据。现在有人重新解释这种现象，认为一些小泡在质膜上瞬变式融合后又离开，另一些小泡接着再与质膜瞬变式融合，如此相继进行，于是引起质膜电容量的阶梯式增大。也就是说，分泌小泡在离开膜之前由各个小泡与质膜相继进行瞬变融合的结果。在慢速分泌细胞(如小鼠胰腺细胞)上已观察到瞬变式融合的胞吐作用；对快速分泌细胞(如神经细胞或肥大细胞)有人认为既要考虑节省时间又要考虑节省能量，因而以瞬变式融合的可能性更大[16]。用原子力显微术对胰腺腺泡细胞的观察发现细胞质膜上有一种复杂而又规则排列的凹陷，这些凹陷分布在腺泡细胞顶部，那里正是胞吐分泌的部位，根据凹陷形态大小变化的分析，说明胞吐作用只有瞬变式的膜融合。瞬变式融合即使不是胞吐作用的唯一机制，也可能是普遍存在的一种形式，也许只有在质膜的特别部位(如质膜受体、离子通道、转运体等)才发生完全膜融合。另外，近来Solsona等人对肥大细胞施加一定的流体静水压，使其充胀，结果发现充胀细胞能够可逆性地折开其构造，以调制胞吐融合作用。在细胞恢复它的正常大小过程中，细胞内胞质液重新聚集成为融合孔骨架，这可以防止胞内酶、蛋白质的流失，并且融合孔的活动性对

质膜的张力非常敏感[19]。

鉴于 Ca^{2+} 是细胞的多功能信使，Ca^{2+} 常常作为触发信号引起胞吐作用（如神经递质释放），目前已发现细胞膜表面的钙受体不仅对胞外游离 Ca^{2+} 浓度起调节作用，而且参与某些重要的生理与病理过程[20]。因此，很可能，在胞吐过程中膜表面的钙受体也参与了膜融合机制，这方面的问题很值得进一步开展研究。

参 考 文 献

[1] Monck, JR. et al., 1994, *Neuron*, **12**: 707－716.
[2] Schweizer, FE. et al., 1995 *Neuron*, **14**: 689－696.
[3] 崔宗杰，1996，生理科学进展，**27**(3)：233－237.
[4] Harris, KM. et al., 1995, *Neuropharmacolopy*, **34**(1)：1387－1395.
[5] Ramaswami, M. et al., 1994, *Neuron*, **13**: 363－375.
[6] Li C, 1995, *Nature*, **375**: 594－599.
[7] McMahon HT, et al., 1995, *J Biol. Chem.* **270**: 2213－2217.
[8] 宋玲，陈宜张，1995，神经科学，**2**(1)：22－45.
[9] 徐晓虹，吴馥梅，1997，细胞生物学杂志，**19**(3)：123－128.
[10] Okamoto M et al., 1997, *J Bio. chem.* **272**(50)：31459－31464.
[11] Nakata T, et al., 1998, *J cell Bio*, **140**(3)：659－674.
[12] Calakos, N. et al., 1996, *Physiol. Rev.*, **76**(1)：1－29.
[13] 吴馥梅等，1997，生物化学与生物物理进展，**24**(3)：211－214.
[14] Redecker, P. 1996, *Ceell Tissue Res.*, **283**: 443－454.
[15] Schneider, SW. et al., 1997, *Proc. Natl. Acad, Sci USA*, **94**: 316－321.
[16] Jena, BP, 1997, *Cell Biol. International*, **21**(5)：257－259.
[17] Neher, E, 1993, *Nature*, **363**: 497－498.
[18] De Camilli, P, et al., 1996, *Neuron*, **16**: 481－486.
[19] Solsona C, et al., 1998, *Biophys. J*, **74**: 1061－1073.
[20] 王玺，1998，国外医学：分子生物学分册，**20**(3)：122－126.

神经干细胞和祖细胞

刘仕勇 杨 辉

（第三军医大学新桥医院神经外科 重庆 400037）

利用细胞培养技术分离的神经干细胞和祖细胞是近年来研究的热点之一。1988 年 Frederken 等将癌基因 c-myc 和 sv 40 大抗原（sv 40 large antigen）转入发育中的胚胎细胞而获得了永生性神经祖细胞（Immortalized neural progenitor cell），并证明它们在体外培养时具有无限增殖能力，移植到体内可分化为神经元细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞。由于此类细胞具有干细胞样属性，因此有学者称作神经干细胞[1,2]。此后，Reynolds 等利用无血清细胞培养直接从胎鼠和成年大鼠分离出具有干细胞属性的细胞群，由于此类神经干细胞须在具有丝裂原作用的生长因子刺激下才能维持干细胞特性，因此被称为生长因子维系的（Growth factor extended, GFE）神经干细胞[3-7]。

一、神经干细胞和祖细胞的定义及其属性

作为干细胞（stem cell），它应具有以下属性：(1)自我维持和自我更新的能力；(2)具有多种分化潜能，能分化为本系大部分类型细胞；(3)增殖分裂能力；(4)这种自我更新能力和多分化潜能可以维持相当长的时间，甚至终生；(5)对损伤和疾病具有反应能力[7,8]。而作为神经干细胞（neural stem cell），据 Mckay1997 年在 Science 上发表的文章，就是指具有分化为神经元细胞、星形胶质细胞、少突胶质细胞的能力，能自我更新并足以提供大量脑组织细胞的细胞[9]。祖细胞（neural progenitor）是相对于干细胞而言，其分化能力和自我维持、自我更新能

感谢张可成先生对本文的指导。