

用 TdT 法和 NT 法研究细胞凋亡与其他方法相比有以下几个优点: ① 标记反应直接在 DNA 断片的 3'-末端发生, 因而是从分子水平研究凋亡细胞的裂解; ② DNA 断裂是在凋亡的极早期发生, 因而可用来研究凋亡的早期事件; ③ 因为除了测 DNA 断裂还可以测 DNA 含量, 所以测凋亡可以与细胞在循环周期中的位置或染色体的倍数联系起来; ④ 反应可以在固定的细胞上发生, 细胞在乙醇中固定的时间可以变动, 对 DNA 断裂的探测没有影响。这为积累和运送临床标本提供了可能。

TdT 法与 NT 法相比, TdT 更优越: ① TdT 法标记凋亡细胞 DNA, 荧光更强, 因而更敏感; ② 从标记反应的动力学看, TdT 更快, 30 分钟的孵育时间就足够了, 而 NT 法则须几个小时^[6]。

凋亡早期阶段细胞的分离和它们早期裂解的探测有助于弄清凋亡过程的早期步骤。从形态上看, 染色质结构的早期变化很重要, 早期变化形成 300-50 kbp 的 DNA 片段, 用原位缺口平移法和流式细胞术可以探测到。这有助于我们发现启动染色体断裂的因子。

凋亡所涉及基因的蛋白产物的抗体已经获得, 用流式细胞术研究细胞周期循环和诱发凋亡基因的表达将是一个富有成果的研究领域^[7]。

摘 要

本文综述了目前使用流式细胞术研究细胞凋亡的几种方法。即 Hoechst-PI 染色法、选择性光解法、乙醇抽提法、吖啶橙(AO)染色法、末端标记法、缺口平移法。简要介绍了这几种方法的原理和优缺点。

参 考 文 献

- [1] Schmid, I. et al., 1994, *Cytometry*, 15, 12-20.
- [2] Gorczyca, W. et al., 1993, *Exp. Cell Res.*, 1993, 207: 202-205.
- [3] Telford, W. G. et al., 1994, *J. Immuno. Meth.*, 172: 1-16.
- [4] Xun, L. et al., 1994, *Cancer Res.*, 54, 4289-4293.
- [5] Sgonc, R. et al., 1994, *TIG*, 10 (2).
- [6] Gorczyca, W. et al., 1993, *Cancer Res.*, 53: 1945-1951.
- [7] Ormerod, W. G., 1994, *CMB*, 1: 35-43.

突触小泡膜蛋白—SB 蛋白的若干研究进展

徐晓虹* 吴馥梅

(南京大学生物科学与技术系神经生物学研究室 210093)

突触是神经信息传递的关键结构, 化学突触的信息传递通过突触小泡释放神经递质而完成。神经冲动到达突触前末梢引起 Ca^{2+} 快速内流, Ca^{2+} 触发突触小泡沿突触前膜贴靠并与其融合, 经胞吐作用向突触间隙释放递质, 然后小泡膜进入再循环(recycling)而重新被利用。鉴于突触在信息传递中的重要性, 人们从形态学、生理学、药理学及生物化学多种途径对突触结构和功能进行了大量研究。目前, 已

从突触的亚微结构层次向分子水平深化, 其中关于突触前末梢内各种蛋白质的分离纯化、鉴定以及对其作用机理的研究引起了广泛的重视, 取得了令人瞩目的进展。尤其在突触小泡向突触前膜移动、接近(approach)、停靠(docking)、融合(fusion)及胞吐作用等一系列步骤的动态过程中, 各种类型的突触蛋白究竟

* 吴馥梅教授实验室的访问学者, 工作单位为浙江师范大学生物学系。

起着怎样的作用,正是当前人们注意的热点问题。

一、几种重要的突触蛋白简介

突触区的蛋白质种类非常多,已经研究报道的蛋白质(包括酶)有数十种,其中也有同一种蛋白质在研究过程中有不同命名的情况。例如,B-50蛋白曾有多种名称(如 F_1 蛋白、 P_{67} 蛋白、GAP-43蛋白等),现已证实为同一种蛋白质,是PKC的底物,浓集于发育中的神经生长锥和成熟神经元的突触前末梢,是与神经信息传递和突触可塑性有关的重要蛋白质。近年来,围绕神经递质从突触小泡排放的分子机制,不断报道了一些突触蛋白的作用,甚至提出一些推论和假说。有些突触蛋白目前在我国还没有统一固定的译名。例如,synapsin 1过去称为蛋白质I,现已译为突触素I^[1],是突触小泡外侧表面的特异性膜蛋白,并且是多种蛋白激酶的底物,通过其分子磷酸化及脱磷酸化的可逆过程对突触小泡释放神经递质起调节作用。又如,synaptophysin^[2,3],常简称为SYP蛋白,已被译成突触泡膜素^[1],也是突触小泡的特异性膜蛋白,其分子由307个氨基酸组成,有4个跨膜区段,其生理生化特性的研究提示,它可能作为胞吐过程的融合孔组成成分或作为膜通道成分而参与突触小泡的转运和递质的释放,并且是以 Ca^{2+} 依赖性的磷酸化作用方式参与调节过程^[4]。再如,synaptotagmin又称 p_{65} 蛋白^[5],可简称ST蛋白,其分子含有一个跨膜区,功能区段是C端的胞浆肽段。有人认为这种蛋白质实际上是胞吐作用的调节因子,有实验结果提示它作为 Ca^{2+} 的受体或作为协同受体(co-receptor)而起作用^[6]。此外,还有突触小泡通道蛋白synaptoporin^[2,3]、突触前末梢的质膜蛋白syntaxin^[7]以及结合 Ca^{2+} 和磷脂的突触小泡外侧膜蛋白Rabphilin-3A^[8]等,这些蛋白质的作用也正受到重视。另有一类突触小泡膜蛋白synaptobrevin,可以简称为SB蛋白,属突触

小泡膜蛋白(vesicle-associated membrane proteins)家族类,即VAMPs。brevi是“短、小”的意思,也可将synaptobrevin译为突触小蛋白。本文对这类蛋白的一些研究进展作简要的介绍。

二、SB蛋白的性质

从海洋魮鱼(ray)电器官分离的突触小泡中首次发现这类膜蛋白^[9],这是带有一个C末端跨膜区的小蛋白质分子,分子量为18—20KD。在哺乳类动物的神经元至少有两种特异性的异构体表达出来。人们用cDNA克隆来推断这种蛋白质的氨基酸序列,发现枪乌贼大突触内的SB蛋白由125个氨基酸组成,其排列顺序与已知的电鲷(torpedo)、大鼠以及人类神经元内的SB蛋白氨基酸序列具有高度的同一性,特别是与哺乳类有65—68%的氨基酸序列相同。从C末端亲水跨膜区的第40个氨基酸到中心区段的氨基酸序列,在种间具有高度的保守性,但在富含脯氨酸的N末端区却有较大的差异。枪乌贼与哺乳类SB蛋白的长度非常相似,而果蝇的SB蛋白却有独特的N和C末端的延长。

SB蛋白为突触小泡膜的特异蛋白,免疫组织化学鉴定表明,枪乌贼巨大突触前末梢内SB蛋白的分布与突触小泡在末梢的超微结构定位完全一致^[10]。

三、SB蛋白在神经递质释放中的作用

1. SB蛋白的裂解抑制递质的释放

最近几年,许多研究都证实SB蛋白参与突触小泡的递质释放过程。已有实验表明:强烈抑制神经递质释放的破伤风毒素(TeTox)和肉毒杆菌毒素(BoTox)是通过 Zn^{2+} 蛋白酶特异性地引起SB蛋白分解而起抑制作用^[11-13]。TeTox和BoTox神经毒素是由两条以二硫键相连的多肽链组成:一条重链与神经质膜相

连,另一条轻链(LC)具有蛋白酶活性^[13]。有人报道哺乳类的SB蛋白2能选择性地被TeTox和BoTox轻链在第76个氨基酸的谷氨酰胺残基处裂解,且裂解位点附近的氨基酸序列具有高度的保守性^[12]。为了验证枪乌贼的SB蛋白是否真正被这些神经毒素的含Zn²⁺蛋白酶裂解,有人用两种形式的SB蛋白(即枪乌贼突触小泡制备提取的天然SB蛋白和细菌表达产生的蛋白)分别与TeTox和BoTox轻链一起孵育,结果发现枪乌贼的SB蛋白确实被神经毒素裂解^[9]。而神经毒素的蛋白酶水解功能密切依赖于Zn²⁺的激活作用和二硫键的解离作用,使其轻链游离而引起SB蛋白裂解。

为了进一步证实SB蛋白的裂解确实抑制神经递质的释放作用,一些研究者在枪乌贼巨大神经末梢内注射一系列作用于SB蛋白的特异性药物。首先微注射TeTox毒素轻链,对递质释放产生了一种缓慢而不可逆的抑制作用;单独注射空白缓冲液或非还原性毒素,对递质释放不产生影响。若与毒素一同注射一种含有SB蛋白裂解位点的短肽,则可防止TeTox轻链对递质释放的抑制作用。这表明TeTox毒素的轻链对SB蛋白的裂解作用确是阻断神经传递的原因^[14]。用BoTox B代替TeTox进行以上实验,结果相类似,但BoTox B产生抑制效应的速度始终比TeTox缓慢。借助于细胞内微电极技术,记录突触前动作电位,再测试由此引起的突触后电位(PSP)的变化,就可验证这一结果。当注射TeTox以后,约需要35—70分钟就可降低PSP上升率的50%;而注射BoTox则需120—280分钟才降低PSP上升率的50%。由此可见这些毒素对神经递质释放起抑制作用的限速因素主要是SB蛋白的分解作用速度而不是毒素的扩散速度^[15]。上述实验结果一致证明SB蛋白确实参与了突触小泡释放递质的过程。

2. SB蛋白不影响突触前Ca²⁺浓度

起第二信使作用的Ca²⁺是神经递质释放中一个不可缺少的因素,Ca²⁺进入突触前末梢

可诱发突触小泡释放递质。近年来,SB蛋白参与递质释放过程的机制一直是研究的热点,SB蛋白是否通过改变突触前Ca²⁺浓度而调制递质的释放? TeTox活性实验为SB蛋白在递质释放中的作用提供了一些新见解。有关这类神经毒素作用机制的早期间接实验结论不一。Hirokawa和Heuser曾提出这类神经毒素可减少突触前Ca²⁺内流,而Gundersen等和Dreyer等则发现该毒素对细胞外记录到的Ca²⁺流没有影响。同样,Molgo和Thesleff还曾提出该毒素能改变神经元的Ca²⁺平衡,而McMahon等^[16]则证明该毒素对KCl去极化的突触体内Ca²⁺水平没有影响。为此,Hunt和Bommert等^[14]直接测试TeTox中毒前后单个神经末梢内递质的释放和诱发Ca²⁺瞬间浓度变化的动作电位。他们先在突触前末梢内微注射一种发荧光的Ca²⁺指示剂,当突触前的动作电位产生时,必然会增加这种染料的荧光强度。然后再向突触前末梢微注射TeTox轻链,并定量分析突触前动作电位产生前后该染料荧光强度的变化(ΔF),结果表明荧光强度并没有因动作电位的产生而发生显著变化,其荧光强度变化率($\Delta F/F_0$,即动作电位产生后荧光强度变化值 ΔF 与动作电位产生前所测荧光强度 F_0 之比)仅下降3%,而注射TeTox可使PSP上升率下降90%以上。如果递质释放的抑制作用是通过Ca²⁺水平的下降而引起,那么由动作电位诱发的这种Ca²⁺水平的升高应下降50—90%。因此,Hunt和Bommert等得出结论:SB蛋白并不直接影响突触前末梢的Ca²⁺内流和积累,其参与递质释放过程应该在Ca²⁺流入和积累后的某一环节^[14]。

3. SB蛋白参与突触小泡停靠与融合之间的环节

许多不同研究方法得出的结果都提示:SB蛋白参与了突触小泡的停靠和融合,或者介于停靠与融合之间的中间环节。但有人认为SB蛋白参与了突触小泡的停靠过程^[17]。人们分离鉴定了包括SB蛋白在内的主要突触蛋白

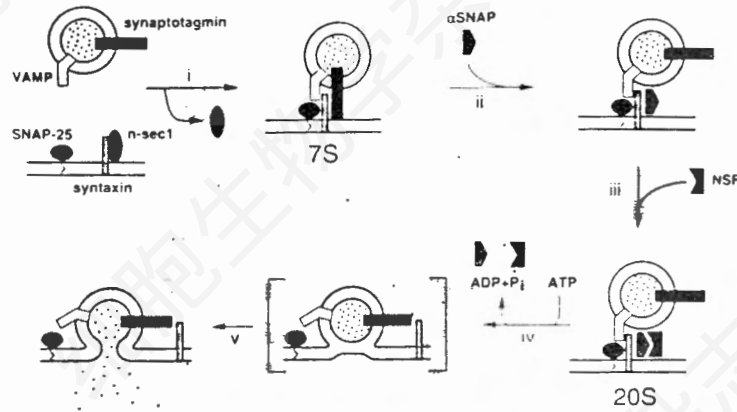


图 在突触小泡停靠和融合过程中 SB 蛋白等蛋白质相互作用模式图^[17]

(n-secl 与 syntaxin 解离导致 7S 颗粒形成, 使小泡停靠(i), 然后 ST 蛋白从 7S 颗粒中解离, 使 α -SNAP(ii)和 NSF 结合(iii), 形成 20S 颗粒。ATP 分解(iv), 20S 颗粒解离导致膜融合, 小泡释放递质。n-secl 与 syntaxin 再结合, 开始新的循环。在这过程中, SB 蛋白(VAMP)与突触前膜 syntaxin 有特异性结合作用。

质, 发现突触小泡的两种膜蛋白(ST 蛋白和 SB 蛋白)与突触前膜两种蛋白(syntaxin 和 SNAP-25)相互作用^[18]。这四种蛋白质在离体条件下形成沉降系数为 7S 的颗粒。突触膜蛋白相互作用形成多体复合物(multimeric complex)而使突触小泡在突触前膜停靠。人们在研究中惊奇地发现: 许多种酵母蛋白在大鼠脑神经末梢具有同源物, 包括 syntaxin、SNAP-25、VAMP、NSF、 α -SNAP 以及 GTP 结合蛋白 Rab-3 等^[19]。在啤酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中已鉴定多个分泌突变体(secretory mutants)。又有研究表明: NSF(酵母 sec-18)和 α -SNAP(酵母 sec-17)是突触小泡融合过程所依赖的两种可溶因子^[20]。有人提出, 在神经末梢内 ST 蛋白从 7S 颗粒解离出来, 可使 α -SNAP 和 NSF 结合形成 20s 颗粒^[18]。ATP 水解时, 20S 颗粒的解离过程就导致突触小泡和突触前膜的融合。因此, 小泡停靠和融合的生化机制似乎是贯穿了整个排放过程。

Pevsner 等研究了几种蛋白质的结合特性, 探测了 SB 蛋白 2, SNAP-25 和 syntaxin 在离体条件下的两两结合作用, 发现 SNAP-25 对 SB 蛋白 2 与 syntaxin 1a 和 syn-

taxin 4 的结合有加强作用, 但对 SB 蛋白 2 与 syntaxin 2 和 syntaxin 3 的结合却没有这种效应, 并且 7S 复合物的这三种组份单独相互结合, 对突触小泡与突触前膜停靠和融合的有关蛋白质活动不起控制作用。在结合蛋白中还有一种 n-secl, 为神经元 syntaxin 的特异结合蛋白, 是酵母 sec 1 p 的同源物, 以纳克分子的亲和性与 syntaxin 结合, 形成复合物, 这种复合物不同于以前鉴定的含 syntaxin 的 7S 和 20S 复合物。这就提示: 突触前膜的 syntaxin 蛋白至少有 3 种存在形式, 即与 n-secl 结合的形式以及在 7S 颗粒和 20S 颗粒中^[17]。重组的 n-secl 能阻止 SB 蛋白或 SNAP-25 与 syntaxin 的结合, 因而人们提出: SB 蛋白或 SNAP-25 与突触前膜 syntaxin 的特异性结合作用介导了突触小泡的停靠, 而且 syntaxin 与 n-secl 的复合物起着引导或调节作用。更确切地说, n-secl 是作为突触小泡停靠的一种调节因子起作用, 即通过抑制 VAMP 和 SNAP-25 与 syntaxin 的结合而起调节作用(详见插图)。

与以上观点不同, Hunt 和 Bommert 等(1994)通过一系列实验, 认为 SB 蛋白没有参与小泡的停靠。他们对微注射 TeTox 毒素轻

链并经长时间孵育使毒素充分抑制递质释放所引起的神经末梢形态变化进行了电镜分析,并以同时注射毒素和阻止毒素作用的短肽的神经末梢作为对照。对比分析后,发现 TeTox 引起递质释放的抑制与突触活性区(active zones, 即递质释放区)内突触小泡数量的显著增加完全一致。为了定量分析突触活动区内 TeTox 对突触小泡空间分布的影响,有人还统计了聚集于突触前膜内侧半径为 50 nm 球形区域的突触小泡密度^[21]。所得结果表明:单独注射 TeTox 毒素轻链而没有裂解位点肽时,在所检测的球形区域内突触小泡数目均显著增加。分析与突触前膜相接触的突触小泡数量发现,在微注射 TeTox 毒素轻链的神经末梢突触活性区,这类小泡数比 TeTox 和裂解位点肽共同注射的神经末梢几乎增加两倍。因此,可以认为毒素并不因其引起 SB 蛋白裂解而抑制小泡的停靠,否则接触突触前膜的小泡数应该减少^[21]。TeTox 阻止递质释放但不影响小泡停靠的事实说明 SB 蛋白一定在小泡停靠后的某一环节中起重要作用。

对以上两种观点,人们提出了一种可能的解释^[14]:小泡停靠可能涉及许多复杂的蛋白质与蛋白质之间相互作用,即一种包含 SB 蛋白在内的蛋白质复合物参与突触小泡的停靠过程。当 TeTox 毒素破坏某一作用环节就会阻止小泡与突触前膜的接触从而阻碍它们之间产生融合。鉴于 TeTox 是裂解枪乌贼 SB 蛋白的 85—86 残基的神经毒素,有人推测其 1—85 氨基酸(特别是 SB 蛋白分子中高度保守的中心区段)对于其功能是很重要的。但 Hunt 发现将 SB 蛋白的氨基酸序列中两个表面暴露段(即残基 47—61 和 59—79 短肽)注射到神经末梢时,则对递质释放没有影响。因此提出假设:SB 蛋白参与小泡停靠后的过程是经 N 末端区段与 SNAP/NSF 相互作用而直接参与小泡与质膜融合过程的某一环节。但因目前对突触小泡在停靠和融合之间的反应过程还不清楚,所以,对于 SB/SNAP/NSF 复合物是直

接参与融合过程还是只作用于小泡停靠与融合之间的某一环节这一问题还有待进一步研究确定。

然而,目前有关递质释放调节机制的研究报道犹如雨后春笋,新资料不断涌现。例如,有人认为突触小泡与质膜融合是由半融合机制(a hemifusion mechanism)介导的,某些支架蛋白(scaffold proteins)调节胞吐融合孔的形成,GTP 结合蛋白与钙结合蛋白协同激活融合孔支架蛋白^[22]。已有证据表明:小 GTP 结合蛋白 Rab-5 a 参与神经元的胞吐作用。Rab-5 a 是一种小 GTP 酶,它在小泡膜入胞作用(endocytosis)中起重要作用,调节入胞途径的早期步骤;而另一种小 GTP 结合蛋白 Rab 4 则可能调节再循环的过程^[23]。已经证明突触小泡含有多种 GTP 结合蛋白,还包括 Rab 3,这种蛋白质参与突触小泡在突触前膜的停靠过程,但目前对小泡停靠的分子中介机制并未完全揭示^[24]。而且,在突触小泡膜蛋白中,除本文介绍的 SB 蛋白外,还有几种膜蛋白也协同参与调节递质释放过程。例如,ST 蛋白是一种钙结合蛋白,已译为泡融蛋白^[25]。事实上,突触小泡与质膜融合通过胞吐作用释放递质之后,又由入胞作用进行再循环,最后产生新的小泡被重新利用。在整个循环过程中涉及许多种蛋白质和复杂的级联反应过程,其中动力蛋白(dynamin)在哺乳动物脑组织已鉴定为一种 GTP 酶,神经元的动力蛋白浓集于神经末梢,在突触小泡再循环中起重要作用^[24,26]。已有人提出“吻合并离去”假说(Kiss and Run)用以说明突触小泡再循环的机制^[24,26]。因篇幅有限,这里不作介绍。

摘 要

synaptobrevin(简称 SB 蛋白)属于突触小泡膜蛋白家族(VAMPs),分子量为 18—20 KD,用枪乌贼进行实验,向神经末梢注射破伤风毒素 TeTox 和肉毒杆菌毒素 BoTox,可裂解 SB 蛋白并不可逆地抑制神经递质的释

放,但不影响触发递质释放的突触前 Ca^{2+} 浓度。电镜观察表明,注射 TeTox 的神经末梢,停靠(docking)和末停靠的突触小泡数目均增加。进一步研究证实 SB 蛋白的裂解引起递质释放量减少,但不影响小泡停靠。提示 SB 蛋白可能在突触小泡停靠与融合之间某一环节介导神经递质的释放。

参 考 文 献

- [1] 杜红燕, 吴馥梅, 1995, 生物化学与生物物理进展, 22(5): 422.
- [2] Ovtsharoff W, Bergmann M, Marquze-Pouey B et al., 1993, Dev. Brain Res., 72: 219.
- [3] Bergmann M, Schuster Th, Grabs D et al., 1993, Dev. Brain Res., 74: 235.
- [4] Rubenstein JL, Greengard P and Czernik AJ, 1993, Synapse, 13: 161.
- [5] Koontz MA and Hendrickson AE, 1993, Synapse, 14: 268.
- [6] DeBello WM, Betz H and Augustine GJ, 1993, Cell, 74: 947.
- [7] Sheng ZH, Rettig J, Takahashi M et al., 1994, Neuron, 13: 1303.
- [8] Li C, Takei K, Geppert M et al., 1994, Neuron, 13: 885.
- [9] Trimble WS, Cowan DM and Scheller RH, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 4538.
- [10] Smith SJ, Buchanan J, Osses LR et al., 1993, J. Physiol., 472: 573.
- [11] Huttner WB, 1993, Nature, 365: 104.
- [12] Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, et al., 1992, Nature, 359: 832.
- [13] Sanders D and Habermann E, 1992, Nannyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 346: 358.
- [14] Hunt JM, Bommert K, Charlton MP, et al., 1994, Neuron, 12: 1269.
- [15] Llinas R, Gruner JA, Sugimori M, et al., 1991, J. Physiol., 436: 257.
- [16] McMahon HT, Foran P, Dolly JO, et al., 1992, J. Biol. Chem., 267: 21338.
- [17] Pevsner J, Hsu SC, Braun JEA, 1994, Neuron, 13: 353.
- [18] Sollner T, Bennett MK, Whiteheart SW, et al., 1993, Cell, 75: 409.
- [19] Bennett MK and Scheller RH, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 2559.
- [20] Kaiser CA and Schekman R, 1990, Cell, 61: 723.
- [21] Hess SD, Doroshenko PA and Augustine GJ, 1993, Science, 259: 1169.
- [22] Monck JR and Fernandez JM, 1994, Neuron, 12: 707.
- [23] De Hoop MJ, Huber LA, Stenmark H, et al., 1994, Neuron, 13: 11.
- [24] Schweizer FE, Betz H and Augustine GJ, 1995, Neuron, 14: 689.
- [25] 强梅等, 1996, 生理科学进展, 27(3): 268.
- [26] De Camilli P and Takei K, 1996, Neuron, 16: 481.

研究工作

恒河猴静脉内皮细胞培养的研究

潘玉先 潘明新 何红兵 杨继震

(第一军医大学附属珠江医院普外科血管病研究室 广州 510282)

自从人工血管内皮细胞移植技术引入血管外科领域后,使人工血管置换小口径动脉后的五年通畅率大大提高^[1]。如何获取足量的自体内皮细胞是该技术成功与否的关键。我国人工血管内皮细胞移植研究仅限于低等动物^[2-4],所得结果对临床应用的指导意义十分有限。我们成功建立了稳定的恒河猴血管内皮细胞原代

及传代培养方法。为人工血管内皮细胞移植的临床基础研究奠定了坚实的基础。

材 料 和 方 法

1. 恒河猴静脉内皮细胞的原代培养

采取原位获取法^[6]获取恒河猴(N=10只,8-10 kg,全部为雄性。由华南濒危动物研究所提供)颈