

肉毒神经毒素受体的研究进展*

周建营 施玉樑**

(中国科学院上海生命科学研究院, 上海 200031)

摘要 肉毒神经毒素 (botulinum neurotoxin) 是世界已知毒性最强的生物毒素, 它通过酶切在递质释放过程中起关键作用的 SNARE 蛋白, 抑制神经递质释放, 阻断突触传递. 综述了有关肉毒受体研究的进展. 这些研究表明, 肉毒的结合位点有低亲和力的和高亲和力的两种. 肉毒的结合过程分两步, 它首先与细胞表面的神经节苷脂结合, 形成低亲和力的聚集体, 然后再与高亲和力的蛋白受体——synaptotagmin 结合, 形成牢固的三聚体结构, 并由内吞进入细胞. 这种解释肉毒结合过程的双受体学说得到了越来越多的支持, 文中列举和评述了支持该学说的实验资料.

关键词 肉毒神经毒素, 双受体学说, 神经节苷脂, synaptotagmin

学科分类号 Q52

肉毒神经毒素 (botulinum neurotoxin, 简称肉毒) 是梭状肉毒芽孢杆菌分泌的毒蛋白, 分 A~G 7 个亚型, 是世界毒性最强的生物毒素, 人体只要摄入微量就可引起中毒. 中毒通常表现为眼部及喉部肌群的麻痹, 然后发展为全身骨骼肌麻痹, 最终由呼吸衰竭致死. 中毒可由污染食物、伤口感染、母婴传染或经呼吸道引起. 由于肉毒的剧毒性和易于获得, 使它成为生物武器的首选.

肉毒分子是以与辅助蛋白形成聚合体的形式被分泌的, 辅助蛋白可避免肉毒在胃内强酸性条件下变性或被酶解, 在微碱环境与肉毒分离. 肉毒聚集体可通过受体介导的内吞和跨细胞转运机制, 从肠腔转运到肠道上皮细胞的基底外侧进入循环系统, 再被传送到它的特异性靶点——胆碱能神经末梢.

解释肉毒作用分子机制的“四步学说”认为, 肉毒对靶细胞的作用分为四个步骤^[1~4]: 与细胞表面的受体结合, 通过受体介导的内吞进入神经细胞, 由内吞小泡酸化引发的轻链从小泡到胞浆的转运, 最后轻链酶切在递质释放过程中起重要作用的 SNARE 蛋白, 从而抑制神经递质释放, 阻断突触传递 (图 1).

与受体的“结合”作为肉毒作用的第一步已经被研究了多年, 但由于肉毒的剧毒性, 它的靶组织——周围神经末梢的组织量非常少, 使其受体的分离和鉴定变得非常困难. 近年一些新技术比如蛋白质晶体结构研究技术和转基因技术等的应用为肉

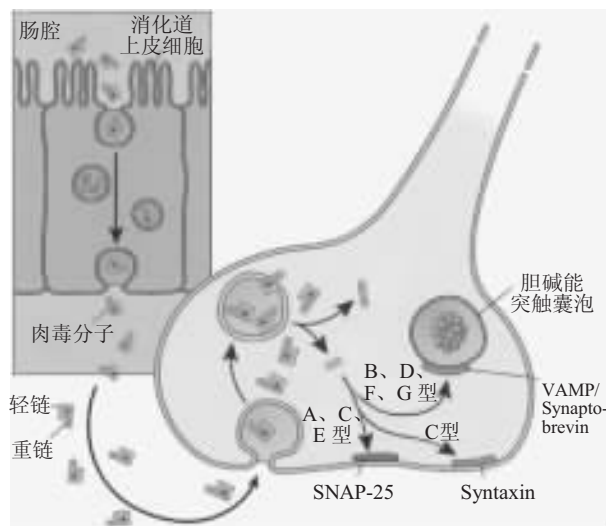


Fig. 1 Major steps of oral poisoning due to botulinum toxin

图 1 肉毒经口中毒的主要过程

由肠上皮细胞转运到循环系统, 再由循环系统到胆碱能神经末梢, 并通过四步作用机制 (结合、内吞、胞内转运和酶切底物) 酶切相应的 SNARE 蛋白, 其中 VAMP 能被 B、D、F、G 型肉毒酶切, SNAP-25 能被 A、C、E 型酶切, Syntaxin 能被 C 型酶切^[1].

*国家重点基础研究发展计划(973)“脑功能和脑重大疾病的基础研究”(G19990540000); 国家自然科学基金资助项目(30170302)和上海市基础研究重点项目(02JC14011).

** 通讯联系人. Tel: 021-54920270, Fax: 021-54920276

E-mail: ylshi@server.shnc.ac.cn

收稿日期: 2005-08-30, 接受日期: 2005-09-30

毒受体研究提供了新的证据. 本文将对有关肉毒受体研究进行介绍.

1 双受体学说和肉毒分子的结合位点

对肉毒受体的研究主要有两类方法: 一是先用药理或其他手段改造肉毒分子或其靶组织, 由观察肉毒分子与其靶组织 (突触体、脊髓细胞、神经肌肉接头等等) 之间的直接结合作用来推断受体; 二是在处理肉毒分子或其靶组织后, 由测定肉毒对靶组织毒性作用的变化来推断肉毒受体.

肉毒受体研究在很大程度上得益于对另一种梭状芽孢杆菌毒素——破伤风毒素受体的研究. 自 1961 年发现神经节苷脂在破伤风毒素中毒过程中的重要作用以来, 越来越多的实验证据显示神经节苷脂很可能是肉毒的受体, 但同时又有很多证据显示它又不是肉毒的唯一受体, 比如: 肉毒与靶组织之间的结合与神经节苷脂的含量并无明显的线性关系, 靶组织经胰蛋白酶处理后对肉毒的结合能力明显减弱, 神经节苷脂只能部分抑制肉毒对神经递质释放的阻断作用等等. 研究还发现肉毒的结合位点有高亲和力与低亲和力的两种^[5], 表明除了神经节苷脂外, 很可能还有某种蛋白质也参与了肉毒的结合过程. 由此, Montecucco^[6] 提出了肉毒结合作用的双受体学说, 认为神经节苷脂是肉毒的第一受体, 与肉毒结合的亲和力相对较低, 肉毒-神经节苷脂复合体靠近突触前膜上的高亲和力蛋白质受体并与之结合成牢固的三聚体.

肉毒分子结构的研究结果为双受体学说提供了更为有力的证据. 目前, 所有肉毒分子的氨基酸序列已被鉴定^[7], 它们由 1 251 (E 型) 到 1 297 (G 型) 个氨基酸组成, 最初是单链分子, 不具有毒性, 在蛋白酶的作用下成为由二硫键和非共价键相连的 100 ku 重链和 50 ku 轻链组成、具有极强毒性的双链结构. A、B 型肉毒的三维晶体结构^[8,9]显示, 肉毒整个分子分为 3 个约 50 ku 的功能结构域(图 2), 即轻链、重链 N 端和重链 C 端部分. 其中轻链能选择性地酶解在神经递质释放过程中起关键作用的 SNARE 蛋白, 重链的 N 端部分是肉毒分子的跨膜转运结构域, 重链的 C 端部分则是肉毒与受体结合的结构域, 它又分为 N 端 (Hc-N) 和 C 端 (Hc-C) 两个亚结构域. Hc-N 的氨基酸序列在所有肉毒分子中是基本一致的, 包含 16 个 β 折叠和 4 个 α 螺旋, 呈桶状排列, 与豆类凝集素的结构相似. Hc-C 结构域的氨基酸序列则相对不保守, 它包含

一个 β -三叶草结构域, 这种结构域在其他分子中 (如白细胞介素 I、成纤维细胞生长因子) 被认为具有识别与结合功能, 可能是蛋白质受体的结合位点. 此外, Hc-C 结构域还存在一个 H...SXWY...G. 保守序列, 晶体结构学的研究结果显示, 该序列形成的口袋结构可以和一个 GT1b 分子的 NAcNeu-Gal 片段结合, 是神经节苷脂的结合结构域^[4,10].

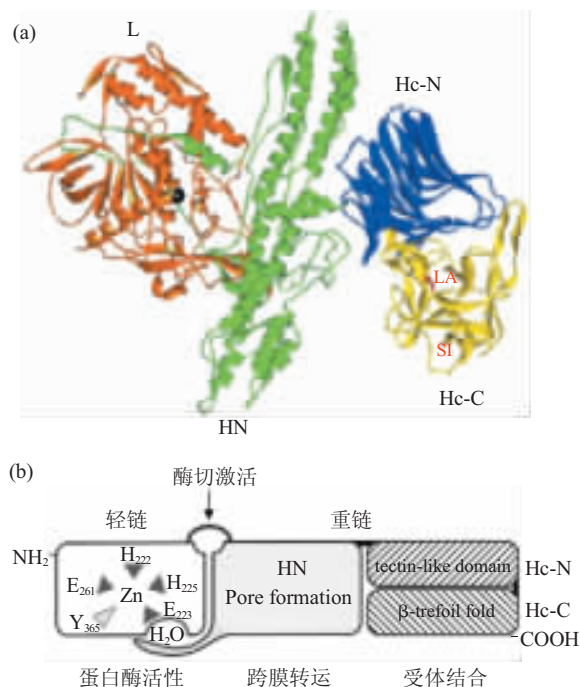


Fig. 2 Molecular structure of botulinum neurotoxin

图 2 肉毒分子结构图

(a) A 型肉毒的三维晶体结构, 其中橙色部分代表轻链(L), 具有锌离子依赖的蛋白酶活性, 黑色小球代表锌离子, 绿色部分代表重链的 N 端部分(HN), 是肉毒的跨膜转运结构域, 黄色和蓝色分别代表重链 C 端的 C 端(Hc-C)和 N 端(Hc-N)部分, 是肉毒与受体的结合结构域, 红色的 LA 代表神经节苷脂的结合位点^[7]. (b)由图 2a 绘制的 A 型肉毒分子结构模式图^[4].

2 神经节苷脂——肉毒的低亲和力受体

神经节苷脂是多种唾液酸化的鞘糖脂的总称, 几乎存在于脊椎动物的所有组织, 富集于神经及内分泌细胞膜特别是突触前膜的外表面. 它通常以神经酰胺分子为母核, 其疏水性的“尾”插入膜脂双层作为膜的一部分, 而结合到神经酰胺分子丝氨酸上的亲水寡糖链 (包括唾液酸) 与丝氨酸一起构成神经节苷脂的亲水端, 伸展到细胞表面. 根据寡糖链的不同神经节苷脂可分为很多种亚型. 作为膜脂

质和糖萼的重要成分,神经节苷脂在维持细胞膜表面负电性、参与细胞识别和信号转导、保护缺血性神经损害等方面都起着重要作用^[1].

Simpson 等曾将肉毒以神经肌肉接头突触前膜的不同组分预处理后再观察它的毒性,研究表明,某些含有唾液酸的分子——神经节苷脂预处理可以让肉毒失去毒性,神经节苷脂与肉毒分子有较高的亲和力,从而推测神经节苷脂可能是肉毒的受体,支持这种推测的证据主要有:

a. 神经节苷脂可减弱肉毒毒性. 给小鼠注射致死剂量的肉毒先与神经节苷脂混合,则可使中毒小鼠的存活时间大大延长,神经节苷脂的这种作用具有浓度依赖性,神经节苷脂尤其是 G_{Tib} 可以让 A、B、E、F 等多种肉毒亚型毒性下降,作用易受溶液中离子强度 (Na^+) 的影响,以多种细胞、神经肌肉接头标本及突触体做的实验也证明了神经节苷脂可以减弱肉毒毒性^[2].

b. 结合外源性神经节苷脂后靶细胞对肉毒更敏感. A 型肉毒可部分抑制 (<40%) 牛嗜铬细胞释放去甲肾上腺素(NA). 当将外源性神经节苷脂结合到细胞表面后,细胞对肉毒的敏感性增加 5 倍,使肉毒对 NA 释放的抑制率增至 60%^[12].

c. 神经节苷脂与肉毒之间有较高的亲和力. G_{Dib} 、 G_{Tib} 和 G_{Qib} 与肉毒的亲和力最强. 利用含有神经节苷脂的脂质体做材料并结合免疫学方法已经成为非常灵敏而有效的检测肉毒手段^[13]. 最近的 BIAcore 实验结果显示, A 型肉毒与 G_{Tib} 之间的解离常数约为 2×10^{-7} mol/L, 与神经节苷脂结合后肉毒的分子结构会发生变化,使得分子中 α 螺旋数目增加而 β 螺旋数目减少^[14].

d. 缺少神经节苷脂的标本对肉毒免疫. 利用唾液酸苷酶分解突触体、脊髓细胞或其他标本的多聚唾液酸神经节苷脂后,这些标本对肉毒的结合能力大大减弱,显示神经节苷脂在肉毒的结合过程中起着非常重要的作用. 利用转基因技术使小鼠缺乏合成神经节苷脂所必需的酶之后,这些动物的神经肌肉标本能够完全抵抗肉毒的作用^[15]. 利用神经节苷脂合成抑制剂抑制神经细胞内神经节苷脂的合成后,这些神经细胞即抵抗肉毒的作用^[16].

e. 具抗肉毒作用的麦胚凝集素和黄蛞蝓凝集素 (lectins from *triticum vulgaris* and *limax flavus*) 与神经节苷脂有很强的亲和力,能抑制肉毒与分离的神经元膜组分的结合,拮抗肉毒对神经肌肉接头的作用,其抗肉毒作用被认为是通过竞争细胞表面的神

经节苷脂受体实现的^[17].

f. 三维结构显示,肉毒分子的 Hc-C 有神经节苷脂的结合位点^[9,10,18].

3 Synaptotagmin——肉毒的高亲和力受体

神经节苷脂已被证明是肉毒受体,但它在中毒过程中的不少问题尚难以以它的作用来解释,如:神经节苷脂广泛分布于多种细胞,而肉毒只是选择性地作用于神经系统,神经节苷脂与肉毒之间的亲和力并不足以说明肉毒的极端毒性,不同肉毒亚型的受体不同,如 A 和 B 型的结合位点明显不一样,他们的结合作用相互之间没有干扰,神经节苷脂不能解释这种差异^[19]. 由此看来,神经节苷脂不是肉毒的唯一受体,肉毒至少应该还有一种蛋白质受体. 目前为止,最受关注的蛋白质受体是 synaptotagmin 家族.

Synaptotagmin 是一类主要存在于神经及内分泌细胞分泌小泡膜的蛋白质,在哺乳动物已经被鉴定的有 16 种亚型,其中 synaptotagmin I 含量最为丰富,它是一种钙调蛋白,能以钙依赖的方式与细胞膜结合,与神经递质释放密切相关. Synaptotagmin 分子由 N 端的跨膜结构域插入突触囊泡膜,胞浆中的 C 端分为 C2A 和 C2B 两个保守结构域^[20] (图 3),这两个结构域通常作为钙或者其他因子的结合位点. 此外, synaptotagmin 还能与 SNARE 蛋白的末梢受体结合,并且与囊泡内吞作用密切相关^[21,22]. 根据钙-synaptotagmin-膜的结合动力学参数的不同, synaptotagmins 可以分为快、中和慢速反应三大类,其中快速反应包括 I, II 和 III 型,可能和快速递质释放相关;中速反应包括 V, VI, IX 和 X 型;慢速反应包括 VII 型,可能和延时释放相关^[23].

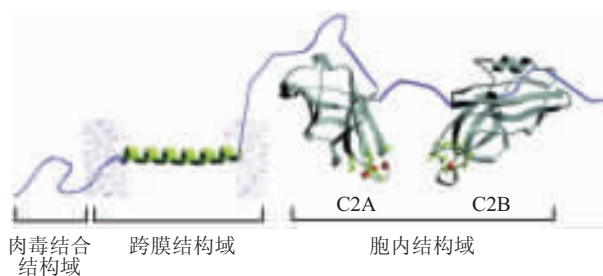


Fig. 3 Molecular model of synaptotagmin III

图 3 Synaptotagmin III 分子结构图

右边的胞浆内结构域 C2A 和 C2B 是钙或者其他因子的结合位点;中间穿越脂双层的部分是跨膜结构域;最左边的 N 端部分为肉毒结合结构域^[20].

Nishiki等^[24]用一种去垢剂提取突触体蛋白,发现提取物与B型肉毒有很强的亲和力,从中纯化出一种约58 ku的蛋白质能和B型肉毒以及神经节苷脂形成约161 ku的聚合物,其单克隆抗体可以识别 synaptotagmin, 而氨基酸序列与 synaptotagmin 完全一致,因此,该蛋白质就是 synaptotagmin. 由此推测, synaptotagmin 是B型肉毒的蛋白质受体. 支持这种观点的实验有:

a. 该蛋白质与B型肉毒有很高的亲和力, synaptotagmin I -BoNT/B 聚合体的解离常数是2.3 nmol/L, synaptotagmin II -BoNT/B 聚合体的是0.23 nmol/L^[25].

b. CHO 细胞 (Chinese hamster ovary cells) 表达 synaptotagmin II 后能与B型肉毒分子结合,而将外源性神经节苷脂 (G T1b 或 G D1a) 结合到该细胞可使细胞对肉毒的结合能力大大增强^[26].

c. Synaptotagmin I 和 II 分子的NH₂端部分(囊泡腔内部分,当突触囊泡与细胞膜融合后即暴露在细胞外表面)有能与B、G型肉毒分子相互结合的位点,其中位于囊泡腔内的10个氨基酸的作用尤其重要^[27,28].

d. Synaptotagmin I 和 II 介导了B型肉毒在PC12细胞上的内吞,并且是肉毒在该细胞内吞的必要条件^[26].

e. 还有证据显示 synaptotagmin I 和 II 可能也是A、E等型肉毒的受体,并且A、E型肉毒能相互抑制对方的结合,说明它们的受体可能是相同的^[16,29].

除 synaptotagmin 外,突触部位尚存在其他能与肉毒结合的蛋白质. Schengrund 等^[30,31]利用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离突触体蛋白,然后观察A型肉毒及破伤风毒素与突触体蛋白条带的相互结合,发现两种毒素都能与一个80 ku的蛋白质和一个116 ku的蛋白质结合,神经节苷脂能增强他们之间的结合能力. 用同样方法分离的肝、胆、肾等组织未发现与两种毒素结合. 后续的实验发现这两种蛋白质分别是 synapsin 和 β -adducin. Synapsin 主要存在于突触囊泡的外表面, β -adducin 主要存在于细胞膜的内表面,两者都不分布在细胞的外表面,因此作为肉毒受体的可能性不大,但它们与肉毒的结合可能同肉毒在细胞内的稳定性或肉毒轻链与其底物的相互作用有关.

4 结语与展望

目前,双受体学说较好地解释了肉毒与其靶组织的结合机制,认为肉毒的结合作用分两步,首先是肉毒分子的Hc-C结构域与细胞表面的神经节苷脂结合,形成亲和力较低的聚合物,然后这种聚合物横向迁移并与高亲和力的蛋白质受体(synaptotagmin)相结合,形成牢固的三聚体结构,再通过内吞作用进入细胞执行其他后续步骤^[6](图4).

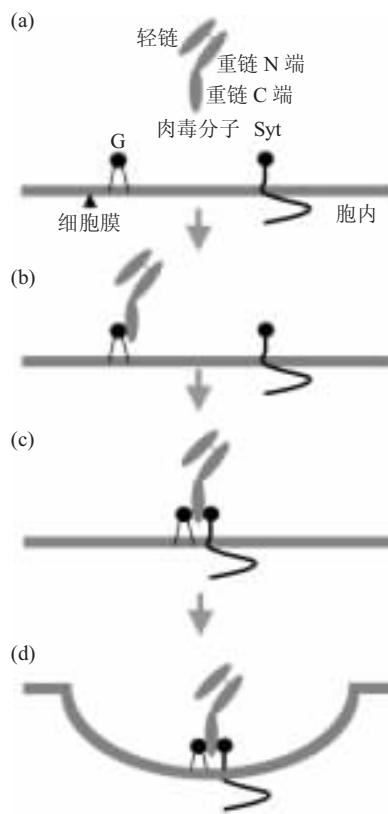


Fig. 4 Binding of BoNT to its receptors

图4 肉毒与受体结合过程示意图

(a) G: gangliosides, 神经节苷脂; Syt: Synaptotagmin, 当突触囊泡与突触前膜融合后,能与肉毒结合的N端被暴露在细胞表面. (b)肉毒分子的重链C端结构域与细胞膜上的神经节苷脂受体结合,形成相对较低亲和力的聚合物. (c)肉毒-神经节苷脂聚合物横向迁移,并与蛋白质受体 synaptotagmin 结合形成高亲和力的聚合物. (d)在蛋白质受体的诱导下,肉毒-神经节苷脂-蛋白质受体聚合物通过内吞进入细胞.

蛋白质受体数量很少并且只分布在神经及内分泌细胞的特殊部位,而G1b系列神经节苷脂主要

分布在神经细胞外表面,这就决定了肉毒对神经及内分泌系统的高度选择性. *Synaptotagmin* 与肉毒结合的结构域只有在突触囊泡融合后才暴露在细胞外表面,这就解释了为什么突触活化区对肉毒结合能力特别强,以及肉毒作用的突触活动依赖性. *Synaptotagmin* I 和 II 能介导 B 型肉毒在 PC12 细胞的内吞而不能介导 A、E 型肉毒的内吞,在一定程度上为肉毒亚型的结合位点差异提供了间接证据.

肉毒的受体对肉毒作用并不是充分条件. CHO 细胞表达 *synaptotagmin* II, 可以使细胞与 B 型肉毒结合,外源性神经节苷脂的存在能增强这种结合能力,但肉毒并不能被吞入细胞内,细胞中表达 *synaptobrevin* II 的量也不被酶切^[26].而在 PC12 细胞表达 *synaptotagmin* I 和 II 则能诱导肉毒的内吞.这些现象说明肉毒-神经节苷脂-*synaptotagmin* 聚合体形成后还需要细胞拥有胞吞机制才能让肉毒完全发挥作用.神经细胞拥有一套完整的胞吞胞吐体系,这也在另一方面解释了肉毒对神经系统的高度选择性.

对肉毒作用机制的了解将推进肉毒中毒的预防和治疗,新的有效抗肉毒分子的发现将为分析肉毒作用机制提供新的思路.我国学者发现,从中药提取的川楝素是目前最有效的抗肉毒化合物,我们已证明,它是通过影响肉毒分子与其受体的结合以及相继的内吞和胞内转运等过程,阻止肉毒分子轻链与其酶解底物 SNARE 蛋白的接近而实现抗肉毒效应的^[32,33].

肉毒的剧毒性除了给人类的生命安全造成威胁外,也使它在临床和基础科学研究领域拥有广阔的应用前景.目前,人们在利用定点微量注射肉毒的方法治疗运动系统失调疾病、面瘫、多汗、(偏)头痛乃至面部去皱美容等方面已经积累了相当多的经验.同时,肉毒也成了科学家研究神经递质释放机制的有力工具^[34].由于肉毒对其靶位点具有极高的选择性,它的分子或分子片段正被人们尝试做分子载体,引导药物寻找其靶点^[35],这种研究有可能对药物开发产生巨大影响.肉毒的这些应用最终要得益于人们对它作用机制的了解.

参 考 文 献

- 1 Simpson L L. Identification of the major steps in botulinum toxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004, **44**: 167~193
- 2 施玉樑, 胡 谦. 肉毒杆菌神经毒素作用机制的研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 1998, **25** (2): 126~130
- 3 Shi Y L, Hu Q. *Prog Biochem Biophys*, 1998, **25** (2): 126~130
- 4 Montecucco C, Papini E, Schiavo G. Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism. *FEBS Lett*, 1994, **346** (1): 92~98
- 5 Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C. Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev*, 2000, **80** (2): 717~766
- 6 Blasi J, Egea G, Castiella M J, *et al.* Binding of botulinum neurotoxin to pure cholinergic nerve terminals isolated from the electric organ of Torpedo. *J Neural Transm Gen*, 1992, **90** (2): 87~102
- 7 Montecucco C. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? *Trends Biochem Sci*, 1986, **11** (8): 315~317
- 8 Lacy D B, Stevens R C. Sequence homology and structural analysis of the clostridial neurotoxins. *J Mol Biol*, 1999, **291** (5): 1091~1104
- 9 Swaminathan S, Eswaramoorthy S. Structural analysis of the catalytic and binding sites of *Clostridium botulinum* neurotoxin B. *Nat Struct Biol*, 2000, **7** (8): 693~699
- 10 Lacy D B, Tepp W, Cohen A C, *et al.* Crystal structure of botulinum neurotoxin type A and implications for toxicity. *Nat Struct Biol*, 1998, **5** (10): 898~902
- 11 Rummel A, Mahrhold S, Bigalke H, *et al.* The HCC-domain of botulinum neurotoxins A and B exhibits a singular ganglioside binding site displaying serotype specific carbohydrate interaction. *Mol Microbiol*, 2004, **51** (3): 631~643
- 12 唐向东. 神经节苷脂的结构、合成和功能. *生命的化学*, 1995, **15** (2): 32~34
- 13 Tang X D. *Chem of Life*, 1995, **15** (2): 32~34
- 14 Marxen P, Fuhrmann U, Bigalke H. Gangliosides mediate inhibitory effects of tetanus and botulinum A neurotoxins on exocytosis in chromaffin cells. *Toxicon*, 1989, **27** (8): 849~859
- 15 Ahn-Yoon S, DeCory T R, Durst R A. Ganglioside-liposome immunoassay for the detection of botulinum toxin. *Anal Bioanal Chem*, 2004, **378** (1): 68~75
- 16 Yowler B C, Schengrund C L. Botulinum neurotoxin A changes conformation upon binding to ganglioside GT1b. *Biochemistry*, 2004, **43** (30): 9725~9731
- 17 Bullens R W, O'Hanlon G M, Wagner E, *et al.* Complex gangliosides at the neuromuscular junction are membrane receptors for autoantibodies and botulinum neurotoxin but redundant for normal synaptic function. *J Neurosci*, 2002, **22** (16): 6876~6884
- 18 Yowler B C, Kensinger R D, Schengrund C L. Botulinum neurotoxin A activity is dependent upon the presence of specific gangliosides in neuroblastoma cells expressing *synaptotagmin* I. *J Biol Chem*, 2002, **277** (36): 32815~32819
- 19 Bakry N, Kamata Y, Simpson L L. Lectins from *triticum vulgaris* and *limax flavus* are universal antagonists of botulinum neurotoxin and tetanus toxin. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991, **258** (3): 830~836
- 20 Ginalska K, Venclovas C, Lesyng B, *et al.* Structure-based sequence alignment for the beta-trefoil subdomain of the clostridial neurotoxin family provides residue level information about the putative ganglioside binding site. *FEBS Lett*, 2000, **482** (1~2):

- 119~124
- 19 Black J D, Dolly J O. Interaction of ^{125}I -labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves. *J Cell Biol*, 1986, **103** (2): 521~534
 - 20 Sutton R B, Ernst J A, Brunger A T. Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications Ca^{2+} -independent snare complex interaction. *J Cell Biol*, 1999, **147** (3): 589~598
 - 21 Bai J, Chapman E R. The C2 domains of synaptotagmin--partners in exocytosis. *Trends Biochem Sci*, 2004, **29** (3): 143~151
 - 22 Poskanzer K E, Marek K W, Sweeney S T, *et al.* Synaptotagmin I is necessary for compensatory synaptic vesicle endocytosis *in vivo*. *Nature*, 2003, **426** (6966): 559~563
 - 23 Hui E, Bai J, Wang P, *et al.* Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: Candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102** (14): 5210~5214
 - 24 Nishiki T, Kamata Y, Nemoto Y, *et al.* Identification of protein receptor for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin in rat brain synaptosomes. *J Biol Chem*, 1994, **269** (14): 10498~10503
 - 25 Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, *et al.* The high-affinity binding of *Clostridium botulinum* type B neurotoxin to synaptotagmin II associated with gangliosides GT1b/GD1a. *FEBS Lett*, 1996, **378** (3): 253~257
 - 26 Nishiki T, Tokuyama Y, Kamata Y, *et al.* Binding of botulinum type B neurotoxin to Chinese hamster ovary cells transfected with rat synaptotagmin II cDNA. *Neurosci Lett*, 1996, **208** (2): 105~108
 - 27 Dong M, Richards D A, Goodnough M C, *et al.* Synaptotagmins I and II mediate entry of botulinum neurotoxin B into cells. *J Cell Biol*, 2003, **162** (7): 1293~1303
 - 28 Rummel A, Karnath T, Henke T, *et al.* Synaptotagmins I and II act as nerve cell receptors for botulinum neurotoxin G. *J Biol Chem*, 2004, **279** (29): 30865~30870
 - 29 Li L, Singh B R. Isolation of synaptotagmin as a receptor for types A and E botulinum neurotoxin and analysis of their comparative binding using a new microtiter plate assay. *J Nat Toxins*, 1998, **7** (3): 215~226
 - 30 Schengrund C L, DasGupta B R, Ringler N J. Ganglioside GD3 enhances adherence of botulinum and tetanus neurotoxins to bovine brain synapsin I. *Neurosci Lett*, 1993, **158** (2): 159~162
 - 31 Schengrund C L, DasGupta B R, Hughes C A, *et al.* Ganglioside-induced adherence of botulinum and tetanus neurotoxins to adducin. *J Neurochem*, 1996, **66** (6): 2556~2561
 - 32 Zhou J Y, Wang Z F, Ren X M, *et al.* Antagonism of botulinum toxin type A-induced cleavage of SNAP-25 in rat cerebral synaptosome by toosendanin. *FEBS Lett*, 2003, **555** (2): 375~379
 - 33 Shi Y L, Wang Z F. Cure of experimental botulism and antibotulismic effect of toosendanin. *Acta Pharmacol Sin*, 2004, **25** (6): 839~848
 - 34 Pearce L B, First E R, MacCallum R D, *et al.* Pharmacologic characterization of botulinum toxin for basic science and medicine. *Toxicon*, 1997, **35** (9): 1373~1412
 - 35 Simpson L L, Maksymowych A B, Kiyatkin N. Botulinum toxin as a carrier for oral vaccines. *Cell Mol Life Sci*, 1999, **56** (1~2): 47~61

Studies on The Receptors of Botulinum Neurotoxins*

ZHOU Jian-Ying, SHI Yu-Liang**

(Shanghai Institutes for Biological Sciences, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Botulinum neurotoxin (BoNT) is the most lethal biotoxin known to mankind. It inhibits acetylcholine release from the cholinergic nerve ending by cleavage of SNARE proteins, followed by neuromuscular blockade and paralysis. Gangliosides are considered to act as a first receptor of BoNT with low affinity. Then the membrane bound gangliosides-BoNT complex moves laterally to reach and bind the toxin specific protein receptor, synaptotagmin, with a high affinity constant. At last the gangliosides-BoNT-synaptotagmin complex undergoes receptor-mediated endocytosis. This double-receptors theory is widely accepted. The research data are summarized and reviewed.

Key words botulinum neurotoxin BoNT, double-receptor theory, ganglioside, synaptotagmin

*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (G1999054000), The National Natural Science Foundation of China (30170302) and The Basic Research Program of Shanghai (02JC14011).

**Corresponding author. Tel: 86-21-54920270, Fax: 86-21-54920276, E-mail: ylshi@server.shnc.ac.cn

Received: August 30, 2005 Accepted: September 30, 2005