

Xiayang 712100, China).

**Abstract** The plant phototoxins are excited by absorption of light to produce singlet oxygen or radicals which damage cell membrane systems and protein or nucleic acid molecules.

The excited phototoxins have a very important role in plant defensive responses to viruses, bacterium, fungus, nematodes, and plants.

**Key words** phototoxin, singlet oxygen, radical, plant defensive response

## 突触素 I 的若干研究进展 \*

杜红燕 吴馥梅

(南京大学生物科学与技术系, 南京 210093)

**摘要** 突触素 I (synapsin I) 是神经元特有的一类与小型突触囊泡外侧相连的磷蛋白, 该蛋白在进化过程中是比较保守的, 其基因位于 X 染色体上. 通过基因重组产生的小鼠 Synapsin I 基因的零突变及脑片电生理学的观察, 发现 Synapsin I 在神经递质释放及突触可塑性等生理活动过程中具有重要作用.

**关键词** 突触素 I, 突触囊泡, 磷酸化作用, 神经递质释放, 突触可塑性

在神经末梢部位, 神经递质贮存在突触囊泡内, 并通过胞吐作用释放出来. 突触囊泡是由 de Robertis 和 Bennett 以及 Palade 和 Palay 在本世纪50年代中期首次发现的, 它是一类非常小且高度特化的细胞器, 目前已知的功能是贮存和释放神经递质<sup>[1,2]</sup>. 随着人们对突触囊泡蛋白质结构与特征的认识, 对其生物学作用提出了诸多假说. 目前已知的突触囊泡蛋白质有 Synapsin I、Synapsin II、Synaptophysin、Synaptobrevin、Synaptotagmin、Synaptoporin 等. 其中 Synapsin I (即突触素 I) 也称蛋白质 I, 是与突触囊泡相连的磷蛋白, 是小突触囊泡特异性的外侧膜蛋白, 它在突触囊泡总蛋白中含量较大. 在体内和离体的实验研究<sup>[3,4]</sup>表明突触素 I 至少是4种不同蛋白激酶的底物, 其磷酸化作用在完成生物功能的过程中具有重要作用. 突触素 I 能调节神经递质的释放, 且在突触可塑性 (尤其是短时程突触可塑性) 的发生过程中具有不容忽视的作用<sup>[3]</sup>. 在哺乳动物体内, 突触素 I 基因位于 X 染色体上, 在进化过程中具有高度保守性. 对人类来说, 该基因的畸变往往发生在某些与 X 染色体相关的疾

病发生过程中, 这时并伴随有某些神经元的退化, 如 Rett 综合症<sup>[5]</sup>.

### 1 突触素 I 的分布与性质

突触素 I 是神经元的特异性磷蛋白, 占神经元总蛋白含量的1%及突触囊泡总蛋白的6%, 是囊泡中含量较大的蛋白. 它是由 Synapsin Ia 和 Synapsin Ib 两个多肽 (分子量分别为86 000和80 000, 等电点分别为10.3和10.2) 组成. 它是一类非穿膜性通道蛋白, 位于突触囊泡膜的外表面, 分子为长形结构, 包含一个球形头部和一个尾区<sup>[6]</sup>. 免疫化学研究表明突触素 I 最初出现在突触发生过程中, 主要集中在中枢及外周神经元的突触前末梢, 与小突触囊泡膜相连. 它首先是作为脑中 cAMP 依赖性蛋白激酶和  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 依赖性蛋白激酶 (CaMK) 的一种主要底物而被发现的. 在离体情况下, 它可被 cAMP 依赖性蛋白激酶及 CaMK I 在 N 端 (位点1) 磷酸化, 同时也可被 CaMK II 在 C 端的两个位点磷酸化<sup>[7]</sup>. 纯

\* 国家自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1994-10-11, 修回日期: 1994-11-26

化的突触素 I 可结合至突触囊泡、微管、肌动蛋白丝、CaM 及血影蛋白上<sup>[6,8~12]</sup>。突触素 I C 端磷酸化位点(位点2,即所谓尾区)的磷酸化作用可降低该蛋白对突触囊泡的亲和力,减弱它与肌动蛋白丝的相互作用<sup>[8,9]</sup>。这些研究导致这样一个假说的提出:在神经末梢,突触素 I 可能以某种磷酸化作用依赖性方式使突触囊泡附着于一种或几种细胞骨架成分上,借助于细胞骨架成分使突触囊泡向神经末梢转运,并聚集于突触活性区。

值得提出的是,突触素并非存在于所有的突触前成分。最新研究发现,突触素 I 分布于常规的突触结构上,而不存在于条带突触(ribbon synapse)上。Koontz 等<sup>[13]</sup>用免疫细胞化学技术在光镜和电镜下对猴视网膜内两类突触观察了突触素 I 的分布,发现突触素 I 只存在于常规的普通突触连接上,光感受器末梢的条带突触缺乏这种蛋白质。Mandell 等<sup>[14,15]</sup>也证明光感受器末梢的突触囊泡缺乏突触素 I 和突触素 II。他们还发现突触素 I 和突触素 II 可分布于视网膜内不同的细胞亚群。

## 2 突触素 I 基因

近若干年来,人们对突触素 I 的研究日益深入。Südhof 等<sup>[16]</sup>研究表明,突触素 I a 和 I b 结构之间的差异主要是由于单转录本剪接过程的不同而产生的。目前,用于检测突触素 I a 与 I b 的 mRNA 的一个 cDNA 已从 cDNA 文库中分离出来(该文库来自富含突触素 I 信使的大鼠脑多聚(A)<sup>+</sup>RNA)。利用该克隆作为探针, Yang-Feng 等<sup>[5]</sup>通过对人类及中国仓鼠体细胞中突触素 I 基因的研究,发现人类突触素 I 基因位于 X 染色体 X<sub>P11</sub> 带上,鼠类突触素 I 基因则位于 X 染色体 X<sub>A1-A4</sub> 带上。

许多作者利用 DNA 克隆技术、DNA 测序及 DNA 印迹法等生化手段,对突触素 I 基因及蛋白的结构进行了研究。曾有人以牛突触素 I 基因的不同片段作为探针,将得到的克隆体系分成3类:a. 以高亲和力仅与来自突触素 I 的探针杂交后产生的克隆;b. 以高亲和力仅与

来自突触素 II 的探针杂交后产生的克隆;c. 以低亲和力与来自二者的探针杂交后产生的克隆。Südhof 等从第一类克隆体系(来自牛突触素 I cDNA 不同区域的特殊探针进行杂交产生的突变性克隆体系)中选择了3个克隆进行分析,并把含外显子的部分亚克隆至质粒载体中,得到了这些亚克隆的限制性酶图谱,并通过 DNA 印迹法将外显子定位,发现人突触素 I 基因具有13个外显子(见图1)。

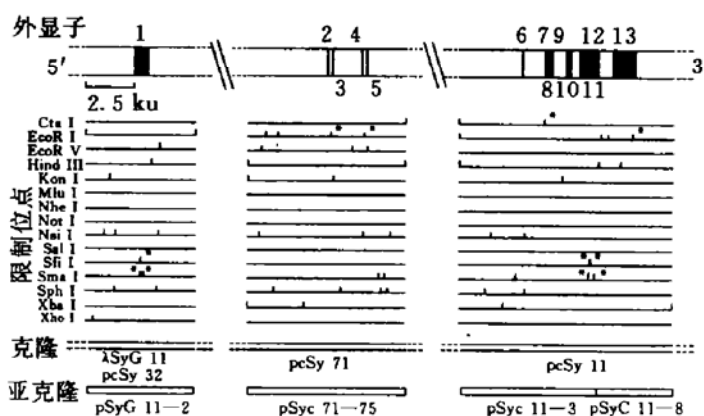


图1 人突触素 I 基因的限制性酶图谱

图下方所示为质粒 λ(λpcSy 11、71和32)和(SyG 11)的克隆及亚克隆位点。图中间部分则表示15种酶在突触素 I 基因上的限制位点。星号

则表示限制位点位于外显子内。

鉴于各种原因,尚不能测定出该基因的具体长度,但已经知道人突触素 I 基因所包含的碱基数远远超过30 000。内含子中以2和5(intron 2和intron 5,尚未得到克隆)较大,13个外显子的大小、分布各不相同,其中以1、12和13(exon 1、exon 12和 exon 13)较大(详见 Südhof 等,1990年)。有人曾假设了一个关于突触素 I 的区域分布模型(见图2),图2显示外显子的分布与假设的突触素 I 的区域具有相关性,分析表明突触素 I 的 N、C 端区域可从单个外显子区域获得(区域 A、B 在外显子1内,区域 D 在外显子12内,区域 E、F 在外显子13内),而中间同源的区域 C 则含多个小的外显子。区域 C 含突触素 I、II 同源性最高的序列,可能在突触素 I 连接肌动蛋白丝及连接突触囊泡的过程中起一定作用<sup>[16]</sup>。

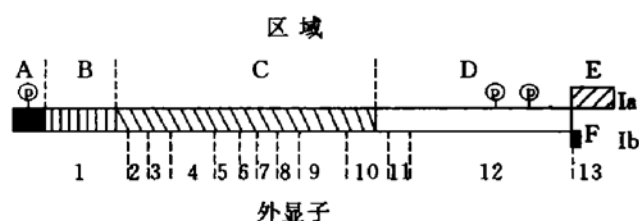


图2 突触素 I 区域结构中外显子的分布

上、下两横棒分别代表 Ia 和 Ib。棒上(P)则表示磷酸化位点。

同参与细胞基本生物过程的其他蛋白质一样,突触素 I 在进化上也是高度保守的(见 Südhof 等 1990 年,人、牛、鼠的突触素 Ia 和 Ib 均具有 96% 以上的相似性),这种保守性也包括产生突触素 Ia 和 Ib 的可变性剪接机制。除突触素 I 和 II 基因转录过程不同外,在不同神经元中这种可变性剪接过程所受的调节也有所不同。从而认为 5'-及 3'-未翻译区独特、保守的核酸序列可能具有一定的调节作用<sup>[4]</sup>。

### 3 突触素 I 的生理意义

#### 3.1 调节神经递质释放

神经信息的传递是通过突触部位神经递质的释放来完成的,神经递质贮存于突触囊泡中,囊泡是神经末梢特有的细胞器,含递质的囊泡群积聚在突触活性区。神经末梢接受刺激导致  $\text{Ca}^{2+}$  内流,触发突触囊泡的胞吐作用,从而使神经递质释放。突触素 I 是清亮型突触囊泡的外在膜蛋白,至少是 4 种蛋白激酶的底物<sup>[3,4]</sup>。Greengard 等<sup>[7]</sup>根据其生化特征及其去极化依赖性的磷酸化作用,提出关于其功能模型的假说。该假说把突触素 I 当作神经递质释放的一个调节因子,通过控制突触囊泡的胞吐过程而起作用。由此模型可知,脱磷酸化的突触素 I 通过附着于肌动蛋白微丝上而与之紧密结合,从而阻止突触囊泡开口排放递质。当 CaMK II 使突触素 I C 端发生磷酸化作用,降低其结合力,于是突触囊泡得以开口进行胞吐作用。本假说的关键是突触素 I 通过其 C 端作用位点进行磷酸化或脱磷酸化作用,因而对调

节神经递质的释放有重要作用。Llinas<sup>[17]</sup>的实验证据支持本假说。该实验把脱磷酸化的突触素 I 或  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM 依赖性蛋白激酶 II 注射入乌贼巨轴突末梢(突触前成分),结果表明脱磷酸化的突触素 I 可使神经递质释放减少,即对于神经元之间的信息传递具有抑制作用, CaMK II 促进突触素 I C 端位点的磷酸化过程可以逆转上述抑制作用,而 cAMP 依赖性蛋白激酶和 CaMK I 在 N 端的磷酸化作用则无此逆转作用。Lu 等<sup>[18]</sup>将突触素 I 注入神经末梢,也发现它可增强神经递质的释放<sup>[19]</sup>。

近若干年来的研究表明:调节神经递质释放的突触蛋白有多种,除 Synapsin 以外,还有 Synaptophysin 及 Synaptotagmin 等,暂且将二者译为突触泡膜素和突触膜融素,它们也都是突触囊泡膜的特异性整合蛋白,且都是穿膜蛋白。有报道认为,突触泡膜素可能构成突触囊泡膜上的特异性通道,参与突触囊泡的转运和神经递质的释放过程;突触膜融素作为配体可与突触前膜受体结合,从而引导突触囊泡与突触前膜融合,于是开口进行胞吐作用释放神经递质<sup>[13,20]</sup>。从目前的研究资料看来,突触素 I 与其他几种突触蛋白相互协调、共同作用,最终保证神经信息的突触传递过程。

#### 3.2 在突触可塑性中的作用<sup>[3]</sup>

成对脉冲易化作用 (paired pulse facilitation, PPF) 和成对脉冲抑制作用 (paired pulse depression, PPD) 分别代表了两种短时程突触可塑性。PPF 是指当一个突触受到间隔很短的两个刺激后产生两次突触应答,其中,第二次应答比第一次应答更为强烈,几乎遍布整个突触,这是由于第二个刺激导致大量的神经递质释放的结果<sup>[21]</sup>。Rosahl 及其同事们通过电生理学研究表明,当以某范围内 (50~300 ms) 的任一刺激间隔刺激 Schaffer 并行联合纤维与海马 CA<sub>1</sub> 区锥体细胞之间形成的突触时,突变鼠(即 synapsin I 基因发生零突变的小鼠)海马片上 PPF 的平均值变大,尤其是在短刺激间隔情况下最为显著,即 PPF 呈选择性增强,而其他参数并不发生变化。但在两类动物(突变小鼠与

野生型小鼠) 脑片上, PPF 对刺激间隔具同样广泛的依赖性, 表明 PPF 的延迟时相在两类动物中具有相似性, 即神经末梢部位  $\text{Ca}^{2+}$  的动力学不会由于突触素 I 的缺乏而发生变化. PPD 是与 PPF 相反的反应, 是内侧通路的一个特征. 该作者还发现在某刺激间隔 ( $>50$  ms) 的情况下, 突变鼠脑片上呈显著减弱的 PPD. 这样, 在缺乏突触素 I 时, 两类具有不同基本特征的突触对于两个相近空间刺激中第 2 个刺激的反应来说, 它们受影响的方式是很相似的. 因而认为, 突变鼠中 PPF 与 PPD 的显著性变化表明了突触素 I 的缺乏可严重影响短时程突触可塑性. 由此得出结论, 认为突触素 I 在递质释放的短期 ( $<1$  ms) 调节过程和限制 PPF 的发生过程中具独特作用; 突触素 I 的缺失仅影响这种短时程可塑性的程度, 并不影响该可塑性的动力学特征. 此外, 他们还进一步观察了突触素 I 对长时程可塑性的影响. 结果发现在一个较长时期内, 突变鼠脑片显示了稍高的 LTP 值, 但在两类鼠脑片中 LTP 时相或峰值却无显著性差异, 提示突触素 I 对长时程突触可塑性无显著影响.

### 3.3 突触发生

曾假设突触素 I 在突触发生过程中具有一定的功能. 该假说认为缺乏突触素 I 的鼠脑, 不管该动物是否表现出明显的神经系统功能障碍, 都可能导致其突触结构的改变<sup>[18]</sup>. 为证实此假说, Rosahl 等利用不同的突触标记物对缺乏突触素 I 的突变小鼠和正常小鼠进行了免疫细胞化学分析, 在突变小鼠脑中未见突触素 I 抗体的免疫染色, 而大、小脑皮层、海马及脑干核团内的突触蛋白, 如 Synaptotagmin 或 Synaptoporin/Synaptophysin II 的免疫染色结果表明脑的突触结构无明显变化<sup>[3]</sup>. 提示突触素 I 对突触的发生过程无显著影响.

### 参 考 文 献

- Südhof T C, Jahn R. *Neuron*, 1991; **6**: 665
- Jessell T M, Kandel E R. *Cell*, 1993; **72** (Suppl Neuron, 10): 1
- Rosahl T W, Gappert M, Spillane D *et al.* *Cell*, 1993; **75**: 661
- Südhof T C. *J Bio Chem*, 1990; **265**: 7849
- Yang-Feng T L, de Gennaro L J, Francke U. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; **83**: 8679
- Schiebler W, Jahn R, Doucet J P *et al.* *J Biol Chem*, 1986; **261**: 838
- Greengard P, Valtorta F, Czernik A J *et al.* *Science*, 1993; **259**: 780
- Bahler M J, Greengard P. *Nature*, 1987; **326**: 740
- Petrucci T C, Morrow J. *J Cell Biol*, 1987; **105**: 1355
- Bennett A F, Hayes N V, Baines A J. *Biochem J*, 1989; **276**: 793
- Hayes N V, Bennett A F, Baines A. *Biochem J*, 1991; **275**: 93
- Sikorski A F, Goodman S R. *Brain Res Bull*, 1991; **27**: 195
- Koontz M A, Hendrickson A E. *Synapse*, 1993; **14**: 268
- Mandell J W, Czernik A J, Decamilli P *et al.* *J Neurosci*, 1992; **12**: 1736
- Mandell J W, Townes-Anderson E, Czernik A J *et al.* *Neuron*, 1992; **5**: 9
- Südhof T C, Czernik A J, Kao H *et al.* *Science*, 1989; **245**: 1474
- Llinas R, Gruner J A, Sugimori M *et al.* *J Physiol*, 1991; **436**: 257
- Lu B, Greengard P, Poo M M. *Neuron*, 1992; **8**: 531
- Nichols R A, Chukite T J, Czernik A J *et al.* *J Neurochem*, 1992; **58**: 783
- Rubenstein J L, Greengard P, Czernik A J. *Synapse*, 1993; **13**: 161
- Mallart A, Martin A R. *J Physiol*, 1968; **196**: 593

**Some Progress in the Study of Synapsin I.** Du Hongyan, Wu Fumei (*Department of Biology Science and Technology, Nanjing University, Nanjing 210093, China*).

**Abstract** Synapsin I is a specific phosphoprotein of neuron, it is associated with the cytoplasmic surface of small synaptic vesicles. It is highly conservative in evolution and its gene locates in X-chromosome. By means of null mutation of synapsin I gene in mice and investigation of brain slices electrophysiologically, the mutation is generated by ho-

mologous recombination. And it is found that synapsin I plays a vital role in physiological events such as neurotransmitter release and synaptic plasticity, etc.

**Key words** synapsin I, synaptic vesicles, phosphorylation, neurotransmitter release, synaptic plasticity

## 白细胞介素 2 免疫毒素研究进展

王 露 马大龙

(北京医科大学免疫系, 北京 100083)

**摘要** 应用基因工程技术已研制出多种免疫毒素, IL-2免疫毒素是研究最为成功的例子之一, 包括 IL-2与绿脓杆菌外毒素的融合蛋白, IL-2与白喉毒素的融合蛋白等. 这类毒素以 IL-2为导向分子, IL-2受体阳性细胞为靶细胞, 治疗移植排斥反应、自身免疫性疾病、T 细胞淋巴瘤等疾病, 在 I/II 期临床试验中已取得了较好的疗效. 但是这类免疫毒素对人体均有较强的抗原性, 使治疗时间和效果均受限制, 为此研制了人源化的 IL-2免疫毒素, 能在体内外杀伤 IL-2受体阳性细胞.

**关键词** 白细胞介素 2, 免疫毒素, 人源化毒素

在免疫毒素研究领域, 一个值得注意的研究动向是将细胞因子与毒素偶联制成细胞因子免疫毒素, 用于移植排斥反应、自身免疫病及某些肿瘤特别是白血病的治疗. 其中白细胞介素 2 (IL-2) 免疫毒素是研究最为成功的例子之一, 目前在美国已进入临床 I/II 期试验, 收到较好疗效, 是一种应用前景看好的新一代免疫抑制剂<sup>[1~3]</sup>. 本综述主要介绍 IL-2免疫毒素的结构、功能及临床应用的最新进展.

### 1 IL-2和 IL-2受体

IL-2是在分裂素或特异性抗原刺激下, 主要由辅助性 T 细胞产生的一种淋巴因子. IL-2受体 (IL-2R) 至少是由三种独特的膜成分组成, 分别是  $\alpha$  链 (IL-2R $\alpha$ )、 $\beta$  链 (IL-2R $\beta$ ) 和  $\gamma$  链 (IL-2R $\gamma$ ). 绝大多数静止的 T 细胞、LGL 和单核细胞并不表达 IL-2R, 而在一些肿瘤、自身免疫病和移植排斥反应的病人体内有 IL-2R 的异常高表达, 这些表达 IL-2R 的细胞恰好可以成为 IL-2免疫毒素治疗的一个靶子, 使 IL-2免疫毒素可以准确地杀伤这类细胞<sup>[4]</sup>.

### 2 基于 PE 的 IL-2免疫毒素

#### 2.1 绿脓杆菌外毒素 (PE)

PE 是绿脓杆菌分泌的单链毒素, 其作用机理主要是通过催化 ADP 的不可逆核糖化, 在 NAD 存在时使延长因子 2 (EF-2) 失活. 肽链不能延长, 蛋白质合成即被抑制, 引起细胞的死亡. PE 有三个主要功能区, 即 I 区 (由 Ia 和 Ib 组成), II 区和 III 区. 缺失掉 Ia 区的 1~252 氨基酸残基后可产生一个分子量为 40 000 的蛋白质, 称为 PE40<sup>[5]</sup>.

#### 2.2 IL-2-PE40免疫毒素

Lorberbourn-Galski 等<sup>[6]</sup>1988 年构建了第一个 PE 与 IL-2 的融合毒素即 IL-2-PE40. 这种融合毒素可以抑制靶细胞蛋白质的合成, 具有细胞毒性作用, 体内试验也证明具有较好的免疫抑制剂作用, 能使小鼠的恶性淋巴瘤消退, 抑制移植排斥反应, 延缓心脏移植鼠的存活期, 抑制一些自身免疫病的发生发展, 如自身免疫性关节炎、葡萄膜炎和脑膜炎等, 但是 IL-2-PE40 对活化的人 T 细胞和成人 T 细胞白血病