

综述与专论

ω -芋螺毒素及其在 Ca^{2+} 通道研究中的应用*

徐幼芬 施玉樑

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

提 要

ω -芋螺毒素 (ω -CTX)——一组含 25—29 个氨基酸残基的亲水肽, 已能人工合成, 是近年从海产软体动物中发现的专一作用于电压敏感性钙通道的突触前阻断剂, 利用它和双氢吡啶类药物可将细胞膜的 Ca^{2+} 通道区分为不同亚型。

关键词 ω -芋螺毒素, 电压敏感性钙通道, 神经递质释放, Ca^{2+} 通道亚型, Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome

芋螺 (conus), 属海洋软体动物腹足类, 约有 300—500 种, 芋螺的毒液装置为 3.5—7 μ m 的椭圆形颗粒, 外被以多糖包膜, 中心透明液体含毒蛋白及其它有机化合物^[1]。

在芋螺毒液中除发现一些酶, 睡眠肽, 加压素及兴奋心肌和平滑肌的物质外, 还含多种小分子毒蛋白, 依其对神经肌肉传递的作用部位, 可将这些毒蛋白分为三类: a. α -芋螺毒素, 与 α -银环蛇毒素相似, 作用于突触后, 同乙酰胆碱 (ACh) 竞争受体。b. μ -芋螺毒素, 与河豚毒素相似, 选择性地抑制电压敏感的钠通道。c. ω -芋螺毒素 (ω -conotoxin, ω -CTX), 专一

阻断神经末梢的电压敏感钙通道, 影响神经末梢递质释放^[2]。(见图 1)

通道和受体蛋白的鉴定、纯化, 依赖于具专一作用和高亲和性结合能力的毒素。 α -银环蛇毒素对胆碱受体, 河豚毒素和蝎毒素对钠通道研究的推动就是成功的例子。 ω -CTX 正是近年发现的, 对钙通道有专一作用的配体。由于它对不同亚型钙通道的作用不同, 使得它成为研究 N 型钙通道、分析神经末梢的递质释放过程和鉴别钙通道亚型的有用工具。

ω -CTX 是分子量为 2 000—3 000kD 含 25—29 个氨基酸残基的亲水肽, 呈弱碱性, 分子带 +5 电荷, 含三对二硫键, 及多个羟基化氨基酸残基, 包括三个羟脯氨酸^[3]。

ω -CTX 的氨基酸序列如图 2 所示。目前有关 ω -CTX 的研究资料主要来自两种芋螺的毒素: a. 地纹芋螺毒素 (conus geographus, ω -CgTX), 现已分离出五类结构: GVIA, GVIB, GVIC, GVIIA, GVIIB; b. 魔术师芋螺毒素 (conus magus, ω -CmTX), 现已分离

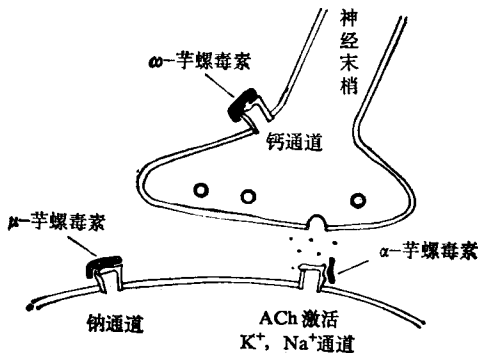


图 1 ω -芋螺毒素在神经肌肉接头的作用部位

* 国家自然科学基金资助项目 No. 3907323.

收稿日期: 1992-01-22 修回日期: 1992-08-27

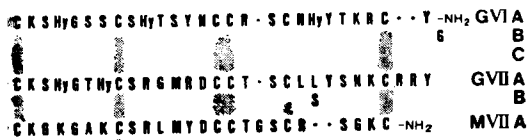


图2 ω-芋螺毒素的氨基酸顺序(引自[2])

出 MVIA 和 MVIIA 两类。尽管来源不同,但目前得到的多种 ω-CTX 在结构上的差异都不很大^[2]。

1 ω-CTX 的结合位点和受体

ω-CTX 的受体在脑中的分布是不均匀的。标记 GVIA 在大脑皮层中密度最高,两倍于海马,12—25 倍于垂体,白质中很少。在垂体中齿状回和后叶密度高,中叶几乎不存在。由于垂体后叶主要为神经末梢,看来 ω-CTX 受体分布与神经元和突触的分布相一致^[4]。

用 ¹²⁵I-GVIA 对脑 P₂ 组分进行光亲和性标记,发现三个被特异标记的多肽,分子量分别为 310kD, 230kD 和 37kD^[5]。其中小分子量的光带最强,甚至有某些未标记毒素存在时也能显示出来。但若有大量未标记 GVIA 存在时,这三个光带就不明显了,说明这些成分与 GVIA 的结合是特异的。由此推测这三个成分组成了 GVIA 受体。GVIA 与 37kD 的成分呈等分子结合,而两个大分子量的成分含有不等量碳水化合物。不同组织中的 GVIA 受体分子量的差异,可能就源于此^[5]。上述三个成分可能组成钙通道的几个亚单位^[5]。

ω-CTX 与其受体的结合是很迅速和牢固的^[6]。一般 5min 内与受体结合的毒素即达 50%,之后变缓,90min 饱和。结合是相对不可逆的,与受体结合 8h 后只有约一半毒素解离。随着毒素浓度的升高与受体结合的量亦增加,但二者不呈直线关系。硫氮卓酮(ditiazem)抑制毒素与受体结合的实验结果提示,可能存在两个或多个结合位点。用鼠脑 P₂ 组分进行研究,得到了 GVIA 高、低两个结合位点的参数,高亲和性结合位点的 K_d(解离常数)为 3.0 pmol/L, B_{max}(蛋白的最大结合量, pmol/mg)为 0.38,低亲和性结合位点相应的数值分

别为 K_d3.5 nmol/L, B_{max} 为 2.91。从中看到,高、低亲和性结合位点的解离常数都很低,但结合位点的数量后者大大多于前者。

GVIA 与受体的结合受 2 价和 3 价金属离子的抑制^[7]。抑制强度同这些离子抑制神经母细胞慢失活钙内流的一致。即 La³⁺ > Cd²⁺ > Ni²⁺ > Ca²⁺。作者认为这些离子的作用可能是通过同毒素竞争结合位点而实现的,若受体已与毒素结合,则这些金属离子就失去作用。氨基糖苷类抗菌素和多粘菌素 B 也抑制 GVIA 与受体结合^[8],其作用机制可能同 2 价和 3 价离子的相似, GVIIA, GVIIIB 也抑制 GVIA 与受体的结合^[5,6]。

2 ω-CTX 对神经肌肉传递的作用

Sano 等的资料^[9]表明,ω-CTX 以不可逆地阻遏神经递质的释放而无突触后作用。40 μmmol/L 的 ω-CTX 能明显减小青蛙皮胸肌神经肌肉接头的终板电位(EPP)振幅,这种作用是不可逆的,与毒素的浓度和作用时间有关,并随着溶液中钙浓度的提高而减弱(见图 3)。以冲洗除去毒素,6h 后亦不见 EPP 恢复。外液中钙浓度增加到 10mmol/L 后,ω-CTX 就不再降低 EPP 的振幅。实验还表明,ω-CTX 能降低 EPP 的平均量子含量(m),减少可利用的量子数(n),但不影响量子释放的几率(P)。ω-CTX 对小终板电位(MEPP)的振幅和发放频率以及神经末梢的动作电位均无影响。由一些作用于神经冲动诱发钙内流过程的药物,如 4-氨基吡啶,链霉素等均能改变可利用的量子数,以及 Ca²⁺ 对 ω-CTX 作用的对抗,Sano^[9]指出,接头前神经末梢的电压敏感性钙通道为 ω-CTX 的作用靶器。

在牛蛙的交感神经节也获得了相似的结果^[10]。2 μmol/L 的 ω-CTX 在几秒钟内即明显降低兴奋性突触后电位的振幅和量子含量,依 Ca²⁺ 动作电位的振幅和最大上升速率。高浓度 Ca²⁺ 使毒素作用减弱。研究还发现,小鼠的神经肌肉接头在高达 100nmol/L 的 ω-CTX 作用下,EPP 不受影响。进一步分析表明,这

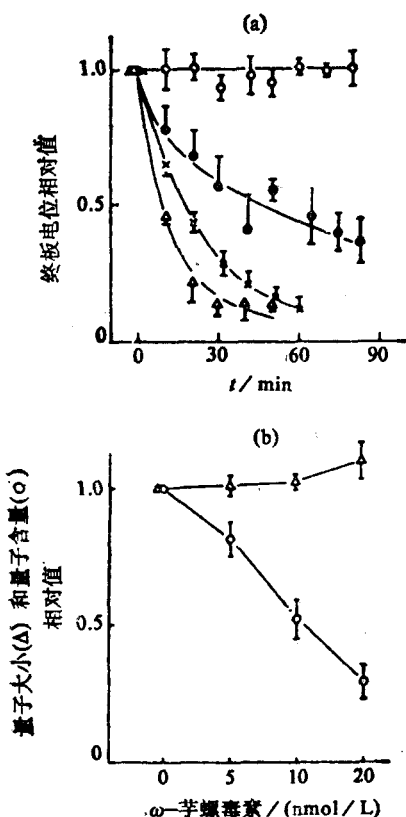


图3 ω-CgTX对神经肌肉传递的抑制作用
(a)与溶液中[Ca²⁺]有关(○, ●, ▲和△分别表示[Ca²⁺]为0.9, 2.7, 6和10mmol/L); (b)明显降低终板电位的量子含量, 而不影响量子大小 (引自[9])

与小鼠的运动神经末梢具有与蛙不同亚型的钙通道有关^[9]。最近利用标记ACh在小鼠膈肌研究了ACh的诱发释放以及刺激突触前 α_1 和 β_1 肾上腺素能受体对这种释放的易化, 结果表明, 虽然两种钙通道阻滞剂(ω -CTX和双氢吡啶类药物, DHPS), 均不改变电刺激诱发的ACh释放, 但却分别抑制上述两种肾上腺素能受体易化的效应。

3 ω-CTX敏感的钙通道

电压门控钙通道在调节膜兴奋性、神经递质释放和激素分泌以及肌肉收缩中有重要的作用。Nowycky等^[13]依据电生理和药理学资料, 将钙通道分为T, L和N三个亚型。近年来, 研究者们倾向于依据激活阈值把T型归为低阈值

钙通道(LVA), L和N型以及近年所发现的P型通道归为高阈值钙通道(HVA)。双氢吡啶类药物, 如硝苯吡啶, Nitrendipine等主要作用于L型钙通道, 而 ω -CTX则主要作用于神经元的N型钙通道^[12]。

用鸡胚感觉神经元进行“细胞贴附式”(cell-attached mode)膜片箝记录时发现两种HVA钙通道电流^[4], 单位电导分别为25.6和13.1pS。在“外面向外式”(outside-out mode)膜片箝记录时, 观察到5 μ mol/L的 ω -CTX即能不可逆地阻遏小电导的钙通道, 而对25.6pS的钙通道无影响, 或仅有微弱的抑制作用, 冲洗后即恢复(见图4)。这些不受 ω -CTX作用的钙通道, 则对DHPS类钙通道拮抗剂和激动剂(如硝苯吡啶和Bay K 8644)敏感。实验还观察到, 对 ω -CTX敏感的Ca²⁺电流衰减较快, 而对DHPS敏感的Ca²⁺电流无衰减现象。这样可将鸡胚感觉神经元存在的两种HVA钙通道区分为对 ω -CTX敏感的N型钙通道和对DHPS敏感L型钙通道。后者进而又可区分为对 ω -CTX不敏感的和仅受 ω -CTX短暂影响的钙通道^[4]。在鸡胚感觉神经元中, 以N型为主, L型仅占10%。类似的实验结果, 在IMR-32人类神经母细胞, 成熟大鼠后根神经节细胞, PC₁₂细胞和颈上神经节细胞中也有报道。

控制神经递质释放的是对 ω -CTX敏感

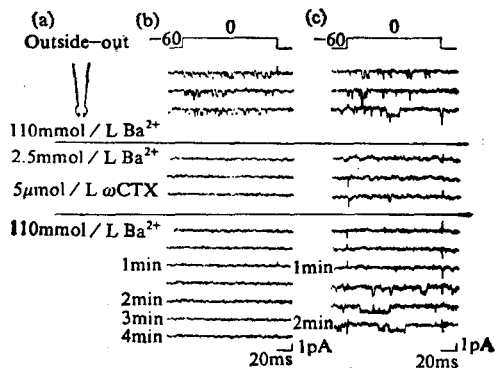


图4 ω-芋螺毒素对两种不同电导钙通道的作用
(a)实验条件, “外面向外式”膜片; (b)不可逆抑制小电导活动; (c)对大电导的作用是可逆的。0和-60为钳位电压(mV)。 (由[14]改画)

而不是对 DHPS 敏感的钙通道,这已在外周神经,如神经肌肉接头,交感神经节,电鱼电器官^[10],肾神经得到证实。在中枢神经系统的纹状体和海马也有报道, ω -CTX 可抑制由电刺激引起的递质释放,而 DHPS 则无此作用。但对由 KCl 诱发的去极化, DHPS 仍有一定抑制效应。

4 对 ω -CTX 和 DHPS 均不敏感的钙通道

对大鼠中枢神经系统 and 外周神经系统的研究发现,除存在分别对 ω -CTX 和 DHPS 敏感两种不同的 HVA 钙通道外,还有另一种对 ω -CTX 和 DHPS 均不敏感的钙通道^[15]。如在大鼠后根神经节细胞, $3\mu\text{mol/L}$ 的 ω -CTX,能快速、不可逆地抑制 HVA Ca^{2+} 电流的 54%, $0.1\text{--}10\mu\text{mol/L}$ 的硝苯吡啶可抑制 HVA 的 30%,但当将二者混合使用时,只能抑制

HVA 的 69%。这样大鼠的 HVA 钙通道就被分为对 ω -CTX 敏感和对 DHPS 敏感以及对二者均不敏感的三种。其它神经元也有对 ω -CTX 和 DHPS 均不敏感的 HVA 钙通道的报告^[15](图 5),它在大鼠交感神经节占 10%,在浦肯野氏神经元占 90%。在大鼠后根神经元,脊髓神经元和视皮层,这三种钙通道的比例均为:对 ω -CTX 敏感的占 50%,对 DHPS 敏感的和对二者均不敏感的各占 1/3。

从上述实验可以看出, ω -CTX 和 DHPS 的作用有重叠,而不是简单的相加,目前认为,这是由于 $10\mu\text{mol/L}$ 的硝苯吡啶阻断了一部分 N 型 Ca^{2+} 电流所致^[16]。对 ω -CTX 和 DHPS 均不敏感的 HVA Ca^{2+} 流,其动力学性质与 N 型 ω -CTX 敏感的 Ca^{2+} 流相似。

有资料^[17]表明,对 ω -CTX 和 DHPS 均不敏感的 HVA Ca^{2+} 流,可被漏斗网蜘蛛毒素 (funelwep spide toxin) 所阻断。利用亲和层析分离出的该毒素结合蛋白,证明是另一种钙通道,被命名为“P”通道^[17]。P 通道集中于神经末梢,它被认为参与神经递质释放过程。

综上所述,依据 ω -CTX 和 DHPS 的药理作用,可将 HVA 钙通道分为不同亚型,这些亚型在不同神经元或同一细胞中的不同部位有不同分布。而对 ω -CTX 敏感的钙通道在不同组织、细胞中分布的不同,导致了该毒素对不同组织、细胞作用的差异。如浓度为 $0.3\mu\text{mol/L}$ 的 ω -CTX 能完全阻断鸡、蛙脑突触体由去极化引起的钙内流,而在大鼠脑突触体,浓度高达 $3.3\mu\text{mol/L}$ 的该毒素只能抑制 Ca^{2+} 流的 40%^[18]。这就是说,调节大鼠脑突触体由去极化引起钙流的通道对 ω -CTX 的敏感性只有鸡、蛙突触体的十分之一。在同一种动物的中枢神经和外周神经元中,也存在着这种差异,如蛙外周运动神经末梢对 ω -CTX 的敏感性较中枢低 10 倍。在大鼠中枢存在着对 ω -CTX 敏感性低的钙通道,而在神经肌肉接头前末梢膜,则未发现对 ω -CTX 敏感的钙通道。所以将毒素注射于大鼠颅内可引起动物颤抖,而施于外周则不影响神经肌肉传递^[18]。

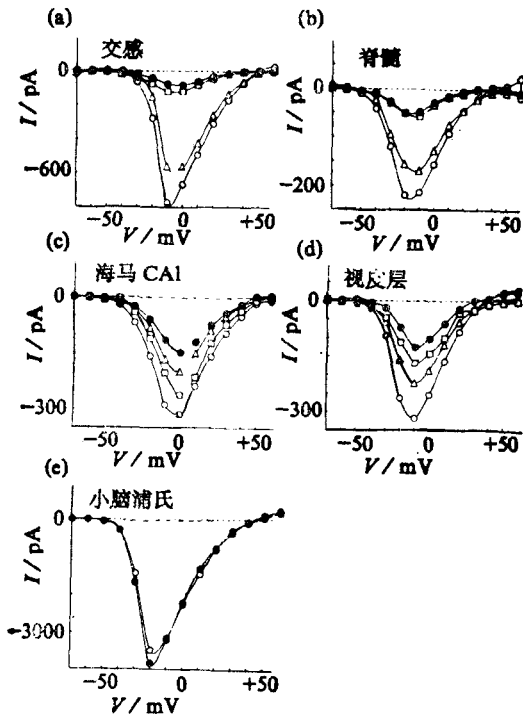


图 5 Nitrendipine 和 ω -CgTX 作用下大鼠不同神经元的 HVA 钙流的 I(pA)-V(mV) 关系
 ○: 对照, △: $10\mu\text{mol/L}$ Nitr, □: $3\mu\text{mol/L}$ ω -CgTX, ●: ω -CgTX + Nitr. (由 [15] 改绘)

5 对 LEMS 病因与 Ca^{2+} 通道功能研究的推动

LEMS (Lambert-Eaton Myasthenic Syndrome) 是一种自身免疫性疾患,病人中有的同时伴有周围胆碱能神经传递功能障碍。临床症状为四肢无力,易疲劳及植物性神经功能紊乱。目前的资料已证明, ω -CTX 敏感的钙通道为 LEMS 自身抗体的靶器^[19]。¹²⁵I- ω -CTX 能与人体小细胞肺癌细胞结合,并显示出特异性和饱和性,与同神经元的结合相似。研究还发现,在小细胞肺癌细胞膜具有电压敏感的钙通道:高 K^+ 去极化引起钙内流,不但 EGTA,而且 2 价金属离子 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 都能抑制这种 Ca^{2+} 流, ω -CTX 也能使这种 Ca^{2+} 流明显减小。对 ω -CTX 不敏感的那部分 Ca^{2+} 流则可能被硝苯吡啶所抑制,这些结果说明,小细胞肺癌细胞存在着分别对 ω -CTX 和硝苯吡啶敏感的两类钙通道^[19]。研究还发现,LEMS 病人血清的抗体能与 ¹²⁵I- ω -CTX 标记的小细胞肺癌细胞以及神经元的电压敏感钙通道产生相同的沉淀反应^[19]。这进一步表明,病人周边胆碱能传递紊乱,是由于小细胞肺癌细胞作为抗原触发引起的自身免疫,从而影响了参与递质释放的钙通道的功能。当将 LEMS 病人的血清或血清免疫球蛋白注射给大鼠后,用电子显微镜观察到大鼠运动神经末梢递质释放活动带数目减少,和电压敏感钙通道的数量减少^[19]。

6 ω -CTX 减少功能钙通道数目

McCleskey 等利用膜片箝技术在鸡胚后根神经节神经元对 ω -CTX 的作用进行了分析^[12]。获得的结果是,在含有多个通道的“外面向外式”膜片,将 ω -CTX 施加于膜外溶液时, Ca^{2+} 电流振幅迅速降低。同时伴有与通道活动有关的噪音降低。在仅含几个通道的“外面向外式”膜片,当膜片微管中存在 ω -CTX 时,去极化引起的单位活动减少,但单通道电流的振幅不变。这说明毒素的作用是减少功能通道的数目。

实验还观察到,在“细胞贴附式”膜片,将 ω -CTX 加到标本溶液,即将毒素应用于膜片以外的其余膜部分,结果是多次施加毒素,亦未能观察到通道活动的变化;甚至在极小片“外面向外式”膜片,仍能观察到 ω -CTX 的作用。由此看来, ω -CTX 不像是通过一可扩散的细胞浆内的第二信使或 G 蛋白,而是直接作用于钙通道本身^[12]。研究还表明,将细胞膜维持在 -60 mV 以使通道关闭,或以持续去极化使通道失活,即无论静止态或失活态的钙通道,均可受到 ω -CTX 的作用。

参 考 文 献

- 1 魏利平,傅敏.有毒的贝类.海洋药理学杂志,1984;3(1): 57
- 2 Olivera B M, Cray W R. Marine snail venoms. *Handbook of Natural Toxins*, 1988; 3: 327
- 3 Olivera B M, McIntosh J M, Cruz L J *et al.* Purification and sequence of a presynaptic peptide toxin from conus geographus venom. *Biochem*, 1984; 23(22): 5087
- 4 Takemura M, Kiyama H, Fukui H *et al.* Distribution of the ω -conotoxin receptor in rat brain. An autoradiographic mapping. *Neurosci*, 1989; 32: 495
- 5 Abe T, Saisu H. Identification of the receptor for ω -conotoxin in the brain. Probable components of the calcium channel. *J. Biol Chem*, 1987; 262: 9877
- 6 Yamaguchi T, Saisu H, Mitsui H *et al.* Solubilization of the ω -conotoxin receptor associated with voltage-sensitive calcium channels from bovine brain. *J Biol Chem*, 1988; 263: 9491
- 7 Abe T, Koyano K, Saisu H *et al.* Binding of ω -conotoxin to receptor sites associated with the voltage-sensitive calcium channel. *Neurosci Lett*, 1986; 71: 203
- 8 Kanus H-G, Striessnig J, Koza A *et al.* Neurotoxic aminoglycoside antibiotics are potent inhibitors of [¹²⁵I] omega-conotoxin GVIA binding to guinea-pig cerebral cortex membranes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1987; 336: 583
- 9 Sano K, Enomoto K-I, Maeno T. Effects of synthetic ω -conotoxin, a new type Ca^{2+} antagonist, on frog and mouse neuromuscular transmission. *Eur J Pharmacol*, 1987; 141: 235
- 10 Koyano K, Abe T, Nishiuchi Y *et al.* Effects of synthetic ω -conotoxin on synaptic transmission. *Eur J Pharmacol*, 1987; 135: 337
- 11 Wessler I, Dooley D J, Osswald H *et al.* Differential blockade by nifedipine and ω -conotoxin GVIA of α_1 and β_1 adrenoceptor-controlled calcium channels on motor nerve terminals of rats. *Neurosci Lett*, 1990; 108: 173
- 12 McCleskey E W, Fox A P, Feldman D H *et al.* ω -conotoxin: direct and persistent blockade of specific types of calcium channels in neurons but not muscle.

- Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**: 4372
- 13 Nowycky M C, Fox A P, Tsien R W. Three types of neuronal calcium channels with different calcium agonist sensitivity. *Nature* (London), 1985; **316**: 440
 - 14 Aosaki T, Kasai H. Characterization of two kinds of high-voltage-activated Ca-channel currents in chick sensory neurons. Differential sensitivity to dihydropyridines and ω -conotoxin GVIA. *Pflugers Arch*, 1989; **414**: 150
 - 15 Regan L J, Sah D W Y, Bean B P. Ca^{2+} channels in rat central and peripheral neurons: high-threshold current resistant to dihydropyridine blockers and ω -conotoxin. *Neuron*, 1991; **6**: 269
 - 16 Jones S W, Jacobs L S. Dihydropyridine actions on calcium currents of frog sympathetic neurons. *J Neurosci*, 1990; **10**: 2261
 - 17 Llinas R, Sugimori M, Lin J-W *et al.* Blocking and isolation of calcium channels from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; **86**: 1689
 - 18 Suszkiw J B, Murawsky M M, Fortner R C. Heterogeneity of presynaptic calcium channels revealed by species differences in the sensitivity of synaptosomal ^{45}Ca entry to ω -conotoxin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987; **145**: 1283
 - 19 De Aizpurua H J, Lambert E N, Griesmann G E *et al.* Antagonism of voltage-gated calcium channels in small cell carcinomas of patients with and without lambert-eaton myasthenic syndrome by autoantibodies, ω -conotoxin and adenosine. *Cancer Res*, 1988; **48**: 4719

室温下三重态探针在生物大分子研究中的应用

卑其新 程极济

(复旦大学生理学及生物物理学系, 上海 200433)

提 要

综述了室温下三重态探针的制备和测量技术, 并举例说明了室温下三重态探针在各种生物大分子的结构、功能和动力学研究中的应用。

关键词 三重激发态, 三重态探针, 磷光

长时间以来, 人们一直使用荧光探针研究生物大分子的结构、功能和动力学, 较少使用三重态探针。过去曾认为, 磷光只能在低温下观测到。近来发现这种观念是错误的。在解决了仪器测量及除氧等技术问题后, 在室温下可以观测到溶液中蛋白质等生物大分子的磷光。由于三重态至单线态的跃迁是自旋禁戒的, 因而三重态的寿命较长, 范围在毫秒至秒之间。因此, 三重态探针比单线态探针有更多的有利之处, 可以对生物大分子运动中的慢过程如酶转换数、脂和蛋白质在膜中的旋转运动, 生物大分子复合物的运动, 蛋白质和 DNA 结构域的挠性等进行研究。通过磷光发射的物理参数, 如光谱特性、偏振特性、寿命等可以了解以上过程。

1 三重激发态的探测

有很多方法可以探测三重态^[1]。磷光的测量是最直接的方法。由于许多样品的荧光强度比磷光强度大很多, 而且荧光和磷光发射光谱常常有一定程度的重叠, 因此, 大多数磷光测量仪采用脉冲方法, 即用闪光激发分子, 通过瞬时控制一个机械光闸, 除去寿命仅几纳秒的瞬间荧光后测量磷光。目前, 仪器采用氙灯闪光灯, 时间分辨率达毫秒级。而使用激光系统时间分辨率达亚微秒级。测量磷光的另一种方法是相位方法。这种方法采用一个连续的激发光源, 强度调制成正弦函数。这样, 发射光强