神经元突触前可塑性的结构及分子基础*

潘平越[1)] 陆佩华[1)] 盛祖杭[1,2)]**

（[1)]上海第二医科大学神经生物学实验室，上海 200025；

[2)] *Synaptic Function University, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland* 20892，USA）

摘要 突触可塑性是神经元间信息传递的重要生理调控机制，它包括突触前可塑性和突触后可塑性. 突触前可塑性是指通过对神经递质释放过程的干预、修饰，调节突触强度的过程. 突触强度的变化，是通过影响量子的大小，活动区的个数和囊泡释放概率来实现的. 而突触前囊泡活动尤为重要：从转运、搭靠、融合至内吞进入下一轮循环，每一步都是由一群互相作用的蛋白质共同完成的.

关键词 突触前可塑性，突触强度，量子大小，活动区，递质释放概率

学科分类号 Q421

突触强度（synaptic strength）具有极大的变异性（variation），它不但体现在不同类的突触间，而且会在同一个突触的发育及活动过程中产生适应性变化. 我们称这种现象为突触的可塑性. 决定突触后反应大小的因素可来源于突触前，亦可来源于突触后. 根据 Katz 在 1969 年研究神经-肌肉接头时提出的“量子化理论”，突触后电流（PSC）的幅度取决于突触后接受的量子大小（q），突触前活动区（active zone）的个数（N），以及在突触前释放一个量子递质的概率（release probability，p），即 $PSC = Npq$. 这三个参数中，N 和 p 显然反映突触前的结构及分子调节机制，唯有参数 q 除了受到突触前囊泡内所含神经递质量的影响外，还有一部分取决于突触后膜神经递质受体特性. 由此可见，突触前结构及影响递质释放概率的分子生物学变化对于神经元间信息传递起着至关重要的调控作用.

1 突触前可塑性产生的结构基础

1.1 与量子大小（quantal size）相关的可塑性

突触强度的变化可来源于量子大小变化. 导致量子大小变化的突触前因素主要有两个：囊泡内神经递质的含量和神经递质离开囊泡的动力学.

1.1.1 递质含量：许多实验表明，突触囊泡（synaptic vesicle，SV）内的递质浓度是相同的，因此囊泡体积越大则递质含量越多，q 也相应增大[1,2]. 囊泡的大小也呈活动依赖性变化，即活动越频繁，囊泡越小，这一现象于 20 世纪 70 年代和 80 年代就在七鳃鳗等水生动物的神经系统突触活动中观察到. 但亦有研究表明，在乙酰胆碱能突触中，囊泡内递质浓度可受递质转运体（transmitter transporter）的调节而发生改变，由此影响量子的大小. 递质含量水平对突触强度的调节是突触活动过程中一种有效的适应机制.

1.1.2 囊泡动力学：递质释放的过程本身也会影响量子大小. 近年来观察到的有趣现象是，被神经递质激活的受体量不受递质释放量的影响，而受递质释放速率的调控[3]. 如哺乳动物中枢神经系统在未成熟时，因为谷氨酸的释放速率较慢，只能激活突触后的 NMDA 受体，而不能激活 AMPA 受体，使得突触后记录到的 mEPSC 幅度降低，即 q 变小. SV 的胞吐与内吞模式可能直接影响递质释放速率. 目前，除经典的囊泡完全融合（full-fusion），又提出了两种更有效的囊泡循环机制：“kiss-and-run”模式和“kiss-and-stay”模式. 但在这两种模式中递质的释放量及速率是否有变化，尚有争议.

现在人们普遍认为三种模式可共同存在于同一神经元的递质释放过程. 最近 Grandhi 等[4]在《Nature》杂志上报道，他们在海马神经元单个囊泡水平上观察到三种循环方式并存，而且发现释放概率高的突触倾向于采用慢动力学特性（即“完全融合”型）的囊泡回收机制，而释放概率低的突触则多用“kiss-and-run”模式. 可见这是神经元信息传递在不同的生理活动调节下做出的适应性反应.

* 上海市科技发展基金资助项目（01JC14023）.

** 通讯联系人.

Tel：301-4354596，E-mail：ShengZ@ninds.nih.gov

收稿日期：2004-01-05，接受日期：2004-02-28

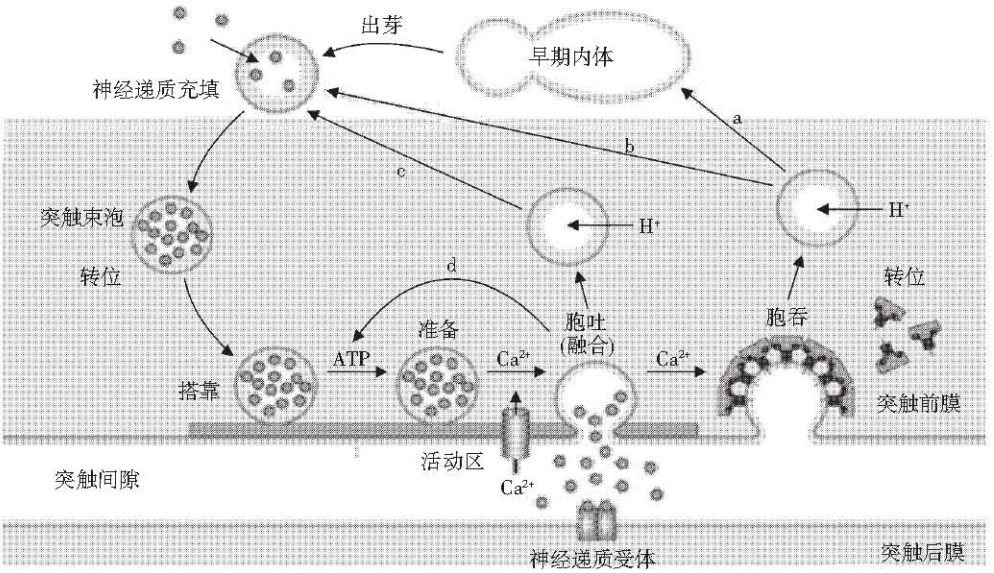

Fig. 1 Synaptic vesicle recycling mode[5]

图 1 突触囊泡循环模式[5]

突触囊泡完全融合后经 clathrin 依赖的内吞途径回收：可以通过早期内体（early endosome）回收（a）也可以直接回收（b）. 囊泡不完全融合，递质释放后迅速回收，即 kiss-and-run 模式（c）. 囊泡不完全融合，递质释放后原位填充新递质，即 kiss-and-stay 模式（d）.

1.2 与突触活动区相关的可塑性

突触活动区（active zone）具有高度规则的结构：搭靠在突触前膜的囊泡（docked vesicles）与电压依赖性钙通道蛋白紧密镶嵌（tightly sandwiched）成致密区. 尽管有不少突触只具有单一的活动区来支持突触前囊泡释放，但也有一些突触结构包含数个活动区. 如在海马神经元的兴奋性突触中，许多突触具有多个活动区的结构[6]. 活动区的个数也可以在发育后神经活动过程中被调节而增减，而这一变化总是和活动区大小（active zone size）的变化密切相关. 大多数研究认为，活动区面积越大、数量越多，突触后钙流及突触后反应也越大.

那么活动区的数量和大小是如何被调控的呢？Weeks 等[7]在海马齿状回（dentate gyrus）可塑性的研究中发现，在诱导了长时程增强（long-term potentiation，LTP）后 1 h，活动区面积相应增大，但是在 24 h 后，活动区面积反而下降，直至第 5 天才出现回升. 这种变化和新的活动区形成高度相关. 在突触活动诱导下，增大的活动区产生割裂（splitting），形成的新突触通常比已有的突触要小，这些小突触会在数日内慢慢长大，直至建立新的平衡. 在突触的发育及活动过程中这一割裂现象不但使活动区个数（N）增加，而且使单个活动区的释放概率（p）也相应增大. 但是活动区割裂是否是由突触后致密斑（postsynaptic density，PSD）割裂诱导所致，一直有争议. 新近研究发现，突触前存在不依赖突触后结构而自身具有囊泡循环和递质释放能力的活动区类似结构，称“orphan release sites”[8]. 这些高度活跃的结构可在发育和活动过程中，锚着到相应的突触后致密斑上，进而发育成新的活动区. 这一主动的调节过程为先前的“割裂”学说作了很好的补充.

1.3 与囊泡相关的可塑性

释放概率（p）对于突触前递质释放起着至关重要的作用. 活动依赖性短时程可塑性（short-term plasticity），即在强直刺激（tetanic stimulation）下短时间内出现的增大或减小的突触后反应，就和释放概率的不断变化有关. 而 p 在突触前的重要结构基础是待释放囊泡（readily releasable vesicles）.

在强直刺激下出现的突触强度变化很大程度上反映了突触前囊泡的回收及循环利用状态. 待释放囊泡池（readily releasable pool，RRP）中的囊泡可以在钙离子流激发下迅速与突触前膜融合并释放递质. 这些囊泡清空后可以被离活动区较远的缓慢释放囊泡池（slowly releasable pool，SRP 或 proximal

pool）中的囊泡快速补充. 在高频活动下 RRP 和 SRP 中囊泡又可被位于更远的储存囊泡池（reserve pool）中的囊泡补充. 荧光染料 FM1-43 及膜电容测量技术的应用，给囊泡循环的研究提供了直接观察的方法. 利用染料嵌插于脂膜并随内吞进入胞体的特征，每一个囊泡的融合循环（fusion cycle）都可以被跟踪记录，具有不同融合特性的囊泡也因此得以区分[9]. 许多体内和体外的实验结果提示：待释放囊泡的量和突触前囊泡释放概率密切相关，RRP 越大，p 就越大.

2 突触前可塑性产生的分子基础

2.1 调节囊泡循环的分子基础

在具有致密核心颗粒（dense-core vesicle）的突触中，囊泡大小不但随刺激频率的变化而改变，也可以受到突触前第二信使如 cAMP 等的调节[10]. 影响囊泡融合及递质释放动力学的因素就更为复杂. 囊泡膜和突触前膜的融合依赖 SNARE（soluble NSF attachment protein receptor）核心复合体的形成. 研究表明，一旦复合体的形成受到抑制，递质释放的速率就会下降. 一般来说，所有介导囊泡融合的分子和所有参与囊泡内吞的分子都有可能参与这一调节. Synaptotagmin 是耦联胞吐及胞吞过程的一种重要蛋白质. 它不但作为钙离子感受器调节胞吐过程，也通过和 AP2 蛋白相互作用参与对内吞过程的调控. 不同型别的 synaptotagmin（Syt）在囊泡循环模式的选择上有明显的个体特异性[11]. 如 Syt Ⅰ的 C_2A 区段的钙离子结合位点发生突变，SV 就无法与突触前膜完全融合（full fusion）；如果使 Syt Ⅳ的 C_2B 区段的钙离子结合位点发生突变，“kiss-and-run”模式就受到明显抑制. 除 synaptotagmin 外，与胞吐-胞吞耦联相关的蛋白质还有 syntaphilin 等. 新近研究发现，syntaphilin 不但可以通过和 syntaxin 结合，抑制 SNARE 核心复合体的形成，还可以和 GTP 酶 dynamin1 相互作用，阻碍 clathrin 依赖的囊泡内吞[12]. 此外，由于胞吐作用是在钙离子内流激发下产生的，所以一些钙离子敏感的酶类，如 calcinurin 等也可能参与调控.

2.2 调节活动区结构的分子基础

活动区面积的增加以及新活动区的形成需要一系列骨架蛋白、细胞间黏附分子和蛋白激酶等共同完成. 实时成像显示，这一变化过程在几十分钟内就可以完成. 构成活动区的必需蛋白是在 Piccolo-Bassoon 运输小泡的携带下，特异地定位、组装，并发育为有功能的活动区[13]. 其中包括介导囊泡膜融合的 SNARE 蛋白：syntaxin，Snap-25 等，活动区骨架蛋白：Piccolo，Bassoon，RIM（Rab3-interacting molecule）等. 近来有报道提示，RIM1α 可能作为突触前主要骨架分子，整合了所有活动区蛋白质和突触囊泡间的相互作用，调节着囊泡释放[14]. 此外，SYN-2 编码的 liprin 蛋白也可能通过酪氨酸激酶的途径在维持活动区结构及功能中起重要作用. 在 SYN-2 的突变体中，突触活动区结构弥散，囊泡释放亦受到影响[15]. 研究还发现，在突触活动过程中，突触前活动区的形成，还受到突触后扩散分子 NO 的反向调控（retrograde regulation）[16].

2.3 影响囊泡释放概率的分子基础

2.3.1 囊泡准备（priming）：就分子水平而言，囊泡融合前的准备过程对其释放概率影响极大. 准备过程是这样的：静息状态下的闭合型（closed form）syntaxin-1 在各种准备因子（priming factors）的作用下，与 Munc18-1 分离，形成开放构象，这是 SNARE 复合体形成及囊泡膜融合的前提. 在准备过程中，SNAREs 处于可复性部分聚合状态，而一旦被钙离子激发，更紧密的复合体便迅速形成，从而在 30 ms 内快速完成膜融合[17]. Unc13/Munc13 及 RIM 也是两个主要的准备因子. 现已发现在线虫的 unc-13 及 RIM 突变体中，递质释放受到严重阻碍. 在大鼠中，敲除 RIM-1 的神经元，表现出各种突触可塑性的改变，如在海马 CA1 区兴奋性神经元的囊泡释放概率 p 减小，而抑制性神经元 p 却略有升高[14]；此外，mossy fibre 突触的 LTP 被完全抑制[18]，提示突触前囊泡释放还参与了某些长时程可塑性的机制. 本文作者实验室最近发现，死亡相关蛋白激酶（DAP-kinase）通过磷酸化 syntaxin-1A，调节了其与 Munc18-1 的结合，且这种调节呈钙离子/突触活动依赖性[19]. 该实验室克隆的另一个蛋白 syntaphilin[20]，可通过与 SNAP-25 竞争结合 syntaxin，而抑制 SNARE 核心复合体的形成. 它对递质释放的抑制作用已在大鼠颈上神经节和海马神经元的突触传递中证实.

2.3.2 SNAREs 蛋白循环：在 SNARE 核心复合体形成前，足量 SNARE 蛋白单体的存在是膜融合的先决条件，这就涉及 SNARE 蛋白的循环利用（图 2）. 在完成了一次膜融合及胞吐外排后，形成紧密复合体的 SNARE 蛋白需要通过 SNAPs 介导 NSF 的 ATP 酶解，变成结构舒松的蛋白质单体，分布于囊泡膜

及突触前膜. 本文作者实验室研究表明，SNAP-29 通过结合 SNARE 复合体中的 syntaxin-1，阻碍 α-SNAP 与 syntaxin-1 的相互作用，从而抑制 SNARE 核心复合体的解聚. 在大鼠颈上神经节突触前神经元内注入 SNAP-29 重组蛋白，可影响突触的持续活动[21].

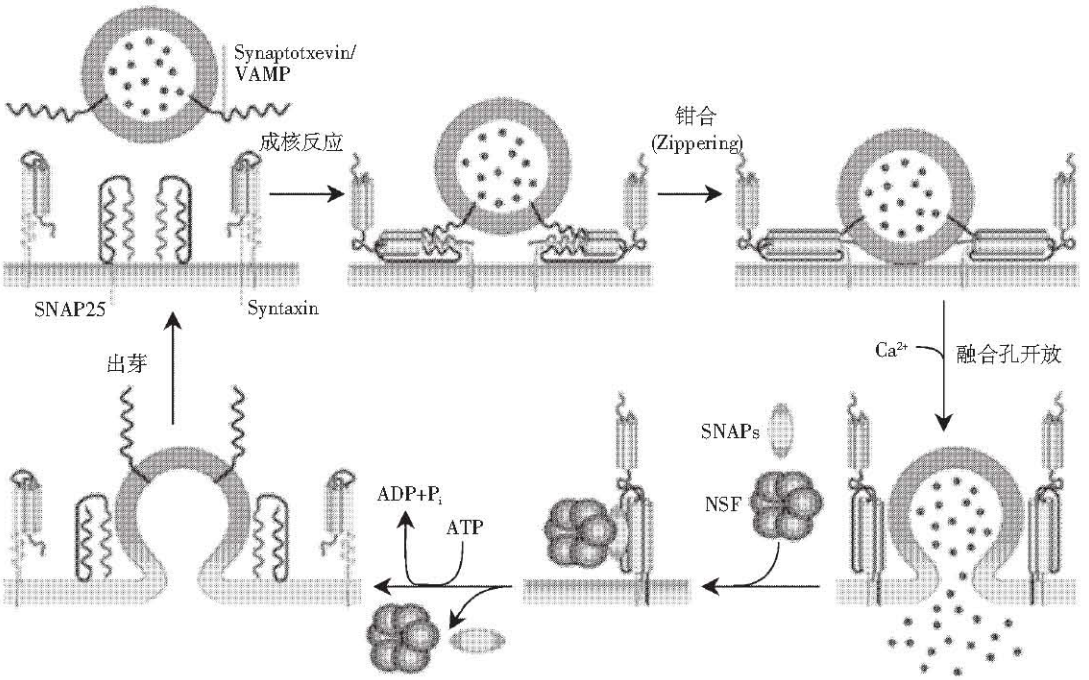

Fig. 2 SNARE complex recycling during synaptic vesicle fusion[22]

图 2 突触囊泡融合过程中 SNARE 复合物的循环[22]

2.3.3 钙离子通道及相关蛋白：影响释放概率 p 的另一类特殊分子就是钙离子通道及其相关蛋白质. 它们主要通过干涉膜融合过程来调节递质释放. 传导性（conductance）大的、开放概率高的通道可以允许较多的钙离子在突触前膜形成局域性浓集，从而使 p 增大. 具有高密度通道的小活动区，能在突触后产生较大的反应也是这个原因. G 蛋白可能通过和钙离子通道的作用改变其开放动力学，从而影响钙离子内流[23]. 在哺乳动物 CNS 中，钙离子通道 α1 亚基可以和许多囊泡蛋白及活动区蛋白相互联系，为突触强度可塑性的产生提出了另一可能的分子机制. 囊泡蛋白 synaptotagmin 是目前较为公认的钙离子感受器（calcium sensor）[24]，它对钙离子的敏感性主要受自身磷酸化及去磷酸化的调节. 已经有许多研究报道了该蛋白质的不同异构体对突触强度的影响[25]. 而 synaptotagmin 对钙离子的敏感性亦受到突触前若干相关蛋白，如 complexins[26]，Snapin[27]等的调节. 本文作者实验室克隆了能和 SNAP-25 相互作用的 snapin，发现它能调节 SNARE 复合物和 synaptotagmin 的结合，促进突触传递. 进一步研究表明，此作用同时受到 PKA 的调控[28].

2.3.4 囊泡动员（vesicle mobilization）：在高频活动下，储存囊泡的动员，以及对 RRP 囊泡数的补充也调节着 p 的大小. Synapsins 是其中研究较为成熟的一种存在于囊泡膜上的蛋白质. 它们通过和突触前骨架结构（微丝和微管）的交联，使大量储存囊泡处于制动状态. 在胞内钙增高时，synapsins 被钙调蛋白激酶（CaMK）磷酸化而解聚，从而动员被交联制动的囊泡，使它们进入待释放状态[29]，其他激酶如 MAP kinase，PKA，PKC 等也参与 synapsins 的功能调节.

神经系统的功能在外环境作用下，不断产生适应性改变，从而维持其相对稳定. 这种变化在微观水平上就表现为突触结构及功能的变化. 本文就突触前机制对突触传递的调节作了综述. 需要指出的是，并非所有突触在任何时候都遵循钙离子依赖的 SNARE 融合模式[30]，这里，我们也不可能涵盖所有的调节机制. 应该看到，在突触前可塑性的诠释中，没有一种固定的，普遍适用的模式. 神经系统

中，不同部位的神经元间，乃至同一神经元不同突触间均有很大的差异，在培养体系中观察到的功能变化也并不一定真实反映体内情况. 因此，仍有许多未知数有待我们去进一步探索，以理解突触功能的调节及其生理意义.

参 考 文 献

1 Bruns D, Riedel D, Klingauf J, *et al*. Quantal release of serotonin. Neuron, 2000, **28** (1): 205 ~ 220

2 Henze D A, McMahon D B T, Harris K M, *et al*. Giant miniature EPSCs at the hippocampal mossy fiber to CA3 pyramidal cell synapse are monoquantal. J Neurophysiol, 2002, **87** (1): 15 ~ 29

3 Renger J J, Egles C, Liu G. A developmental switch in neurotransmitter flux enhances synaptic efficacy by affecting AMPA receptor activation. Neuron, 2001, **29** (2): 469 ~ 484

4 Gandhi S P, Stevens C F. Three modes of synaptic vesicular recycling revealed by single-vesicle imaging. Nature, 2003, **423** (6940): 607 ~ 13

5 Gundelfinger E D, Kessels M M, Qualmann B. Temporal and spatrial coordination of exocytosis and endocytosis. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2003, **4**: 127 ~ 139

6 Schikorski T, Steven C F. Quantitative ultrastructural analysis of hippocampal excitatory synapse. J Neurosci, 1997, **17** (15): 15858 ~ 15867

7 Weeks A C, Ivanco T L, Leboutillier J C, *et al*. Sequential changes in the synaptic structural profile following long-term potentiation in the rat dentate gyrus: Ⅲ. Long-term maintenance phase. Synapse, 2001, **40** (1): 74 ~ 78

8 Krueger S R, Kolar A, Fitzsimonds R M. The presynaptic release apparatus is functional in the absence of dendritic contact and highly mobile within isolated axons. Neuron, 2003, **40** (5): 945 ~ 957

9 Rettig J, Neher E. Emerging roles of presynaptic proteins in calcium-triggered exocytosis. Science, 2002, **298** (5594): 781 ~ 785

10 Burgone R D, Barclay J W. Splitting the quantum: regulation of quantal release during vesicle fusion. Trends Neurosci, 2002, **25** (4): 176 ~ 178

11 Wang C T, Lu J C, Bai J, *et al*. Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. Nature, 2003, **424** (6951): 943 ~ 947

12 Das S, Gerwin C, Sheng Z H. Syntaphilin binds to dynamin-1 and inhibits dynamin-dependent endocytosis. J Biol Chem, 2003, **278** (42): 41221 ~ 41226

13 Shapira M, Zhai R G, Dresbach T, *et al*. Unitary assembly of presynaptic active zones from Piccolo-Bassoon transport vesicles. Neuron, 2003, **38** (2): 237 ~ 252

14 Schoch S, Castillo P E, Jo T, *et al*. RIM1α forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. Nature, 2002, **415** (6869): 321 ~ 326

15 Zhen M, Jin Y. The liprin protein SYD-2 regulates the differentiation of presynaptic termini in *C. elegans*. Nature, 2001, **401** (6751): 371 ~ 375

16 Nikonenko I, Jourdain P, Muller D. Presynaptic remodeling contributes to activity-dependent synaptogenesis. J Neurosci, 2003, **23** (24): 8498 ~ 8505

17 Chen Y A, Scales S J, Scheller R H. Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. Neuron, 2001, **30** (1): 161 ~ 170

18 Castillo P E. Schoch S, Schmitz F, *et al*. RIM1α is required for presynaptic long-term potentiation. Nature, 2002, **415** (6869): 327 ~ 330

19 Tian J H, Das S, Sheng Z H. Calcium-dependent phosphorylation of syntaxin-1A by the death-associated protein (DAP) kinase regulates its interaction with Munc-18. J Biol Chem, 2003, **278** (28): 26265 ~ 26274

20 Lao G, Scheuss V, Gerwin C M, *et al*. Syntaphilin: a syntaxin-1 clamp that controls SNARE assembly. Neuron, 2000, **25** (1): 191 ~ 201

21 Su Q, Mochida S, Tian J H, *et al*. SNAP-29: a general SNARE protein that inhibits SNARE disassembly and is implicated in synaptic transmission. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, **98** (24): 14038 ~ 14043

22 Chen Y A, Scheller R H. SNARE mediated membrane fusion. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001, **2**: 98 ~ 106

23 Jarvis S E, Zamponi G W. Interactions between presynaptic Ca^{2+} channels, cytoplasmic messengers and proteins of the synaptic vesicle release complex. Trends Pharmacol Sci, 2001, **22** (10): 519 ~ 525

24 Fernández-Chacón R, Konigstorfer A, Gerber S H, *et al*. Synaptotagmin Ⅰ functions as a calcium regulator of release probability. Nature, 2001, **410** (6824): 41 ~ 49

25 Südhof T C. Synaptotagmins: why so many? J Biol Chem, 2002, **277** (10): 7629 ~ 7632

26 Reim K, Mansour M, Varoqueaux F, *et al*. Complexins regulate a late step in calcium-dependent neurotransmitter release. Cell, 2001, **104** (1): 71 ~ 81

27 Ilardi J M, Mochida S, Sheng Z H. Snapin: a SNARE-associated protein implicated in synaptic transmission. Nature Neurosci, 1999, **2** (2): 119 ~ 124

28 Chheda M G, Ashery U, Thakur P, *et al*. Phosphorylation of Snapin by PKA modulates its interaction with the SNARE complex. Nature Cell Biol, 2001, **3** (4): 331 ~ 338

29 Chi P, Greengard P, Ryan T A. Synaptic vesicle mobilization is regulated by distinct synapsin Ⅰ phosphorylation pathways at different frequencies. Neuron, 2003, **38** (1): 69 ~ 78

30 Zhang C, Zhou Z. Ca^{2+}-independent but voltage-dependent secretion in mammalian dorsal root ganglion neurons. Nature Neurosci, 2002, **5** (5): 425 ~ 430

The Structural and Molecular Mechanism of Neuronal Presynaptic Plasticity*

PAN Ping-Yue[1)], LU Pei-Hua[1)], SHENG Zu-Hang[1,2)]**

([1)] *Department of Neurobiology, Shanghai Second Medical University, Shanghai* 200025, China;

[2)] *Synaptic Function University, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland* 20892, USA)

Abstract Synaptic plasticity is a physiologically important mechanism underlying neuronal information processing. In terms of expression site, synaptic plasticity can be divided into presynaptic and postsynaptic. Presynaptic plasticity is implicated in the modulation of the neurotransmitter release machinery and consequently in synaptic strength. From a physiological perspective, this type of plasticity could be derived from a change in quantal size, active zone structure, probability of transmitter release, especially, synaptic vesicle dynamics: from synaptic vesicle trafficking to the nerve terminal, docking at or fusion with the presynaptic plasma membrane, and finally, reconstitution following endocytosis. Each of these steps is mediated by the concerted activities of multiple proteins and protein complexes, thus presenting numerous points at which the cascades leading to effective neurotransmitter release could be modulated. Potential mechanisms by which the synaptic vesicle release could be modulated and synaptic activity could be silenced or enhanced at the presynaptic terminal are reviewed.

Key words presynaptic plasticity, synaptic strength, quantal size, active zone, probability of transmitter release

* This work was supported by grant from Shanghai Science Development Fund (01JC14023).

** Corresponding author. Tel: 86-301-4354596, E-mail: ShengZ@ninds.nih.gov

Received: January 5, 2004 Accepted: February 28, 2004

2004 年国际生物芯片技术论坛即将召开

2004 年 10 月 21～24 日，北京中关村生命科学园

会议由清华大学、生物芯片北京国家工程研究中心、科技部、教育部、国家自然科学基金委员会等单位共同主办，由生物芯片北京国家工程研究中心具体筹办.

会议议题将主要包括以下内容：

（1）DNA、蛋白质、细胞及组织微阵列芯片技术；（2）微流体芯片及缩微芯片实验室技术；（3）芯片药物筛选技术；（4）生物信息学技术.

会议已邀请到三十余位国际上最具权威性的生物芯片专家来做大会特邀报告，其中既有从事生物芯片前沿性探索研究的科研院校的著名教授，也有从事生物芯片研发的知名商业公司的总裁或部门经理，是国内学者和投资机构进行交流和学习的良好机会.

会议网站：http://www.capitalbiochip.com/ IFBT2004/

联系人：生物芯片北京国家工程研究中心，任琛

地址：北京市海淀区清华大学生物科学与技术系 301 室，邮编：100084

电话：010-62772239，13651155414 传真：010-62773059 E-mail:ychen@capitalbiochip.com