

## 高锶离子亲和力传感蛋白介导 CALYX 突触囊泡异步和自发释放\*

郭建立<sup>1, 2)</sup> 田昊<sup>1)</sup> 孙坚原<sup>1)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup>中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; (<sup>2)</sup>中国科学院大学, 北京 100049)

**摘要** 突触囊泡在钙离子( $\text{Ca}^{2+}$ )触发下释放神经递质普遍存在着同步和异步两种形式. 突触囊泡膜蛋白(synaptotagmin 2, Syt-2)已被证实是 Calyx of Held 突触囊泡同步释放的  $\text{Ca}^{2+}$  传感蛋白, 而相关的异步释放  $\text{Ca}^{2+}$  传感蛋白还有待于探索. 虽然锶离子( $\text{Sr}^{2+}$ )因其物理和化学性质都接近  $\text{Ca}^{2+}$ , 且能触发更多的囊泡异步释放成分而成为研究异步释放机制的常用工具, 但有关  $\text{Sr}^{2+}$  触发异步释放的机制存在着争议. 本文在胞外以  $\text{Sr}^{2+}$  替换  $\text{Ca}^{2+}$  的条件下, 通过对野生型(WT)和 Syt-2 敲除型(Z2B<sup>-/-</sup>)小鼠 Calyx 突触囊泡自发和诱发释放的电生理特性分析, 发现 Syt-2 是介导  $\text{Sr}^{2+}$  诱发的突触囊泡快速释放的传感蛋白, 但不是介导  $\text{Sr}^{2+}$  相关神经递质异步释放和自发释放的传感蛋白; 而未知的触发囊泡异步释放的传感蛋白相比 Syt-2 对  $\text{Sr}^{2+}$  具有更高的亲和力, 同时也介导突触囊泡的自发释放. 这一研究为探索并最终发现触发囊泡异步释放的未知传感蛋白提供了新的线索.

**关键词** 神经递质释放, synaptotagmin-2, 锶离子( $\text{Sr}^{2+}$ ), Calyx of Held 突触

**学科分类号** Q6, R338

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2014.00138

突触囊泡量子释放神经递质的动力学是决定神经信息编码的重要机制. 神经递质释放是由神经兴奋引起钙离子内流触发突触囊泡融合而实现的<sup>[1-2]</sup>. 神经递质释放普遍存在着同步和异步两种形式, 它们在神经信息传递与处理中发挥不同的作用, 而相关  $\text{Ca}^{2+}$  触发递质释放的机制一直是神经科学领域一个尚需解答的基本问题. 虽然突触囊泡膜蛋白(synaptotagmin, Syt)-1, -2, -9 已被发现是神经递质同步释放的  $\text{Ca}^{2+}$  传感蛋白<sup>[3]</sup>, 但对神经递质异步释放的触发机制和相关的  $\text{Ca}^{2+}$  传感蛋白的探索, 以及对神经递质自发释放与同、异步释放机制关系的揭示则仍是突触传递领域中的核心课题之一. 虽然新近的研究发现 synaptotagmin-7 和 Doc2 蛋白可能在培养的海马神经突触中起着囊泡异步释放的  $\text{Ca}^{2+}$  传感作用, 但在诸如 Calyx of Held 等其他突触中目前仍无法得到类似的观察. 这提示可能还存在着介导突触囊泡异步释放的未知蛋白<sup>[4-5]</sup>.

由于锶元素与钙都属于元素周期表中的第二主族元素, 元素原子的外层电子排布模式相同, 因此

$\text{Sr}^{2+}$  与  $\text{Ca}^{2+}$  的物理和化学性质都比较接近, 它们与触发囊泡释放的 synaptotagmin 蛋白的结合特性相似<sup>[6]</sup>. 然而,  $\text{Sr}^{2+}$  和  $\text{Ca}^{2+}$  在囊泡释放事件中的同步性存在着较大差别. 由  $\text{Sr}^{2+}$  触发的神经递质释放较  $\text{Ca}^{2+}$  触发的神经递质释放在动力学上具有更多的异步成分. 正是由于这样的特点, 研究者们以此为工具在研究神经信号传递的工作中用  $\text{Sr}^{2+}$  替换  $\text{Ca}^{2+}$ , 而使神经递质异步释放动力学过程更为显著, 以推断  $\text{Ca}^{2+}$  以及传感蛋白分子在引发囊泡胞吐和递质释放过程中的功能和特点, 并以此获得有关神经递质释放机制, 特别是异步释放机制的进一步洞察. 然而, 对于  $\text{Sr}^{2+}$  触发的神经递质释放异步化机制的解释, 目前仍有两种经典假说: a. 单  $\text{Sr}^{2+}$  传感蛋

\* 国家重点基础研究发展计划(973) (2013CB835100)和国家自然科学基金(30825012)资助项目.

\*\* 通讯联系人.

Tel: 010-64888537, E-mail: jysun@ibp.ac.cn

收稿日期: 2014-05-16, 接受日期: 2014-06-27

白假说,即不存在异步释放的  $\text{Sr}^{2+}$  传感蛋白,神经递质释放异步化是因为相比  $\text{Ca}^{2+}$ ,突触终末的  $\text{Sr}^{2+}$  缓冲能力较弱,  $\text{Sr}^{2+}$  进入突触内达到峰值以及被清除的速度都明显更慢<sup>[7]</sup>; b. 双二价离子( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$  等)传感蛋白假说,即分别存在着具有不同的神经递质同步和异步释放的二价离子传感蛋白,它们分别介导同步和异步两种形式的囊泡释放<sup>[7-10]</sup>.

本文用不同浓度的胞外  $\text{Sr}^{2+}$  替换生理条件的胞外  $\text{Ca}^{2+}$ ,以脑干斜方体中核(media nuclei of trapezoid body, MNTB)的 Calyx 突触为标本,利用其特有的电生理优势,观测并定量地分析  $\text{Z2B}^{-/-}$  及其同窝野生型小鼠 Calyx 突触上神经递质的自发和诱发释放.通过比较 WT 和  $\text{Z2B}^{-/-}$  小鼠 Calyx 突触递质释放的  $\text{Sr}^{2+}$  浓度依赖性,检测  $\text{Sr}^{2+}$  触发的神经递质异步释放的两种假说,并讨论了囊泡异步释放的钙传感蛋白与  $\text{Sr}^{2+}$  的亲亲和特性,为进一步探索并最终发现触发囊泡异步释放的未知传感蛋白提供新的线索.

## 1 方 法

### 1.1 含有 Calyx 突触的脑片标本制备

实验使用出生 11~13 天的 Syt-2 敲除( $\text{Z2B}^{-/-}$ )及其同窝野生型(WT) C57 品系小鼠.小鼠用乙醚麻醉,断头后迅速分离脑组织置于低温( $4^{\circ}\text{C}$ )切片用人工脑脊液中(其成分为(mmol/L): 125 NaCl, 25  $\text{NaHCO}_3$ , 3 肌醇, 2 丙酮酸钠, 2.5 KCl, 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25 葡萄糖, 0.4 维生素 c, 0.1  $\text{CaCl}_2$ , 3  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.2, 渗透压约 300 mOsm, 药品购自 Sigma, USA).使用 VT1200S 震动切片机(Leica, Germany)切取 2~3 片厚度为 200  $\mu\text{m}$  的脑片,并将脑片依次转移到  $37^{\circ}\text{C}$  孵育用人工脑脊液(其成分为(mmol/L): 125 NaCl, 25  $\text{NaHCO}_3$ , 3 肌醇, 2 丙酮酸钠, 2.5 KCl, 1.25  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 25 葡萄糖, 0.4 维生素 c, 2  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.2, 渗透压约 300 mOsm, 药品购自 Sigma, USA)中孵育 30 min 备用.脑片制备过程在室温( $22^{\circ}\text{C}$ ~ $24^{\circ}\text{C}$ )下完成. $4^{\circ}\text{C}$  切片用人工脑脊液和  $37^{\circ}\text{C}$  孵育用人工脑脊液均持续通入二元气(95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ).

### 1.2 电生理实验

实验过程中,使用 Axopatch 200B 放大器(Axon Instruments Inc., CA)以全细胞电压钳模式记录突触后自发释放和诱发释放电流.记录用玻璃

电极由 P2000 (Sutter Instrument, USA)拉制仪制成,内部灌入电极内液(其成分为(mmol/L): 125 K-gluconate, 20 KCl, 10 HEPES, 10  $\text{Na}_2$ -phosphocreatine, 4 MgATP, 0.3 NaGTP, 0.5 EGTA, pH 7.2, 渗透压约 300 mOsm, 药品购自 Sigma, USA).电极的入液电阻范围在 2~3  $\text{M}\Omega$ ,待突触后形成全细胞记录模式后的串联电阻(series resistances)小于 7  $\text{M}\Omega$ ,记录电流时以 5 kHz 进行低通滤波,数据采集频率为 20 kHz.

兴奋性突触后电流(excitatory postsynaptic currents, EPSC)由刺激器(Model 2100, A-M Systems Inc., USA)经双极电极刺激传入神经纤维诱发(10~20V, 时程为 0.1 ms),EPSC 经 98%串联电阻补偿后获得(补偿延迟时间为 10  $\mu\text{s}$ ).

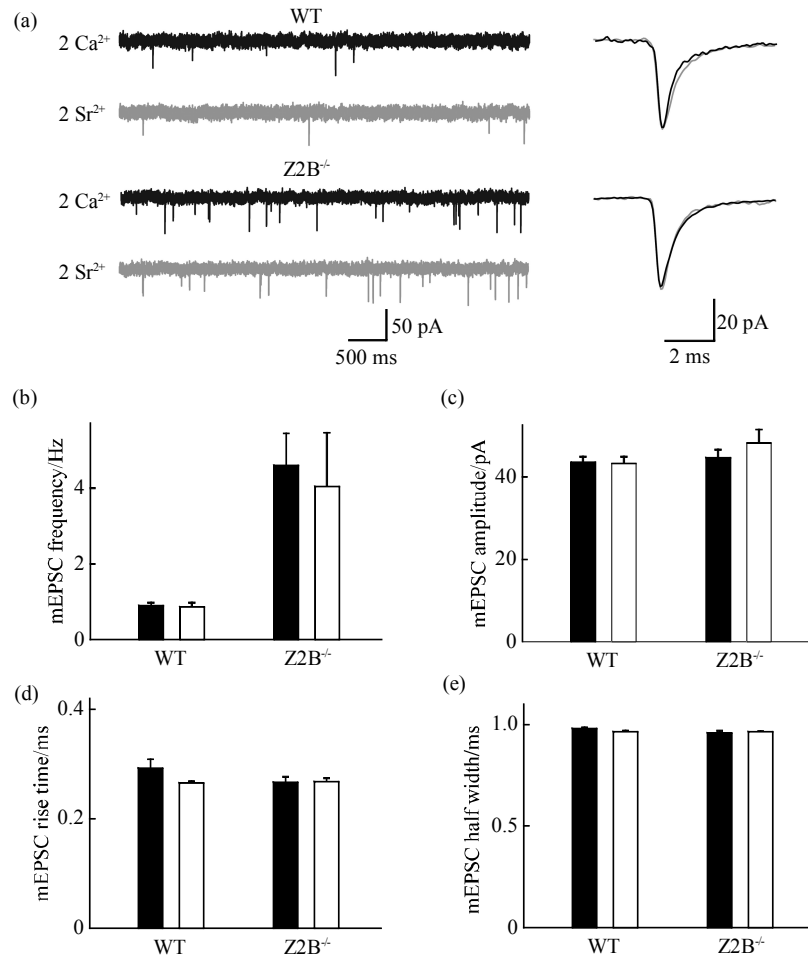
### 1.3 数据分析

数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  表示相差显著,  $P < 0.01$  表示相差非常显著.统计学数据均用 SigmaPlot (版本 10.0, Systat Software Inc., USA)与 Igor Pro 6.32A(WaveMetrics, USA)软件包处理.

## 2 结 果

### 2.1 $\text{Sr}^{2+}$ 介导的神经递质自发释放

用 2 mmol/L  $\text{Sr}^{2+}$  替换 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  胞外液并记录相应的突触后兴奋性微电流(miniature excitatory postsynaptic currents, mEPSC).实验结果显示,野生型突触的 mEPSC 幅值和频率在替换前后分别为( $43.63 \pm 1.44$ )pA 和( $0.90 \pm 0.07$ )Hz( $n=10$ )与( $43.28 \pm 1.76$ )pA 和( $0.86 \pm 0.13$ )Hz( $n=10$ )(图 1b, c);同窝  $\text{Z2B}^{-/-}$  小鼠在胞外 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$  条件下, mEPSC 幅值及频率分别为( $44.63 \pm 2.00$ )pA 和( $4.61 \pm 0.85$ )Hz( $n=8$ ).替换为 2 mmol/L  $\text{Sr}^{2+}$  后分别为( $48.20 \pm 3.21$ )pA 和( $4.05 \pm 1.41$ )Hz( $n=8$ )(图 1b, c).这些结果表明,无论是 WT 还是  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触, mEPSC 幅值和频率均无明显变化( $P$  值分别为 0.34 和 0.72).我们还观测了上升沿时间(rise time)和半峰宽度(half width),结果发现这些 mEPSC 的动力学参数均不因  $\text{Sr}^{2+}$  替换  $\text{Ca}^{2+}$  而改变(图 1d~e).因此,在野生型和  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触上,施加 2 mmol/L  $\text{Sr}^{2+}$  没有改变单个囊泡释放神经递质释放动力学过程.这个结果也暗示,  $\text{Sr}^{2+}$  可能参与了与  $\text{Ca}^{2+}$  同样的释放机制,对单个囊泡与细胞膜融合所需的结构和分子机器以及理化条件也没有明显影响.



**Fig. 1 Comparison of mEPSCs at 2 mmol/L external Ca<sup>2+</sup> or Sr<sup>2+</sup> concentration**

(a) Sample traces of mEPSCs recorded from wild-type (black) and Syt2-deficient (gray) neurons at 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup> or Sr<sup>2+</sup> concentration (left panel) and sample traces of average mEPSCs (right panel). (b~e) Summary plots of mEPSC frequency (b), amplitude (c), rise time (d) and half width (e). ■: 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup>; □: 2 mmol/L Sr<sup>2+</sup>.

为了研究 Calyx 突触自发释放的 Sr<sup>2+</sup> 依赖性, 分别使用 2、5 和 10 mmol/L Sr<sup>2+</sup> 替换细胞外液中的 Ca<sup>2+</sup>, 并记录相应的 mEPSC (图 2a)。记录到野生型小鼠 mEPSC 频率分别为  $(0.86 \pm 0.13)\text{Hz}$  ( $n=8$ ),  $(1.63 \pm 0.22)\text{Hz}$  ( $n=7$ ) 和  $(3.63 \pm 0.19)\text{Hz}$  ( $n=7$ ), 具有明显的胞外 Sr<sup>2+</sup> 浓度依赖性 (图 2b)。在 Z2B<sup>-/-</sup> 小鼠突触上, 2、5 和 10 mmol/L 胞外 Sr<sup>2+</sup> 情况下, mEPSC 频率分别为  $(4.05 \pm 1.41)\text{Hz}$  ( $n=8$ ),  $(8.63 \pm 1.69)\text{Hz}$  ( $n=7$ ) 和  $(14.74 \pm 4.56)\text{Hz}$  ( $n=7$ ), 同样随胞外 Sr<sup>2+</sup> 浓度增加明显上升而显示明显的胞外 Sr<sup>2+</sup> 浓度依赖性 (图 2b)。与此同时, 不同的胞外 Sr<sup>2+</sup> 浓度并不改变 mEPSC 的幅度 (图 2c)。

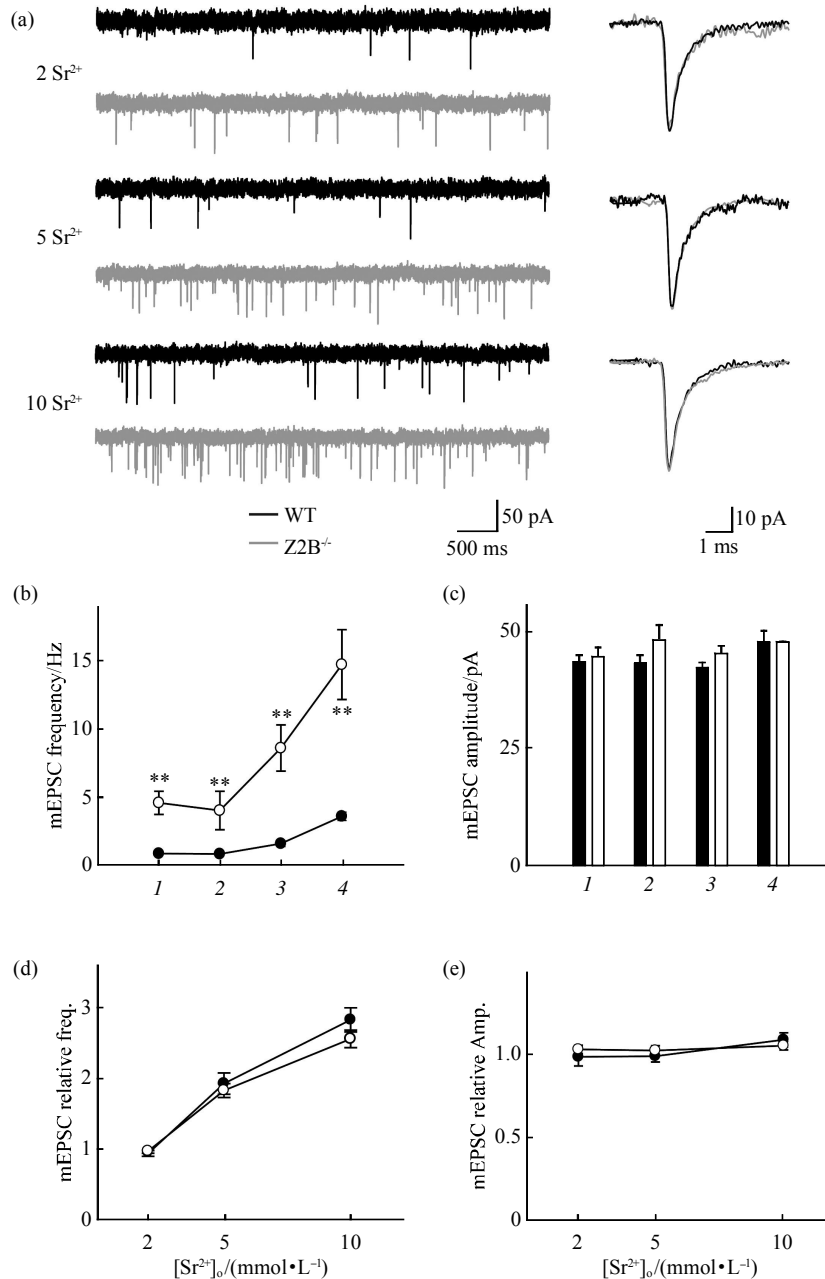
值得注意的是, 相同浓度胞外 Sr<sup>2+</sup> 条件下,

在 Z2B<sup>-/-</sup> 小鼠突触上 mEPSC 频率均明显高于野生型 (图 2b), 但 mEPSC 幅值无明显差别 (图 2c)。现有研究已经表明, 在正常的 2 mmol/L 胞外 Ca<sup>2+</sup> 条件下, Syt-2 缺失小鼠 mEPSC 频率相比野生型会显著地增加。本实验用 Sr<sup>2+</sup> 替换 Ca<sup>2+</sup> 后仍然观测到此现象, 进一步提示 Sr<sup>2+</sup> 浓度依赖的自发释放与 Ca<sup>2+</sup> 条件下有着同样的途径和机制。

为了更准确检测自发释放的 Sr<sup>2+</sup> 浓度依赖性, 我们将不同胞外 Sr<sup>2+</sup> 浓度条件下记录到的 mEPSC 频率与该细胞对应胞外 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup> 时的 mEPSC 频率之比做归一化处理。在 2、5 和 10 mmol/L Sr<sup>2+</sup> 条件下, 野生型小鼠 mEPSC 相对频率分别为  $(0.95 \pm 0.04)$  ( $n=8$ ),  $(1.94 \pm 0.15)$  ( $n=7$ ) 和  $(2.84 \pm 0.17)$  ( $n=7$ )

(图 2d),  $Z2B^{-/-}$  小鼠 mEPSC 相对频率分别为  $(0.98 \pm 0.03)(n=8)$ ,  $(1.84 \pm 0.10)(n=7)$  和  $(2.57 \pm 0.12)(n=7)$  (图 2d). 比较同一  $Sr^{2+}$  浓度下的数据, 发现  $Z2B^{-/-}$  与野生型组之间没有显著性差异. 因此, mEPSC

频率的  $Sr^{2+}$  依赖关系在野生型和  $Z2B^{-/-}$  小鼠中没有显著差别, 换言之, Syt-2 的存在与否并不影响  $Sr^{2+}$  介导囊泡的自发释放.



**Fig. 2 The external  $Sr^{2+}$  dependence of mEPSC frequency and amplitude**

(a) Sample traces of mEPSCs recorded from wild-type (black) and Syt2-deficient (gray) neurons at different external  $Ca^{2+}$  or  $Sr^{2+}$  concentrations (left panel) and sample traces of average mEPSCs (right panel). (b) Dose-response curves of mEPSC frequency. (c) Summary plots of mEPSC amplitude. (d, e) Normalized dose-response curves of mEPSC frequency (d) and amplitude (e).  $**P < 0.01$ . 1: 2 mmol/L  $Ca^{2+}$ ; 2: 2 mmol/L  $Sr^{2+}$ ; 3: 5 mmol/L  $Sr^{2+}$ ; 4: 10 mmol/L  $Sr^{2+}$ . ●—●: WT; ○—○:  $Z2B^{-/-}$ .

## 2.2 $Sr^{2+}$ 介导的神经递质的诱发释放

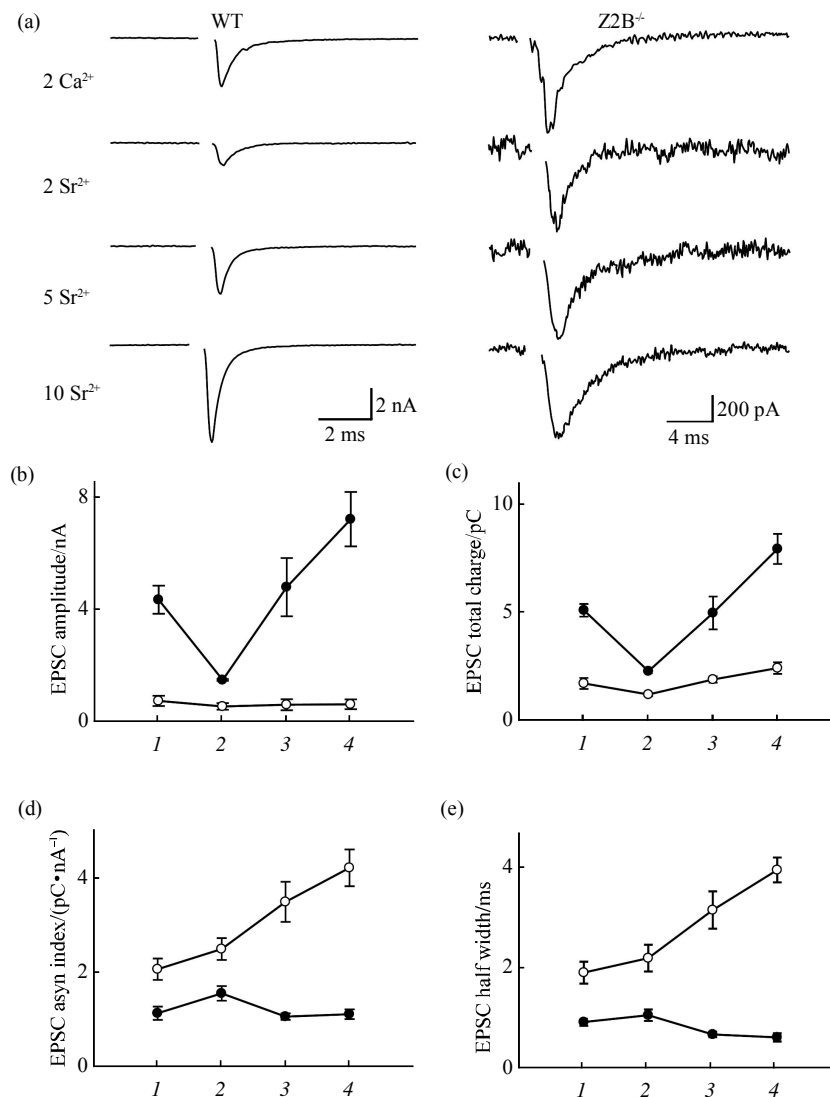
我们进一步观察了对传入神经纤维进行刺激诱

发的 EPSC(图 3a). 当胞外  $Sr^{2+}$  浓度分别为 2、5 和 10 mmol/L 时, 野生型突触的 EPSC 幅值分别为

( $1.47 \pm 0.04$ )nA ( $n = 8$ ), ( $4.78 \pm 1.04$ )nA ( $n = 7$ ) 和 ( $7.20 \pm 0.97$ )nA ( $n=7$ ), 呈显著相关性增加(图 3b). 对相应的 EPSC 进行 20 ms 的时间积分值(总电荷, Total charge) 分别为 ( $2.26 \pm 0.10$ )pC ( $n=8$ ), ( $4.95 \pm 0.76$ )pC ( $n=7$ )和( $7.91 \pm 0.70$ )pC ( $n=7$ ) (图 3c), 也呈现类似的  $\text{Sr}^{2+}$  浓度相关性. 在同样实验条件下,  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触 EPSC 的幅值分别为( $0.52 \pm 0.12$ )nA ( $n=7$ ), ( $0.58 \pm 0.20$ )nA ( $n=9$ )和( $0.60 \pm 0.17$ )nA ( $n=6$ ) (图 3b), 不同浓度实验组之间 EPSC 幅值无显著性差异. 然而, 相应的 EPSC 积分值分别为 ( $1.19 \pm 0.07$ )pC ( $n = 7$ ), ( $1.88 \pm 0.15$ )pC ( $n = 9$ ) 和 ( $2.41 \pm 0.27$ )pC ( $n=6$ ) (图 3c), 却呈现一定的  $\text{Sr}^{2+}$  浓

度相关性. 上述结果显示, 与野生型组对比,  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触上 EPSC 幅值的  $\text{Sr}^{2+}$  依赖性不明显而异步释放的  $\text{Sr}^{2+}$  依赖性相对显著.

为了更好地反应异步释放成分的变化, 我们引入了 EPSC 异步指数, 即总电荷与幅值之商, 作为检测指标, 异步指数越大表明 EPSC 中的慢速异步成分所占比重越大, 即对应的递质释放更加异步. 在胞外 2、5 和 10 mmol/L  $\text{Sr}^{2+}$  条件下, 野生型突触 EPSC 的异步指数为 ( $1.56 \pm 0.16$ )pC/nA, ( $1.06 \pm 0.07$ )pC/nA 和 ( $1.11 \pm 0.10$ )pC/nA (图 3d), 而  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触 EPSC 的异步指数分别为( $2.50 \pm 0.23$ )pC/nA, ( $3.50 \pm 0.43$ )pC/nA 和 ( $4.23 \pm 0.39$ )pC/nA (图 3d). 此



**Fig. 3 The external  $\text{Sr}^{2+}$  dependence of EPSCs in wild-type and  $\text{Syt2}$ -deficient neurons**

(a) Sample traces of evoked responses from wild-type (left panel) and  $\text{Syt2}$ -deficient (right panel) neurons at different external  $\text{Ca}^{2+}$  or  $\text{Sr}^{2+}$  concentrations. (b ~ e) Dose-response curves of EPSC amplitude (b), total charge (c), asynchronous index (d) and half width (e) from wild-type and  $\text{Syt2}$ -deficient neurons. 1: 2 mmol/L  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2: 2 mmol/L  $\text{Sr}^{2+}$ ; 3: 5 mmol/L  $\text{Sr}^{2+}$ ; 4: 10 mmol/L  $\text{Sr}^{2+}$ . ●-●: WT; ○-○:  $\text{Z2B}^{-/-}$ .

外, 我们对 EPSC 的半峰宽度也进一步做了分析, 在胞外 2、5 和 10 mmol/L  $\text{Sr}^{2+}$  条件下, 野生型突触 EPSC 的半峰值宽度分别为  $(1.05 \pm 0.11)\text{ms}$ ,  $(0.67 \pm 0.05)\text{ms}$  和  $(0.61 \pm 0.08)\text{ms}$  (图 3e),  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触 EPSC 的半峰值宽度分别为  $(2.19 \pm 0.27)\text{ms}$ ,  $(3.15 \pm 0.37)\text{ms}$  和  $(3.95 \pm 0.25)\text{ms}$  (图 3e), 这一结果提示, WT 的 EPSC 半峰宽度随  $\text{Sr}^{2+}$  浓度增加下降, 而  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触的 EPSC 半峰宽度则随  $\text{Sr}^{2+}$  浓度增加而上升,  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触 EPSC 的异步指数和半峰宽度都大于野生型对照结果, 显示 Syt-2 的缺失造成  $\text{Sr}^{2+}$  诱发释放大幅度异步化。

### 2.3 在野生型与 $\text{Z2B}^{-/-}$ 小鼠突触上 $\text{Sr}^{2+}$ 电流的对比

长期以来, Syt-2 的缺失对神经元  $\text{Sr}^{2+}$  内流的影响未曾进行过特异性的研究, 而本研究中发现的 WT 和  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触囊泡同步和异步释放动力学上的

差异与  $\text{Sr}^{2+}$  内流量的关系也需要理清. 我们利用 Calyx of Held 突触良好的电压钳制特性, 直接测量了 WT 和  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触经  $\text{Ca}^{2+}$  通道的  $\text{Sr}^{2+}$  内流特性. 对突触前膜施加不同程度的去极化刺激, 并记录了相应的  $\text{Sr}^{2+}$  电流.

实验过程中, 突触前膜首先被钳制在  $-80\text{ mV}$ , 紧接着对突触前膜给予从  $-40 \sim +40\text{ mV}$  的去极化刺激, 阶跃电压为  $20\text{ mV}$ , 刺激时间为  $25\text{ ms}$ , 同时记录  $\text{Sr}^{2+}$  电流(图 4a). 实验结果表明, 野生型突触最大  $\text{Sr}^{2+}$  电流 (Maximal currents) 为  $(942.45 \pm 44.79)\text{ pA}$  ( $n=9$ ), 而  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触上最大  $\text{Sr}^{2+}$  电流为  $(962.40 \pm 44.49)\text{ pA}$  ( $n=8$ ), 两组之间没有显著性差 ( $P=0.76$ ) (图 4b). 进一步的最大  $\text{Sr}^{2+}$  电流 - 刺激电压关系显示,  $\text{Z2B}^{-/-}$  与野生型组之间在不同测试电压下也没有显著性差异(图 4b).

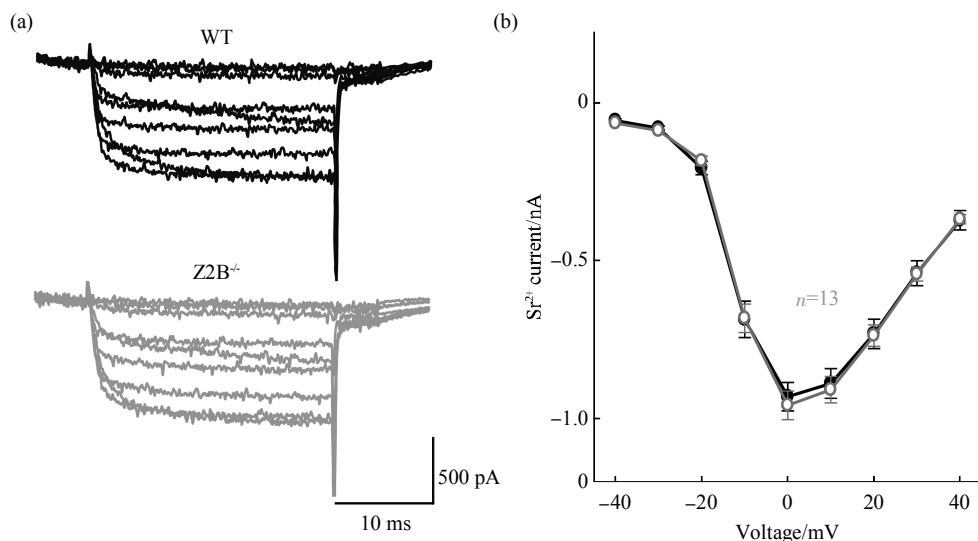


Fig. 4 Presynaptic  $\text{Sr}^{2+}$  current is not altered in Syt2-deficient neurons

(a) Sample traces of  $\text{Sr}^{2+}$  current recorded from wild-type (above) and Syt2-deficient neurons (bottom). (b) Current- voltage relationship of  $\text{Sr}^{2+}$  current.

●—●: WT; ○—○:  $\text{Z2B}^{-/-}$ .

## 3 讨 论

### 3.1 Syt-2 是 Calyx 突触介导 $\text{Sr}^{2+}$ 突触诱发的快速神经递质释放的主要离子传感蛋白

在已有的研究中, Syt-1, -2, -9 被证实为中枢神经系统中同步释放的  $\text{Ca}^{2+}$  传感蛋白<sup>[9]</sup>. 在 Calyx 神经突触没有 Syt-1 和 Syt-9 的表达, 因此, Syt-2 是唯一的同步释放的  $\text{Ca}^{2+}$  传感蛋白. 我们在排除了 Syt-2 缺失对  $\text{Sr}^{2+}$  内流影响的基础上, 分别检测了 WT 和  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触在相同胞外  $\text{Sr}^{2+}$  浓度条件下的传

入纤维刺激诱发的 EPSC, 发现  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触反应的动力学缺少同步成分, 且明显慢于野生型(图 3).

本文进一步研究了 WT 和  $\text{Z2B}^{-/-}$  小鼠突触的囊泡释放动力学的  $\text{Sr}^{2+}$  依赖性. 将 EPSC 的积分与其幅值之比作为衡量 EPSC 异步程度的异步指数, 发现 WT 的 EPSC 异步指数随胞外  $\text{Sr}^{2+}$  增加而有所下降(图 3), 即随着胞外  $\text{Sr}^{2+}$  浓度增加, 野生型小鼠递质诱发释放过程更加趋向同步化. 而在  $\text{Z2B}^{-/-}$  突触上, 异步程度指数则大幅度显著增加(图 3). 进一步观测递质释放量相关的 EPSC 积分, 显示

Z2B<sup>-/-</sup> 突触与野生型突触递质释放 Sr<sup>2+</sup> 敏感的相关性(cooperativity)也是不同的(图 3). 上述结果表明, 对于 Sr<sup>2+</sup> 触发 Calyx 突触囊泡的同步释放, Syt-2 是必要的离子传感蛋白.

### 3.2 Syt-2 不是自发释放的主要离子传感蛋白

突触囊泡自发释放的机制目前尚不明了, 有研究表明自发释放的突触囊泡很可能来自于不同的群体<sup>[11-12]</sup>, 也可能与诱发释放的囊泡有着不同的释放位点. 一般认为, 自发释放和诱发释放一样, 都是通过经典的囊泡释放机制来实现, 即依赖 Ca<sup>2+</sup> 结合相应 Ca<sup>2+</sup> 传感蛋白触发 SNARE(soluble NSF attachment protein receptor proteins)复合体变构, 最终导致囊泡融合, 并由此推断 Ca<sup>2+</sup> 依赖的自发释放应当也具有相应的 Ca<sup>2+</sup> 传感蛋白. 通过胞外 Ca<sup>2+</sup> 浓度滴定实验, 多个研究组报道了囊泡自发释放在很大程度上有 Ca<sup>2+</sup> 依赖性. 在神经终末, P/Q 型和 N 型 Ca<sup>2+</sup> 通道被认为主要地介导了囊泡自发释放<sup>[13-14]</sup>.

Xu 等<sup>[15]</sup>通过分子生物学和电生理学的手段深入分析了自发释放的 Ca<sup>2+</sup> 依赖性, 得出 Syt-1 是自发释放的钙离子传感蛋白, 介导了超过 90% 的自发释放的结论. 而 McMahan 等<sup>[16]</sup>却认为 Doc2 蛋白才是突触囊泡自发释放的 Ca<sup>2+</sup> 传感蛋白. 我们使用 2 mmol/L Sr<sup>2+</sup> 替换细胞外 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup> 记录 mEPSC 发现, 野生型或 Z2B<sup>-/-</sup> 突触的自发释放频率都没有明显变化(图 1c). 与此同时, 依照 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup> 结果归一化的 mEPSC 频率在所有 Sr<sup>2+</sup> 浓度下都没有因为 Syt-2 敲除出现统计学显著差异(图 2), 表明自发释放的胞外 Sr<sup>2+</sup> 依赖性在野生型与 Z2B<sup>-/-</sup> 突触上基本相同. 这些结果显示在 Sr<sup>2+</sup> 引发的神经递质自发释放中, Syt-2 不是主要的二价离子传感蛋白. 值得注意的是, 曾被认为是突触囊泡自发释放的 Ca<sup>2+</sup> 传感蛋白——Doc2 蛋白, 最近被发现在培养的海马神经元上也介导了神经递质异步释放<sup>[5]</sup>. 另一方面, 双 Ca<sup>2+</sup> 传感蛋白假说模型曾经根据突触囊泡的异步释放与自发释放具有相同的 Ca<sup>2+</sup> 依赖性, 提示突触囊泡的异步释放与自发释放由同一类钙离子传感蛋白介导<sup>[10]</sup>. 本文中用 2 mmol/L Sr<sup>2+</sup> 替换细胞外 2 mmol/L Ca<sup>2+</sup> 进行了有关 EPSC 和 mEPSC 的观察, 上述研究报告和结果都指向一个推论, 即 Calyx 突触囊泡的异步释放传感蛋白同时介导着囊泡的自发释放.

### 3.3 神经递质异步释放的离子传感蛋白

有关 Sr<sup>2+</sup> 触发神经递质异步释放机制有两种经

典的假说: a. 只有一种二价离子传感蛋白. 而神经递质释放异步化是因为相比 Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> 进入突触内达到峰值以及被清除的速度都明显更慢<sup>[7]</sup>; b. 双 Ca<sup>2+</sup> 传感蛋白假说<sup>[7-10]</sup>. 分别存在着具有不同 Ca<sup>2+</sup> 结合位点数的介导神经递质同步和异步释放的 Ca<sup>2+</sup> 传感蛋白, Sun 等<sup>[10]</sup>研究中提出可能存在某种亲和力约为 44 μmol/L, 钙协同性约为 2 的异步释放钙离子传感蛋白, Synaptotagmin 与这种异步释放传感蛋白构成递质释放的双 Ca<sup>2+</sup> 传感蛋白模型. 本文在 Z2B<sup>-/-</sup> 小鼠 Calyx 突触上使用 Sr<sup>2+</sup> 诱发递质释放的结果显示, 当 Syt-2 不存在时仍然能够记录到超过 10 倍于 mEPSC 幅值的 EPSC(图 3), 表面 Calyx 突触中仍然存在明显的神经递质诱发释放. 在 2、5 和 10 mmol/L Sr<sup>2+</sup> 情况下, 这些 EPSC 电荷量以及异步指数随着胞外 Sr<sup>2+</sup> 浓度的上升而显著增加(图 3), 显示观测到的异步释放是 Sr<sup>2+</sup> 浓度依赖的. 因此, 虽然突触终末内细胞质的 Sr<sup>2+</sup> 与 Ca<sup>2+</sup> 相应快速缓冲能力的差异会导致 Sr<sup>2+</sup> 与 Ca<sup>2+</sup> 对异步释放和自发释放的影响不同, 但有一点可以肯定, 除了 Syt-2 之外必定还存在着介导突触囊泡异步释放的离子传感蛋白. 这种未知的 Sr<sup>2+</sup> 传感蛋白极有可能在生理情况下也参与了 Calyx 突触的神经递质异步释放过程, 是异步释放的离子传感蛋白. 从高浓度胞外 Sr<sup>2+</sup> 条件下 Z2B<sup>-/-</sup> 突触的 EPSC 幅度没有显著不同推断, 这个二价离子传感蛋白因与 Sr<sup>2+</sup> 具有更高亲和力而趋于饱和.

综上所述, 不同模式的神经递质释放可能具有不同的触发机制. 在 Calyx 突触, 由 Sr<sup>2+</sup> 引发的神经递质释放中存在着双离子传感器机制<sup>[10]</sup>, Syt-2 作为离子传感蛋白介导了诱发同步释放, 而某种未知的二价离子传感蛋白则负责触发突触囊泡的异步释放. 这种未知的触发囊泡异步释放的传感蛋白相比 Syt-2 对 Sr<sup>2+</sup> 具有更高的亲和力, 同时也介导突触囊泡的自发释放. 虽然 Syt-7 和 Doc2 蛋白在培养的海马神经元上具有异步释放钙离子传感器功能<sup>[4-5]</sup>, 但在 Calyx 突触上介导异步释放的钙离子传感蛋白尚未可知. 我们的研究结果为探索并最终发现触发囊泡异步释放的未知的钙离子传感蛋白提供了新的线索.

**致谢** 感谢中国科学院生物物理研究所科学研究平台维修部赵旭东和刘苏两位老师在实验技术方面给予的支持和帮助.

## 参 考 文 献

- [1] Katz B. The release of neural transmitter substances. 1969, Liverpool, UK: Liverpool University Press
- [2] Sabatini B L, Regehr W G. Timing of synaptic transmission. *Annu Rev Physiol*, 1999, **61**: 521–542
- [3] Xu J, Mashimo T, Südhof T C, *et al.* Synaptotagmin-1, -2, and -9 -  $\text{Ca}^{2+}$  sensors for fast release that specify distinct presynaptic properties in subsets of neurons. *Neuron*, 2007, **54**(4): 567–558
- [4] Bacaj T, Wu D, Yang X, *et al.* Synaptotagmin-1 and synaptotagmin-7 trigger synchronous and asynchronous phases of neurotransmitter release. *Neuron*, 2013, **80**(4): 947–959
- [5] Yao J, Gaffaney J D, Kwon S E, *et al.* Doc2 is a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor required for asynchronous neurotransmitter release. *Cell*, 2011, **147** (3): 666–677
- [6] Li C, Davletov B A, Südhof T C. Distinct  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Sr}^{2+}$  binding properties of synaptotagmins: definition of candidate  $\text{Ca}^{2+}$  sensors for the fast and slow components of neurotransmitter release. *J Biol Chem*, 1995, **270**(42): 24898–24902
- [7] Goda Y, Stevens C F. Two components of transmitter release at a central synapse. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (26):12942–12946
- [8] Schneggenburger R, Neher E. Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature*, 2000, **406**(6798): 889–893
- [9] Bollmann J H, Sakmann B, Borst J G. Calcium sensitivity of glutamate release in a calyx-type terminal. *Science*, 2000, **289**(5481): 953–957
- [10] Sun J, Pang Z P, Qin D, *et al.* A dual  $\text{Ca}^{2+}$  sensor model for neurotransmitter release in a central synapse. *Nature*, 2007, **450**(7170): 676–682
- [11] Glitsch M D. Spontaneous neurotransmitter release and  $\text{Ca}^{2+}$ —How spontaneous is spontaneous neurotransmitter release. *Cell Calcium*, 2008, **43**(1): 9–15
- [12] McKay S M, Oleskevich S. The role of spontaneous activity in development of the end bulb of Held synapse. *Hearing Research*, 2007, **230**(1–2): 53–63
- [13] Ermolyuk Y S, Alder F G, Surges R, *et al.* Differential triggering of spontaneous glutamate release by P/Q-, N- and R-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels. *Nat Neurosci*, 2013, **16**(12): 1754–1763
- [14] Williams C, Chen W, Lee C H, *et al.* Coactivation of multiple tightly coupled calcium channels triggers spontaneous release of GABA. *Nat Neurosci*, 2012, **15**(19): 1195–1197
- [15] Xu J, Pang Z P, Shin O H, *et al.* Synaptotagmin-1 functions as a  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for spontaneous release. *Nat Neurosci*, 2009, **12** (6): 759–766
- [16] Groffen A J, Martens S, Díez Arazola R, *et al.* Doc2b is a high affinity  $\text{Ca}^{2+}$  sensor for spontaneous neurotransmitter release. *Science*, 2010, **327**(5973):1614–1618



## Ca<sup>2+</sup> Sensor for Asynchronous Vesicle Release Has High-affinity to Sr<sup>2+</sup> and Mediates Spontaneous Release at The Calyx of Held Synapses\*

GUO Jian-Li<sup>1,2</sup>, TIAN Hao<sup>1</sup>, SUN Jian-Yuan<sup>1</sup>\*\*

<sup>1</sup> Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>2</sup> University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

**Abstract** The kinetics of Ca<sup>2+</sup> triggered synaptic vesicle fusion contains synchronous and asynchronous components. At the Calyx of Held synapse, synaptotagmin-2 has been identified as the Ca<sup>2+</sup> sensor protein for synchronous vesicle release while the Ca<sup>2+</sup> sensor for asynchronous vesicle release remains unknown. Sr<sup>2+</sup> is a divalent cation similar in size to Ca<sup>2+</sup> and often substituted for Ca<sup>2+</sup> as a tool in studying asynchronous vesicle release. However, the mechanism of Sr<sup>2+</sup> triggering vesicle release is still under debate. We studied the spontaneous and evoked vesicle release at the wild type and synaptotagmin-2 knock-out calyceal synapses in the existence of extracellular Sr<sup>2+</sup> and found synaptotagmin-2 only mediates the Sr<sup>2+</sup> triggered synchronous vesicle release but not the asynchronous and spontaneous release; the unknown divalent sensor for asynchronous vesicle release has high-affinity to Sr<sup>2+</sup> and mediates the spontaneous vesicle release. Our study provided a new insight into exploring the divalent sensor in triggering asynchronous synaptic vesicle release.

**Key words** neurotransmitter release, synaptotagmin-2, Sr<sup>2+</sup>, the Calyx of Held synapse

**DOI:** 10.3724/SP.J.1206.2014.00138

---

\*This work was supported by grants from National Basic Research Program of China (2013CB835100) and The National Natural Science Foundation of China(30825012).

\*\*Corresponding author.

Tel: 86-10-64888537, E-mail: jysun@ibp.ac.cn

Received: May 16, 2014 Accepted: June 27, 2014