

factors (FGFs) is mediated by a dual-receptor system. This comprises a family of four receptor tyrosine kinases (FGFRs) and heparin sulphate proteoglycans (HSPG). The binding of the FGFs to the FGFRs is marked by a pattern of overlapping specificity despite alternative splicing events generating a large number of FGFRs. HSPG receptors may stimulate the combination between the FGFs and FGFRs, and provide

additional specificity allowing a cell to fine tune its response to the FGFs. FGFRs induce the activities of downstream signal molecules which then act in different ways that affect the cell's development, mitogenesis, and neuronal differentiation, respectively.

Key words · fibroblast growth factor receptors, heparin sulphate proteoglycans, dual-receptor system

肉毒杆菌神经毒素作用机制的研究进展*

施玉樑 胡 谦¹⁾

(中国科学院上海生理研究所, 上海 200031)

摘要 肉毒杆菌神经毒素 (BoNT) 作用机制的研究近年取得的主要进展是: a. 证明 BoNT 是通过降低神经递质释放系统对 Ca^{2+} 的敏感性阻遏突触传递; 直接将 BoNT 导入胞内不显示胆碱能专一性. b. BoNT 与细胞表面的结合包括低亲和与高亲和相继两步, 有不同的受体. c. BoNT 的作用包括毒素与受体的结合, 内吞和导入, 变构、易位以及毒素作为酶在胞内酶裂与胞吐有关的蛋白质等过程. 毒素重链的 C 端半段、N 端半段及轻链分别是与上述过程有关的功能域.

关键词 肉毒杆菌神经毒素, 突触小泡融合, 神经递质释放, 功能域

学科分类号 Q42

肉毒杆菌神经毒素 (botulinum neurotoxin, BoNT) 包括 A、B、C1、D、E、F、G 七种血清特异的毒蛋白^[1-3]. 除肉毒杆菌 (*Clostridium botulinum*) 外, *Clostridium butyricum* 和 *Clostridium barati* 也可产生 BoNT \ E 和 \ F. 编码 BoNT \ A、\ B、\ E 的基因来源于细菌本身, 编码 BoNT \ C1、\ D 的基因来源于感染细菌的噬菌体, 编码 BoNT \ G 的基因则来源于细胞质粒^[3].

细菌先合成毒素单链, 再经酶裂成由二硫键相连的重链 (相对分子质量约为 100 000) 和轻链 (相对分子质量约为 50 000) 组成的 BoNT. 除 BoNT \ E 外, 细菌本身均具有用于酶裂的酶, 唯 BoNT \ E 是在分泌后经外源酶的酶切形成的^[3]. 酶裂是指在近其 N 端三分之一处被切除几个氨基酸残基和形成双链的过

程, 毒素的激活还需在其重链的 C 端切除一小肽^[3,4]. 打开二硫键, 可得到重链 (HC) 和轻链 (LC); HC 还可酶裂为 C 端半段 (H_C) 和 N 端半段 (H_N), 它们分别是 BoNT 的三个有独立功能的结构域^[3,4]. 氨基酸序列和抗原性的研究表明, 各类 BoNT 可能来源于一个共同的祖先基因^[4].

1 降低释放机制的 Ca^{2+} 敏感性

研究表明, BoNT 不影响神经冲动的传导, 递质的合成、储存, 而专一地破坏递质释

*国家“八·五”攀登项目和国家自然科学基金 (39470238) 资助.

¹⁾现在地址: Hu Qian, Bldg 36, Rm 2C02, NINDS/NIH, Bethesda, Md 20892 USA.

收稿日期: 1996-12-31, 修回日期: 1997-03-17

放系统对钙离子的敏感性,从而阻遏突触传递.作用有以下特点: a. 虽然 BoNT 降低小终板电位 (mepp) 的幅度和频率,但并不使之完全消失. BoNT 抑制正常 mepp, 对亚 mepp 没有作用, 随着作用时间的延长使巨型 mepp 出现的几率增加. b. BoNT \ A、\ E 虽可完全取消神经刺激诱发的释放, 但增加终板电位 (epp) 量子含量的因素, 如提高 $[Ca]_o$ 、增加刺激频率、施加钾通道抑制剂等, 均可增加中毒末梢的 epp 量子含量; 但在 BoNT \ B、\ D、\ F 中毒标本上, 神经刺激不再引起 epp, 而只引起一串 mepp, 上述可增加 epp 量子含量的因素也只能增加递质的自发释放. c. BoNT 的作用是使释放机制对 Ca^{2+} 的敏感降低. 在 BoNT 中毒标本, 那些可增加 epp 量子含量的因素, 对释放的易化作用明显要比在正常标本上的弱: 增加 $[Ca^{2+}]_o$ 或 $[K^+]_o$ 以及施加离子载体 A23187 或 X537A 等, 在 BoNT 中毒标本上完全或几乎没有作用. d. α -latrotoxin 有效地对抗 BoNT \ A 的作用, 使 mepp 的频率及幅度分布恢复到正常水平. 这常常被作为 BoNT 不影响末梢内递质总含量的证据. e. 低温、减少神经刺激、用低钙高镁溶液处理标本等可极大地延缓 BoNT 的作用.

2 对胆碱能突触的专一性

比较实验表明, 高浓度的 BoNT 对自主或中枢神经系统的非胆碱能神经元以及一些非神经细胞的释放也有阻断作用. 如, BoNT \ A 尚可抑制去甲肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺、 γ -氨基丁酸、甘氨酸、甲啡肽等多种递质释放. 将毒素直接导入胞内 BoNT 没有胆碱能专一性: 如注射 BoNT \ A 到嗜铬细胞、注射 BoNT \ A、\ B、\ E 到海兔的胆碱能或非胆碱能神经元、或将 BoNT \ A、\ B、\ E 导入 PC-12 细胞内, 都可有效地阻断这些细胞的递质释放. BoNT 对胆碱能突触传递的专一性看来是由胆碱能神经末梢膜表面富含与毒素结合的受体造成的^[3-5].

3 四步相继作用模型

早已观察到, 毒素的作用要经过相当长的潜伏期方出现传递阻遏^[1]. Simpson 等^[4,8]利用多克隆抗体做的一系列实验证明毒素的阻遏作用是可以与其结合过程分开的. 首先, 他们将神经肌肉标本, 在高镁和低温 (4℃) 下与 BoNT 孵育, 洗去毒素后, 将标本移至 37℃ 的正常溶液中, 刺激神经, 测量肌肉麻痹时间. 结果显示, 孵育的时间越长肌肉麻痹越快, 直到一个极值, 再增加孵育时间也不能加速麻痹. 这表明, 在没有递质释放的情况下, 毒素虽可与细胞表面结合并达到饱和, 但其作用仍要等温度升高并给予神经刺激后才出现. 其次, 将毒素在 4℃ 和高镁的条件下与标本孵育, 使结合达到饱和, 洗去未结合的毒素, 再加入毒素的抗体孵育 1 h 后洗去抗体, 将标本置于正常溶液中测量刺激神经引起的肌肉麻痹时间. 实验显示, 抗体孵育减弱毒素的毒性. 这表明毒素与膜结合后, 其分子空间结构并没有发生根本改变. 最后一组实验是, 先在上述条件下使结合达到饱和, 洗去毒素后, 将标本置于 37℃ 的正常溶液给予不同时间的神经刺激, 再放回 4℃ 的含高镁的溶液加入抗体孵育 1 h, 洗去抗体后再将标本置于 37℃ 的正常溶液中, 记录由刺激神经引起标本麻痹的时间. 他们发现, 在那些与抗体接触前未经神经刺激的标本上, 毒素的毒性被抗体大大降低了; 而在抗体作用前给予神经刺激的标本, 其麻痹时间与抗体作用前的刺激时间呈函数关系, 并且当该神经刺激时间达 20~30 min 后, 抗体对标本不再有任何保护作用. 这一结果提示, 此时毒素已从细胞表面消失而进入细胞内了. 这些观察以及以后的大量工作导致了下述 BoNT 作用的相继四步作用模型^[3,4,6]的提出: a. BoNT 与细胞膜表面受体的结合; b. BoNT 通过受体介导的内吞和转入; c. BoNT 在吞饮小胞内发生构型变化并穿过吞饮小胞膜进入胞内的变构和易位; d. BoNT 作为酶在胞内作用于与递质释放有关分子的酶切过程^[3,6,8].

4 毒素与膜受体的结合和 H_C

利用标记 BoNT 进行的实验表明, BoNT 选择地结合于突触前膜, 每平方微米约 150 个 BoNT \ A 和 630 个 BoNT \ B 结合位点, BoNT \ A 对 BoNT \ B 的结合有竞争, 而 BoNT \ B 对 BoNT \ A 的结合没有竞争; 结合具可饱和性, 不依赖于温度; 细胞膜表面存在大量的 BoNT 低亲和的受体和少量的高亲和的受体; 单独的重链 (HC) 可阻止毒素与运动神经末梢的结合, 但轻链对全毒的结合没有竞争作用; 用酶将重链的 C 端段 H_C 切除, 剩下的部分 (H_NL) 不能与膜上受体结合也不能阻止全毒素与受体的结合. 这表明, 毒素的 HC 部分是与结合过程有关的功能域^[2,8].

在脊椎动物的神经肌肉接头上的结果还表明, 单独 HC 和 LC 都没有作用, 但如先将标本与 HC 接触, 洗去后再加入 LC, 即观察到毒素的作用; 若先加 LC, 洗去后再加 HC, 则见不到毒素的作用. 利用注射或脂质体将 HC、LC 导入胞内的实验发现, 单独的 HC 没有阻断递质释放的作用, 而单独的 LC 可阻断递质释放. 这些结果表明, HC 与受体结合, 帮助 LC 进入胞内, LC 在胞内起作用^[3,9]. 顺便指出, 在海兔标本上的结果是 HC、LC 必须都进入胞内才有作用^[10].

5 神经节苷脂和双受体假说

早已经发现神经节苷脂可降低 BoNT 的毒性^[9]; 神经节苷脂上的唾液酸残基对神经节苷脂与毒素的结合有重要作用^[3], 毒素是结合在突触前膜的神经节苷脂 GT_{1b}或 GD_{1a}上的. 如果用神经氨基酶切除嗜铬细胞膜上的 GD_{1a}, 可使 BoNT 对 carbachol 诱发的 [³H] noradrenaline 释放的抑制作用减弱; 混合神经节苷脂 (GN₁, GD_{1a}, GD_{1b}, GT_{1b}), 增强 A 型毒素的作用. 另外在大脑皮层突触体或脑和脊髓的培养细胞上, 也都发现 A 型毒素对神经氨基酶敏感.

由以上结果曾推测神经节苷脂是 BoNT 在

膜上的受体^[3]. 但考虑到: a. 神经节苷脂在各类神经细胞表面都很丰富, 不好解释 BoNT 的胆碱能专一性; b. 神经节苷脂与毒素的亲和力还不够强, 不足以解释毒素结合的高效性; c. 用神经氨基酶切除神经节苷脂上的唾液酸残基后, 毒素的毒力的降低在各种标本上很不一致^[3], Montecucco 提出了 BoNT 结合的双受体假说. 该假说认为毒素与细胞膜的结合为两步, 先与膜上的神经节苷脂进行低亲和结合, 再促使毒素与其膜上受体的高亲和结合^[11]. 近年已证实了这一假说, 如无论用蛋白酶还是用唾液酸酶处理突触小体, 都显著降低标本与 BoNT \ B 的结合; 胞外加外源性的神经节苷脂 GD_{1a}和 GT_{1b}都可恢复被唾液酸酶降低了的毒素的结合, 但不能恢复被蛋白酶降低了的毒素的结合. 提示毒素可能是与蛋白受体-神经节苷脂复合体结合的^[12]. Nishiki 等从大鼠的脑突触体分离了 BoNT \ B 的受体并发现它是突触小胞膜上的 synaptotagmin. Synaptotagmin 有一个跨膜区, 可通过胞吐暴露到神经末梢的外表面与神经节苷脂作用^[13].

6 胞饮, H_N 和毒素的导入

利用多克隆抗体和标记 BoNT 进行的研究表明, 毒素先与细胞膜上的受体结合, 再通过胞饮进入胞内^[3]. 这方面的证据是抑制胞饮的药物氯喹、氯化铵和氯化羟甲胺都拮抗 BoNT 的作用; 利用碘标 BoNT 做的电镜放射自显影发现, 毒素与细胞膜结合后再进入吞饮小胞, 此过程是需能的, 可被代谢抑制剂和低温阻断, 刺激神经加速.

目前认为, 进入吞饮小胞的毒素随着小胞内 pH 的变化发生构变, 暴露其疏水域并插入小胞膜, 再穿过小胞膜进入细胞^[3]. 这方面的证据有: a. BoNT 的拮抗剂 bafilomycin 既不阻止毒素与细胞膜的结合, 也不影响毒素的胞内毒性, 而是由影响吞饮小胞内的酸化来阻止毒素进入细胞的. b. BoNT 可在脂双层形成供毒素通过的跨膜通道. c. 结构和功能方面的实验表明, BoNT 的重链的 N 端段 H_N 具形成通道

的活性^[3].

但还有些不同的实验结果, 如在海兔标本观察到 HC 是帮助毒素通过吞饮小胞的功能域^[10]; 用光化学试剂的观察发现, 毒素的轻链和重链都插入脂双层, 说明毒素在吞饮小胞膜上的易位可能需要毒素轻链和重链的共同作用^[3]. 还有实验提示, 只有 1/3 进入吞饮小胞的毒素进入细胞质, 其间, 不但毒素的构型发生变化, 而且轻链间的二硫键也要断裂, 是毒素易位过程的限速步骤^[13, 14].

7 轻链的底物是参于融合过程的蛋白

毒素的最终作用部位在胞内, 轻链是与其有关的功能域. 从作用的高效性和持久性推测毒素的轻链是作为酶起作用的^[15].

递质释放的 SNARE 假说认为, 突触小泡和神经末梢膜的融合是胞浆中可溶性融合原与它在小泡和末梢膜上的受体结合、相互作用、形成复合体及复合体解体、导致胞吐的过程. Synaptobrevin/VAMP 和 synaptotagmin 是可溶性融合原在小泡膜上的受体, Syntaxin/ HPC-1 和 SNAP-25 则是可溶性融合原在末梢膜上的受体^[16]. 研究发现, BoNT 的轻链约含 450 个氨基酸残基, 其中部 18 个残基是高度保守的, 包括由 His-Glu-Xaa-Xaa-His 组成的锌肽链内切酶 (zinc endopeptidase) 的锌离子结合中心^[8]. BoNTs 选择地作用于可溶性融合原的不同受体, 影响 SNARE 复合体的形成或/和解体、阻止突触小泡与末梢膜的融合, 抑制递质释放^[17, 18]: BoNT \ A 和 \ E 切断 SNAP-25; BoNT \ C₁ 对 syntaxin 和 SNAP-25 都有作用; BoNT \ B, \ D, \ F 和 \ G 是在不同位点上切断 synaptobrevin/VAMP^[17, 18]. 对 BoNT 与其胞内底物的研究, 丰富了我们参与递质释放有关蛋白质功能的认识, 如通过分析它们对钙依赖的胞吐过程的作用, 证明 SNAP-25 蛋白的 C 端 (Ile¹⁸¹-Gln¹⁹⁷) 对小胞着位以后的过程是至关重要的^[19].

对天然毒素的研究除指导中毒的预防和救治外, 更深远的意义是从中发掘具专一作用的

化合物, 用于分析复杂的生命过程; 跨膜信号转导、突触传递、递质释放等基本生命过程的研究都离不开多种活性物质的应用. 对 BoNT 作用机制的深入了解, 为我们提供了多种工具 and 实际应用前景, 首先 BoNT 可用做药理学去神经手段建立神经疾病模型, 研究神经肌肉间营养关系和治疗、校正某些肌痉挛. 其二, 利用 BoNT 对胆碱能神经元的高亲合性, 分离和标记胆碱神经元; 毒素重链还可用于分子重组, 将它与药物结合, 专一地干扰胆碱能突触的功能. 其三, BoNT 的胞内底物的发现, 使它已成为分析参与递质释放有关蛋白的功能, 研究胞吐机制的有用工具.

参 考 文 献

- 1 施玉梁. 肉毒杆菌毒素的作用原理 (上). 生物化学与生物物理进展, 1977, **15** (3): 44~ 47
- 2 施玉梁. 肉毒杆菌毒素的作用原理 (下). 生物化学与生物物理进展, 1977, **15** (4): 45~ 48
- 3 Simpson L L. The actions of clostridial toxins on storage and release of neurotransmitters. In: Natural and synthetic neurotoxins. Academic Press, 1993. 277~ 317
- 4 Simpson L L. The origin, structure, and pharmacological activity of botulinum toxin. Pharmacol Rev, 1981, **33**: 155~ 188
- 5 Simpson L L. Molecular pharmacology of botulinum toxin and tetanus toxin. Ann Rev Pharmacol Toxicol, 1986, **26**: 427~ 453
- 6 Gundersen C B. The effects of botulinum toxin on the synthesis, storage and release of acetylcholine. Progr Neurobiol, 1980, **14**: 99~ 119
- 7 Simpson L L. Kinetic studies on the interaction between botulinum toxin type A and the cholinergic neuromuscular junction. J Pharmacol Exp Ther, 1980, **212**: 16~ 21
- 8 Schiavo G, Rossetto O, Santucci A *et al*. Botulinum neurotoxin are zinc proteins. J Biol Chem, 1992, **267**: 23479~ 23483
- 9 Poulain B, Molgo J. Botulinum neurotoxins: mode of action on neurotransmitter release. In: Methods in neurosciences. Academic Press, 1992. 38~ 54
- 10 Poulain B, Mochida S, Wadsworth J D F *et al*. Inhibition of neurotransmitter release by botulinum neurotoxins and tetanus toxin at *Aplysia* synapses: Role of the constituent chains. J Physiol Paris, 1990, **84**: 247
- 11 Montecucco C. How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes? Trends Biochem Sci, 1986, **11**: 314 ~ 317
- 12 Ogasawara J, Kamata Y, Sakaguchi G *et al*. Properties of a protease sensitive acceptor component in mouse brain synaptosomes for *Clostridium botulinum* type B neurotoxin. FEMS Microbiol Lett, 1991, **79**: 351~ 355
- 13 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**: 10498~ 10503
- 14 Montecucco C, Schiavo G. Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. Molecular Microbio, 1994, **13** (1): 1~ 8
- 15 Simpson L L. Current concepts on the mechanism of action of clostridial neurotoxins. In: DasGupta B R ed. Botulinum and tetanus neurotoxins. Plenum Press, 1993. 5~ 15
- 16 Martin T F. The molecular machinery for fast and slow neurosecretion. Curr Opin Neurobiol, 1994, **4**: 626~ 632
- 17 Schiavo G, Rossetto O, Montecucco C. Clostridial neurotoxins as tools to investigate the molecular events of neurotransmitter release. Seminars Cell Biol, 1994, **5**: 221~ 229
- 18 Williamson L C, Halpern J L, Montecucco C *et al.* Clostridial neurotoxins and substrate proteolysis in intact neurons. J Biol Chem, 1996, **271**: 7694~ 7699
- 19 Banerjee A, Kowalchuk J A, DasGupta B R *et al.* SNAP-25 is required for a late postdocking step in Ca^{2+} -dependent exocytosis. J Biol Chem, 1996, **271**: 20227~ 20230

Progress in Study on the Mechanism of Botulinum Neurotoxin Actions. SHI Yu-liang, HU Qian (*Shanghai Institute of Physiology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China*).

Abstract Recent achievements in researching botulinum neurotoxin actions' mechanism are as follows. (1) Electrophysiology experiments demonstrate the decrease of Ca^{2+} sensitivity in the transmitter release system is responsible to the synaptic block induced by BoNTs. Directly

intracellular introducing of BoNTs shows BoNTs have no intracellularly cholinergic specificity and inhibit secretion from all types of cells. (2) Binding experiments indicate the binding of BoNTs includes an initial low-affinity step and a subsequent high-affinity step. The low-affinity receptors might be gangliosides, while the high-affinity receptor might be synaptotagmin, a synaptic vesicle membrane protein. (3) The intoxication of BoNTs is more appropriately described by a four-step process: binding to the preferential receptors, internalizing by the process of receptor-mediated endocytosis, membrane translocation and escaping endosomes by an acidification process, as well as selectively cleaving the proteins involved in exocytosis as an enzyme. The carboxyterminus and the aminoterminal of the heavy chain as well as the light chain play important roles in tissue targeting, internalization, and intracellular target modification respectively. The internalized light chain cleaves the proteins involved in the fusion of synaptic vesicles so that the exocytosis as well as the transmitter releases are inhibited.

Key words botulinum neurotoxin, vesicle fusion, neurotransmitter release, function domain

富勒烯的生物活性研究进展*

徐正 锁志勇 魏先文

(南京大学配位化学研究所, 配位化学国家重点实验室, 南京 210093)

朱德煦

(南京大学生物化学系, 南京 210093)

摘要 90年代初以来, 富勒烯类化合物的生物活性逐渐引起人们的注意, 初步研究表明在抗艾滋病、酶活性抑制、切割DNA、光动力学治疗等方面具有独特的功效. 此类化合物在生化、医学、药理学等领域有良好的应用前景.

关键词 富勒烯, 生物活性, 毒性, 溶解性, 新陈代谢, 光动力学治疗

学科分类号 R914

富勒烯是单质碳的第三种同素异形体, 具有中空的笼状结构, 它的家族成员有 C_{60} 、 C_{70} 、 C_{76} 、 C_{78} 、 C_{82} 、 C_{84} 、 C_{90} 、 C_{94} ... C_{240} 、

C_{540} 等, 它们中的突出代表是 C_{60} 和 C_{70} . 自

* 国家自然科学基金资助项目 (29671018).

收稿日期: 1996-12-25, 修回日期: 1997-03-28