

囊泡单胺转运体的研究进展

任今鹏, 蒋雨平

(复旦大学附属华山医院神经内科 200040)

关键词 VMAT₁; VMAT₂; 帕金森病; 单胺类递质

摘要 囊泡单胺转运体(vesicular monoamine transporter, VMAT)也称为囊泡单胺转运蛋白,介导单胺类递质在突触囊泡中的转运。近年来其分子结构在体内的分布及生理功能已被初步阐明,就此做一综述。

神经元和内分泌细胞通过胞吐作用释放单胺类物质,此过程需要其前体被转运并积聚到分泌性囊泡中。在中枢神经系统,单胺类神经递质被两种不同类型的调节分泌的囊泡所摄取和贮存:小突触囊泡和大致密中心囊泡(large dense core vesicles)。生物化学和药理学证据表明这种摄取是由特定的囊泡单胺转运体介导的^[1]。研究表明囊泡单胺转运体在两种亚型VMAT₁和VMAT₂^[2]。分子克隆技术鉴定表明:VMAT₁主要在外周组织中表达,参与外周单胺类递质转运的调节;VMAT₂则主要在脑内表达,VMAT₂决定了细胞内单胺类递质的贮存部位,并认为与中枢单胺类递质及相关神经心理性疾病的调节有关^[1]。近来研究表明,VMAT₂可能通过清除毒物入囊泡而对神经元有保护作用,使其免受毒素的损害^[3];还有研究表明在帕金森病患者的脑内VMAT₂的含量和mRNA减少^[4],提示VMAT可能在帕金森病的发病机制中起一定作用。

囊泡单胺转运体的结构

VMAT的克隆 在大鼠体内存在两种不同的囊泡单胺转运体:VMAT₁和VMAT₂。Edwards和Erickson等分别在哺乳动物细胞上克隆出大鼠的VMAT。Edwards是将VMAT作为一个抗MPP⁺(1-methyl-4-phenylpyridine)基因获得的。对MPP⁺有独特敏感性的中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞被源自PG-12细胞的cDNA文库逐步转染,然后在有MPP⁺的培养基中培养,分离出对MPP⁺有抗性的克隆。这个克隆编码的VMAT表明这些转化细胞通过利舍平敏感的方式积聚多巴胺。此种VMAT的蛋白和mRNA只在

大鼠的肾上腺表达,为VMAT₁^[5]。

Erickson等用大鼠的嗜碱性细胞系cDNA文库通过在猴的肾脏细胞上表达克隆分离出另一种VMAT的cDNA。此克隆编码的VMAT的蛋白和mRNA只在大鼠的脑内表达,为VMAT₂^[6]。

对人和牛的VMAT的同工型也作了研究,结果表明VMAT的两种同工型与大鼠是极为相似的^[7]。VMAT₁和VMAT₂的基因分别位于第8染色体(8p21.3)^[8]和第10染色体(10q25)^[7]。

囊泡单胺转运体的分子结构 研究表明,VMAT是结合于膜上的糖蛋白,相对分子质量约在 $65 \times 10^3 \sim 85 \times 10^3$ 。VMAT₁具有约521个氨基酸^[5],VMAT₂具有约518个氨基酸,不同种属的VMAT相对分子质量和氨基酸数略有差异。对大鼠VMAT序列的疏水性分析表明:VMAT都具有12个跨膜螺旋区,N-末端和C-末端位于胞质^[5]。囊泡基质中的环上存在N-连接的糖基化作用位点。位于跨膜区1和2之间。这一模式结构可适用于各种来源的VMAT₁和VMAT₂的结构中。在胞质侧的氨基酸序列中含有蛋白激酶C和蛋白激酶A的磷酸化位点,提示磷酸化可能参与调节VMAT的功能。可变性最大的部分为N-和C-末端的部分以及巨大的糖基化环。例如,在这个环上,VMAT₁和VMAT₂的同源性只有22%;另一方面,一些跨膜区相当保守,在那些区域一些带电的氨基酸很稳定。

人VMAT₁和VMAT₂氨基酸序列具有60%的同源性,最大的同源性在12个跨膜转运区。在VMAT₁有3个糖基化位点,而在VMAT₂有4个糖基化位点。N-末端和C-末端具有很少的保守性^[7]。

[文章编号] 1008-0678(2004)01-089-04 [中图分类号] R742.5 [文献标识码] A

[作者简介] 任今鹏,男(1970)山东青岛人,博士,主治医师,目前在上海交通大学附属第六人民医院神经内科工作,从事帕金森病的研究。

大鼠的 VMAT₁ 和 VMAT₂ 具有 62% 的同源性和 78% 的相似性。序列的主要不同在位于跨膜区 1 和跨膜区 2 之间的大环结构和 N-末端及 C-末端^[8]。

VMAT 的另一个特点,在物种进化过程中具有高度保守性。不同种属的 VMAT₁ 之间以及 VMAT₂ 之间氨基酸序列具有很高的同源性。例如,人和大鼠 VMAT₁ 的氨基酸序列在 12 个跨膜区上具有 97% 的同源性,小鼠 VMAT₂ 的氨基酸序列与人及大鼠分别具有 92% 和 96% 的同源性^[8]。

囊泡单胺转运体的分布

在大鼠,最初发现 VMAT₁ 在肾上腺髓质表达而 VMAT₂ 在脑内表达。并且分别将 VMAT₁ 和 VMAT₂ 称为分泌型和神经原型^[5]。但是,此假说被从嗜碱性白细胞库中克隆出 VMAT₂ 而被推翻^[4]。有人应用多克隆抗体对 VMAT₁ 和 VMAT₂ 在大鼠和人脑中的分布进行了研究^[7]。结果表明 VMAT₁ 主要分布在大鼠的内分泌和旁分泌细胞(嗜铬细胞、肠的嗜铬粒蛋白 A 阳性细胞、肠嗜铬细胞和颈上神经节多巴胺能 SIF 细胞),而在成年脑内不表达。VMAT₂ 则在脑内的多巴胺能、去甲肾上腺素能、肾上腺素能、5-羟色胺能以及组胺能神经元中都有表达,在交感神经中也有表达。另外,在胃壁黏膜层的多巴胺能嗜铬粒蛋白 A 阳性细胞和肠嗜铬细胞样细胞中也有 VMAT₂ 的表达。在人类中也有类似的结果,VMAT₁ 只在神经内分泌细胞包括嗜铬细胞和肠嗜铬细胞中表达,VMAT₂ 则在中枢以及外周神经系统中都有表达^[13]。在中枢神经系统,VMAT₂ 在尾壳核、伏隔核^[8]、黑质、被盖腹侧区、蓝斑、中缝核群和孤束核有高表达,在中脑、脑干腹侧部、下丘脑和嗅球都有表达,在大脑皮质亦有少量表达^[9]。

在肾上腺中的分布比较复杂,而且在大鼠、牛和人身上的结果是不同的。在大鼠,肾上腺中主要是 VMAT₁ 表达^[5],但 VMAT₂ 在其中的神经节细胞也许还有一些嗜铬细胞中表达^[6,9]。相反,在牛的肾上腺中主要是 VMAT₂ 表达,而在人的肾上腺髓质中 VMAT₁ 和 VMAT₂ 都有表达^[7]。大鼠血小板的 VMAT 尚未鉴定出,人的血小板表达 VMAT₂。

在大鼠 VMAT₂ mRNA 主要集中于中枢单胺能神经元,VMAT₂ 蛋白主要集中于脑内突触囊泡膜^[5,7]。

囊泡单胺转运体的生理功能

VMAT 具有以下明显的特性:①对 5-羟色胺、多巴胺和肾上腺素的摄取具有广泛的选择性;②利舍平和

丁苯那嗪对其转运有特定的抑制作用;③对单胺的转运依赖于跨膜 H⁺-电化学梯度^[10]。

各种循环细胞通过特定的浆膜转运体(如多巴胺转运体)摄取单胺类递质,并在 VMAT 的帮助下将其储存于分泌囊泡。VMAT 位于突触囊泡膜上,从胞质转运单胺类递质入囊泡贮存以便释放至突触间隙。VMAT 利用囊泡内的质子交换胞质的单胺,此转运的能量来自囊泡膜上的 H⁺-ATPase 产生的跨囊泡膜的 pH 梯度。H⁺-ATPase 主动的将质子沿着 pH 梯度泵入囊泡,囊泡里产生高质子浓度和低 pH 值,囊泡内的低 pH 值有助于单胺稳定的贮存^[11]。

单胺类递质包括多巴胺、去甲肾上腺素、5-羟色胺和组胺。在单胺能神经末梢,重摄取占释出总量的 3/4,为单胺能神经递质终止其生理作用的主要方式,既保证了突触传递的灵活性,又符合生物学经济原则。VMAT₁ 在外周组织清除单胺入囊泡(如肾上腺髓质),VMAT₂ 则清除单胺类递质入脑内的突触囊泡^[9]。VMAT₂ 的功能对于囊泡 Ca²⁺ 依赖的量子化释放非常重要^[7]。VMAT₂ 通过携带多巴胺进入突触囊泡和调节随后的释放而在多巴胺的贮存和释放中起关键作用^[12]。一旦多巴胺进入突触前神经末梢,它就被 VMAT₂ 转运入小囊泡^[5,10]。当神经冲动到达末梢时,细胞膜对 Ca²⁺ 通透性改变, Ca²⁺ 进入细胞产生兴奋释放偶联,使囊泡与突触前膜融合,然后胞裂而将囊泡内的单胺类递质以量子释放至突触间隙,一个突触小泡内的递质代表一个量子单位。

另外,VMAT 对于毒素的清除也十分重要。VMAT₂ 是毒素清除反向转运体基因家族的一员,包括一些细菌抗生素的抗性基因。在细菌中,VMAT₂ 可以从细胞清除毒素。有人认为 VMAT₂ 从胞质中清除潜在的毒性物质,通过分离毒性物质进入囊泡,从而防止毒性物质与细胞器作用,使细胞免受毒性物质的损害^[3]。选择性多巴胺神经元的毒素 MPTP 活性代谢产生 MPP⁺ 损害多巴胺神经元和其他表达多巴胺转运体(dopamine transporter, DAT)的细胞,从而导致帕金森综合征。在 VMAT₂ 基因敲除的杂合子小鼠黑质多巴胺神经元数量,纹状体多巴胺和 DAT 明显减少及神经胶质增生,表现出对 MPTP 的高度敏感性,表明低于正常水平的 VMAT₂ 的表达对 MPTP 的毒性易感性增强^[3]。VMAT₂ 抑制剂增强 MPTP 对大鼠纹状体的毒性作用。VMAT 的过量表达能够通过从细胞质的线粒体损害部位清除 MPP⁺ 至囊泡而抑制 MPP⁺ 的毒性^[5]。有研究证实,大鼠之所以表现出对 MPTP 的神经毒作用较小

鼠不敏感是因为大鼠纹状体的多巴胺能神经元的囊泡中含有更多的 VMAT₂, 能将更多的 MPP⁺ 清除入囊泡而减轻了 MPTP 的毒性作用^[14]。苯丙胺通过破坏穿过囊泡膜的 pH 梯度从而从贮存囊泡释放单胺^[11]。苯丙胺产生的多巴胺的释放和 VMAT₂ 介导的囊泡重摄取之间的平衡对于由适量苯丙胺产生的非量子化非 Ca²⁺ 依赖的细胞外的多巴胺的释放和高剂量的苯丙胺引起的多巴胺的毒性非常重要。高浓度的苯丙胺可能通过细胞质的多巴胺氧化和自由基形成而产生氧化应激造成多巴胺的毒性。

尽管 VMAT₂ 提供一定程度的保护作用, 但是一些内源性和外源性毒物还是通过浆膜转运体如 DAT 进入神经元。因此, VMAT 和 DAT 与毒物的相互作用就影响多巴胺能神经元功能和最终存活^[3], 维持 DAT 和 VMAT₂ 之间介导递质转运的平衡对于细胞功能是极为重要的^[15]。

中枢囊泡单胺转运体(VMAT₂) 和帕金森病的关系

鉴于 VMAT 特别是脑内 VMAT₂ 具有的上述生理功能, 因此对 VMAT₂ 和临床疾病关系的研究集中在神经系统变性疾病, 尤其是帕金森病的研究。近年来, 试图把 DAT 和 VMAT₂ 作为多巴胺神经元损害的指标, 以利于对帕金森病的症状前检测和干预, 减缓帕金森病的发展。由于 DAT 的表达能被 L-dopa、苯丙胺及可卡因等发生改变, 因此有学者认为 VMAT₂ 可能是在帕金森病中用来检测多巴胺神经末梢完整性的更可靠指标^[16, 20]。

VMAT₂ 的 mRNA 在帕金森病中受损害的各主要细胞群中都有表达(多巴胺能、去甲肾上腺能和 5-羟色胺能)。在帕金森病患者的脑组织中, VMAT₂ 的蛋白含量明显减少^[17]。在帕金森病的动物模型上也观察到 VMAT₂ 的结合位点及 mRNA 的表达减少^[18, 19]。表明 VMAT₂ 在帕金森病的发病机制中可能起一定作用。VMAT₂ 帮助维持胞质低的多巴胺水平, 对于细胞正常功能是必须的。高水平的胞质多巴胺会抑制线粒体呼吸造成多巴胺自动氧化和自由基的形成。选择性多巴胺神经元毒素 MPTP 的活性代谢产物 MPP⁺ 选择性的通过 DAT 在黑质纹状体的多巴胺神经元中积聚, 损伤多巴胺神经元和其他表达 DAT 的细胞, 从而导致帕金森综合征。帕金森病的病因中包括环境因素, 特别是环境毒物。研究表明暴露于除草剂及有机氯农药是帕金森病的危险因素, 通过影响 VMAT₂ 的正常功能可能

是其机制之一。VMAT₂ 能够通过清除毒素入囊泡而防止对神经元的毒性^[20], 从而可以减轻对神经元的损害。在帕金森病中对损害最敏感的区域是壳核和尾状核, 在这些区域 DAT 的表达最多^[3], 而同样 VMAT₂ 也有高表达^[17], 但这并不能防止这些区域出现神经元的损害, 说明仅仅 VMAT₂ 的存在并不能保护单胺能神经元免受损伤, 尚有另外的因素影响多巴胺神经元变性^[3, 17]。有学者认为, 在那些 VMAT₂ 表达相对较低水平的细胞可能对帕金森综合征诱导剂或单胺的自动氧化更敏感。DAT 和 VMAT₂ 的比值可能表明神经元对多巴胺毒物的敏感性。DAT/VMAT₂ 的比值高增加细胞对毒素的敏感性, 而 DAT/VMAT₂ 比值低将减少其对毒素的敏感性^[3, 17]。在帕金森病中损害最严重的壳核 DAT 与 VMAT₂ 的比值更高, 说明比值可帮助确定对损害最敏感的区域^[3, 17]。

基于以上观点, 如果 DAT 和 VMAT₂ 确实介导对神经变性疾病敏感性, 那么通过药物干预这些转运体可能会为帕金森病的治疗开辟一条新途径。增加由 VMAT₂ 介导的囊泡摄取可以减少环境毒物对神经元的损伤, 延缓神经元的变性, 预防或减慢帕金森病的进程。但是, 关于 VMAT₂ 与帕金森病关系的研究尚处于初步阶段, 其在帕金森病中的作用机制及其意义尚待进一步研究。

参考文献

- [1] Nirenberg MJ, Liu Y, Peter D, et al. The vesicular monoamine transporter 2 is present in small synaptic vesicles and preferentially localizes to large dense core vesicles in rat solitary tract nuclei [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 8773-8777
- [2] Liu Y, Schweitzer ER, Nirenberg MJ, et al. Preferential localization of a vesicular monoamine transporter to dense core vesicles in PC12 cells [J]. *J Cell Biol*, 1994, 127: 1419-1433
- [3] Miller GW, Gainetdinov RR, Levey AL, et al. Dopamine transporters and neuronal injury [J]. *Trends*, 1999, 20: 424-429
- [4] Kilboun MR, Kuspi K, Sherman P. Rapid and differential losses of in vivo dopamine transporter (DAT) and vesicular monoamine transporter (VMAT2) radioligand binding in MPTP-treated mice [J]. *Synapse*, 2000, 35: 250-255
- [5] Liu Y, Peter D, Roghani A, et al. A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter [J]. *Cell*, 1992, 70: 539-551
- [6] Mahata SK, Mahata M, Fischer-Colbrie R, et al. Vesicle monoamine transporters 1 and 2 differential distribution and regulation of their mRNAs in chromaffin and ganglion cells of rat adrenal medulla [J]. *Neurosci Lett*, 1993, 156: 70-72
- [7] Suratt CK, Persico AM, Yang CD, et al. A human synaptic vesicle monoamine transporter cDNA predicts posttranslational modifications reveals chromosome-10 gene localization and identifies Taq I RFLPs [J]. *EFBS Lett*, 1993, 318: 325-320

[8] Takahashi N, Uhl G. Murine vesicular monoamine transporter 2: molecular cloning and genomic structure [J]. Mol Brain Res, 1997, 59: 7-14

[9] Peter D, Liu Y, Sternini C, et al. Different expression of two vesicular monoamine transporters [J]. J Neurosci, 1995, 15: 6179-6188

[10] Erickson JD, Eiden LE, Hoffman BJ. Expression cloning of a reserpine-sensitive vesicular monoamine transporter [J]. Proc Natl Acad USA, 1992, 89: 10993-10997

[11] Sulzer D, Rayport S. Amphetamine and other psychostimulants reduce pH gradients in midbrain dopaminergic neurons and chromaffin granules: a mechanism of action [J]. Neuron, 1990, 5: 797-808

[12] Lee WY, Chang JW, Nemeth NL, et al. Vesicular monoamine transporter-2 and aromatic L-amino acid decarboxylase enhance dopamine delivery after L-3, 4-dihydroxyphenylalanine administration in Parkinsonian rats [J]. J Neurosci, 1999, 19: 3266-3274

[13] Staal RG, Sonsalla PK. Inhibition of brain vesicular monoamine transporter (VMAT2) enhanced L-methyl-4-phenylpyridinium neurotoxicity in vivo in rat striata [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293: 336-342

[14] Staal RG, Hogan KA, Liang CL, et al. In vivo studies of striatal vesicles containing the vesicular monoamine transporter (VMAT2): rat versus mouse difference in sequestration of L-methyl-4-phenylpyridinium [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 293: 329-325

[15] Fumagalli F, Gainetdinov RR, Wang YM, et al. Increased mdamphetamine neurotoxicity in heterozygous vesicular monoamine transporter 2 knock-out mice. Neurosci, 1999, 19: 2424-2431

[16] Wilson JM, Levey AL, Rajput A, et al. Differential changes in neurochemical markers of striatal dopamine nerve terminals in idiopathic Parkinson's disease [J]. Neurology, 1996, 47: 718-726

[17] Miller GW, Erickson JD, Perez JT, et al. Immunochemical analysis of vesicular monoamine transporter (VMAT2) protein in Parkinson's disease [J]. Exp Neurol, 1999, 156: 138-148

[18] Hogan KA, Staal RG, Sonsalla PK. Analysis of VMAT2 binding after mdamphetamine or MTP treatment: disparity between homogenates and vesicle preparations [J]. J Neurochem, 2000, 74(5): 2217-2220

[19] Ito Y, Fujita M, Shimada S. Comparison between the decrease of dopamine transporter and that of L-DOPA uptake for detection of early to advanced stage of Parkinson's disease in animal models [J]. Synapse, 1999, 31: 178-185

[20] Gainetdinov RR, Fumagalli F, Wang YM, et al. The neurotoxin L-methyl-4-phenylpyridinium is sequestered within neurons that contain the vesicular monoamine transporter [J]. Neuroscience, 1998, 84: 1177-1185

(2000-11-13 收稿 2002-02-04 修回)

阵发性运动源性舞蹈手足徐动症

王 晔, 郭大文, 王德生*

(沈阳军区总医院神经内科 110015; * 哈尔滨医科大学第一临床医学院神经内科 150001)

关键词 运动障碍; 离子通道; 癲 ; 舞蹈; 手足徐动

摘要 PKC 为一种离子通道病, 多呈常染色体显性遗传, 表现形式多样, 可见突然、简短、非意志性异常运动, 抗癲 治疗有效。随着年龄增长, 症状逐渐减轻。

概 述

阵发性运动障碍 (paroxysmal dyskinesias) 为一种离子通道病, 可见短暂舞蹈手足徐动症或肌张力障碍, 持续时间较短^[1]。Gowers (1885) 首先描述运动诱发舞蹈手足徐动症样或肌张力障碍性癲^[2]。1940 年 Mount 和 Reback 报道 1 例常染色体显性遗传 23 岁男性, 可见上下肢舞蹈手足徐动症样运动, 每天发作 2~ 3 次,

持续 5 min 至数小时不等, 诱因包括乙醇、咖啡、茶、疲劳、吸烟等。发作间期正常, 称为家族性阵发性肌张力障碍性舞蹈手足徐动症 (familial paroxysmal dystonic choreoathetosis)^[3]。Lishman 等 1962 年报道“阵发性运动源性舞蹈手足徐动症”^[4]。1967 年 Kertesz 详细描述“舞蹈肌张力障碍发作”, 诱因为突然运动(运动源性)、应激或兴奋状态, PKC 发作形式多样, 可见突然、简短性单侧或双侧异常运动, 如肌张力障碍性姿势、舞蹈、

[文章编号] 1008-0678(2004)01-092-04 [中图分类号] R742.2 [文献标识码] A
 [作者简介] 王晔, 男 (1967), 黑龙江哈尔滨市人, 沈阳军区总医院神经内科主治医师, 医学博士, 神经病学博士后, 主要从事脑血管病和神经变性疾病的研究。