

分子神经生物学

刘安西 王秀玲 等编译

FZSHJSHUX

南开大学出版社

Q7
LAX

分子神经生物学

刘安西 王秀玲 吕宪禹 张文清
赵勇 何力 陈东

编译

南开大学出版社

内 容 简 介

本书论述了分子神经生物学的基本概念、理论和学说以及基因克隆技术在通道蛋白分子定序中的应用，同时还介绍了目前已知通道蛋白的分子结构，反映了当前国际分子神经生物学所取得的重要成果。可作为综合性大学生物系和医学院校生理学、药理学等专业本科生及研究生教材，也可供有关的科研人员参考。

〔津〕新登字011号

分子神经生物学

刘安西 等编译

南开大学出版社出版

(天津八里台南开大学校内)

邮政编码300071 电话349318

新华书店天津发行所发行

河北省邮电印刷厂印刷

1992年2月第1版 1992年2月第1次印刷

开本：850×1168 1/32 印张：10.75

字数：282千 印数：1—2000

ISBN 7-310-00553-8/Q·21 定价：7.00元

编译者的话

神经科学与分子生物学结合产生了分子神经生物学，其任务是在分子水平上研究神经系统的结构与功能。它已在递质、受体和细胞膜离子通道三个方面获得重大进展，成为生命科学中发展最快的领域之一。80年代初，随着电压钳位技术的广泛应用以及近年来膜片钳单通道记录技术的发展和单克隆抗体、基因工程技术的引入，人们对神经膜离子通道有了进一步认识。离子通道中，如烟碱样乙酰胆碱受体通道、钠通道、钾通道中的A通道、 γ -氨基丁酸受体通道和L型钙通道的分子结构相继得到阐明，不仅为细胞的生命现象提供了重要信息，同时也被广泛应用于生理学、药理学、神经生物学和膜生物物理学领域。因此，我们在为研究生开设“细胞膜离子通道”和“分子神经生物学”专题课基础上，以D.M.Glover和B.D.Hames所著《Molecular Neurobiology》(1989)为主，选取书中主要章节，并参阅了David J.Aidley所著《The physiology of excitable cells》(1989第三版)的部分章节编译成此书。

本书以近年来国际上在分子神经生物学和离子通道各研究领域所取得的重要成果为资料，阐述了分子神经生物学的基本概念、理论和学说，对基因克隆技术在果蝇快钾通道、乙酰胆碱受体通道等分子结构研究中的应用及以受体单克隆抗体为探针的研究方法作了介绍。这些方法是研究受体通道分子结构与功能的主要途径，在阐明离子通道的本质、在机体功能调节中的作用和药物作用原理以及寻找新药物方面都具有重要的理论和实际意义。

编译本书的目的在于为正在学习动物学、生理学、生物物理学、细胞生物学和分子生物学的高年级学生和研究生提供一本具有教科书性质的参考书。

由于水平有限，书中定有错误和不妥之处，恳请读者和各方面专家批评指正。

刘安西

目 录

第一章 绪论	(1)
第二章 神经传导的离子学说	(10)
第一节 动作电位的“钠离子学说”	(12)
第二节 神经活动期的离子移动	(13)
第三节 电压钳位实验	(17)
第四节 巨大轴突灌流实验	(33)
第五节 再论传导性	(36)
第六节 固定电荷和钙离子介入	(39)
第三章 电压门控性离子通道	(45)
第一节 钠通道	(45)
第二节 延迟整流钾通道	(75)
第三节 钙通道	(90)
第四章 果蝇神经生理的分子生物学实验方法	(105)
第一节 概述	(105)
第二节 胆碱能系统的分子遗传学分析	(115)
第三节 光传导作用的分子遗传学分析	(120)
第四节 钠通道的分子遗传学分析	(126)
第五节 钾通道的分子遗传学分析	(136)
第六节 结论	(146)
第五章 神经肌肉的突触传递	(148)
第一节 突触传递的性质	(148)
第二节 神经肌肉突触的结构	(150)
第三节 运动神经末梢释放的乙酰胆碱	(151)
第四节 终板电位	(153)

第五节	乙酰胆碱对终板膜的作用.....	(158)
第六节	终板电位的离子基础.....	(161)
第七节	乙酰胆碱酯酶.....	(164)
第八节	递质释放的量子性质.....	(166)
第九节	递质释放的突触前事件.....	(176)
第十节	易化、强化与抑制作用.....	(181)
第十一节	乙酰胆碱的非量子释放.....	(183)
第六章	乙酰胆碱受体通道的分子生物学.....	(185)
第一节	引言.....	(185)
第二节	受体cDNA的制备.....	(189)
第三节	从电鳗AChR cDNA推导氨基酸序列及结构.....	(193)
第四节	AChR亚基序列的相似性及通道侧壁序列的定位.....	(205)
第五节	AChR新亚基.....	(212)
第六节	表达系统.....	(215)
第七节	AChR单个亚基功能的确定.....	(220)
第八节	烟碱型AChR染色体组基因的分离.....	(229)
第九节	神经AChR的分离.....	(231)
第十节	其它克隆通道.....	(233)
第十一节	结论.....	(242)
第七章	烟碱样乙酰胆碱受体.....	(243)
第一节	生理学.....	(243)
第二节	结构与发育.....	(256)
第三节	药理学和免疫学.....	(261)
第八章	神经递质及其受体.....	(263)
第一节	第二信使和G蛋白.....	(267)
第二节	药物对神经肌肉传递作用的影响.....	(270)
第三节	其它胆碱能突触.....	(274)

第四节	伦肖细胞.....	(275)
第五节	哺乳动物脑的胆碱能受体.....	(277)
第六节	无脊椎动物的受体.....	(278)
第七节	氨基酸递质.....	(293)
第八节	嘌呤类.....	(309)
第九节	神经肽递质.....	(310)
参考文献.....		(319)

第一章 绪 论

20世纪自然科学最重要的进展是分子生物学的发展，即用分子结构与功能关系的基本原理阐明生命现象的本质。由于当前学科发展的特点是交叉性强，因此分子生物学的研究极大地推动和影响了许多其它生物和医学部门，使之推进到分子水平。目前出现了分子遗传学、分子药理学、分子细胞学、分子免疫学与分子神经生物学等，而其中的神经科学是60年代形成的综合学科，是现在生物科学中发展最快的领域之一。到了70年代，分子生物学与神经科学相结合便产生了分子神经生物学，其任务是在分子水平上研究脑和神经系统的结构和功能，它已在递质、受体和离子通道三个方面获得重大进展。正是如此，分子神经生物学与细胞神经生物学紧密结合在一起。一方面，递质、受体和离子通道要通过神经细胞才能发挥作用；另一方面，神经细胞在执行其功能时也离不开递质、受体和离子通道。这说明当前对生命科学中重要问题的探讨需要多学科全方位的共同协作，这些学科逐步形成一门独立发展的生命科学中的新兴学科。分子神经生物学便是其中发展最快的学科之一。

神经科学的多学科性也表现在所用实验技术上，它往往把几种技术结合起来，以尽可能多地获取知识。重组DNA、基因克隆、单克隆抗体和膜片钳单通道记录技术的应用，使人们对受体和离子通道的认识有了飞跃的进步。重组DNA技术是分子遗传学的主要技术，它在神经科学研究中发挥着重要作用，形成一个新的前沿——分子遗传神经科学。重组DNA技术主要包括四个方面：（1）用限制性内切酶将DNA切割成特定的片段；（2）用核酸杂交钓出特定的DNA或RNA顺序；（3）DNA克隆或扩增；（4）DNA顺序测定，再根据

三联体密码推断蛋白质的氨基酸顺序，其速度远超过经典的蛋白质化学方法。换言之，重组DNA技术可以将特定的基因从基因库中分离出来，进行增扩和表达，把蛋白质语言转变成核酸语言。利用这一技术操纵和组装DNA片段，并分离出单个基因，进行诱发突变，再将其重新导入完整的机体中。例如：把需要得到的且又要长久保留的性状导入植物品系中，以获得新型优良品种。也可以用被克隆的基因为探针，以改变人类家族遗传性染色体缺陷疾病。在杂交试验中，利用放射性标记探针确定mRNA群体和追踪它在胚胎发育中的途径。在细菌或动物细胞系里，克隆基因的表达可以产生稀少的动物蛋白等。

分子神经生物学是重组DNA技术和神经科学的结合产物，而神经科学本身仍然是生命科学中最重要的未知领域。人们对自身这个能够认识和改造世界的大脑迷惑不解，不断提出为什么我们能看见所见的一切？神经系统是怎样控制功能的？行为的分子基础是什么？记忆、学习、意识、感情、识别的分子基础又是什么？分子神经生物学所要解决的便是从分子水平上认识脑、神经系统结构和功能的关系。分子神经生物学的研究刚刚开始。根据传统神经生物学的研究，我们能够识别种种大分子，其中许多是神经系统中已确定其功能的神经递质、调质和受体。表1.1中列出了目前已知的大分子。由于在神经元DNA库中，人们应用重组DNA技术发现了新的类别和亚型，因此，表格中的内容不断增加。现代分子神经生物学的大部分工作在于确立表1.1中各种神经功能蛋白的分子结构。通过比较其结构，分门别类，从而弄清相关分子的可能作用，直到了解其完整的氨基酸顺序。

在这个方面，DNA克隆可作为研究神经系统自身分子的工具。一旦某种成分的基因被克隆，那么，分子神经生物学的研究将包括以下部分：

(1) 通过被转录的RNA和将RNA注入爪蟾卵母细胞后的翻译过程，产生出与生物活性成分相关的克隆cDNA。或者将DNA转

表 1.1 神经系统特殊功能蛋白

神经递质和激素受体
离子通道蛋白和相关信息传导成分
脑特定蛋白激酶¹⁴
神经肽调控代谢物前体蛋白
递质合成酶
神经肽作用酶
递质释放器
递质重吸收载体
神经细胞骨架和轴突传递蛋白
特定神经元生长或存活营养因子及其受体
神经元生长相关蛋白
神经细胞生长抑制因子
特定神经胶质生长因子及其受体
神经节和树突形态因子
神经细胞粘连和细胞寻址大分子
神经系统形成素
记忆机理相关蛋白（推测）

染入哺乳动物细胞的表达系统，其产物的生物活性能够被测试。例如，活性物质同特殊放射性配位体结合；用电生理方法（包括膜片钳单通道技术）对受体和离子通道蛋白进行功能性测试或者通过抗体来识别。

（2）转染所有用于编码某种成分的DNA，将其植入永久细胞系中，从而表达出相应的蛋白质。这些细胞系是药理学研究的有效工具，它能指出受体或离子通道类型的特征，也使得药物筛选更为合理。

（3）直接使编码蛋白质的基因发生突变，或者生产编码杂种或嵌合分子的基因。通过这种生物工程技术产生新的蛋白质，用来检验设想的某种功能所需要的蛋白质结构。新蛋白质的功能测试可以

通过配位体位点与放射性标记物的亲和性结合神经肽、阻断通道等试验对蛋白质本身的化学研究进行补充。

(4)识别表达系统。这种表达系统为与第二信使系统相关的信息传导所需,也是脑蛋白激酶调节作用所需要的。

(5)确定结构基因的组成,外显子与功能区域的关系和在非翻译顺序中寻找普通神经元的成分或特殊类型的成分。

(6)切除、增添、移位细胞中移植的DNA序列中的前体顺序或调节顺序,以确定调控基因表达的信号。这种方法将对了解某种特定类型或特定位置神经元的基因选择性表达,有十分重要的意义。

(7)对于每个功能单位和在家族系统中的每种神经多肽利用DNA探针,以原位杂交方法绘制出这种多肽在脑中的空间分布,确定它们各自mRNA的表达时间和被控制的调节因子。

(8)根据mRNA或抗原的分布,识别中枢神经系统(CNS)一定发育阶段出现的蛋白质。这种蛋白质作用于形态表达或神经元的其它特征,以及胶质细胞的识别。

(9)蛋白质识别。这种蛋白在简单行为、学习和记忆的实验中,特别是在较简单的神经系统中,经历了合成或共价结合等不同方式的变更。

(10)在人类家族中或动物的筛选方面,利用DNA探针,区分决定神经或精神障碍性遗传方式的基因或血统的制造者。

以上方面指出了分子克隆的应用领域和途径。

离子通道是当代生物科学普遍关心的一个重要课题。离子通道具有选择性和门控性,使细胞维持一定的膜电位,并诱发可兴奋细胞产生动作电位,在肌肉中实现兴奋-收缩偶联;在非兴奋细胞中,调节各种细胞对激素的分泌过程;控制生殖细胞的生殖过程;调节免疫细胞的运动和吞噬;在信息传递中可改变细胞内 Ca^{2+} 的浓度,作为第二信使调节多种由 Ca^{2+} 活化的生化过程,由此可见对通道进行研究的重要意义。而离子通道研究的热点又在于用重组DNA

及单克隆抗体等技术研究通道蛋白的分子结构和门控机理。因此本书在有关章节中介绍了钠通道、L型钙通道、A钾通道等的分子结构及有关理论。如：电压门控钠通道活化期有4~6个门控电荷从膜一侧运动到另一侧，这就要求通道蛋白分子结构中具有带电荷的残基，在膜电场变化时发生位移，从而引起孔道的构象变化。1984年Narahashie测出这种构象变化为 10^{-4} 秒量级，在能测出离子电流之前，构象变化已基本完成。这种变化与 S_4 片段正电荷残基的分布有关，即每3个残基中就有一个正电荷残基。对此，Catteratt、Kayano、Guy等提出了“滑动螺旋”或“螺旋旋转”模型。认为 S_4 片段以 α 螺旋垂直跨膜，其精氨酸残基围绕螺旋轴排列，并与周围螺旋中负电荷残基形成离子对。膜去极化时，电场导致 S_4 片段沿 α 螺旋向外滑动。

在“果蝇分子神经生物学”一章中介绍了果蝇不仅是研究遗传学的好材料，而且还是研究离子通道分子结构和功能的好材料。由于果蝇生活周期短（7天），易于饲养，变种容易获得和成活，基因图谱已确认等优点，故果蝇已被广泛地用于分子神经生物学、兴奋膜分子机理和药物毒理学研究。对果蝇进行的研究内容大多都是神经科学的前沿课题。对于某些特定的问题和机制分析得比较清楚，使人们获得利用高等动物实验中无法获得的结果和知识，意义是明显的。例如：由于钾通道种类繁多且又缺乏高亲和的配体，因此，分离、纯化的研究进展缓慢。近年来有人用遗传学和分子克隆的方法进行研究，发现果蝇突变型Shaker KS 133在乙醚麻醉下全身摇晃，电生理分析证明其神经和肌肉细胞都缺乏快钾离子通道(I_A)。这种果蝇唾液腺染色体特定位置上有缺损，而染色体缺损在临近位置上的果蝇无摇晃现象， I_A 也完整。因此证明快钾通道蛋白的结构基因在此位置上，目前已对该基因进行了克隆，并确定了该通道蛋白氨基酸排列顺序。这种方法运用于其它动物细胞，也得到了相同的实验结果，因此用果蝇进行分子生物学的研究具有普遍意义。

表1.2列出了已知的4类神经递质和受体。受体主要有两大功

表 1.2 已知的神经递质和受体

1 类：配基门控性离子通道

乙酰胆碱（烟碱样）

ATP

GABA_A

甘氨酸

谷氨酸：海人草酸盐型

慢君子氨酸盐型

NMDA型

5-HT₃

2 类：G-蛋白（双重）受体（1 个亚单位，1 个膜蛋白）

乙酰胆碱（毒蕈碱样）

腺苷

α -肾上腺素

β -肾上腺素

多巴胺

组氨酸

5-HT₁和5-HT₂

多种神经肽

3 类：生长因子神经肽受体

(a) 神经系统中生长因子活性受体（例如，神经生长因子）

(b) 表现神经元功能和其它功能的某些肽的受体。这些受体

（从非神经元部位得知）具有与(a)类型相同的结构，即单一膜区域。例如脑胰岛素受体。

4 类：鸟苷酸环化酶多肽受体

例如，心房促钠排泄肽（ANP）受体

缩写，GABA， γ -氨基丁酸；5-HT，5-羟色胺；

NMDA，N-甲基-D-天冬氨酸盐。

这里仅指出了脊椎动物具有的类型。某些谷氨酸受体也能激活第二信使系统。

能：识别并结合特殊的递质分子（配体）；把递质-受体复合体中的信息加以变换，以改变细胞的生理状态或生化反应进程。已知递质受体都是蛋白质，镶嵌在细胞膜内，其配体结合位点露在膜外。受体通道分为两个大家族：

（1）烟碱样乙酰胆碱受体（nAChR）、GABA_A受体和甘氨酸受体等，均由亚单位组成，且其亚单位的大小和氨基酸顺序有一定相似性，每个亚单位有4个疏水 α 螺旋结构穿过膜。AChR由5个亚单位构成（ $\alpha_2\beta\gamma\delta$ ）。利用非洲爪蟾卵母细胞的表达系统可以研究AChR的通道特性，也可研究各亚单位，甚至亚单位中某些片段在门控中的作用。电鳗电器官AChR和小牛肌AChR之间门控特性的差别，主要由 δ 亚单位决定；而小牛肌成年型AChR和胚胎AChR之间的差别，则由 ϵ 亚单位决定。

GABA受体由两种4个（ $\alpha_2\beta_2$ ）亚单位组成，在GABA_A亚型上存在着两个或多个配基的识别位点即苯二氮䓬和GABA位点，两个位点之间可以发生变构性的相互作用。如果两个识别位点中的一个存在着两种结构（过渡）状态，在同一受体上的其它位点亦可能发生其它的过渡性变化。现在已知GABA受体调节Cl⁻通道的 α 和 β 亚单位存在着多种分子形式，那么可以推测GABA_A也存在着多种分子形式。这样就有可能找到作用于GABA_A受体不同亚型的变构调节中心的正性和负性变构调节物。这些药物有可能特异性地解除不同类型的焦虑症状（如恐惧、惊慌、焦虑等），并用以确定是否由于特定的GABA_A受体亚单位发生了遗传变异，从而导致特定的情绪异常。因此，有学者认为以递质的识别位点作为药物对受体进行非变构性阻断的靶子，来治疗神经精神病症状的时代已经过去了，更多的是对突触功能调节的自然机制即受体变构调节中心起作用的分子机制加以考虑，这将是研制治疗神经精神病新药物的一个途径。

（2）毒蕈碱型乙酰胆碱受体（mAChR）、 α 、 β 肾上腺素受体（ α AR、 β AR）和视紫红质（Rh）等，虽然其生理功能各异，

但相似处颇多：都是一个肽链，其氨基酸顺序有20~30%相同，有7个 α 螺旋跨膜；被激活后先活化G蛋白，通过第二信使使离子通道开闭。多巴胺、去甲肾上腺素、5-HT和组胺受体也以这种方式起作用。

Rh由视黄醛和视蛋白两部分组成。光量子使视黄醛分子变构，从而使Rh受到激发(Rh*)，后者与转换蛋白(一种G蛋白)结合并使之活化。G蛋白激活磷酸二酯酶，迅速破坏cGMP分子。一个Rh*分子可活化许多G蛋白分子，最终可使10万个cGMP分子分解。这种放大作用就是视杆细胞对光敏感的原因。在黑暗中，cGMP与细胞膜钠通道结合使之开启；光照时，cGMP被分解，通道关闭，使视杆细胞产生超极化。

80年代以来，认为G蛋白是受体和效应酶(腺苷酸环化酶、磷酸酯酶)偶联的功能蛋白，具有调节作用的观点已被普遍接受。磷酸化的受体使G蛋白磷酸化，并激活效应酶而产生细胞的第二信使，因此G蛋白是信息传导的枢纽。G蛋白种类很多，有起激活作用的Gs，也有起抑制作用的Gi，其分子结构也已基本弄清。两种G蛋白十分相似，即由 α 亚单位和 β 、 γ 二聚体组成。G蛋白不仅和受体偶联(通过第一信使)影响细胞内第二信使水平，如： Ca^{2+} 、环腺苷酸(cAMP)、IP3、肌醇三磷酸、甘油二酯等，而且影响细胞膜电位，而膜电位本身又是细胞功能的潜在调节因子。下图表示依赖G蛋白的信号传输过程。

部 位	输 入	传 导	输 出
	细胞外环境	质 膜	细胞内环境或质膜
功能成分	G蛋白偶联受体 G蛋白调节效应器 第一信使$\cdots \rightarrow$ R(受体)$\cdots \rightarrow$ G蛋白$\cdots \rightarrow$ E(酶)$\rightarrow$ 第二信使 膜电位		

G蛋白不仅涉及神经递质、激素，也涉及离子通道和光，是当

前研究的重点。在我国国家自然科学基金委员会生命科学部的生物物理学和神经科学的发展战略研究中，均将“神经递质、受体、离子通道研究”作为中、短期重点加强和支持的课题。我们正在揭开大脑之谜，在漫长的探索中一定能回答莎士比亚的议题：“告诉我，想象在哪里？在心里，还是在大脑！”。