

# Endophilin-A1 的功能和作用机制及与认知功能的关系

罗峥 综述 徐晓云 审校

同济大学附属上海市东方医院神经内科,上海市 200120

**摘要:**最近国内外研究提示 endophilin-A1 在多种认知功能损害性疾病,如阿尔茨海默病(AD)和糖尿病认知功能损害中异常表达。Endophilin-A1 是一种广泛表达于脑的突触前神经终末的胞浆蛋白,在突触囊泡的内吞回收,尤其是网格蛋白介导的囊泡内吞(CMVE)过程中起重要作用。研究认为其本身可能调节 A $\beta$  的生成,也可能通过 CMVE 来影响脑内 A $\beta$  的生成与释放,提示其与 AD 的发病有关。此外, endophilin-A1 在糖尿病认知功能损害的大鼠脑内表达下调。本文就近年来 endophilin-A1 的研究进展作一综述。

**关键词:** Endophilin-A1; 突触囊泡; 网格蛋白介导的内吞; 认知损害

众所周知,为了保证神经冲动信号持续、有效地传递,负责递质转运的囊泡需快速地回收至突触膜,等待释放,将突触前的电信号转为化学信号传到突触后膜。递质回收实质是一种细胞内吞作用,神经细胞自有一套特殊而有效的突触复合物装置来完成这一囊泡回收过程。网格蛋白介导的囊泡内吞(clathrin-mediated vesicle endocytosis, CMVE)主要在突触前复合物中参与突触囊泡的回收,这也是海马神经元突触囊泡回收最主要的机制<sup>[1-3]</sup>。Endophilin-A1 作为突触囊泡内吞回收蛋白家族中的一员,最主要的功能是参与网格蛋白介导的囊泡内吞,因其作用机制复杂,目前尚未明确。最新研究提示 endophilin-A1 的异常表达与多种认知功能损害性疾病,如阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD),精神发育迟滞(mental retardation, MR)及糖尿病认知功能损害等有关,提示认知功能损害疾病可能存在新的发病机制。

## 1 Endophilin-A1 概述

### 1.1 家族成员

Endophilin 家族分为 A 和 B 亚家族,其中 A 亚家族中有 3 个成员:A1、A2、A3; B 亚家族有 2 个:B1、B2。Endophilin-A1 是 endophilin 家族 A 亚家族中的一员,为含有 SH3 (Src homology 3) 结构域的胞浆蛋白,具有高度保守的种属性,又命名为 EEN2B1、SH3GL2、SH3p4、endophilin I 和 EA1。它选择性地高表达于包括枕叶、额叶、颞叶皮质和小脑皮质的神经元,而在胼胝体、下丘脑盖和脊髓仪

有很低的表达<sup>[4]</sup>,位于突触前神经末梢。此外,还表达于睾丸组织。

### 1.2 基本结构

Endophilin-A1 与其他 endophilin 家族成员具有一些共同的结构特点,即羧基(C)端含有一个 SH3 结构域,与已知接头蛋白(如 Grb2、Drk、Sem-5 等)的 SH3 结构域同源性达 70%,能与富含脯氨酸结构域(proline-rich domains, PRD)的蛋白质结合;氨基(N)端含有一个 BAR (Bin-Amphiphysin-Rvs) 结构域,由含有 21 个氨基酸的两性  $\alpha$  螺旋和卷曲样卷曲(coiled-coil, C-C)结构组成,中央为一段短的铰链区结构;其中 N 端结构具有溶血磷脂酸脂酰基转移酶(lysophosphatidic acid acyltransferase, LPAAT)活性,通过与 LPA 和 PA 结合起作用。大鼠 endophilin-A1,是由 Sh3gl2 基因编码的含有 352 个氨基酸、分子量约为 40 kDa 的胞浆蛋白(UniProt No. O35179)。氨基酸 290-349 为 SH3 区,18-249 为 BAR 区,60-87 为 C-C 区。通过其 C-C 结构区相互作用,单个分子的内吞蛋白-A1 形成二聚体,并以这种形式存在和发挥作用<sup>[5]</sup>,见表 1。

## 2 Endophilin-A1 的功能及作用机制

### 2.1 Endophilin-A1 与网格蛋白介导的囊泡内吞(CMVE)及主要作用机制

网格蛋白介导的囊泡内吞是神经细胞,尤其是海马神经元突触囊泡内吞最常见的方式<sup>[1-3]</sup>。Endophilin-A1 作为 CMVE 的辅助因子之一,通过与 dynamin-1 和 synaptojanin 这两个同样在 CMVE 中发

收稿日期:2011-05-07;修回日期:2011-09-08

作者简介:罗峥(1984-),女,硕士研究生。

通信作者:徐晓云,教授,硕士生导师,主要从事糖尿病认知功能损害和痴呆的临床与基础研究。Email:xxyl95211@163.com。

挥重要作用的蛋白结合,参与突触囊泡的内陷(in-vagination)、剪切(fission/scission),从而调节囊泡内吞回收。Dynamin-1,分子量约为100 kDa的GTP酶(GTPase),与endophilin I相对应地在神经元表达,与endophilin-A1一起聚集在网格蛋白包被的小窝(clathrin-coated pits)颈部形成环状,促使新形成的囊泡与膜断离并释放<sup>[6]</sup>。Synaptojanin是一种位

于突触前神经终末的多磷酸肌醇磷酸酶,通过对磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>)的脱磷酸作用介导囊泡脱网格蛋白包被<sup>[7]</sup>。同时,作为BAR蛋白超家族的一员,endophilin-A1选择性地增大脂质双层的曲度,并与带负电荷的脂质结合而发挥膜相关的骨架功能<sup>[8]</sup>。

表1 endophilin-A1的主要功能结构域/区

类别	AA 起始位置	长度(AA)	功能描述	参考文献
Endophilin-A1	1-352	352	参与突触囊泡内吞回收过程	[5]
SH3 结构域	290-349	60	与含PRD结构域的蛋白作用,参与囊泡回收	[7]
BAR 结构域	18-249	232	识别并改变膜曲率,形成囊泡	[11]
LPAAT 活性区	1-125	125	结合脂质体并使之形成管状	[9]
两性α螺旋区	1-21	21	辅助脂质体结合、芽管形成	[10]
C-C 区	60-87	28	二聚体化	[5]

早期通过谷胱甘肽S-转移酶(GST)融合蛋白、抗体显微注射、肽封闭等方法对SH3结构域的干扰研究,认为endophilin-A1主要通过其C端SH3结构域与其他一系列参与囊泡回收蛋白的PRD结构域结合发挥作用。同时,研究推测endophilin-A1通过脂质变形使外凸的正向膜曲率转为内陷的负向膜曲率,促使囊泡初步形成<sup>[9]</sup>;endophilin-A1不依赖其溶血磷脂酸脂酰基转移酶活性,而通过N端BAR结构域直接与脂质双层结合并内陷形成细窄的芽管(tubules)<sup>[10]</sup>,进一步提示其在质膜变形(membrane deformation)与囊泡出芽(vesicle budding)中的作用。此外,膜插入序列两性α螺旋可能协同N端BAR结构域识别并改变质膜曲率,并将一系列内吞相关的结合分子(如dynamin-1)募集到高曲率膜部,促进突触前囊泡颈的形成<sup>[8, 11, 12]</sup>。

近来对endophilin-A1 BAR结构域的研究进一步证实了其在网格蛋白介导的囊泡内吞中的作用。Fredrik等<sup>[13]</sup>将完整抗体或靶向BAR结构域的Fab片段显微注射到七鳃鳗的巨大突触,观察到生理刺激下的突触囊泡的减少,同时在活性区周围可见大量网格蛋白包被的浅凹聚集。在dynamin缺如的小鼠成纤维细胞,网格蛋白包被的小凹显现出由endophilin覆盖的长而窄的颈部,提示endophilin的BAR结构域促使囊泡颈部缩窄作用在dynamin募集之前<sup>[14]</sup>。随后,Bai等<sup>[15]</sup>通过endophilin BAR结构域基因突变的线虫模型研究,结果提示,endophilin SH3结构域固然能调节其内吞活性,但BAR结构

域及其膜弯曲活性对突触囊泡内吞的作用更为关键,同时提出其可能作用于dynamin介导的囊泡剪切前的质膜内陷,也可能是剪切后加速囊泡去包被。Mizuno小组<sup>[16]</sup>采用冷冻电镜(cryoEM)及三维重建技术从微观结构作用模式上充分肯定了endophilin,尤其是BAR结构域与脂质的相互作用是内吞膜动力学改变的基础。

综上所述,endophilin-A1在CMVE中的作用已得到证实。已有研究认为endophilin-A1的SH3和BAR结构域共同参与并在此过程中互相影响,其作用机制复杂,随着对BAR结构域的结构和功能的研究逐步深入,其识别并诱导质膜曲率改变、质膜内陷及相关分子募集等功能在CMVE中的作用亦更显重要。

2.2 Endophilin-A1 的其他功能

Endophilin-A1除了主要在突触囊泡回收过程中起作用,还可以通过调节c-jun N末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)活性,调控丝裂原活化的蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导途径。JNK-MAPK途径是一系列与细胞增殖、分化、凋亡相关的复合途径。Endophilin-A1对JNK的调节作用提示其可能参与一些凋亡相关的疾病和退行性疾病的发病<sup>[5]</sup>。

3 Endophilin-A1 与认知功能损害

研究显示Endophilin-A1的基因突变、表达异常或作用阻断等通过不同程度地损害CMVE而导致突触活性区可释放囊泡减少,神经电生理研究显示

神经冲动的传导障碍,进而表现为神经功能受损。目前,一些研究提示 endophilin-A1 可能与认知功能损害有关,主要集中在阿尔茨海默病,精神发育迟滞和糖尿病认知功能损害。

### 3.1 Endophilin-A1 与阿尔茨海默病 (AD)

$\beta$ -淀粉样蛋白 ( $\beta$ -Amyloid,  $A\beta$ ) 是 AD 病理学特征物老年斑 (senile plaques, SPs) 的主要成分之一,其在神经元细胞外的沉积是 AD 最重要的病因, endophilin-A1 及其参与的网格蛋白介导的内吞与  $A\beta$  的产生密切相关<sup>[17]</sup>。Schöbel 等<sup>[18]</sup> 和 Lichtenthaler 等<sup>[19]</sup> 利用表达克隆 (expression cloning) 筛查发现 endophilin-A1 和 endophilin-A3 是极强地刺激淀粉样前体蛋白 (amyloid precursor protein, APP) 脱落 (shedding) 的激动剂,通过减少 APP 的内吞而增加细胞表面的 APP。我们知道, APP 经  $\alpha$ -分泌酶 ( $\alpha$ -secretase) 裂解的产物不具有神经元毒性;而进入内吞小体内的 APP 由  $\beta$ -分泌酶 ( $\beta$ -secretase) 裂解产生神经元毒性的  $A\beta$ 。抑制网格蛋白介导的囊泡内吞能降低脑间质液 (interstitial fluid, ISF) 的  $A\beta$  水平,而提高突触活性的刺激则促进 APP 内吞,脑间质液  $A\beta$  水平增高<sup>[20]</sup>。由此可见, endophilin-A1 本身可能调节  $A\beta$  的生成,也可能通过网格蛋白介导的囊泡内吞来影响脑内  $A\beta$  的生成与释放,提示其与 AD 发病的复杂联系,可能成为 AD 治疗的新靶点。

最近, Ren 等<sup>[21]</sup> 采用 Western blot 和免疫组织化学分析发现, AD 病人颞叶皮质中 endophilin-I 表达较正常对照者增加。此研究用  $A\beta$  和  $A\beta$  结合的酒精脱氢酶 (amyloid-b binding alcohol dehydrogenase, ABAD) 共同处理 AD 小鼠模型,发现其颞叶皮质及海马区的 endophilin-I 表达上调。我们知道,  $A\beta$ /ABAD 相互作用会增加神经元的应激,并导致学习和记忆能力受损,但其促进 endophilin-I 表达的机制尚不清楚。他们在转染的小鼠原代培养皮质神经元中发现, endophilin-I 的表达增强了生发中心激酶样激酶 (germinal center kinase-like kinase, GCK) 活性进而激活 JNK,导致神经元的死亡。这一研究尚不能确定 endophilin-I 表达上调是否为 AD 发病中的特异性反应,或仅仅是一种普遍的应激反应,因而 endophilin I 是否在退行性认知疾病中扮演重要角色仍待进一步研究。

### 3.2 Endophilin-A1 与精神发育迟滞 (MR)

Akiko 等<sup>[22]</sup> 发现突触前 oligophrenin (OPHN, Rho

基因连锁的智能发育迟滞蛋白,编码 Rho-GTP 酶激活蛋白,对突触囊泡的有效内吞有重要作用) 通过其 PRD 结构域与 endophilin-A1 的 SH3 结构域相互作用而影响突触转运功能,并由此推测 SV 内吞功能障碍可能是 OPHN 连锁的精神发育迟滞 (OPHN1-linked mental retardation, OLMR) 的发病机制之一。

### 3.3 Endophilin-A1 与糖尿病认知功能损害

国内金花等<sup>[23]</sup> 在对有认知功能损害的早期糖尿病大鼠海马组织蛋白质组学的研究中发现 endophilin-A1 表达缺失,提示突触囊泡的内吞回收蛋白表达缺陷可能参与了糖尿病认知功能损害的发病。这一发现为探讨糖尿病认知功能损害的发病机制提供了新的思路,值得进一步的实验证实与机制研究。

## 4 总结

Endophilin-A1 作为网格蛋白介导的囊泡内吞的重要辅助因子,其 BAR 结构域的功能十分重要,但具体作用环节与方式仍有待进一步的研究来明确。人类的认知功能损害包括 AD、糖尿病认知功能损害等一大类疾病,其发病机制复杂不明。Endophilin-A1 在这些疾病中的表达异常已初见报道,提示其可能成为探讨认知功能损害发病机制的新的研究方向。

## 参 考 文 献

- [1] Björn G, Benjamin O, Stephen JR, et al. Clathrin-mediated endocytosis is the dominant mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *Neuron*, 2006, 51 (6): 773-786.
- [2] Björn G, Benjamin O, Stephen JR, et al. Clathrin-mediated endocytosis: the physiological mechanism of vesicle retrieval at hippocampal synapses. *J Physiol*, 2007, 585 (3): 681-686.
- [3] Stephen JR, Leon L. Clathrin-Mediated Endocytosis at the Synaptic Terminal: Bridging the Gap Between Physiology and Molecules. *Traffic*, 2010, 11 (12): 1489-1497.
- [4] So CW, Sham MH, Chew SL, et al. Expression and protein-binding studies of the EEN gene family, new interacting partners for dynamin, synaptojanin and huntingtin proteins. *J Bio*, 2000, 348 (Pt 2): 447-458.
- [5] Reutens AT, Begley CG. Endophilin-1: a multifunction protein. *Int J Biochem Cell Biol*, 2002, 34 (10): 1173-1177.
- [6] Mettlen M, Pucadyil T, Ramachandran R, et al. Dissecting

- dynamin's role in clathrin-mediated endocytosis. *Biochem Soc Trans*, 2009, 37 ( Pt 5 ) : 1022-1026.
- [ 7 ] Liu, Y, Bankaitis VA. Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Prog Lipid Res*, 2010, 49 ( 3 ) : 201-217.
- [ 8 ] Gallop JL, Jao CC, Kent HM, et al. Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J*, 2006, 25 ( 12 ) : 2898-2910.
- [ 9 ] Schmidt A, Wolde M, Thiele C, et al. Endophilin-1 mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*, 1999, 401 ( 6749 ) : 133-141.
- [ 10 ] Farsad K, Ringstad N, De Camilli P, et al. Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *J Cell Biol*, 2001, 155 ( 2 ) : 193-200.
- [ 11 ] Weissenhorn W. Crystal structure of the endophilin-A1 BAR domain. *J Mol Biol*, 2005, 351 ( 3 ) : 653-661.
- [ 12 ] Masuda M, Takeda S, Sone M, et al. Endophilin BAR domain drives membrane curvature by two newly identified structure-based mechanisms. *EMBO J*, 2006, 25 ( 12 ) : 2889-2897.
- [ 13 ] Andersson F, Low P, Brodin L. Selective perturbation of the BAR domain of endophilin impairs synaptic vesicle endocytosis. *Synapse*, 2010, 64 ( 7 ) : 556-560.
- [ 14 ] Ferguson SM, Raimondi A, Paradise S, et al. Coordinated actions of actin and BAR proteins upstream of dynamin at endocytic clathrin-coated pits. *Dev Cell*, 2009, 17 ( 6 ) : 811-822.
- [ 15 ] Bai JH, Hu ZT, Dittman JS, et al. Endophilin functions as a membrane-bending molecule and is delivered to endocytic zones by exocytosis. *Cell*, 2010, 143 ( 3 ) : 430-441.
- [ 16 ] Mizuno N, Jao CC, Langen R, et al. Multiple modes of endophilin-mediated conversion of lipid vesicles into coated tubes: implications for synaptic endocytosis. *J Biol Chem*, 2010, 285 ( 30 ) : 23351-23358.
- [ 17 ] Wu FB, Yao PJ. Clathrin-mediated endocytosis and Alzheimer's disease: An update. *Ageing Res Rev*, 2009, 8 ( 3 ) : 147-149.
- [ 18 ] Schöbel S, Neumann S, Seed B, et al. Expression cloning screen for modifiers of amyloid precursor protein shedding. *Int J Devl Neuroscience*, 2006, 24 ( 2-3 ) : 141-148.
- [ 19 ] Lichtenthaler SF. Ectodomain shedding of the amyloid precursor protein: cellular control mechanisms and novel modifiers. *Neurodegener Dis*, 2006, 3 ( 4-5 ) : 262-269.
- [ 20 ] Cirrito JR, Kang JE, Lee J, et al. Endocytosis is required for synaptic activity-dependent release of Amyloid- $\beta$  in vivo. *Neuron*, 2008, 58 ( 1 ) : 42-51.
- [ 21 ] Ren YM, Xu HW, Yan SD, et al. Endophilin I expression is increased in the brains of Alzheimer Disease patients. *J Biol Chem*, 2008, 283 ( 9 ) : 5685-5691.
- [ 22 ] Akiko NK, Kasri NN, Newey SE, et al. The Rho-linked mental retardation protein OPHN1 controls synaptic vesicle endocytosis via endophilin A1. *Curr Biol*, 2009, 19 ( 13 ) : 1133-1139.
- [ 23 ] 金花,徐晓云,徐海元,等. 糖尿病大鼠海马超微结构及蛋白质组学研究. *中华糖尿病杂志*, 2010, 2 ( 3 ) : 205-209.

## 丘脑病变及其临床特征

耿静 综述 苏志强 审校

哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科,黑龙江省哈尔滨市 150001

**摘要:**丘脑是神经系统中重要的灰质团块,是大部分传入性神经通路通向大脑皮质的换元站,本文从丘脑的解剖功能、血液供应、丘脑发生病变的各类原因、临床表现及影像学改变予以综述,以便充分认识丘脑病变及其临床特征。

**关键词:**丘脑病变;解剖;CT;MRI;临床特征

丘脑 ( thalamus ) 是对称分布于第三脑室两侧的卵圆形灰质复合体,大小直径约 3 cm × 1.5 cm。

收稿日期:2011-05-07;修回日期:2011-09-08

作者简介:耿静(1986-),女,住院医师,在读硕士研究生,主要从事脑血管病的研究。

通讯作者:苏志强(1965-),男,教授,主任医师,博士、硕士生导师,从事脑血管病、癫痫的研究。E-mail:suzhiqiang2004@126.com。