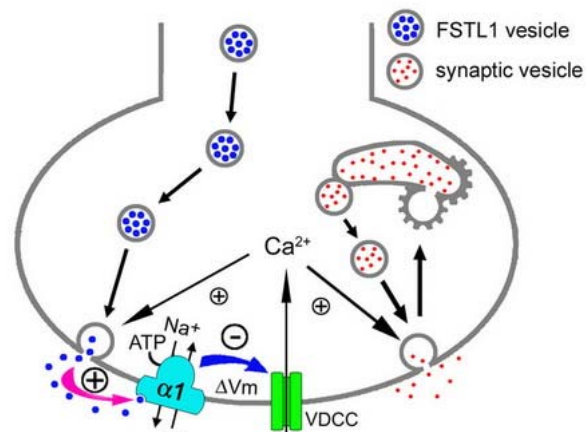


内源性 FSTL1 通过激活钠-钾泵引起的膜超极化调节痛觉信息传递

突触是神经细胞间信息传递的关键部位,信号从一个神经元传递到另一个神经元需要通过突触这一“关卡”。神经元的膜电位和兴奋性对于调节其功能起十分重要的作用。神经元消耗能量,通过钠-钾泵(Na^+ , K^+ -ATPase, NKA)在细胞浆中浓集钾离子并排出细胞内的钠离子,从而维持细胞膜内外的钠、钾离子浓度梯度,调控神经元的膜电位和兴奋性。既往研究证实 ATP、钠和钾离子可以调节钠-钾泵的功能以及一些神经递质、激素通过它们的受体间接地调节钠-钾泵活性,还发现哇巴因(ouabain)以及地高辛可以直接抑制钠-钾泵活性;然而,人体内是否存在钠-钾泵的内源性的激动剂还不清楚。

近日,中科院上海生科院神经所张旭实验室通过对背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)的研究,发现在 DRG 中有一种选择性高表达的蛋白——滤泡素抑制素样蛋白 1(Follistatin-like 1, FSTL1)能通过清亮小泡运输至脊髓内的传入神经末端释放,并直接与传入神经末端突触前膜上的钠-钾泵 $\alpha 1$ 亚基相结合,增强钠-钾泵活性,使细胞膜超极化,从而对传入神经末端的兴奋性突触传递起抑制作用。这一研究发现了 FSTL1 作为第一个被人们认识到的内源性钠-钾泵激动剂在调控突触传递方面的重要作用。

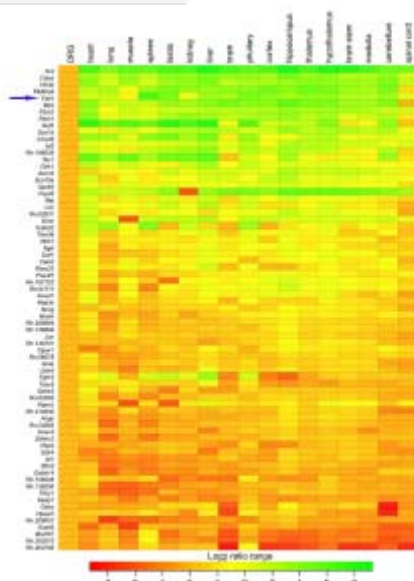


FSTL1-钠钾泵系统调节突触传递的模式图:膜去极化导致突触囊泡和 FSTL1 囊泡释放,释放的 FSTL1 激活传入神经末端突触前膜上的钠钾泵的 $\alpha 1$ 亚基,使细胞膜超极化,从而对传入神经末端的兴奋性突触传递起抑制性作用。

该研究 DNA 微阵列实验由生物芯片上海国家工程研究中心(www.ebioservice.com)合作完成。

研究者以背根神经节(DRG)为研究对象。为了寻找在 DRG 中发挥特异功能的分子,研究者利用两大数据库(Mouse GeneAtlas database 和 NCBI)找到了 71 个可能在 DRG 中高表达但是在其他组织中低表达的基因。与生物芯片上海国家工程研究中心合作自制点样芯片,检测这 71 种基因在不同组织中的表达丰度。芯片结果显示 FSTL1 是 DRG 表达丰度最高的分子之一。随后,研究者用 Northern blotting 和 Western blotting 的方法分别检测 FSTL1 的 mRNA 和蛋白表达水平,结果与芯片结果一致。FSTL1 在 DRG 表达量较高,但在别的组织表达量较低。

对脊髓背角进行蔗糖密度梯度离心实验,取相同体积的不同比重组份做 Western blotting,结果显示 FSTL1 主要存在于清亮小泡中。体外培养大鼠 DRG 神



芯片结果显示 FSTL1 是 DRG 表达丰度最高的分子之一。

经元检测培养基中 FSTL1 的含量，结果显示在没有刺激的情况下，FSTL1 能缓慢自发放，而 K^+ 离子诱导的去极化也能导致 FSTL1 的释放。而“whole-cell recording”实验，纯化的 FSTL1 重组蛋白作用于脊髓背角，会导致兴奋性突触传导功能的降低。

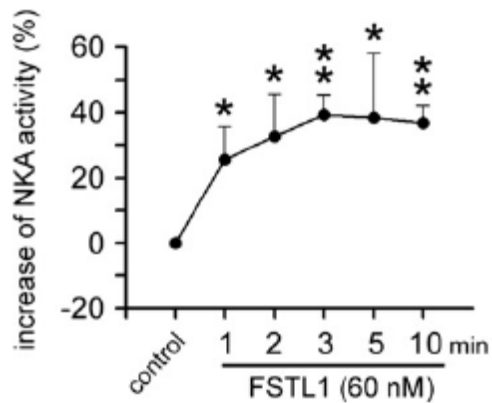
综上所述，研究者发现 FSTL1 是一种在 DRG 高表达，但是在别的组织低表达的蛋白；主要存在于清亮小泡，并且通过清亮小泡传输；能自发放或者通过刺激依赖的方式释放；释放后能抑制兴奋性突触传导。

随后研究者开始寻找 FSTL1 发挥作用的机制，用带有 Myc 标签的重组 FSTL1 蛋白孵育培养的大鼠 DRG 神经元，BS³ 交联与细胞膜上受体结合的 FSTL1，裂解细胞。细胞裂解物做 Western blotting，用抗 Myc 的抗体进行免疫共沉淀 (IP)，在 140 kD 处发现阳性条带。由于 FSTL1 约 40 kD，因此推断 FSTL1 结合了约 100 kD 的蛋白。相同的方法富集交联复合物，用质谱分析发现结合蛋白可能为 NKA 的 $\alpha 1$ 亚基。放免实验和 co-IP 实验证明了与 FSTL1 结合的蛋白正是 NKA 的 $\alpha 1$ 亚基。

由于 FSTL1 能通过清亮小泡分泌到胞外，NKA 是一种跨膜蛋白。因此推断，FSTL1 可能是与 NKA 的胞外部分结合。研究者合成了 NKA $\alpha 1$ 亚基在胞外的肽段，用 BIAcore 分析这些肽段与 FSTL1 的结合能力，发现 M3M4 和 M7M8 肽段与 FSTL1 的结合能力较强。进一步的细胞实验发现 M3M4 和 M7M8 部位有突变的 $\alpha 1$ 亚基与 FSTL1 结合能力较弱，从另一个侧面证明了以下结论：FSTL1 正是通过与 M3M4 和 M7M8 胞外肽段与 NKA $\alpha 1$ 亚基结合。

而在培养的 DRG 神经元中加入 FSTL1 重组蛋白能观察到 NKA 活性的增加，说明 FSTL1 的分泌能激活 NKA。NKA 活性的增加会导致传入神经末端的超极化，从而抑制传入神经末端的兴奋性突触传递。

课题组与南京大学模式动物研究所合作，还从动物水平上对上述现象进行验证。制备了当时国内第一例条件式敲除小鼠，在 DRG 中特异性敲除了 FSTL1 的基因。研究发现 FSTL1 条件式敲除小鼠兴奋性突触传递增强，痛觉敏感性增加。因此，FSTL1 作为第一个被发现的内源性钠-钾泵激动剂，对于保持正常的躯体感觉是必需的，FSTL1 减少则会导致痛觉感受异常。该发现表明内源性钠-钾泵激动剂可以通过影响突触传递，从而对神经系统功能有重要的调控作用。



FSTL1 处理 1min，NKA 蛋白活性显著增加；处理 3min，活性达到顶峰。

原文出处：

Neuron. 2011 Mar 10; 69(5): 974-87.

Follistatin-like 1 Suppresses Sensory Afferent Transmission by Activating Na^+, K^+ -ATPase.

Li KC, Zhang FX, Li CL, Wang F, Yu MY, Zhong YQ, Zhang KH, Lu YJ, Wang Q, Ma XL, Yao JR, Wang JY, Lin LB, Han M, Zhang YQ, Kuner R, Xiao HS, Bao L, Gao X, Zhang X.