α-LTX 及α-LTX^{N4C} 通过不同机制促进胰腺β细胞$[Ca^{2+}]_i$升高

酒亚明[①*] 胡志涛[①*] 刘 杰[①*] 吴政星[①†] 徐 涛[①②†]

(① 华中科技大学生命科学与技术学院, 生物物理与生物化学研究所, 武汉 430074; ② 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家实验室, 北京 100101. * 同等贡献. † 联系人, E-mail: xutao@ibp.ac.cn; ibbwuzx@mail.hust.edu.cn)

摘要 α-LTX 是一种从黑寡妇蜘蛛毒腺中提取的神经毒素, 它通过和受体的结合, 可以有效地触发神经末梢突触前囊泡的释放. α-LTX^{N4C}是一种研究α-LTX 同 CIRL 受体作用的有效工具. 通过对大鼠胰腺β细胞的研究, 发现α-LTX 通过在细胞膜上的穿孔引发外钙的内流使$[Ca^{2+}]_i$升高, 而α-LTX^{N4C}是通过引起胞内钙库 Ca^{2+}的释放导致$[Ca^{2+}]_i$升高, 并且α-LTX^{N4C}的作用依赖于细胞外二价阳离子的存在.

关键词 **α-latrotoxin** **α-LTX^{N4C}** 钙离子

黑寡妇蜘蛛神经毒素α-latrotoxin(α-LTX)是一种从黑寡妇蜘蛛毒腺中提取的惟一作用于脊椎动物的神经毒素, 它通过和细胞膜上特异的高亲和力受体结合, 可以造成大量的神经递质释放[1,2]. 通过长期的研究, 人们已经发现了几种在结构上完全不相同的α-LTX细胞膜表面受体. 最早报道的是Neurexin[3,4], 该受体只有在细胞外Ca^{2+}存在的时候才可以和α-LTX结合. 后来人们又发现α-LTX在没有外Ca^{2+}存在时也可以发挥作用, 这就导致了非钙依赖性受体(calcium independent receptors of α-latro- toxin, CIRL)也称为Latrophilin[5,6]的发现. CIRL是一种有着 7 个跨膜区的蛋白质, 属于G蛋白偶联受体的分泌素/钙调素受体家族[7]. 最近, 人们还发现了一个新的α-LTX受体蛋白酪氨酸磷酸酯酶(PTP_δ), 该受体同毒素的作用也是非钙依赖性的[8]. 但是有研究表明, PTP_δ对α-LTX的功能只是起着次要的作用.

虽然人们很早就认识到在有二价阳离子(Ca^{2+}或Mg^{2+})存在的情况下, α-LTX可以形成二聚体, 然后进一步形成四聚体, 从而在细胞膜上形成对Ca^{2+}通透的孔道[9,10]. 然而, 在触发细胞分泌的机制上, 毒素并不是仅仅通过对Ca^{2+}通透的孔道起作用. 有研究表明, 在没有外Ca^{2+}存在的情况下, α-LTX仍然可以触发细胞分泌. 这也就意味着, 在α-LTX的作用中, 存在着一种非Ca^{2+}依赖的方式[11], 这种结果归于受体介导的信号通路的作用. 有些实验表明, 毒素和CIRL的结合会激活磷脂酶C(phospholipase C, PLC)从而导致IP_3 的生成, 促使Ca^{2+}从胞内钙库中释放出来[12~14]. 因而有人认为在α-LTX的作用中, 细胞内Ca^{2+}的释放起到了一个关键性的作用[14,15], 但是这种理论并不能解释由α-LTX引起的所有现象.

在α-LTX受体介导的信号通路研究中, 由于α-LTX可以在细胞膜上形成穿孔, 外钙内流导致的各种强烈效应往往使信号转导研究受到影响. 突变毒素α-LTX^{N4C}可以很好的解决这个问题, 虽然它与受体的亲合力与野生型相同, 但是它不能在膜上形成穿孔. 在功能上, α-LTX^{N4C}和α-LTX一样, 也可以促发神经递质的释放[12,16], 为对毒素的受体介导的信号通路研究提供了一个很好的材料. 本文针对α-LTX及其突变体α-LTX^{N4C}对β细胞的细胞内钙影响进行了比较研究.

1 材料与方法

(ⅰ) 溶液配制. 参照娄雪林等人[17]的方法配制标准Krebs-Ringer碳酸氢盐缓冲液(KRBB), 无Ca^{2+}, Mg^{2+}的KRBB缓冲液. 细胞培养基为添加有 10%(体积比)的灭活胎牛血清的DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium). 标准细胞外液含(mmol/L): NaCl, 150; KCl, 2.8; $MgCl_2{\cdot}6H_2O$, 2; $CaCl_2{\cdot}2H_2O$, 2.6; 葡萄糖, 3; HEPES, 10. 标准细胞外液去除$CaCl_2$, 加入 1 mmol/L EGTA则得到无Ca^{2+}细胞外液, 在此基础上把外液中的$MgCl_2$ 用NaCl取代, 则得到无Ca^{2+}, Mg^{2+}的细胞外液. 有镧外液则是在标准细胞外液中加入 2 mmol/L $LaCl_3$, 所有外液的pH为 7.4, 渗透压为 310 mOsm. 胎牛血清, BSA, DMEM 为 Gibco 产品; Fura-2/AM为Molecular Probe公司产品, 其他常用试剂均为Sigma公司产品.

(ⅱ) 细胞制备及培养. 分离培养单个原代β细

胞的基本方法参见文献[17]. 将Wistar大鼠的胰腺组织取出, 使用V型胶原酶(Collagenase V)使胰岛散开, 再通过Dispase II 消化出单个的β细胞, 贴壁, 加入培养基, 在 5% CO_2 的恒温培养箱中培养, 实验中选择直径为 12~14 μm的细胞为实验对象.

(iii) $[Ca^{2+}]_i$显微荧光测量. 将培养 2~4 d 的细胞转至相应的细胞外液中, 加入酯化的钙荧光探针 Fura-2/AM 至终浓度 3 μmol/L, 在 37℃下孵育 20 min. 在 Zeiss Axiovert 100 荧光显微镜上配置的 TILL[Ca^{2+}] 测量系统可接收细胞内 fura-2 受 340 和 380 nm 紫外光激发的荧光信号 F340 和 F380. 荧光比率(F340/F380)可反映$[Ca^{2+}]_i$ 的相对变化. 采样频率为 1 Hz, 实验在(30±2)℃下进行.

(iv) 膜电容测量. 采用 EPC-9 膜片钳放大器和 PULSE + LOCK-IN 软件(Heka Electronics Lambrecht, 德国)记录和分析静息时和加α-LTX 处理后的 β 细胞的膜电容变化. 实验中所使用的电极电阻值为 3~5 MΩ, 细胞钳制电位为−70 mV, 给予频率为 1024 Hz 振幅为 10 mV 的正弦波命令电压刺激以记录细胞膜电容的变化, 所采集到的信号用 2.9 kHz 滤波, 采样频率为 15 kHz. 实验所用的电极内液为(mmol/L): CsGlu, 125; HEPES, 40; MgATP, 2; Na_2GTP, 0.3; $MgCl_2{\cdot}6H_2O$, 1; EGTA, 0.3 (pH 7.2, 300 mOsm). 膜电容数据用 IGOR Pro 4.9 (WaveMetrics, Lake Oswego, OR)分析.

(v) 刺激物及其施加. α-LTX购自Alomone Labs (Cat# L-130, Jerusalem, Israel), $\alpha\text{-LTX}^{N4C}$由英国 Yuri Ushkaryov教授(Department of Biochemistry, Imperial College, London, UK)赠送. 在电极拉制器(Narishige, 日本)上拉制出孔径约 5 μm的玻璃微滴管, 以相应的细胞外液将毒素的浓度调至 3 nmol/L后, 充灌到微滴管内. 刺激时, 将此加药微管迅速移至距所测细胞约 10 μm处, 对微管内施加正气压即可将药液吹出, 加完药后, 立即将加药管撤出. 此种近距离的加药可使单个细胞完全处于刺激溶液中[18].

2 结果

2.1 α-LTX 引起$[Ca^{2+}]_i$的升高依赖于细胞外液中的Ca^{2+}

在零钙的外液中, 于 60 s 处给予β细胞 3 nmol/L 的α-LTX 刺激时, 细胞的荧光比值 F340/F380 没有明显变化, 表明细胞$[Ca^{2+}]_i$ 没有明显变化, 2 min 后进行

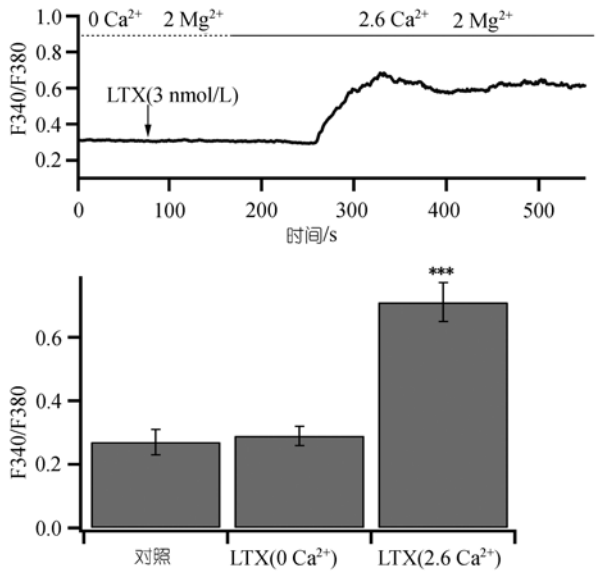


图 1　α-LTX 引起的$[Ca^{2+}]_i$ 升高依赖于外液中的钙离子

在零钙外液中, α-LTX 不能引起$[Ca^{2+}]_i$ 的升高, 但是用正常有钙外液(2.6 mmol/L)置换以后, α-LTX 则可以引起明显的$[Ca^{2+}]_i$升高(n = 5, P < 0.01), ***, P<0.01

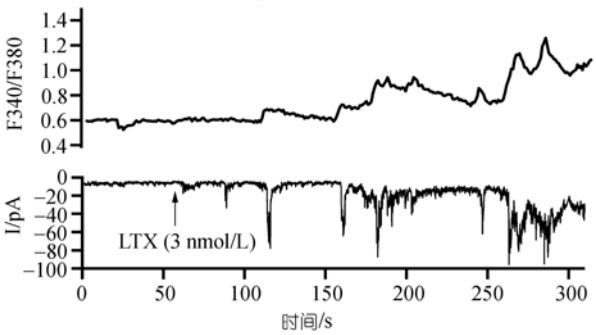


图 2　α-LTX 在细胞膜上形成穿孔导致外钙内流从而引起$[Ca^{2+}]_i$ 升高

在全细胞模式下, 对单个 β 细胞吹加α-LTX, 可以同时记录到打孔所引起的电流及相应的细胞内钙离子浓度(以 F340/F380 比值表示)的变化(n = 4)

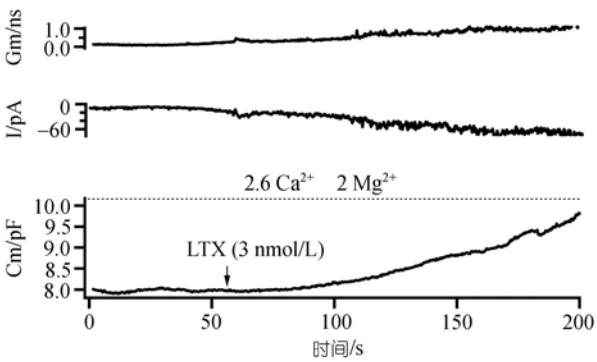


图 3　α-LTX 引起细胞膜电容的增加

α-LTX 在细胞膜上打孔, 引起外钙内流, 从而进一步引发钙离子依赖性的分泌(膜电容的增加). 膜电容的平均增加量为 1.6 ± 0.4 pF (n = 6, P < 0.05). 实验选用全细胞模式, 钳制电压为−70 mV

外液灌流，将外液置换成正常外液，可以看到在大约 90s 以后，随着时间的延长，细胞$[Ca^{2+}]_i$明显升高(图 1). 正常外液中，用全细胞模式(钳制电压为−70 mV，封接电阻为 1~2 GΩ)可以纪录到由α-LTX 引起的内向电流，即打孔现象，并同时纪录到 F340/F380 比率的增加，表明细胞的$[Ca^{2+}]_i$ 在同步升高. 随着时间的延长，打孔增多，F340/F380 比值也增加，两者之间有着很好的一致性(图 2). 这表明$[Ca^{2+}]_i$ 的升高是由于外液中 Ca^{2+}的内流造成的. 用膜片钳膜电容测量方法，我们也观察到α-LTX 引起 β 细胞明显的钙依赖性分泌(膜电容的增加)(图 3).

2.2 α-LTX 引起的$[Ca^{2+}]_i$上升可以被 La^{3+}阻断

为了进一步验证上述实验的结果，我们在正常外液中加入 2 mmol/L $LaCl_3$，再给予 3 nmmol/L 的 α-LTX 刺激. 可以看到$[Ca^{2+}]_i$ 没有明显的变化，但是在同一个细胞中，当将无钙外液置换为正常外液以后，由α-LTX 造成的$[Ca^{2+}]_i$上升可以重新恢复. 这表明α-LTX 引发的$[Ca^{2+}]_i$升高可以被 La^{3+}阻断.

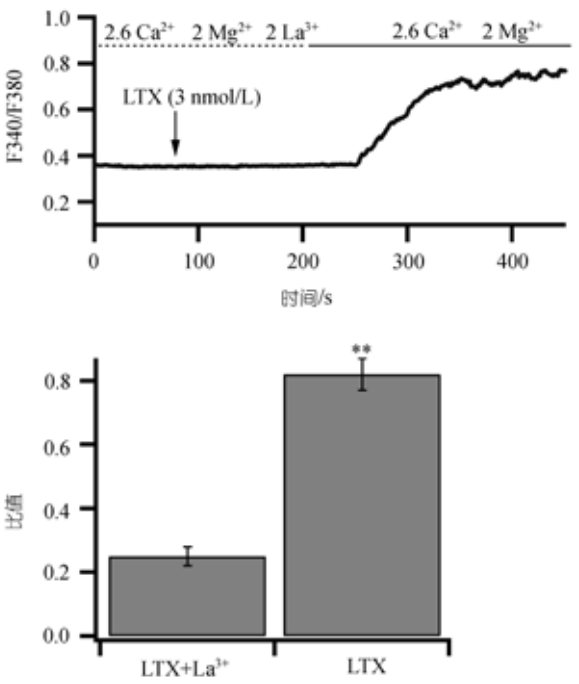


图 4 La^{3+}可以阻断α-LTX 在细胞膜上的穿孔

在含有 La^{3+}(2 mmol/L)的正常外液中，对细胞吹加α-LTX，不能引起$[Ca^{2+}]_i$ 的升高. 但在同一个细胞上，用无 La^{3+}的外液将其置换以后，α-LTX 又可引起明显的$[Ca^{2+}]_i$升高($n = 5$, $P < 0.01$). **, $P<0.01$

2.3 α-LTX^{N4C} 引起的$[Ca^{2+}]_i$上升依赖于二价阳离子

α-LTX^{N4C} 作为一种突变毒素，它在细胞膜上不能形成穿孔，也不会造成 Ca^{2+}的内流，因此它是研究受体介导的信号通路的很好材料. 在正常外液和无 Ca^{2+}外液中，加入 3 nmol/L 的α-LTX^{N4C} 都可以造成$[Ca^{2+}]_i$ 的升高，而且结果有很强的相似性，表明 α-LTX^{N4C} 引发的$[Ca^{2+}]_i$ 升高是由于细胞内钙库 Ca^{2+}的释放造成的. 这种$[Ca^{2+}]_i$ 升高可以较快的恢复到基值水平(图 5(a)和(b)). 为了进一步研究外液中二价阳离子对α-LTX^{N4C} 影响，我们去除外液中的 Ca^{2+}和 Mg^{2+}以后，再给予α-LTX^{N4C} 刺激，$[Ca^{2+}]_i$ 没有明显变化，表明α-LTX^{N4C} 对$[Ca^{2+}]_i$ 的作用需要二价阳离子的存在.

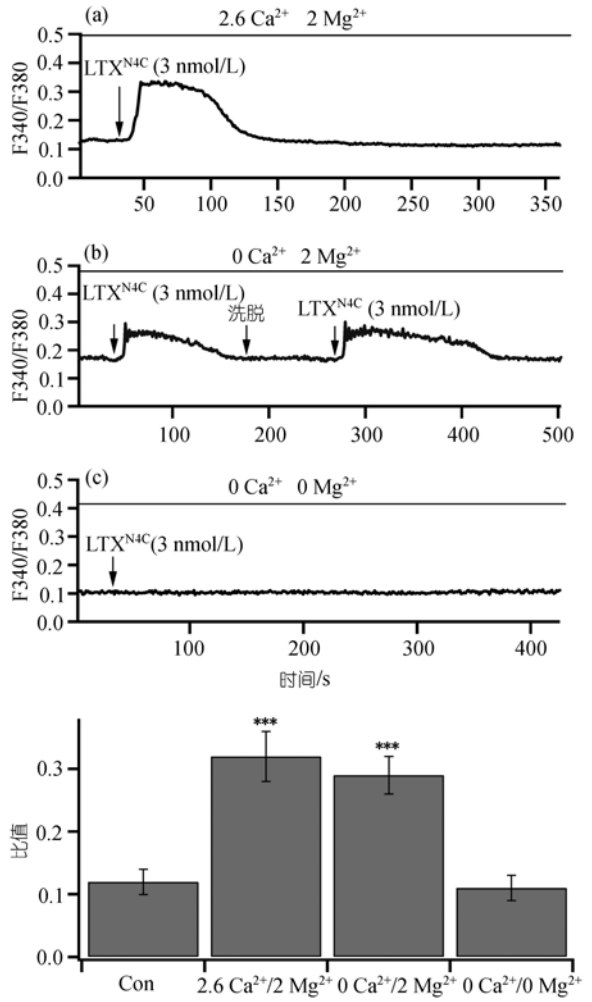


图 5 α-LTX^{N4C} 引起胞内钙库 Ca^{2+}的释放

(a) 在正常外液中，α-LTX^{N4C} 可以引起明显的$[Ca^{2+}]_i$升高，并且在达到峰值之后又可以快速的回落至基值水平($n = 6$, $P < 0.001$). (b) 与 α-LTX 的作用方式不同，α-LTX^{N4C} 可以在零钙外液中引起$[Ca^{2+}]_i$的升高($n = 5$, $P < 0.001$). (c) 在零钙零镁的外液中，α-LTX^{N4C} 完全不能引起$[Ca^{2+}]_i$的变化，表明α-LTX^{N4C} 的作用依赖于二价阳离子的存在. ***, $P<0.01$

2.4 α-LTX 和α-LTX^{N4C} 对[Ca^{2+}]$_i$的影响不同

从前面的结果可以看出，在无钙外液中，α-LTX和α-LTX^{N4C} 引发的[Ca^{2+}]$_i$ 变化是明显不同的．为了进一步验证这个结果，在β细胞中分别给予α-LTX 和α-LTX^{N4C} 的刺激，结果表明，α-LTX 不能导致[Ca^{2+}]$_i$的变化；但是在同样的细胞上，用α-LTX^{N4C} 刺激，可以看到[Ca^{2+}]$_i$ 有很明显的上升，并且可以较快地恢复至静息水平(图 6(a))．为了进一步验证在 β细胞上的结论，选取 β 细胞的传代细胞系 INS-1 细胞重复了同样的实验，结果表明α-LTX 和α-LTX^{N4C} 在 INS-1 上的作用与在β细胞中的作用完全一致(图 6(b))．

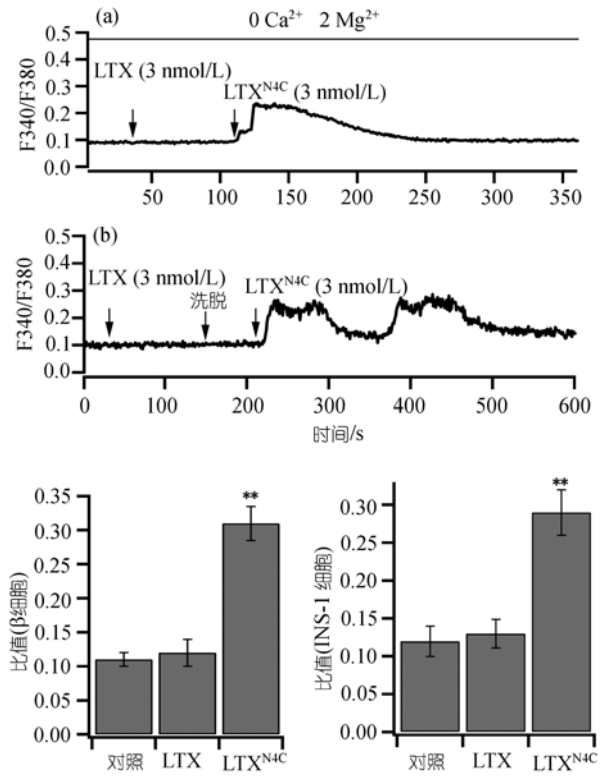


图 6　α-LTX 和α-LTX^{N4C} 对[Ca^{2+}]$_i$ 影响的差异

(a) 在零钙外液中，在同一个 β 细胞上先后吹加α-LTX 和α-LTX^{N4C}，进一步证实了二者的作用方式是不同的(n = 8, P < 0.01). (b) 在 INS-1 细胞上也得到了同样的结果(n = 4, P < 0.01). **, P<0.01

3　讨论

α-LTX是一种由黑寡妇蜘蛛分泌的神经毒素，它可以引起神经递质的释放[1,19]．在α-LTX不敏感的 PC12 细胞上表达其受体后，也可以导致细胞对α-LTX敏感，表明它的作用依赖于其细胞表面受体的存在[7,20].实验结果表明，当细胞外液中有Ca^{2+}存在时，α-LTX引起[Ca^{2+}]$_i$升高．当外液中没有Ca^{2+}时，α-LTX 并不能引发[Ca^{2+}]$_i$的升高．这些结果表明[Ca^{2+}]$_i$的升高是由外液中的Ca^{2+}通过毒素在细胞膜上的穿孔内流造成的．α-LTX形成的穿孔可以被La^{3+}阻断[21~23]，产生这种现象的原因可能有两种：(ⅰ) La^{3+}造成α-LTX四聚体的解聚从而抑制毒素形成孔道；(ⅱ) 即使孔道可以形成，细胞外液中的La^{3+}也可以使孔道的结构不稳定并快速地阻断通道[21]．

有人认为，细胞内钙库的Ca^{2+}释放对于α-LTX在细胞外液中没有Ca^{2+}时发挥功能起到了关键的作用[14,15]．α-LTX毒素刺激受体CIRL，这种受体同G蛋白的亚基$G_{\alpha q/11}$ 相互作用，激活下游效应物PLC，导致PIP_2 的水解，产生IP_3．细胞质中的IP_3 可以使Ca^{2+}从IP_3 敏感的钙库(线粒体、内质网)内释放出来，从而引起细胞产生一系列的反应[12]．但是使用内钙排空剂Thapsigargin并不能阻断α-LTX的作用[24]，而且在α-LTX的常见作用对象突触中所存在的细胞内钙库数量很少[25]．因而目前对这种观点还存在一定的疑问．本研究结果表明，在零钙外液的情况下，野生型α-LTX并不能导致大鼠胰腺β细胞的[Ca^{2+}]$_i$ 的变化．这也就说明在大鼠胰腺β细胞中胞内钙库并不是α-LTX所有作用的关键因素．

在正常的细胞外液中，由于α-LTX可以在细胞膜上形成穿孔，并导致非选择性的离子内流[26]，引发很强的细胞效应．这种现象很有可能掩盖了信号转导引发的效应．为了避免这种影响，通常可以采用在外液中加入三价阳离子阻断通道，但是三价阳离子可能使细胞的正常生理功能受到影响，因而在实验中受到很大限制．突变毒素α-LTX^{N4C}可以很好的解决这个问题．α-LTX^{N4C}为在α-LTX的N端的锚定重复区中插入了 4 个氨基酸(Val-Pro-Arg-Gly)序列的突变体，这种氨基酸上的不同会导致毒素空间结构发生很明显的变化，不能形成四聚体，因而在细胞膜上就不能形成穿孔[10,16,21]．但是α-LTX^{N4C}的受体的亲和力仍然和α-LTX一样，这就说明α-LTX^{N4C}可以应用于研究受体的信号通路上．通过α-LTX^{N4C}的刺激可以看到在正常外液和无Ca^{2+}外液中，细胞的[Ca^{2+}]$_i$都会升高．许多研究都认为α-LTX^{N4C}通过与非外钙依赖受体CIRL的结合，通过$G_{\alpha q/11}$ 激活PLC，导致PIP_2 的水解，产生IP_3[12~14]，细胞质中的IP_3 可以使Ca^{2+}从细胞钙库中释放出来，这种[Ca^{2+}]$_i$升高和α-LTX在正常外液中引发的现象不同，它可以比较

快地通过细胞内的各种$[Ca^{2+}]_i$调节机制回到静息水平. 这些结果表明由α-LTX^{N4C}引发的$[Ca^{2+}]_i$升高是由细胞内的钙库释放引起的. 在外液中去除二价阳离子以后, α-LTX^{N4C}引发的$[Ca^{2+}]_i$升高现象消失, 由此认为α-LTX^{N4C}的作用依赖于二价阳离子的存在, 推测二价阳离子在α-LTX^{N4C}和受体结合上起到了辅助作用, 这一点也和许多蛋白质之间的相互作用需要含有 Ca^{2+}, Mg^{2+}的存在相一致.

我们注意到, α-LTX^{N4C}和α-LTX造成的细胞$[Ca^{2+}]_i$升高的方式上是不一样的, 特别是在无外钙时α-LTX对$[Ca^{2+}]_i$无影响, 而α-LTX^{N4C}仍然可以造成的细胞$[Ca^{2+}]_i$升高, 这一点和以前的研究结果[26](即α-LTX^{N4C}和α-LTX对细胞$[Ca^{2+}]_i$的影响是一致的)完全不同, 推测其原因可能是在正常外液中, α-LTX^{N4C}是以二聚体的形式存在, 但是不能形成四聚体, 这样α-LTX^{N4C}就不会插入到细胞膜上形成穿孔. 其主要作用方式是和细胞表面上的受体发生作用, 这种作用对象主要是CIRL, 通过一系列的信号转导, 导致 IP_3 的产生从而激活细胞内的钙库释放. 但在同样条件下, α-LTX可以形成四聚体, 通过和受体Neurexin结合, 在细胞膜上形成孔道, 从而导致大量的细胞外钙内流, 引起$[Ca^{2+}]_i$升高. α-LTX在细胞膜上和CIRL的作用没有α-LTX^{N4C}那么强烈, 因而不能够引发胞内的钙库释放. 当然这种假设的可能性是较小的, 因为两种受体同α-LTX的亲和力是很接近的. 还有一种可能是在两者在和受体的作用后的, 产生的下游效应物上存在一定的差异, 这种不同的下游效应物直接导致了不同的细胞内钙变化. 另外, 突变毒素α-LTX^{N4C}是否还存在着和其他细胞膜表面蛋白的作用也有待于进一步的研究.

总之, α-LTX^{N4C}虽然是研究α-LTX 作用的有效工具, 但是其作用机制和α-LTX 存在着一定差异, 由α-LTX^{N4C}引发的生理作用并不能够完全等同于α-LTX 的作用. 对α-LTX 和α-LTX^{N4C}的研究对我们在细胞信号转导和神经递质分泌领域的机理研究具有积极的意义.

致谢 感谢 Imperial College 的 Yuri Ushkaryov 教授提供的α-LTX^{N4C}. 本工作为国家自然科学基金(批准号: 30270363, 30130230), 高等学校博士学科点专项科研基金(批准号: 20020487021)和国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999054000, 2004CB720000)资助项目.

参 考 文 献

1 Frontali N, Ceccarelli B, Gorio A, et al. Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junctions. J Cell Biol, 1976, 68(3): 462~479
2 Tzeng M C, Siekevitz P. The effect of the purified major protein factor (α-latrotoxin) of black widow spider venom on the release of acetylcholine and norepinephrine from mouse cerebral cortex slices. Brain Res, 1978, 139(1): 190~196
3 Petrenko A G, Kovalenko V A, Shamotienko O G, et al. Isolation and properties of the α-latrotoxin receptor. EMBO J, 1990, 9(6): 2023~2027
4 Ushkaryov Y A, Petrenko A G, Geppert M, et al. Neurexins: Synaptic cell surface proteins related to the α-latrotoxin receptor and laminin. Science, 1992, 257(5066): 50~56
5 Davletov B A, Shamotienko O G, Lelianova V G, et al. Isolation and biochemical characterization of a Ca^{2+}-independent α-latrotoxin-binding protein. J Biol Chem, 1996, 271(38): 23239~23245[DOI]
6 Krasnoperov V G, Beavis R, Chepurny O G, et al. The calcium-independent receptor of α-latrotoxin is not a neurexin. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 227(3): 868~875[DOI]
7 Krasnoperov V G, Bittner M A, Beavis R, et al. α-Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. Neuron, 1997, 18(6): 925~937[DOI]
8 Krasnoperov V, Bittner M A, Mo W, et al. Protein-tyrosine phosphatase-sigma is a novel member of the functional family of α-latrotoxin receptors. J Biol Chem, 2002, 277(39): 35887~35895[DOI]
9 Grasso A, Alema S, Rufini S, et al. Black widow spider toxin-induced calcium fluxes and transmitter release in a neurosecretory cell line. Nature, 1980, 283(5749): 774~776[DOI]
10 Orlova E V, Rahman M A, Gowen B, et al. Structure of α-latrotoxin oligomers reveals that divalent cation-dependent tetramers form membrane pores. Nat Struct Biol, 2000, 7(1): 48~53[DOI]
11 Meldolesi J, Huttner W B, Tsien R Y, et al. Free cytoplasmic Ca^{2+} and neurotransmitter release: Studies on PC12 cells and synaptosomes exposed to α-latrotoxin. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81(2): 620~624
12 Capogna M, Volynski K E, Emptage N J, et al. The α-latrotoxin mutant α-LTX^{N4C} enhances spontaneous and evoked transmitter release in CA3 pyramidal neurons. J Neurosci, 2003, 23(10): 4044~4053
13 Ichtchenko K, Khvotchev M, Kiyatkin N, et al. α-latrotoxin action probed with recombinant toxin: Receptors recruit α-latrotoxin but do not transduce an exocytotic signal. EMBO J, 1998, 17(21): 6188~6199[DOI]
14 Rahman M A, Ashton A C, Meunier F A, et al. Norepinephrine exocytosis stimulated by α-latrotoxin requires both external and stored Ca^{2+} and is mediated by latrophilin, G proteins and phospholipase C. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1999, 354(1381):

379~386[DOI]

15 Lelianova V G, Davletov B A, Sterling A, et al. α-latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors. J Biol Chem, 1997, 272(34): 21504~21508[DOI]

16 Volynski K E, Capogna M, Ashton A C, et al. Mutant α-latrotoxin (α-LTX^{N4C}) does not form pores and causes secretion by receptor stimulation: this action does not require neurexins. J Biol Chem, 2003, 278(33): 31058~31066[DOI]

17 Lou X L, Yu X, Chen X K, et al. Na^+ channel inactivation: A comparative study between pancreatic islet β-cells and adrenal chromaffin cells in rat. J Physiol, 2003, 548(Pt 1): 191~202[DOI]

18 Zhou Z, Misler S. Amperometric detection of quantal secretion from patch-clamped rat pancreatic beta-cells. J Biol Chem, 1996, 271(1): 270~277[DOI]

19 Clark A W, Mauro A, Longenecker H E Jr, et al. Effects of black widow spider venom on the frog neuromuscular junction. Effects on end-plate potential, miniature end-plate potential and nerve terminal spike. Nature, 1970, 225(5234): 701~703

20 Sugita S, Khvochtev M, Sudhof T C. Neurexins are functional α-latrotoxin receptors. Neuron, 1999, 22(3): 489~496[DOI]

21 Ashton A C, Volynski K E, Lelianova V G, et al. α-Latrotoxin, acting via two Ca^{2+}-dependent pathways, triggers exocytosis of two pools of synaptic vesicles. J Biol Chem, 2001, 276(48): 44695~44703[DOI]

22 Chanturiya A N, Nikoloshina H V. Correlations between changes in membrane capacitance induced by changes in ionic environment and the conductance of channels incorporated into bilayer lipid membranes. J Membr Biol, 1994, 137(1): 71~77

23 Hurlbut W P, Chieregatti E, Valtorta F, et al. α-latrotoxin channels in neuroblastoma cells. J Membr Biol, 1994, 138(1): 91~102

24 Khvotchev M, Sudhof T C. α-latrotoxin triggers transmitter release via direct insertion into the presynaptic plasma membrane. EMBO J, 2000, 19(13): 3250~3262[DOI]

25 Shepherd G M, Harris K M. Three-dimensional structure and composition of CA3→CA1 axons in rat hippocampal slices: Implications for presynaptic connectivity and compartmentalization. J Neurosci, 1998, 18(20): 8300~8310

26 Volynski K E, Meunier F A, Lelianova V G, et al. Latrophilin, neurexin, and their signaling-deficient mutants facilitate α-latrotoxin insertion into membranes but are not involved in pore formation. J Biol Chem, 2000, 275(52): 41175~41183.[DOI]

(2005-06-30 收稿, 2005-10-27 接爱)