

- phatidylcholine and acetylcholine. *Proceed Soc Exp Med Biol*, 1989; **191**:316
- 7 Green L C, Wagner D A, Glogowski J *et al*. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982; **126**:131
- 8 Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*, 1988; **141**:2407
- 9 Bredt D S, Snyder S H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**:682
- 10 Knowles R G, Merrett M, Salte M *et al*. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J*, 1990; **270**(3):833
- 11 Feelish M, Noack E A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrate and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol*, 1987; **139**(1):19
- 12 Knowles R G, Salter M, Broods S L *et al*. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; **172**(3):1042

简单而又神秘的生物信使——NO

董华玲 沈 政

(北京大学心理系和视觉、听觉信息处理国家实验室, 北京 100871)

提 要

新近发现一氧化氮(NO)广泛分布于生物体各处, 包括中枢及周边神经系统. NO可作为突触前递质从神经末梢释放, 也可作为逆信使从突触后膜释放. 另外, NO还参与心血管调节、免疫调节、性行为调节等过程. NO分子的发现为神经系统突触可塑性、神经发育及某些疾病的药物治疗等问题提供了一种可能的解释和线索. NO可能代表了一类新型的生物信使分子.

关键词 NO, NO合成酶, 黄递酶, 非肾上腺素能非胆碱能神经元, 神经发育

自Humphrey Davy 1935年在研究“笑气”(N₂O)时发现一氧化氮(nitric oxide, NO)以来, NO一直被看作是对生物有毒的简单无机分子, 曾在战争中作为生物毒剂(芥子气)使用, 成为声名狼藉的有毒物. NO常温下为气体, 水中溶解度很有限(1 mmol/L), 极易透过细胞膜扩散. NO拥有额外电子, 具有高度化学反应能力, 在生物组织中半衰期只有几秒钟. NO的这些性质与我们所熟知的神经递质分子特性相去甚远. 但几年来大量的研究已表明: NO作为可能的突触前递质和突触后逆信使在神经系统信息传递和发育中起作用, NO作为生物信使分子也在机体免疫和血流血压调节中

起着重要作用^[1].

1 NO是周边神经系统中的新递质

Hope的实验表明, 新近命名的NO合成酶(NO synthase, NOS)与文献中早有记载的黄递酶(NADPH diaphorase)是同一种蛋白质^[2], NOS已经被纯化、克隆和表达了^[3], 并制成了专一性很强的NOS抗体^[4]. 对黄递酶与NOS的统一性认识, 澄清了一个长久以来存在的谜, 即尿素循环中“迷失的一环”. 因为NO合成机制, 为左旋精氨酸(L-Arginine, L-Arg)向瓜

氨酸(citrulline)的转化提供了一条路径,使尿素循环得以部分闭合^[5]。NO的合成机制如图1。NOS是一种分子量约为150 000的蛋白,

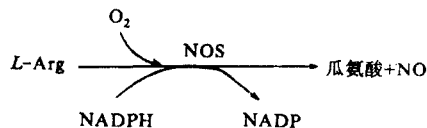


图1 NO的合成机制

有两种形式^[7]:一种是溶于胞质并依赖于Ca²⁺和钙调蛋白的结构型NOS。此种NOS在正常胞内自由Ca²⁺浓度(50nmol/L)时完全无活性,在0.1—1μmol/L Ca²⁺时达最大活性。NO作用靶是可溶性鸟苷酸环化酶(guanylyl cyclase, GC),激活后的GC导致靶细胞内cGMP浓度上升,cGMP随后调节蛋白激酶、磷酸二酯酶和离子通道等。此种NOS主要分布在神经系统等处,在受到物理刺激或受体被激活后此酶被激活,合成并释放NO,发挥信使分子的作用。另一种NOS是在巨噬细胞等被激活后,在其细胞核内合成表达的诱导型NOS,此种NOS也溶于胞质,但其活性不依赖于Ca²⁺和钙调蛋白,而需要四氢生物喋呤等一些辅助因子。此种NOS一旦产生就会长期合成NO。

应用传统的黄递酶组化技术和特异性的NOS免疫组化技术,人们对NO的合成位点及其分布作了大量研究^[6]。不但在嗅球、小脑、海马、上、下丘、纹状体、大脑皮层、网状上行系统等中枢神经系统中发现有NO合成,而且在脑垂体、肠肌丛、脊髓传入神经、视网膜、嗅细胞、肾上腺、阴茎海绵体、血管壁神经丛等处也发现有NOS的广泛存在^[4],这些实验观察提示出NO以递质形式参与神经信息的传导。的确,NO在神经系统中的一个作用模型就是,在周边神经系统(peripheral nervous system, PNS)中作为突触前递质从非肾上腺素能非胆碱能(nonadrenergic noncholinergic, NANC)神经元末梢释放。这种假设认为,NO在突触前成分中伴随动作电位和Ca²⁺内流而合成,并扩散出去作用于靶细胞。

1.1 NO是自主神经系统中的递质

支配胃肠道、盆腔内脏、气管和心血管平滑肌的自主神经的主要成分是NANC神经元,这些神经元释放的究竟是什么样的神经递质,这是多年来争论的问题。人们曾提出许多可能的物质(如ATP,腺苷, P物质,血管活性肠肽等),越来越多的证据表明,NO可能是其中一些神经元的递质。

NOS广泛存在于胃肠壁肠肌丛神经元胞体、纤维及末梢内,在神经受刺激时产生NO,调节肠壁平滑肌的松弛。Bult的实验,用药物阻断去甲肾上腺素和乙酰胆碱作用后,电刺激离体的狗回肠结神经仍能释放出能使血管松弛的NO,用促进NO生成的三硝酸甘油(glyceryl trinitrate, GTN)和使NO稳定的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)可促进这种作用;而用抑制NOS的药物L-氮位硝基精氨酸(N^G-nitro-L-arginine, L-NA)则产生抑制作用^[8]。在豚鼠回肠、结肠处和大白鼠十二指肠的平滑肌神经丛等处也有类似发现。另一些实验证明NO能促进大、小白鼠肛尾肌的松弛。可见NO可能作为NANC神经元释放的递质支配哺乳动物内脏平滑肌的松弛^[7,8]。

加州大学洛杉矶分校的一个研究小组认为,NO可能是引起阴茎平滑肌松弛和海绵体充盈勃起的主要因素^[9]。阴茎勃起是通过副交感神经系统调控血管和阴茎海绵体平滑肌松弛实现的,其神经递质一直未找到,虽然其神经末梢中有一定数量血管活性肠肽,但此物质并不能模拟此生理功能^[9,10]。Burnett^[11]等人用NOS免疫组化技术在大白鼠骨盆神经丛、尿道膜部、膀胱颈和前列腺中都发现有NOS。且NOS选择性地分布于支配阴茎平滑肌的神经元中,NOS的抑制剂选择性地抑制海绵体松弛,直接施用NO和L-Arg会产生如神经受刺激一样的肌松弛,这些结果强有力地证明了,NO如同在胃肠肌神经丛系统中一样,作为NANC神经元递质在泌尿生殖系统中起作用。NO是阴茎勃起、排尿节制和排尿频繁等生理功能的调节物,这为药物治疗阳痿等疾病在理

论上提供了线索。

还有证据表明, NO 在豚鼠呼吸系统中起作用。另外, NOS 分布在动脉、冠状动脉和脑血管等的外壁中, 调节血压、血流和脑血屏障通透性等^[6,7]。因此, NO 可能在哺乳类消化、生殖、呼吸和循环四系统的自主神经调节中起重要作用。

1.2 NO 在周边感觉输入中的作用

在大白鼠的视网膜与脉络膜, 和色素上皮紧连的自主神经末梢内含 NOS^[4]。在一种角鲨视网膜中也有一类双极细胞含有对 NO 敏感的可溶性 GC^[12]。在嗅觉输入中, 气味分子通过刺激嗅通道毛细胞释放 NO 来传导嗅觉信息。NADPH 黄递酶还大量存在于脊髓低胸段后根神经节的内脏传入神经元中^[6]。NO 也参与痛觉传入^[7]。最近的动物实验表明, 由 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 产生的损伤性甩尾反射易化是由内源 NO 控制的。施加 NOS 的抑制剂 L-N-位硝基精氨酸甲酯 (*L*-N^ω-nitro-arginine methylester) 后, 会抑制电刺激脊髓输入纤维引起的单个脊髓后角神经元的电反应, 同时也抑制脊髓后角神经元中机械性损伤刺激引起的 c-fos 基因表达^[13]。以上结果说明 NO 在感觉传入中可能有重要作用。

1.3 NO 在神经内分泌中的作用

NOS 存在于肾上腺髓质中, 与支配嗜铬细胞的神经纤维分布一致。NOS 也存在于肾上腺皮质中^[4]。离体生化实验发现施加硝普盐 (sodium nitroprusside, SNP) 可促使大白鼠肾上腺的组织匀浆产生 cGMP。施加抑制 NO 合成的血红蛋白则抑制这种作用。NO 在肾上腺中的功能并不完全清楚, 但有实验表明 cGMP 在儿茶酚胺分泌和类固醇分泌中有作用, 因此, NO 可能在肾上腺素分泌和激素合成中起调节作用^[4,7,14]。此外在垂体后叶的神经末梢、视上核、室旁核中有 NOS 存在, 可能调节激素释放^[4]。

2 NO 可能是神经发育和突触可塑性的共同分子机制

小脑长时程突触抑制 (long-term depres-

sion, LTD) 现象, 被认为是小脑进行运动、学习的细胞机制^[5,6]。Shibuki 等的研究表明, 脑片细胞内源性 NO 对于诱发 LTD 是必须的^[15]。近年研究认为, 海马长时程增强 (long-term potentiation, LTP) 是学习、记忆过程中的重要机制, 并且 NO 在 LTP 现象中充当逆信使, 增加突触前神经递质释放^[5,7,16]。

成体学习、记忆机制与幼体的神经发育机制之间有很多相似性^[17,19]。十几年前, 人们还认为脑神经元的发育不依赖于经验和细胞电活动, 而仅仅是由基因编码按一定程序合成膜表面的分子, 从而使突触前膜和突触后膜相互识别形成特异连接。而现在看来, 突触发育的三个步骤中, 第一步——神经通路选择和第二步——靶区域的选择, 确实由膜表面识别分子决定。但神经发育的第三步——细胞选择, 即每一个突触前轴突都以点对点的方式精确地同特定的突触后靶神经元相匹配, 却是依赖于细胞电活动的。而在成体中, 突触连接也能由于有机体生活经历改变和细胞电活动改变而变化, 说明神经发育和突触可塑性之间有着时间上的连续性。Kandel 和 O'Dell^[19]提出这两种过程都借助于同一种信使分子: NO 能够协调特定时空条件下突触前和突触后神经元的电活动。由一组突触前神经纤维同步发放所激活的靶细胞, 能够加强那些与之同步激活的突触, 而削弱那些不激活或非同步激活的突触前纤维与靶细胞之间的突触强度 (图 2)。这些功能性的改变也伴随着解剖变化。当轴突成熟后, 它们通过选择性地消退某些神经末梢或长出新分枝来实现神经系统的可塑性变化。因此, NO 可能在成体中兴奋性氨基酸引起的短期突触可塑性效应 (如 LTP 和 LTD), 和神经发育、学习、记忆等长期效应中都有重要作用^[7,17,19]。

Gally 等曾用计算机模拟了 NO 在神经系统中的作用^[20], 他认为, 类似 NO 这样寿命短、迅速弥散的信使分子可以解释 LTP 现象和发育过程中轴突分枝的形成。NO 这一类扩散性信使分子, 可能通过强化或削弱突触连接, 成为与学习相关的突触调节和神经发育中突触形

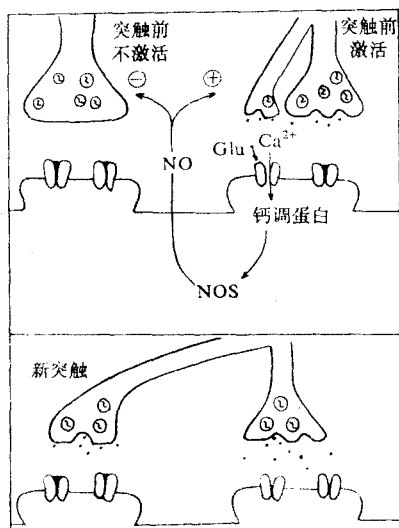


图2 NO在神经发育中的可能作用

上图为突触后释放的信号分子只加强那些同步激活的突触前神经末梢。下图为长期作用效应是导致非同步激活末梢退化，同步激活末梢则稳定下来或长出新分枝。

成这两个极相似过程的共同分子机制。这种假设正在用遗传缺陷的小鼠实验来检验。

3 NO在心血管系统中的调节作用

Furchgott^[5]首先证实了乙酰胆碱、运动缓激肽等血管扩张物质作用于血管壁内皮细胞，使之释放一种血管内皮的松弛因子（endothelium derived relaxing factor, EDRF），EDRF作用于邻近的血管平滑肌，通过增高cGMP引起平滑肌松弛和血管扩张。Palmer等证明NO和EDRF生化性质相同，认为是同一种物质^[1,5]。在心血管系统中，NO释放作为血管内皮对环境变化的一般适应机制，通过对血管平滑肌的作用调节血流和血压^[7]。实验证明给人和动物施用NOS抑制剂后，血压迅速升高。高血压及其它类血压不正常可能与此机制有关。除此之外，血小板中的NO也可能作为一种自体分泌负反馈系统，通过cGMP抑制血小板的凝集和粘附，可能是一种内源性抗血栓剂。

同样，NO似乎在大脑血循环调节中也起关键作用^[6,7]。实验表明GC存在于脑部微血管中，能受SNP作用调节血脑屏障通透性。Ach

引起的基底动脉扩张依赖于NO的生成，阻断NO合成会阻断由神经刺激或施用烟碱而引起的狗脑动脉的松弛和扩张。因为脑的能量代谢乃至认知活动与脑部血液循环密切相关，NO在脑血液循环中的调节作用更显得意义重大。

4 NO在免疫系统中的作用

1981年Tannenbaum和其同事发现，吃低含量硝酸盐（ NO_3^- ）的人或动物仍排泄出很多 NO_3^- 。人患感染性白喉时尿中 NO_3^- 水平增加很高。注射能够引起炎症反应的细菌内毒素会刺激大白鼠分泌 NO_3^- ，而一种先天有巨噬细胞基因缺陷的小鼠却不分泌硝酸^[1]。经过离体和在体细胞的多种实验，现在已基本清楚：当内毒素或T-细胞激活巨噬细胞时，会合成诱导性NOS，这种酶合成产生的NO作为宿主防御机制，对细菌、真菌和肿瘤细胞产生杀伤作用^[1,10]，摧毁侵入有机体的异物和肿瘤细胞（图3）。L-Arg: NO途径目前被认为是一种非特异性免疫机制，用以对抗侵入机体的微生物及病原体等，并对体内肿瘤细胞有毒性作用^[7]。肺和肝是机体循环路径中的主要免疫过滤器，其非特异性免疫功能依赖于NO。在正常情况下，NO可能调节细胞对分裂素（mitogens）的反应，已发现cGMP的浓度变化与许多细胞的增殖启动及控制有关，当然，此种作用与起杀伤病原体作用的NO可能属于不同NOS控制系

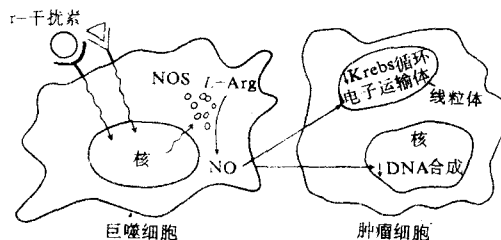


图3 NO在免疫系统中的作用

免疫系统受 γ 干扰素等外来刺激后，传递信号给巨噬细胞的核，导致合成NOS并产生NO。NO通过抑制供能的Krebs循环、线粒体电子传送过程及DNA合成来破坏肿瘤细胞和病原微生物。

统. 另外, 尽管诱导性 NOS 形成的 NO 是否与特异性免疫系统对其它细胞的毒性作用有关目前还不知道, 却有实验证明可以在某些 T 细胞中诱导出 NOS 来.

免疫刺激产生的 NO 对那些表达 NOS 的细胞自身及其附近细胞也有毒性作用, 一些与免疫系统有关的局部或系统组织损伤、病态血管扩张等可能与 NO 释放有关.

小 结

NO 是脊椎动物体内广泛分布的一种分子. NO 可能对神经系统递质传导、突触可塑性、神经发育、脑血流调节、免疫调节等过程十分重要. 但正如在脑中像许多新发现的化合物一样, NO 几乎立即被用以解释每一种未能解释的现象. 很多假设停留于理论阶段未得到事实证据, 一个主要障碍可能是 cGMP 特异性功能尚不完全清楚, NO 合成位点也需进一步研究. NO 可能是一类新型神经递质的一种代表分子. 总之, 笼罩在 NO 这一类小分子上的神秘帷幕还需相当长一段时间才能揭开.

参 考 文 献

- 1 Snyder S H, Bredt D S. Biological roles of nitric oxide. *Sci Amer*, 1992; **267**(5):28-35
- 2 Hope B T, Michael G J, knigge K M *et al.* Neuronal NADPH diaphorase is a nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **88**:2811-2814
- 3 Bredt D S, Hwang P M, Glatt C E *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resemble cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991; **351**:714-718
- 4 Bredt D S, Hwang P M, Synder S H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 1990; **347**:768-770
- 5 Garthwaite J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *TINS*, 1991; **14**(2):60
- 6 Vincent S R, Hope B T. Neurons that say NO. *TINS*, 1992; **15**(3):108-113
- 7 Moncada S, Palmer R M J, Higgs E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 1991; **43**(2):109-134
- 8 Bult H, Boeckstaens G E, Pelckmans P A *et al.* Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature*, 1990; **345**:346-347
- 9 Ignarro L J, Bush P A, Buga G M *et al.* Neurotransmitter identity doubt. *Nature*, 1990; **347**:131-132
- 10 Stroh M. The root of impotence: does nitric oxide hold the key? *Sci News*, 1992; **142**(1):10-11
- 11 Burnett A L, Lowenstein C J, Bredt D S *et al.* Nitric oxide: A physiological mediator of penile erection. *Science*, 1992; **257**:401-403
- 12 Shiells R, Falk G. Retinal on-bipolar cells contain a nitric oxide-sensitive guanylate cyclase. *Neuroreport*, 1992; **3**(10):845-848
- 13 Lee J H, Wilcox G L, Beitz A J. Nitric oxide mediates Fos expression in the spinal cord induced by mechanical noxious stimulation. *Neuroreport*, 1992; **3**(10):841-844
- 14 Afework M, Tomlinson A, Belai A *et al.* Colocalization of nitric oxide synthase and NADPH diaphorase in rat adrenal gland. *Neuroreport*, 1992; **3**(10):893-896
- 15 Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*, 1991; **349**:326-328
- 16 Izumi Y, Clifford D B, Zorumski C F. Inhibition of long-term potentiation by NMDA-mediated nitric oxide release. *Science*, 1992; **257**:1273-1275
- 17 Fazeli M S. Synaptic plasticity: on the trail of the retrograde messenger. *TINS*, 1992; **15**(4):115-117
- 18 Goy M F. cGMP: the wayward child of the cyclic nucleotide family. *TINS*, 1991; **14**(7):293-299
- 19 Kandel E R, O'Dell T J. Are adult learning mechanisms also used for development? *Science*, 1992; **258**:243-245
- 20 Gally J A, Montague P R, Reeke G N *et al.* The NO hypothesis: Possible effects of a short-lived rapidly diffusible signal in the developments and function of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**:3347-3351