

一氧化氮：神经系统内一种新的信使分子

刘 秀 陈宜张

(第二军医大学生理教研室, 上海 200433)

提 要

新近几年, 一氧化氮的许多生物学活性日益被人们所认识, 尤其是它在神经系统内的信息传递作用引人注目. 文章综述了一氧化氮在神经系统内的生物合成、分布、信息传递功能及其机制.

关键词 一氧化氮, 一氧化氮合成酶, 突触可塑性, 神经毒性

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一种新发现的信使分子, 具有独特的理化性质和生物学活性: 分子小, 结构简单; 与 Fe^{2+} 有很高的亲和力; 极不稳定, 易被氧化, 生物半寿期仅 3—5s; 具有脂溶性, 能通过生物膜快速扩散, 因而在细胞之间 (包括神经元之间) 较广泛地起作用. 它在神经系统内具有类似神经递质的信息传递功能; 在免疫系统杀灭肿瘤细胞和细菌的过程中起作用; 可能就是内皮细胞舒血管因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF). 新近几年, 有关 NO 在神经系统内的生物合成、分布、信息传递功能及其机制方面的研究进展十分迅猛, 本文对此予以综述.

1 NO 生物学活性的发现

日本学者 Miki 等人早在 1977 年就发现 NO 能够激活小鼠肝脏和大脑匀浆中的鸟苷酸环化酶 (guanylyl cyclase, GC). 第二年, Murad 报道硝酸甘油和其它硝酸类血管扩张剂的血管平滑肌松弛作用均由它们的代谢产物 NO 所介导, 而且 NO 的作用特点类似于 EDRF. 又过了 10 年, Moncada 用化学方法直接证实了血管内皮细胞能够合成 NO, 根据生物化学和药理学方法的分析结果, 明确提出 NO 就是 EDRF. 新近三四年, 随着越来越广泛而深入的研究, NO 的许多生物学活性正在日益被人们所认识, 尤其是它在神经系统活动中的作用引人注目.

2 NO 的生物合成

NO 是由一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化 L-精氨酸 (L-arginine, Arg) 而生成的. 神经系统中的 NOS 是一种单体酶蛋白分子, 它的催化活性需要钙调素/钙离子 ($\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$), 还原型辅酶 II (NADPH), 黄素核苷酸 (FAD/FMN), 生物蝶呤和铁^[1,2]. NOS 还是一种高度可调节蛋白质, 它能被 cAMP 和 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶即蛋白激酶 A 和 C 磷酸化, 结果使不同的信息传递过程紧密联系起来^[3].

NOS 首先接受 NADPH 传递的电子, 使酶分子中的 FAD/FMN 还原, NOS 呈还原型. 如果有其他受氢体如氮蓝四唑 (nitro blue tetrazolium, NBT) 存在, NOS 又交出电子重新氧化, 但此时却具有了 NADPH 硫辛酰胺脱氢酶 (NADPH diaphorase, NDP) 的活性. 在 $\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$ 和氧的协助下, 使 Arg 末端胍基的氮原子羟化, 此步骤与 P-450 的单氧酶反应一样, 羟化的 Arg 紧密结合于 NOS 上, 进一步被氧化生成 NO 和瓜氨酸 (citrulline, Cit)^[4].

NO 合成后很快即被氧化成 NO_2 , 以硝酸根 (NO_3^-) 和亚硝酸根 (NO_2^-) 的形式存在于细胞内外液中, 从而使 NO 失去生物学活性 (见图 1).

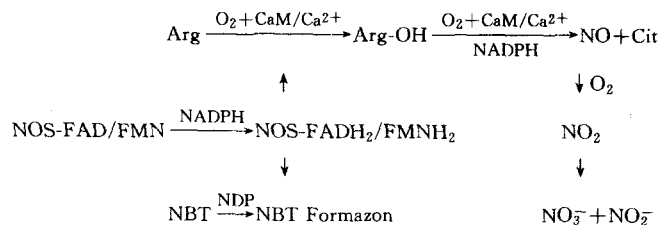


图 1 NO 的生物合成和失活过程

3 NO 在神经系统中的分布

由于 NO 极不稳定, 半寿期不足 5s, 目前尚不能对组织中的 NO 进行直接定位. 因为合成 NO 的底物 Arg 在体内是广泛存在的, 没有特异性, 可是只有那些能够合成 NO 的细胞中才存在有 NOS, 所以人们利用纯化的 NOS 制备抗血清, 进行免疫细胞化学研究^[5], 利用建立的 cDNA 进行原位杂交以确定 NOS 的 mRNA 的存在部位^[6]. 这样, 即可通过 NOS 的定位来反映出 NO 的分布情况^[7].

在不同的脑区, NOS 的免疫反应活性和催化活性呈良好的平行关系, 说明免疫细胞化学定位研究的特异性是很高的. 在大脑皮层、海马和纹状体中只有 2% 的神经元含有 NOS, 而且都是散在分布的对无棘突神经元起中介作用的神经元. 在嗅球神经元和齿状回颗粒细胞中, NOS 含量丰富. 在海马回嗅觉小岛 (Calleja's islets), NOS 只局限于神经纤维中. 在小脑, NOS 的 mRNA 富含于颗粒细胞层和蓝状细胞中, 而 NOS 的免疫反应活性除浓集于颗粒细胞层外, 还丰富地存在于分子层内. 因此提示分子层中的免疫反应活性是颗粒细胞延伸到分子层的纤维中的 NOS, 而不是分子层自身合成的. 其他中枢部位如下丘脑视上核和室旁核及其延伸到垂体后叶的纤维中都含有 NOS. 但是, 所有胶质细胞、浦肯野细胞和海马中的锥体细胞都没有 NOS.

在外周, NOS 主要分布于整个胃肠道的肌间神经丛中. 进一步的分析表明, NOS 阳性者都是抑制性运动神经元, 它们的轴突向肛端走

行, 而且只支配内层环形肌. 在肾上腺, NOS 只存在于髓质的节细胞和神经纤维中, 因而与分泌儿茶酚胺的嗜铬细胞有密切联系. 眼脉络膜神经纤维网和内核层的少长突细胞也含有 NOS.

值得注意的是, NOS 与某些递质或调质有共存现象. 纹状体中所有 NOS 阳性神经元都含有生长抑素和神经肽 Y; 脚桥脑核中的 SON 阳性神经元含有胆碱乙酰转移酶 (其作用是催化合成乙酰胆碱); 胃肠道中的 NOS 与血管活性肠肽共存. 在整个神经系统中, NOS 几乎无例外地与 NDP 共存, 而且没有种属特异性. 有人^[7]用 NOS 的 cDNA 转染缺乏 NOS 和 NDP 的肾 293 细胞, 结果 NOS 和 NDP 均转为阳性, 二者的比例与天然存在于神经系统中的 NOS 和 NDP 的比例完全相同.

4 NO 的信息传递功能

只是在最近三四年中, 人们才开始注意到 NO 在神经系统内具有信息传递的功能, 对许多神经活动有影响. 主要表现在以下几个方面:

4.1 NO 对突触可塑性的影响

已有文献^[8-10]表明, NO 对突触可塑性如长时程增强作用 (long-term potentiation, LTP) 和长时程压抑 (long-term depression, LTD) 有影响. 在海马切片标本上^[8,9], 0.1 μmol/L 的 NOS 抑制剂硝基精氨酸灌注或向突触后细胞内注射均可完全阻断 LTP, Arg 能够反转这个效应. 血红蛋白能结合 NO, 使其不能扩散到突触后神经元中, 明显地减弱了 Arg 的效应. 进一步的研究还表明, NO 能促进

体外培养的海马锥体细胞自发释放神经递质的过程,提示 NO 在 LTP 过程中起逆向因子(retrograde factor)的作用^[9]. 在小脑, LTD 是突触可塑性的一个模式,刺激爬行纤维和平行纤维诱发平行纤维到浦肯野细胞间传递的 LTD,这可能是小脑运动学习的细胞机制. Shibuki 等人^[10]报道,刺激小脑爬行纤维使 NO 大量释放;能够分解出 NO 的硝普钠可以替代对爬行纤维的刺激而诱发 LTD;血红蛋白和 NOS 抑制剂 N-甲基精氨酸则阻断上述 LTD.

4.2 NO 的神经毒性作用

现认为谷氨酸能神经元参与脑缺血时的神经毒性作用. N-甲基-D-门冬氨酸 (N-methyl-D-aspartate, NMDA) 受体拮抗剂在许多脑缺血模型中可阻断神经损伤过程^[11]. 在体外培养大脑皮层神经元时若加入 NMDA, 24h 内多达 80% 的神经元死亡,加入 Arg 或硝普钠明显加强这种毒性作用. 但培养液中耗尽了 Arg 或换用无 Arg 培养液,或加入硝基精氨酸或 N-甲基精氨酸,或加入血红蛋白均可防止上述的细胞毒性作用,提示 NO 介导着谷氨酸的细胞毒性作用^[12]. 在正常情况下,神经元合成并释放出适量的 NO,并不产生毒性作用. 但有过量的谷氨酸时,神经元和小胶质细胞就像其他组织中的巨噬细胞一样产生过多的 NO,足以致死周围的神经细胞. Nowicki 等人^[13]结扎小鼠中脑动脉 5min 到 36h 后,再腹腔注射硝基精氨酸 (1mg/kg),结果脑梗塞的体积明显减小,只为对照组的 30%. Dwyer 等^[14]报道,连续 4d 给大鼠腹腔注射硝基精氨酸 5mg/(kg·d),将不可逆地抑制脑内 NOS 的活性. 上述结果提示硝基精氨酸等 NOS 抑制剂对脑卒中可能有治疗作用.

4.3 NO 在胃肠神经中的作用

肌间神经丛的一个重要功能是介导胃肠平滑肌的非肾上腺素能非胆碱能性 (nonadrenergic-noncholinergic, NANC) 舒张. Arg 和硝普钠都引起与刺激 NANC 纤维相同的舒张反应,而硝基精氨酸或 N-甲基精氨酸却明显抑制上述的平滑肌舒张,提示 NO 在 NANC 舒张中起

中介作用^[15,16]. 在肌间神经丛, NOS 和血管活性肠肽共存并有功能联系,二者均可引起 NANC 舒张,但血管活性肠肽的抗体却只能部分地消除 NANC 舒张,剩余的舒张反应则可被 N-甲基精氨酸所消除^[17].

此外,NO 还介导阴茎海绵体和大脑血管的舒张反应, Burnet 等人^[18]1992 年报道 NO 是参与阴茎勃起反射的生理性介质.

5 NO 的作用机制

NO 作为信使分子的最大特点是,它不需要任何中介机制而快速地扩散通过生物膜,将一个细胞产生的信息传递到它周围的细胞中去,而主要的影响因素只是 NO 的生物半寿期 (3—5s). NO 分子的顺磁性使它对血红素中的 Fe^{2+} 有很高的亲和力,因此它能与含有血红素的蛋白质相结合,所产生的亚硝酰基血红素蛋白质复合物是较稳定的^[19]. Craven 等在 1978 年发现从肝脏部分纯化的不含血红素的 GC 与 NO 无反应,但加入血红素后,NO 便可激活 GC. 4 年后证实细胞内的可溶性 GC 是一种血红素蛋白,其酶蛋白和血红素分子比为 1:1. 此后人们注意到,NO 与血红素蛋白之间的结合,最重要的应属它与 GC 的结合,所形成的亚硝酰基-血红素-酶蛋白复合物就是 GC 的活化状态. NO 的结合能迅速而强烈地增强 GC 的催化活性,使 cGMP 生成的速度加快 50—200 倍^[20]. NO 和 GC 的结合代表着一种新的广泛存在的将细胞外信息转导为临近细胞内的第二信使 cGMP 增加的信息传递机制. NO 在一个细胞内产生后便可调控周围细胞的功能,故在局部调节着对立的或互补的细胞反应.

Garg 等^[21]报道,NO 还可以一种不依赖于 cGMP 的机制来降低细胞内的游离 Ca^{2+} ,从而防止细胞内 Ca^{2+} 过高,这是对细胞的一种保护作用. 反过来,NO 的生成又依赖于细胞内的游离 Ca^{2+} ,如前所述 Ca^{2+} 对维持 NOS 的催化活性是绝对必需的. 这样,NO 又受到能影响细胞内游离 Ca^{2+} 的信息传递过程的调控. 研究最多的是 NMDA 受体的激活使细胞内游离 Ca^{2+} 升

高,明显地加强 NOS 的催化活性,促进 NO 的合成和释放,这可能就是前述的过量谷氨酸致神经元死亡的机理。

参 考 文 献

- 1 Brdet D S, Hwang P H, Glatt C *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991;**352**:714—718
- 2 Mayer B, John M, Heinzel B *et al.* Brain nitric oxide synthase is a bipterin-and flavin-containing multifunctional oxidoreductase. *Eur Biol Sci*, 1991;**288**:187—191
- 3 Bredt D S, Ferris C D, Snyder S H. Nitric oxide synthase regulatory sites: phosphorylation by cyclic AMP dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites. *J Biol Chem*, 1992;**267**:10976—10981
- 4 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
- 5 Bredt D S, Hwang P M, Snyder S H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature*, 1990;**347**:768—770
- 6 Bredt D S, Glatt C E, Hwang P M *et al.* Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 1991;**7**:615—624
- 7 Dawson T M, Bredt D S, Fotuhi M *et al.* Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;**88**:7797—7801
- 8 Bohme G A, Boh C, Stutzmann J M *et al.* Possible involvement of nitric oxide in long-term potentiation. *Eur J Pharmacol*, 1991;**199**:379—381
- 9 O'Dell T J, Hawkins R D, Kandel E R *et al.* Tests of the roles of two diffusible substances in LTP; evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;**88**:11285—11289
- 10 Shibuki K, Okada D. Endogenous nitric oxide release required for long-term synaptic depression in the cerebellum. *Nature*, 1991;**349**:326—328
- 11 Choi D W. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1991;**7**:623—628
- 12 Dawson V L, Dawson T M, London E D *et al.* Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;**88**:6368—6371
- 13 Nowicki J P, Duval D, Poignet H *et al.* Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse. *Eur J Pharmacol*, 1991;**204**:339—340
- 14 Dwyer M A, Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide synthase: irreversible inhibition by L-N-nitroarginine in brain *in vivo* and *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991;**176**:1135—1141
- 15 Desai K M, Sessa W C, Vane J R. Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food of fluid. *Nature*, 1991;**351**:477—479
- 16 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
- 17 Li C G, Rand M J. Nitric oxide and vasoactive intestinal polypeptide mediate non-adrenergic non-cholinergic inhibitory transmission to smooth muscle of the rat gastric fundus. *Eur J Pharmacol*, 1990;**191**:303—309
- 18 Burnett A L, Lowenstein C J, Brdet D S *et al.* Nitric oxide: a physiological mediator of penile erection. *Science*, 1992;**257**:401—403
- 19 Bredt D S, Snyder S H. Nitric oxide: a novel neuronal messenger. *Neuron*, 1992;**8**:3—11
- 20 Ignarro L J. Nitric oxide: a novel signal transduction mechanism for transcellular communication. *Hypertension*, 1990;**16**:477—483
- 21 Garg U C, Hassid A. Nitric oxide decreases cytosolic free calcium in BALB/c 3T3 fibroblasts by a cyclic GMP-independent mechanism. *J Biol Chem*, 1991;**266**:9—12