

一类新的第二信使

——花生四烯酸脂氧合酶代谢物

陈 丁 丁

(江苏农学院生化教研室,扬州)

提 要

海兔感觉神经元对神经活性肽四肽 FMRF 酰胺的抑制性应答,是以花生四烯酸脂氧合酶代谢物为第二信使介导的。这类新的第二信使既可在胞内也可在胞间传递信号。同种离子通道(S通道)的开或关,受两种不同的第二信使系统调节控制。

一、引 言

在神经递质对突触的许多作用中,递质与细胞膜受体结合后,通过第二信使间接改变了离子通道的活性。自1957年 Sutherland 发现 cAMP 的作用以来^[1],在神经元中已有许多物质被相继确认为第二信使,包括 cAMP、cGMP、Ca²⁺、二酰基甘油和肌醇磷酸类(如肌醇三磷酸,IP₃)^[2]。除上述这些可扩散的小分子第二信使外,最近的证据指出,GTP-结合蛋白不经过中间级联系统而直接调节钾离子通道的活性^[3],揭示了一种全新的离子通道调节系统。这些激动人心的成就已在国际上引起了研究第二信使的第二次高潮。

最近,美国哥伦比亚大学的 D. Piomelli 等三组科学家共同协作又发现了另一类小分子第二信使,他们的证据强有力地表明,花生四烯酸活性代谢物甘碳酸类,即花生酸类(eicosanoids)是海生软体动物海兔(*Aplysia*)感觉神经元突触前抑制作用的第二信使^[4]。这是在神经元中发现的一类新的第二信使。

二、FMRF 酰胺与 5-HT

FMRF 酰胺是用单字符号表示的 Phe-Met Arg-Phe-NH₂ 四肽的缩写,是软体动物神

经活性肽。5-HT 是神经递质 5-羟色胺的缩写。

早先的研究表明,5-HT 对海兔感觉神经元的刺激作用,涉及 cAMP 第二信使系统的蛋白质磷酸化作用,对一类特殊的钾离子通道(S-通道)进行全或无的关闭。由 5-HT 引起的通道关闭,在细胞中产生缓慢的去极化作用,增大动作电位和促进从感觉神经元末端释放递质,即突触前易化作用^[5]。近来,运用 FMRF 酰胺作用于这些感觉神经元时发现,其可引起膜的超极化,减少动作电位持续时间,增大 K⁺ 外流,以及抑制神经元末端突触的传递作用,即突触前抑制作用等,与 5-HT 的一系列效应相反。而且,FMRF 酰胺还能使由 5-HT 或 cAMP 引起的 S-通道关闭逆转成开放状态。可见,FMRF 酰胺和 5-HT 在细胞水平和单通道水平上相互拮抗^[6]。

三、海兔中花生四烯酸的代谢途径

花生四烯酸是海兔神经磷脂的一个重要组分。在非神经细胞中,神经元信号通过受体介导而使花生四烯酸从膜磷脂中释放,进入胞内的花生四烯酸很快被代谢产生一类生物活性物质——花生酸,后者被认为是胞内和胞间的信号传递者^[4,7]。

神经调节物质组胺能在海兔的神经元中产生突触前抑制。Piomelli 等测定了在海兔神经组织中应答组胺作用释放的花生四烯酸的代谢。在海兔神经元中,游离的花生四烯酸可通过 12-脂氧合酶、5-脂氧合酶和环氧化酶(cyclooxygenase) 三条途径进入代谢(图 1)^[4],图中还标明了不同代谢抑制剂的作用位点。早先的研究已确证在海兔神经组织中能形成两种稳定的脂氧合酶羟酸产物,12-羟基廿碳四烯酸(12-hydroxyeicosatetraenoic acid, 12-HETE)和 5-羟基廿碳酸(5-HETE)。在哺乳动物中,这些羟酸是由相应短寿命的前体氢过氧化廿碳四烯酸(hydroperoxyeicosatetraenoic acid, HPETE)经酶促还原产生的。由于尚未从海兔中分离到这些不稳定的前体,对它们存在于海兔体中还仅仅是一种逻辑推测。而 12-HPETE 和 5-HPETE 也可代谢产生非羟酸的其它产物。另外,在海兔神经组织中,通过环氧化酶途径则可合成不同的前列腺素(PG),包括 PGE₂和 PGF_{2α}。

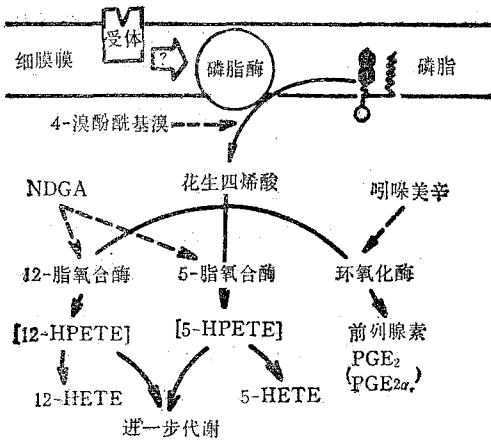


图 1 海兔神经组织中花生四烯酸的代谢途径

四、生物活性花生酸是 FMRF 酰胺的第二信使

Piomelli 等研究花生酸作为一类潜在性第二信使的线索,来自这样的实验结果^[5]:用组胺作用于海兔的大脑神经节,会引起膜上花生四烯酸的释放和降解。产生组胺的神经元对腹

部神经节有抑制作用,随着对这些被抑制神经元的刺激作用,也使花生四烯酸释放和生成一些氧化产物——花生酸类。经生物化学、生理学和药理学的研究清楚表明,神经活性肽 FMRF 酰胺对海兔感觉神经元递质释放的突触前抑制作用,是由花生四烯酸的脂氧合酶代谢物——花生酸介导的。这些化合物是神经元中一类新的第二信使^[4]。

当把外源性花生四烯酸注射在神经元上时,就激发了 FMRF 酰胺样的微观生理效应。如产生缓慢的膜超极化,增加膜的电导,减少动作电位的持续时间和抑制感觉神经元和运动神经元之间的突触传递作用。这些效应在完整的神经节和培养的神经元中都能观察到。而使用廿碳-11-单烯酸则只有极微小的影响。说明花生酸可迅速自由地通过细胞膜,在胞内和胞间传递信号^[4]。

FMRF 酰胺和花生四烯酸生理学效应的一致性,是因为它们具有共同的离子机制。培养的感觉神经元电压钳实验揭示,花生四烯酸和 FMRF 酰胺对膜电流-电位关系有相似的影响。进一步对细胞封接膜片(cell-attached membrane patches)中单一通道 S-通道电流的研究,为 FMRF 酰胺和花生四烯酸具有共同的作用机制提供了更为直接的证据。当把 FMRF 酰胺和花生四烯酸分别与细胞封接膜片(含 S-通道)作用 1—2 分钟后,通过测定膜片中的平均电流和单通道电流振幅值,可定量描述它们对 S-通道活性的影响。在两种情况中, Piomelli 等都观察到了很大程度的 S-通道开放和一致的增大作用。这表明花生四烯酸和 FMRF 酰胺对 S-通道有同样的影响。相反,廿碳-11-单烯酸却无任何作用^[4]。通过膜片的平均电流 I 的大小,依赖于 $N_f \times i \times p$ 三者之积, N_f 为膜片中有功能的通道数目, i 为单通道电流振幅, p 则代表某一通道开放的概率。Belardetti 等^[6]应用单通道记录技术研究指出, FMRF 酰胺通过增加 p 而增大 I , 对 N_f 和 i 则没有影响。Piomelli 等的测定结果说明,花生四烯酸与 FMRF 酰胺相似,也是通过增加 p 而增大 I 的,

对 N_i 和 i 没有影响。

上述实验结果表明, 微量的 FMRF 酰胺 (实验用量 $2 \mu\text{mol}$) 与大量的外源性花生四烯酸 (实验用量 $45-50 \mu\text{mol}$) 的生理效应是一致的。花生四烯酸可模仿 FMRF 酰胺的各种作用。但是这不能证明细胞内源性花生四烯酸释放和降解是对活性肽应答的结果, 也不能证明正是这些代谢物介导了对活性肽的应答。因为外源性花生四烯酸也可能是通过其它独立而平行的机制作用于 K^+ 通道的。为排除此种可能, 从药理学和生物化学两种不同途径和方法研究, 确证了内源性花生四烯酸在此过程中是专一性参入的, 并无其它作用途径^[4], 确实是 FMRF 酰胺的第二信使。

受体介导花生酸生成的第一步可能是花生四烯酸从膜磷脂中释放进入胞内 (图 1), 在哺乳动物中该反应由磷脂酶 A_2 催化, 或由磷脂酶 C 和二酰基甘油酯酶联合作用。这些磷脂酶的活性可被 4-溴酚酰基溴 (4-bromophenacyl bromide) 有效地阻断 (图 1)。 $10 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 4-溴酚酰基溴能完全抑制由 FMRF 酰胺引起的神经元的超极化, 而对在同样细胞中由 5-HT 引起的去极化没有影响, 说明该药物不干扰 S-通道的功能。应用这一抑制剂研究表明, 花生四烯酸的释放是细胞应答 FMRF 酰胺的必需步骤。

为了确定是哪个代谢途径负责产生活性花生酸, 使用了吲哚美辛 (indomethacin) 和去甲二氢愈创木酸 (nordihydroguaiaretic acid, NDGA)。吲哚美辛专一抑制环氧化酶活性^[10], NDGA 则专一抑制脂氧合酶活性^[11] (图 1)。结果发现, 吲哚美辛抑制海兔神经节中前列腺素的形成, 不影响脂氧合酶的活性, 对由 FMRF 酰胺引起的超极化亦没有影响。相反, 使用 NDGA 则抑制感觉神经元对 FMRF 酰胺的超极化应答。经 NDGA 处理后, 细胞对 FMRF 酰胺的超极化应答平均只有未经 NDGA 处理时的 $9.3 \pm 7.4\%$ 。而由 5-HT 引起的去极化则不受影响。说明是脂氧合酶而不是环氧化酶参与了胞内信号的加工过程。

进一步用 ^3H 标记花生四烯酸, 用反相高压液相色谱 (RP-HPLC) 分析脂氧合酶代谢物羟酸的形成, 证实了花生四烯酸脂氧合酶代谢物 12-HETE 和 5-HETE 的大量释放确实是对 FMRF 酰胺的应答, 而在对照 (无 FMRF 酰胺) 和有 5-HT 存在的情况下, 则只能观察到本底量的 12-HETE 和 5-HETE。

脂氧合酶代谢物参与了 FMRF 酰胺作用的另一有力证据来自直接使用外源性脂氧合酶代谢物 12-HPETE、5-HPETE、12-HETE 和 5-HETE 分别作用于感觉神经元, 模拟 FMRF 酰胺的各种效应。结果表明, 12-HPETE 能完全激发 FMRF 酰胺样的各种作用, 5-HPETE 能引起部分效应, 而 12-HETE 和 5-HETE 则几乎没有模拟效应。结合上述实验结果表明, 活性第二信使来自氢过氧化物, 很可能就是 12-HPETE, 而不是来自羟酸 HETEs^[4]。

这些实验结果强有力地证明在神经细胞中花生四烯酸脂氧合酶产物是第二信使, 满足关于第二信使系统的所有标准。这些标准是: (1) 合成: 产生脂氧合酶代谢物的酶存在于神经元中; (2) 受体介导: 脂氧合酶代谢物的形成被神经肽 FMRF 酰胺促进; (3) 激发作用: 花生四烯酸及其脂氧合酶代谢物能激发神经元产生 FMRF 酰胺样的各种效应; (4) 选择性阻断: 阻断花生四烯酸释放和代谢的药物能有效地抑制其对 FMRF 酰胺的生理应答; (5) 终止作用: 有两条途径可将推断的第二信使的作用终止, 即 12-HPETE 可被还原成失活的羟酸或者重新参入膜磷脂中去^[4,12]。

尤其重要的是, 花生酸第二信使与其它已知的胞内第二信使有一个显著的不同之处。花生酸能自由离开产生它的细胞并作为第一信使作用于相邻的细胞^[13]。这一特性具有重要的生物学意义, 可解释某些特殊而有趣的生理学现象, 例如长时间强化作用 (long-term potentiation, LTP)^[7,14]。说明存在着神经元反式-突触调制 (trans-synaptic modulation) 的新方式^[7]。

此外, 令人吃惊和感兴趣的一个重要发现

钙调神经磷酸酶

魏 群 吴国利

(北京师范大学分子生物学及生物化学研究室)

提 要

钙调神经磷酸酶是70年代末80年代初发现的一种直接依赖于钙和钙调素的磷蛋白磷酸酶。它大量存在于脑内,分子量80k,由催化亚基A和调节亚基B 1:1组成。钙调神经磷酸酶是个多底物的磷蛋白磷酸酶,它的活性还受 Mn^{2+} , Ni^{2+} 等多种金属离子的调节。

钙调神经磷酸酶 (Calcineurin) 是70年代后期由加拿大籍华人王学荆教授、美国生物化学家 C. B. Klee 教授和美籍华人张槐耀教授的实验室分别独立发现^[1-3],最初作为环核苷酸磷酸二酯酶的热不稳定抑制剂从脑中提取出来的。由于它结合钙的性质及在脑中大量存在的事实,被命名为 Calcineurin^[4]。80年代前期,它又被发现和证实是一种起脱磷酸作用的磷蛋白磷酸酶^[5]。因此我们把它翻译成钙调神经磷酸酶。

一、分 布

钙调神经磷酸酶最初发现大量存在于脑及
是,同一种 K^+ 通道 (S-通道) 的活性,是受到两种完全不同的、功能相反的第二信使系统 (cAMP 系统和花生酸系统) 共同控制的, cAMP 系统控制其关闭,花生酸系统控制其开放。

花生四烯酸或 FMRF 酰胺的作用范围不会仅限于海兔感觉神经元。应用脂氧合酶和环氧化酶抑制剂进行研究,将会很快发现更多使用花生酸作为第二信使的生物系统。

参 考 文 献

[1] Rall, W., Sutherland, R. J.: *J. Am. Chem. Soc.*, 1957, **79**, 3608.
 [2] Altman, J.: *Nature*, 1987, **325**, 111.

神经组织中,后来报道它也少量存在于心肌,肝脏,肺脏,脾脏,骨骼肌,胎盘等其他组织中^[5-7]。在脑内,它们大部分存在于新纹状体(包括尾状核和豆状核外侧的壳)中^[8]。神经节的免疫化学表明钙调神经磷酸酶存在于突触密度区和树突微管区,并和突触的形成有密切关系。最近人们用单克隆抗体进行了钙调神经磷酸酶在脑内及多种组织内的进一步定位^[9]。

二、纯 化

钙调神经磷酸酶已从脑、骨骼肌、心肌等组织得到纯化。在纯化过程中通常用两种方法进行检测,一种是测酶活的方法,测定从适当的底

[3] Yatani, A. et al.: *Science*, 1987, **235**, 207.
 [4] Piomelli, D. et al.: *Nature*, 1987, **328**, 38.
 [5] Shuster, M. J. et al.: *Nature*, 1985, **313**, 392.
 [6] Belardetti, F. et al.: *Nature*, 1987, **325**, 153.
 [7] Bevan, S. et al.: *Nature*, 1987, **328**, 20.
 [8] Piomelli, D. et al.: *Soc. Neurosci. Abstr.*, 1986, **12**, 1340.
 [9] Flower, R. et al.: *Br. med. Bull.*, 1983, **39**, 260.
 [10] Shen, T. Y. et al.: *Adv. Drug. Res.*, 1977, **56**, 665.
 [11] Egan, R. W. et al.: *Prostaglandins, Leukotrienes and Lipoxins* (ed. Bailey, J. M.), Plenum, New York, 1984, 593—607.
 [12] Needleman, P. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, 1986, **55**, 69.
 [13] Bliss, T. V. P. et al.: *J. Physiol.*, 1986, **377**, 391.
 [14] Smith, S. J.: *Trends Neurosci.*, 1987, **10**, 142.

[本文于1988年6月15日收到]