

脑钠素的分子生物学

韩金祥 王鲁泉 王美岭

(山东省医科院基础所, 济南 250001)

提 要

脑钠素具有很强的利钠、利尿、扩张血管和降血压等功能,在调节体内水盐平衡和血压过程中起着极其重要的作用。脑钠素在体内分布广泛,特别在脑内相对含量较高。许多情况下,脑钠素和心钠素共用同一受体,但在猪大脑的穹隆下器官(SFO)存在脑钠素的特异受体。脑钠素的基因有种属差异,但不同种属脑钠素前体蛋白的N端和C端有较高的同源性。脑钠素含有一对二硫键,它是保持脑钠素生物活性所必需的。

关键词 脑钠素,分子生物学

脑钠素 (brain natriuretic peptide, BNP) 是 1988 年日本学者 Sudoh 在猪脑中发现的一种新的肽类物质^[1]。其功能与心钠素 (atrial natriuretic peptide, ANP) 类似,具有很强的利钠、利尿、扩张血管和降血压等作用,但它们是来自不同基因的表达产物。本文就近一年多来对脑钠素的生理功能,体内分布、受体,基因结构及其结构与功能等方面的研究进展作一简单综述。

一、生理功能

脑钠素主要生理功能与心钠素有类似之处,即具有很强的利钠、利尿、扩张血管和降血压等方面的作用,它在调节体内水及电解质平衡和血压过程中起着极其重要的作用。

Sudoh 等^[1]的研究表明猪 BNP(pBNP)的降血压效果与同剂量人 α -ANP (α -hANP) 的效果一致,鸡直肠松弛活力 (rectum-relaxant activity) 却是 α -hANP 的 2—4 倍。静脉注射合成的 pBNP 可明显引起大鼠尿分泌,且尿中电解质含量增加。在自发性高血压的大鼠心房和血浆中 BNP 的水平明显升高,在高血压和脑

卒中病人血浆中, BNP 浓度水平亦增加,提示 BNP 在高血压的发病中可能具有一定意义。

脑钠素的动力学研究表明, BNP 可以很快被组织所吸收,其分布相半减期为 3.33 ± 0.73 min,但清除速率较慢,消除相半减期为 232 ± 22.30 min。BNP 在血液内的廓清较 ANP 慢一倍多,因此, BNP 的作用可能比 ANP 维持时间长,其机制可能与其不同的降解系统的酶有关^[2]。

在猪脑中, pBNP 的含量至少是 pANP 含量的 13 倍^[3]。进一步研究表明,鼠脑室注射 BNP 不影响基础的血压、心率及水的摄取,但可抑制加压素 (AVP) 的分泌;也可抑制由血管紧张素 II (Ang II) 诱导的血压升高和摄水量增加,这些作用与 ANP 的作用类似^[4],说明在中枢神经系统, BNP 或者单独或者与 ANP 协同对调节血压、水的摄取及 AVP 分泌起着重要作用。1989 年, Morita 等^[5]在正常兔心窦压力感受器去神经 (SAD) 兔及 SAD 并切除迷走神经兔以 $0.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 静脉灌注 BNP, 30 min 观察发现,正常兔组的动脉压 (MAP) 降低 $1066 \pm 133 \text{ Pa}$, 肾神经兴奋 (renal nerve

activity, RNA) 增加 $48 \pm 4\%$, 心率不变. SAD 兔组的 MAP 降低 $2666 \pm 966\text{Pa}$, RNA 增加 $21 \pm 7\%$. SAD 并切除迷走神经兔组的 MAP 降低 $3333 \pm 533\text{Pa}$, RNA 不变. 用注射脱羟肾上腺素和三乙酸甘油酯方法升高或降低 MAP, 并作 MAP-心率(HR) 和 MPA-RNA 曲线, 发现 BNP 不能改变曲线的斜率但可使曲线向左平移. 这些结果说明: (1) 在正常兔中, BNP 通过心窦和心肺血压反射升高 RNA. (2) BNP 重调 HR 和 RNA 的压力反射控制而降低动脉血压.

二、体内定位

BNP 在哺乳动物脑中分布广泛且浓度较高. 1988 年, Ueda 等^[3]报告猪脑中 BNP 样免疫活性物质 (BNP-IR) 浓度为 0.63pmol/g , 比 ANP-IR 浓度高 13 倍, BNP 主要分布在髓桥、纹状体和脊髓中, 其次是下丘脑. Itoh 等^[6]用放射免疫方法 (RIA) 检测猪、犬脑中的 BNP 和 ANP, 发现 BNP 在延髓浓度最高, ANP 则主要分布于中脑和嗅球. 将来自开颅手术的额极切除组织和远离脑瘤的脑组织以及头部外伤病人的脑脊液 (CSF) 进行 RIA 分析, 结果表明在 CSF 中 BNP-IR 含量为 20.0ng/L , 正常脑组织二份, 每克湿组织中 BNP-IR 的含量分别为 480pg/g 和 240pg/g ^[7]. 关于猪脑中 BNP 的存在形式发现主要以 BNP-26 (α -BNP) 和 BNP-32 (β -BNP) 形式存在^[3]. 经高效液相色谱 (HPLC) 分析发现人脑组织和 CSF 中均有两种不同的 BNP 存在形式, 脑组织中以较大分子形式为主, 很可能是 BNP 前体 (γ -BNP), 在 CSF 中, 小分子单体 BNP 略占优势^[7].

BNP 虽然首先在猪脑中发现^[3], 但它在体内其他组织中也广泛存在, 在猪心中, 以心房浓度最高, 达 $148.7 \pm 23.3\text{ng/g}$, 心室中未检测到 BNP-IR ($<1\text{ng/g}$). BNP 的心房分泌速度为 $3.18 \pm 0.76\text{ng/min}$, 血浆浓度为 $4.2 \pm 1.3\text{pg/ml}$, 经凝胶过滤和反相 HPLC 分析, 发现心房中的 BNP 主要以高分子量的形式存在, α -BNP 和

β -BNP 形式含量不到 15%. 在心脏提取物、灌流液和血浆中的 BNP 和 ANP 的比例相等, 说明 BNP 和 ANP 类似, 在心脏合成然后分泌到循环系统^[8].

国内学者张孙曦等^[2]用大鼠股静脉插管给药研究 BNP 在体内的代谢分布情况, 结果表明, BNP 在不同组织的分配比例不同, 早期以肺最高, 其次为肾、肾上腺、肝、心室、卵巢、脾、心耳、主动脉. 这一分布可能与不同组织中血液分配有关, 也可能与这些组织中所含 BNP 的特异性受体有关. 由于肺内 BNP 的分布比例极高, 可能对肺血管或肺功能有重要作用, 此外, 它在生殖系统和脾脏分布较多, 提示其可能对生殖、免疫功能也有一定影响. 静脉注射 BNP 在中枢神经系统中几乎无 BNP 分布, 提示外周 BNP 可能不进入脑内.

三、脑钠素受体

BNP 发现不久, 人们就开始着手 BNP 受体的研究. 1988 年, Song 等^[9]发现牛动脉平滑肌细胞上存在高亲和力 BNP 受体, $K_d = 5.2 \times 10^{-10}\text{mol/L}$, 受体数 $B_{\max} = 398\text{fmol}/10^6$ 细胞, 并证明 BNP 和 ANP 在牛动脉平滑肌细胞上共用同一受体, 其作用由 cGMP 介导, 用合成 BNP 做实验, 发现 ^{125}I -pBNP 与鼠血管平滑肌培养细胞 (VSMC) 结合呈时间依赖关系并能升高细胞内 cGMP 水平. Scatchard 分析表明 pBNP 与位点的结合属单级结合. 其亲和力和受体数与 α -hANP 相同^[10]. 在上颈交感神经节及肾上皮细胞系 (LLC-PK₁) 也发现类似现象, 说明在很多情况下, BNP 和 ANP 共同作用于一个受体, 协同调节着生理功能.

BNP 能升高内皮、平滑肌、纤维和 LLC-PK₁ 肾细胞等的胞内 cGMP 水平, 并呈浓度正相关. 与 ANP 相比, BNP 有更强的激活鸟苷酸环化酶的作用^[9], 说明 BNP 与 ANP 类似, 其生理作用信号的传递涉及到第二信使 (cGMP) 的介导作用. 进一步研究牛肾上皮质的高结合力受体 ($K_d = 1.70 \times 10^{-10}\text{mol/L}$, $B_{\max} = 19.9\text{fmol/mg}$ 蛋白), 发现这是一个

135kD 的蛋白质,它与牛肾上腺皮质的 ANP 受体的分子量(135 kD)相等^[11].我们知道,肾上腺皮质 ANP 受体与鸟苷酸环化酶活性共存于同一条多肽链上,使该受体与鸟苷酸环化酶活性紧紧偶联.由此推测 BNP 的受体可能也与鸟苷酸环化酶活性共存于同一条多肽链上,但迄今尚缺乏直接的证据.

1988 年, Niwa 等^[12]用¹²⁵I-BNP 与猪脑穹隆下器官(SFO)温育,然后用放射自显影和计算机-微密度计(computer-assisted microdensitometry)进行图象分析,发现在 SFO 存在着不同于 ANP 和 AII 的 BNP 的特异性受体,其 $K_d = 0.385 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$, $B_{\text{max}} = 40.1 \text{ fmol/mg}$ 蛋白,说明 BNP 在 SFO 有特殊的生理功能,这种功能有待进一步研究.

四、基因结构

目前,日本、美国实验室已构建了猪、鼠、人的心房组织的 cDNA 文库,并克隆到编码脑钠素前体原的 cDNA,测定了它们的 cDNA 顺序,由此推测脑钠素前体原的一级结构,它们的基本结构一致(图 1).

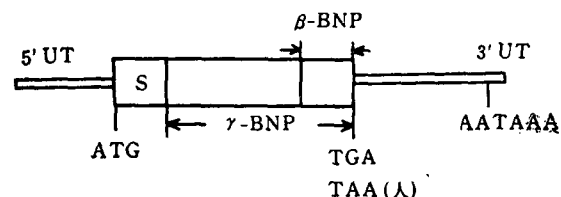


图 1 BNP cDNA 结构示意图

UT: 不翻译区, S: 信号肽

人的 BNP cDNA 全长为 689 bp, 为一个开放阅读框架, 编码 134 个氨基酸残基. 第一个 ATG 密码子出现在 5' 端第 99—101 位, TAA 终止密码子出现在 502—505 位, 3' 不翻译区为 287 bp 左右, 其中含有 AATAAA 顺序^[3]. 该顺序是许多真核生物 mRNA 的多聚 A 位点. 猪和大鼠 BNP cDNA 的基本顺序与人的脑钠素 cDNA 相似, 在 3' 不翻译区含有 AATAAA 多聚 A 位点^[14,15]. 上述三种脑钠素 cDNA 的 3' 不翻译区都含有 AT 富含区, 而 ANP 的

cDNA 中无类似结构^[16]. 富含 AT 的 mRNA 在细胞中不稳定. 因此可以认为 BNP 的表达的调控在转录水平与 ANP 不同.

最近, 美国科学家 Porter 等^[17]从猪的基因文库中克隆到约 1.5 kb 左右的基因片段, 该基因由 3 个外显子和 2 个内含子组成(图 2). 第一个外显子包括 5' 不翻译区, 信号肽顺序以及编码 γ -BNP 氨基端的 16 个氨基酸残基的顺序; 第二个外显子包括编码 γ -BNP 第 17—101 氨基酸残基顺序; 第三个外显子则编码最后 5 个氨基酸残基(其中第 102 位 Val 的密码的第一个核苷酸在第二外显子内)以及 3' 不翻译区. 每个外显子-内含子间均含有公认的裂解顺序.

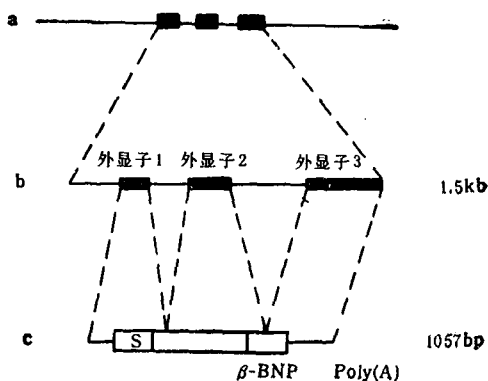


图 2 猪脑钠素基因和 mRNA 的结构

a: 猪 BNP 基因结构, b: ECORI 片段
c: BNP 的 mRNA 结构

根据 cDNA 基因结构可以推测出 BNP 前体原. 鼠、猪、人的 BNP 前体原分别是 121、131 和 134 个氨基酸残基的多肽. 前体原的 N 端 1—26 (猪 1—25), 氨基酸残基序列为信号肽, 其中有相当大比例的疏水性氨基酸残基. 在第 26 位(猪 25 位)是 Ser 残基, 此后为 His-Pro-leu-Gly, 这 5 个残基在三个种属中相当一致, 说明 BNP 前体原加工发生在 Ser-His 的连接处, 这样, 一旦从 BNP 前体原除去信号肽, 可直接产生由 95 (鼠)、106 (猪)、108 (人) 个氨基酸残基组成的 γ -BNP, γ -BNP 是脑钠素在心房中的贮存形式. 三个种属的 γ -BNP 有差异, 这与 γ -ANP 不同, 因为在哺乳动物中,

γ -ANP 有统一的 126 个氨基酸残基的长度.在三个不同种属的 γ -BNP 中,同源序列主要存在于 N 端和 C 端区,而哺乳动物的 γ -ANP 的整个分子都有很好的同源性.在 C 端鼠、猪、人的 γ -BNP 都有一对半胱氨酸,它们可以形成 17 个氨基酸残基组成的环,这 17 个氨基酸残基不论在不同种属的 BNP 还是与 ANP 相比,其同源性都很高.但 BNP 的 C 端最后 6 个氨基酸残基却没有较好的同源性.这与 ANP 也是不同的.在 BNP 的 C 端第 33 位有 Arg 残基,这是常见的加工位点,说明 C 端 32 肽很可能在此加工成为一个内源性形式.这在猪脑中已得到证实^[2].在猪的 γ -BNP 的 C 端第 27 位还有一个 Arg,可以进一步加工成 pBNP-26 作为另一个 pBNP 的内源性形式.这也得到证实^[3],而在鼠和人的 γ -BNP 中第 27 位是 His 和 Gln,没有加工位点,由此推测在人和鼠体内无 α -BNP 存在.

五、结构与功能

目前,有关 BNP 的结构与功能的关系研究的有限,但从上述基因结构和生理功能可推测某些结构和功能的关系.

在 BNP 结构中,有一对二硫键,它们形成一个 17 个氨基酸残基的环,这个环与 ANP 的类似环相差四个氨基酸残基,即有相当高的同源性,实验研究表明用二硫苏糖醇处理 ANP,使其二硫键还原打开,则 ANP 的生物活性完全丧失^[18],人工合成的 ANP 活性很低,经氧化形成二硫键后,其生物活性显著增加^[19],说明二硫键在 ANP 中占有极其重要的地位.脑钠素与心钠素的 17 残基环极为相似.由此可推测二硫键在 BNP 中是保持 BNP 利钠、利尿、降血压等功能所必需的.

六、结束语

心钠素的发现证实了心脏不仅仅是一个循

环器官,而且是一个内分泌系统,它改变了几百年来对心脏功能的肤浅认识,因此 ANP 被誉为是 80 年代十项重大发现之一,而 BNP 的发现却又给人们一种新的启示,那就是原认为由 ANP 调节的生理功能看来是由 BNP 和 ANP 通过双调节共同控制的,况且,BNP 的体内消除时间比 ANP 长,更有希望成为治疗高血压以及由此引起的疾病的有效药物. BNP 在脑内的含量比 ANP 高得多,且有特异性受体存在,由此推测作为神经肽 BNP 可能比 ANP 有更丰富的生理功能.总之,广泛深入地开展 BNP 的研究必将会有很大的社会效益和经济效益,同时也具有重要的理论价值.

参考文献

- 1 Sudoh T *et al.* *Nature*, 1988; 332(3): 78
- 2 张孙曦等,北京医科大学学报,1989;21: 68
- 3 Ueda S *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 155(2): 733
- 4 Itoh H *et al.* *Eur J Pharmacol*, 1988; 150: 193
- 5 Morita H *et al.* *Am J Physiol*, 1989; 256: R 792
- 6 Itoh H *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 158: 120
- 7 盛树力等,中华内分泌代谢杂志,1989;5: 131
- 8 Saito Y *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 158: 360
- 9 Song D L *et al.* *FEBS Lett*, 1988; 232: 125
- 10 Hirata Y *et al.* *FEBS Lett*, 1988; 238: 415
- 11 Takayanagi T *et al.* *J Biol Chem*, 1986; 261: 5817
- 12 Niwa M *et al.* *Neurosci Lett*, 1988; 95: 113
- 13 Sudoh T *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 159: 1427
- 14 Maekawa K *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1988; 157: 410
- 15 Kojima M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 1989; 159: 1420
- 16 Nemer M *et al.* *Nature*, 1984; 312: 654
- 17 Portor J G *et al.* *J Biol Chem*, 1989; 264: 6689
- 18 Currie M G *et al.* *Science*, 1984; 223: 67
- 19 Atlas S A *et al.* *Nature*, 1984; 301: 717

[本文于 1989 年 12 月 30 日收到,

1990 年 3 月 26 日修回]