

神经系统中的一氧化氮

高博 尹桂山

(河北医科大学生物化学教研室, 石家庄 050017)

摘要 一氧化氮 (NO) 是一种广泛存在的独特的生物信使因子和效应因子。NO 参与脑内许多生理功能和病理生理过程。NO 调节神经递质释放和脑血流, 参与神经发育和基因表达调控。NO 可能作为一种逆行信使物质参与海马的长时程突触传递增强和小脑的长时程突触传递抑制。过多的 NO 则具有神经毒性并与许多神经系统疾病有关。

关键词 一氧化氮合酶, 神经传导, 神经毒性

学科分类号 Q55, R74

几十年来, 一氧化氮 (NO) 一直被认为是一种有毒气体, 一种污染物。当人们发现作用于 NMDA 受体的兴奋性神经递质谷氨酸刺激脑胶质细胞产生 NO 时, 才第一次认识到 NO 在神经系统中的应用。NO 是一个性质不稳定的“气体型”小分子, 通过氧化还原反应发挥其所有的生物功能。NO 合成后没有专门的贮存机制, NO 生成后就向四周扩散并直接透过细胞膜而作用于邻近细胞。传统的神经递质活性的终止通过再摄取或者酶降解, NO 活性的终止是指当它与底物化学反应完毕。NO 作用的广泛性和作为信使因子的独特性使之成为 90 年代以来研究的热点之一。

1 一氧化氮合酶 (NOS) 异构体及其分布

应用蛋白质生化和分子克隆技术已分离出至少三种独立的 NOS 基因, 并以组成或以克隆的先后次序命名为神经型 NOS (nNOS) 或 I 型 NOS、巨噬细胞型 NOS (iNOS, 又称免疫型) 或 II 型 NOS、内皮型 NOS (eNOS) 或 III 型 NOS。这三种异构体都可在中枢神经系统中得以表达。NOS 分为 Ca^{2+} 依赖型和 Ca^{2+} 非依赖性的可诱导型, nNOS 和 eNOS (cNOS) 是 Ca^{2+} -CaM 依赖型, 在多数情况下可基本表达。iNOS 是 Ca^{2+} 非依赖型, 它的表达主要在转录水平调节。

eNOS 主要分布在脑血管组织, 一小部分神经元也表达 eNOS。iNOS 在正常脑中不表达, 但病毒感染后免疫激发或外伤后的星形细胞和小胶质细胞中可诱导产生。nNOS 主要在神经元中表达, 神经源性的 NO 调节突触可塑性, 神经信号传导, 参与局部缺血后的神经毒性。nNOS 在神经系统中有广泛的分布^[1], 在大鼠的大脑皮质、海马及纹状

体等区域中, 含 nNOS 的神经元占该区域所有细胞的 1%~2%, 这些细胞主要是无棘突细胞, 它们散在性地分布在整个区域。在海马中, nNOS 主要存在于 CA1 区的中间神经元及海马齿状回的颗粒细胞中, 海马的锥体细胞并不含 nNOS, 但含 eNOS; 在下丘脑, nNOS 主要分布在视上核和视旁核; 在中脑, nNOS 存在于上下丘的表层; 在小脑, nNOS 主要分布在颗粒细胞和它们发出的水平纤维以及筐状细胞中, 但蒲肯野细胞并不含 nNOS。此外, 在嗅球的颗粒细胞层及视觉系统也有 nNOS 的存在; NOS 也存在于脊髓胸段脊神经节的内脏传入神经。用原位杂交方法发现 nNOS mRNA 的分布与 nNOS 本身的分布一致, 小脑中 nNOS mRNA 含量最高, 其次是嗅球、上下丘、海马及大脑皮质。此外, 在脑血管外膜的神经纤维中也含有 nNOS。

2 NO 的生成及调节

用生物化学和分子生物学方法研究了 NO 的生物合成。NOS 催化 L-精氨酸 (L-Arg), 消耗 1.5 mol NADPH 和 2 mol 分子氧, 生成 NO 和 L-瓜氨酸。NOS 通过与它的各种辅助因子相互作用并以特殊的形式发挥催化活性。NOS 的催化形式是二聚体。nNOS 和 eNOS 在合成时以结合了 FMN 和 FAD 的单体形式存在。NOS 单体结合血红素、四氢叶酸和 L-Arg 形成较松驰的二聚体^[2]。细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高引起 Ca^{2+} /CaM 聚合物与 nNOS 或 eNOS 结合, CaM 是一个分子开关, Ca^{2+} /CaM 的结合诱发二聚体的构象改变, 使电子

从含有黄素蛋白结合区的还原酶部分流向含有血红素区的催化位点。而无活性的 iNOS 的单体即使在细胞内 Ca^{2+} 浓度很低时也与 CaM 结合。因此, nNOS 和 eNOS 的激活和 NO 的产生需依赖细胞内 Ca^{2+} 作为催化剂, 而 iNOS 一合成就产生 NO。由此可知, iNOS 活性的调节必定是在 mRNA 水平、蛋白质合成和降解水平上。

nNOS、eNOS 和 iNOS 的基因组结构最近已报道。在 nNOS 5' 调节序列中发现了许多转录因子的保守结合位点。在 nNOS 上有辅助因子和底物结合位点为 NO 产生的调节提供了许多机会。L-Arg 的类似物, 象 N-L-Arg, 竞争结合到催化位点从而降低 NO 的形成。蛋白质磷酸化对 eNOS 亦起调节作用。从大鼠小脑克隆的 eNOS 的 cDNA 显示该酶有磷酸化位点。nNOS 可被 Ca^{2+} /CaM-依赖的 PK、cAMP 依赖的 PK、cGMP 依赖的 PK、PKC 所磷酸化。这些酶对 NOS 的磷酸化降低了 NOS 的催化活性。Caleineurin 是一种蛋白质磷酸化酶, 催化 NOS 脱磷酸化, 引起 NOS 的催化活性升高。由此可见, 磷酸化在 nNOS 的调节中可能起关键作用。

多数细胞因子可影响 NOS 活性, 它们主要作用于转录水平。IFN- γ , TNF- α , IL-1 以及脂多糖上调 NO 合成, 而 IL-4, IL-13 以及 TGF- β 可下调 NO 合成, IL-10 的作用依据特定的情况对 NO 生成的作用可截然相反。例如 IL-10 对暴露于 IFN- γ 的鼠巨噬细胞 NO 生成有抑制, 而对暴露于 IFN- γ 和 TNF- α 两者的细胞则可促进 NO 的生成^[3,4]。最近研究表明, NO 可能抑制 ET-1 产生, 反过来 ET-1 可能促进 NO 形成^[5], 但其机理尚不清楚。

3 NO 在神经系统中的作用

外周神经系统的研究为 NO 递质功能提供了最好的证据。NOS 抑制剂选择性抑制胃肠道非肾上腺非胆碱 (NANC) 能介导的松弛作用。另外, nNOS 在肠肌间神经丛中的选择定位也表明 NO 可能作为 NANC 神经递质发挥作用。nNOS 基因敲除的小鼠的胃明显扩大, 内环肌层肥大。这可能是由于 NO 对幽门扩约肌松弛作用降低的一种补偿反应。另外, NO 的缺乏在幽门狭窄中可能也起一定作用。nNOS 高度集中在轴索传递中的骨盆神经丛。最近研究表明 NO 作为 NANC 神经递质调节阴茎勃起。有趣的是 eNOS 可以补偿 nNOS 的缺乏, 在无 nNOS 小鼠的海绵窦中, eNOS 免疫反应性上调。

大脑皮层和视网膜血管在外膜层自主神经中含有 nNOS, 支配血管的 nNOS 神经元主要来自蝶腭神经节细胞。eNOS 也定位于这些血管的内皮细胞, 这是调节脑血流 NO 的两个主要来源^[6]。在中枢神经系统, NO 可能通过 NOS 神经元的激活调节脑血流。nNOS 也存在于肾上腺髓质的分泌神经节细胞和纤维, 在此通过 NANC 机制调节血流。

NOS 抑制剂阻断 NMDA 受体介导的神经递质从大脑皮质或纹状体突触体中的释放, 由此提供了 NO 在神经递质释放中作用的证据。NO 的作用方向似乎与特定的脑区有关。在下丘脑之下或之后的小脑、下丘脑、脊髓, NO 多抑制递质的释放。在小鼠大脑皮层神经元, NO 供体硝普钠、S-亚硝基乙酰青霉胺 (SNAP) 可诱导 ^3H -GABA 或 ^{14}C -Ach 的释放, 这一效应是由 NO 与超氧阴离子反应生成的过氧化亚硝酸根 (ONOO^-) 介导的。在大鼠海马脑片中, 多报道 NO 可促进 ^3H 去甲肾上腺素的释放。NO 气体、NO 供体 SNP 和 SNAP 及 NO 合成的底物 L-精氨酸均有此作用。在大鼠纹状体脑片中, L-精氨酸和 NO 供体鲁辛黑盐可增加多巴胺 (DA) 的基础释放, 这一效应可被氧化血红蛋白抑制。NO 促进 DA 释放的作用是 cGMP 和 Ca^{2+} 非依赖性的。NO 可能也参与下丘脑和垂体神经肽的释放^[7~9]。NO 参与谷氨酸或去甲肾上腺素对下丘脑 LHRH 释放的刺激作用和 GABA 对它们的抑制作用。NO 介导 DA 和心房钠因子对催乳素从前垂体释放的抑制作用。NO 影响神经递质释放的机制尚不清楚, 然而, NO 可能作用于 Ca^{2+} 敏感和 Ca^{2+} 不敏感的突触囊泡池。而且, NO 和 NO 刺激产生的 cGMP 可能直接调节离子通道。NOS 对神经递质释放的作用可能与 cGMP 激活 cGMP 依赖的 PK, 从而增强突触小泡蛋白的磷酸化有关。

最近报道^[10], NO 合成的阻断剂抑制下丘脑室旁核中应激诱导的 FOS 蛋白表达。FOS 蛋白在室旁核 CRF 和 AVP 基因表达的调节中起作用。由此推断, NO 通过对 FOS 表达的影响参与应激后室旁核神经元的 CRF 和 AVP 基因的激活作用。

海马长时程突触传递增强 (LTP) 和小脑的长时程突触传递抑制 (LTD) 是突触可塑性的形式, 突触的可塑性被认为与学习记忆有关。海马的 LTP 可被 NOS 抑制剂减弱或阻断, 而且这一作用被 L-Arg 所逆转。在海马神经, NO 提高自发的小规模兴奋突触后电位, 而且直接用 NO 可诱发 LTP。这表明 NO 可能是逆行性信使因子。NOS

抑制剂和结合 NO 的血红蛋白干扰 LTP 的建立, 直接把 NOS 抑制剂注入 CA1 锥体神经元可阻断 LTP. 最初认为 LTP 是相当特异性的, 而现在认识到它可通过扩散信号 NO 而扩散到周围的神经元. LTD 被认为是由于突触后 AMPA 受体敏感性下降所致. NO 可能作为一种重要的信使分子参与 LTD 的形成. NO 产生后扩散到蒲肯野细胞激活 GC, 导致 cGMP 增加, 进而激活依赖于 cGMP 的蛋白激酶, 使 AMPA 受体或有关分子磷酸化, 最终导致 AMPA 受体敏感性下降, 形成 LTD.

NO 在神经系统形态发生中也发挥作用. nNOS 在来自大鼠胚胎 E14~ E19 的大脑皮层神经元中一过性表达, 这些细胞的突起可延伸到纹状体和丘脑. 大鼠嗅神经胚胎发育突触形成期表达 nNOS, 出生后快速降低, 7 d 后就检测不到. 在嗅球切除术后再生的嗅神经中 nNOS 可快速诱导, 尤其在过生长的轴索中更为丰富^[11-13]. nNOS 的短暂表达可能反映了它在发育过程中的作用.

4 NO 与神经毒性及神经生理紊乱

在正常生理状态下, NO 主要是一种神经信使分子, 然而大剂量的 NO 像谷氨酸一样可以启动一个神经毒性级联反应. 通过 NMDA 受体起作用的过量谷氨酸在脑缺血中介导细胞死亡. NMDA 受体的激活和由此产生细胞内 Ca^{2+} 水平的增加可能引起更多形式的谷氨酸神经毒性. 来自 nNOS 的 NO 在 NMDA 神经毒性中起重要作用, 用 NOS 抑制剂处理或去除 L-Arg 或加入还原血红蛋白均可阻断这种毒性. 在培养的豆状核和海马中也可观察到 NOS 抑制剂对 NMDA 神经毒性的阻断.

在几种动物模型中, NOS 抑制剂阻断由中脑动脉梗塞引起的局部缺血, 神经源性 NO 在中风后的神经损伤中发挥作用. 研究表明, nNOS 基因敲除小鼠与对照组的野生型鼠相比梗塞面积减小. NO 可能在神经退行性疾病和其他形式的神经毒性中起作用, NO 是中枢神经系统氧毒性的重要介子, NOS 抑制剂保护小鼠免于中枢神经系统氧毒性. NO 与早老性痴呆 (Alzheimer's disease, AD) 病理过程有关. NOS 抑制剂对人 β -淀粉样蛋白片段产生的毒性有保护作用^[14], AD 中 NOS 神经元也相对增多. nNOS 基因敲除小鼠明显抵抗 MPTP 帕金森氏综合征的一种动物模型神经毒性. NO 在 AIDS 痴呆的病理发生学中可能也发挥作用, HIV 包被蛋白 gp120 诱导的神经毒性部分是由于

NOS 的激活. 包被蛋白 gp160、gp120、gp41 在小胶质和星形细胞中诱导 iNOS, 有研究表明感染 HIV 并患痴呆的病人 iNOS 表达明显升高^[15,16]. NO 的过多产生可能在中枢神经系统炎症中也起作用. 在多发硬化化的脱髓鞘区也可观察到 iNOS 诱导; 在细胞性脑膜炎 NO 产生增多, 偏头痛患者对 NO 的敏感性增强; NO 可诱发癫痫也可抗癫痫, 这种双面作用可能是 NO 的氧化还原状态不同所致, 局部的氧化还原微环境可以改变 NO 的氧化还原状态, 使其具有神经保护作用或神经毒性作用.

NO 在中风和其他神经退行性疾病中的作用推动了对选择性 nNOS 抑制剂的研究, 但这些抑制剂在治疗学中尚未发挥作用. 另一个发现神经保护的策略是鉴定靶结构, 这些靶结构启动神经毒性级联反应.

NO 或 ONOO^- 的毒性反应作用机制有多种. NO 作用于巯基使与能量代谢或抗氧化有关的酶失活, NO 作用于铁-硫基团, 抑制线粒体呼吸链作用. ONOO^- 使 SOD 的酪氨酸硝基化, 使高剂量 SOD 丧失保护作用. SOD 结合 NOS 抑制剂可增强其保护作用. NO 抑制 DNA 合成并损伤 DNA, 损伤的 DNA 可激活多聚 ADP-核糖合成酶 (PARS)^[17-19], PARS 在作用过程中可把几百个 ADP 核糖基团加到核蛋白上, 而每一个核糖基团的加入消耗 1 mol NAD, 重新合成 NAD 需 4 mol ATP, 这样 PARS 的激活能快速耗竭能量贮备, 导致细胞死亡. PARS 抑制剂保护皮质细胞培养物免于谷氨酸和 NO 的神经毒性.

NO 这种独特的生物信使因子的发现使我们对神经递质和神经信号传导观念有了许多改变. NO 是一种重要的生物调节因子, 而且也参与许多神经病理过程, 这不仅给发现新的信使因子以启发而且对开发新的药物开辟了一条新的途径.

参 考 文 献

- 1 强文安, 刘枝俏, 刘捷, 等 (Qiang W A, Liu Z Q, Liu J, et al). 脑组织一氧化氮合成酶的特性及其与 NADPH-diaphorase 相关性研究. 中国神经免疫学和神经病学杂志 (Chin J Neuroimmunol and Neurol), 1996, 3 (4): 191~193
- 2 Back K J, Thiel B A, Lucas S, et al. Macrophage nitric oxide subunits purification, characterization and the role of prosthetic groups and substrate in regulating their association into a dimeric enzyme. J Biol Chem, 1993, 268 (28): 21120~21129
- 3 Jacob R, George F K, Floyd E B. Interleukin-2 induces CRF release from the amugdala and involves a nitric oxide mediated signaling. J Pharm Exp Ther, 1995, 272 (2): 815~824
- 4 Naass L, Roux F, Beaus F, et al. Ethanol potentiates lipopolysaccharide or IL-2 beta induced nitric oxide generation in

- RBE4 cells. Eur J Pharm, 1996, **313** (17): 273~ 277
- 5 卞留贯, 孙素芳, 田恒力, 等 (Bian L G, Sun S F, Tian H L, *et al*). 一氧化氮, 内皮素-1 在兔脑局灶性脑缺血中相互关系. 上海医科大学学报 (Acta Academiae Medicine Shanghai), 1997, **24** (1): 45~ 48
 - 6 Huang P I, Huang Z h, Mashimo H, *et al*. Hypertension on mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. Nature, 1995, **377** (6546): 239~ 242
 - 7 Seilicovich A, Duvilanski B H, Pisera D, *et al*. Nitric oxide inhibits hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone release by releasing gaminobutyric acid. Pro Natl Acad Sci USA, 1995, **92** (8): 3421~ 3424
 - 8 Duvilanski B H, Zamruno C, Seilicovich A. Role of nitric oxide in control of prolactin release by the adenohipophysis. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, **92** (1): 170~ 174
 - 9 Calza L, Giardino L, Pozza M, *et al*. Time-course changes of nerve growth factor, corticotropin-releasing hormone and nitric oxide synthase isoforms and their possible role in the development of inflammatory response in experimental allergic encephalomyelitis. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, **94** (17): 3368~ 3373
 - 10 Amir S M, Funk D. Blockers of nitric oxide synthase inhibit stress activation of C-Fos expression in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rats. Neuroscience, 1997, **77** (3): 623
 - 11 Rokams A J, Bredt D S, Dawson T M, *et al*. Nitric oxide mediates the formation of synaptic connections in developing and regenerating olfactory receptor neurons. Neuron, 1994, **13** (1): 289~ 294
 - 12 Ding M, Merrill J E. The kinetics and regulation of the induction of type II nitric oxide synthase and nitric oxide in human fetal glial cell cultures. Mol Psychiatry, 1997, **2** (3): 117~ 119
 - 13 Shoham S, Norris P J, Baker W A, *et al*. Nitric oxide synthase in ventral forebrain grafts and in early ventral forebrain development. Brain Res Dev Brain Res, 1997, **99** (18): 155~ 166
 - 14 Tomas T, Toma G, McLendon C, *et al*. β -Amyloid mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. Nature, 1996, **380** (6571): 168
 - 15 Koka P, He K Y, Zack J A, *et al*. Human immunodeficiency virus envelope proteins induce interleukin tumor necrosis factor alpha and nitric oxide in glial cultures derived from fetal neonatal and adult human brain. J Exp Med, 1995, **182** (4): 941~ 951
 - 16 Wildemann B, Sasaki M, Glass J D, *et al*. Induction of immunologic nitric oxide synthase in AIDS dementia. Soc Neurosci Abstr, 1995, **21** (3): 1520
 - 17 Zhang J, Dawson V L, Dawson T M, *et al*. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. Science, 1994, **263** (4): 687~ 689
 - 18 Heller B, Wang Z Q, Wagner E F, *et al*. Inactivation of the poly (ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. J Biol Chem, 1995, **270** (9): 11176 ~ 11180
 - 19 Hu J, Van E L. S100 beta induces apoptotic cell death in cultured astrocytes via a nitric oxide dependent pathway. Biochim Biophys Acta, 1996, **1313** (11): 239~ 245

Nitric Oxide in the Nervous System. GAO Bo, YIN Gu-Shan (Department of Biochemistry, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China).

Abstract Nitric oxide (NO) is a ubiquitous and unique biological messenger molecule and effector. Discoveries have been made regarding the physiologic and pathologic roles of NO in the nervous system. Effects of NO have been identified on neurotransmitter release, neural morphogenesis, regulation of gene expression and cerebral blood flow. NO may play a role in long-term potentiation of synaptic transmission in the hippocampus and long-term depression of synaptic transmission in the cerebellum as a retrograde messenger. Excessive production of NO is neurotoxic and is implicated in a variety of neurological disorders.

Key words nitric oxide synthase, neurotransmission, neurotoxicity

全国生物医学学术研讨会征文通知

中国科技未来研究会生物医学专业委员会定于 1999 年 7 月在上海 (或苏州) 召开全国生物医学学术研讨会。现将会议征文事宜通知如下:

征文内容: 生物医学基础理论研究与新技术、新成果、新材料的临床应用研究; 生物医学物理试验研究与临床应用研究 (如电、光、磁、声等技术与设备)。征文要求: 论文限 5000 字之内, 并附 400 字论文摘要, 字迹务必清楚。每篇论文汇寄 20 元评审费。大会将评选优秀论文奖, 颁发奖品或奖金; 并公开出版论文集, 颁发论文证书。截稿日期: 1999 年 5 月 30 日。

评审费与来稿请寄: 北京海淀区中国林科院 54 号信箱 617 室高大海收, 邮政编码: 100091。

欢迎与生物医学相关的企、事业单位协助我们举办本届会议, 并希望能给予大会支持或赞助。

联系电话: 010-62889029 (高先生) 021-65683428 (何英介)

BP 机: 010-68154499 呼 99079

中国科技未来研究会生物医学专业委员会