

内源性气体硫化氢在中枢神经系统中的作用

张礼星* 王晓霞¹ 宋水江² 金伟军

(浙江工业大学生物环境学院, 杭州 310014; ¹加拿大 Saskatchewan 大学医学院;

²浙江大学医学院附属第二医院神经科, 杭州 310009)

摘要 内源性硫化氢(H_2S)可以刺激神经细胞cAMP水平增加, 提高NMDA受体介导的突触后兴奋性电位, 提高诱导海马长时程增强。 H_2S 不仅具有神经调节剂的功能, 还有神经保护剂的功能。 H_2S 自身并不能将细胞从氧化应激中解救出来, 但是它能通过提高胞内有效的抗氧化剂——还原型谷胱甘肽的含量而起到保护神经元的作用。对 H_2S 的研究刚刚起步, 对其在神经系统中的作用机制开展研究将有助于了解其在神经元保护方面所起的作用。

关键词 硫化氢; 中枢神经系统; 神经元保护

硫化氢(H_2S)是众所周知的有毒气体。以前的研究都是针对其毒性, 只是近几年在大鼠、牛和人类等脑中发现了含量相当高的内源性 H_2S (50~160 $\mu\text{mol/L}$)后, 才认为它具有生理功能。最近的研究证实, H_2S 可能与学习和记忆以及多种遗传性疾病(比如阿尔茨海默病)的脑功能障碍有关。 H_2S 的作用特点有别于另外两种气体信号分子——NO及CO, 它的信号转导途径和作用机理尚未阐明。越来越多的证据表明, 内源性 H_2S 是一种新的气体信号分子, 对中枢神经系统功能有着重要的调节和保护作用, 对其在大脑内的功能研究是一个的崭新课题, 必将开辟一个新的医学研究和应用领域, 具有重要的理论和临床意义。

1 H_2S 在中枢神经系统的产生和生理功能

在哺乳动物中, H_2S 通过胱硫醚 γ -裂解酶(CSE)和胱硫醚 β -合成酶(CBS)两个酶产生。CSE存在于各种血管组织中, 在回肠、门静脉、胸主动脉和肝等均有表达。CBS存在于大鼠的肝、胰、肾和人的大脑和肺。CBS是脑和神经系统产生 H_2S 的酶, 主要分布在海马、小脑、皮层和脑干等部位。通过对CBS的抑制剂(如羟胺)、激活剂(S-腺苷-L-蛋氨酸, 即AdoMet)^[1]、CBS基因剔除大鼠^[2]等的研究表明, CBS是脑中产生 H_2S 的唯一的酶。

内源性 H_2S 的产生受很多因素调节, 研究表明 H_2S 产生的调节机制至少可分为三类: 第一类是快调节, 如 Ca^{2+} /钙调蛋白介导的信号转导途径, 可快速调节 H_2S 的生成量; AdoMet的结合能激活CBS, 也可快速调节 H_2S 的水平; 研究表明L-谷

氨酸也会短时间内大幅增强 H_2S 的产生^[3]。第二类是慢调节, 是通过转录因子或睾丸激素上调CBS的活性, 从而升高 H_2S 的生成量。第三类是基础水平调节途径, H_2S 含量与年龄和性别存在相关性, 如雌性大鼠含有的 H_2S 量比雄性大鼠低。

H_2S 具有神经调节剂的功能。高于生理浓度的 H_2S 会抑制兴奋性突触后电位(EPSP), 但基础浓度的 H_2S 反而可以加强EPSP。在生理浓度范围内, 内源性 H_2S 可以提高诱导海马CA1区区长时程增强(LTP)^[4], 说明 H_2S 与学习和记忆有关; H_2S 还可通过下丘脑-垂体-肾上腺轴来参与神经内分泌功能的调节^[4]。

H_2S 能提高诱导LTP, 但其作用的机制与NO和CO不同^[1]。首先, 在阻断NMDA受体的情况下并没有观察到 H_2S 能诱导LTP, 这表明 H_2S 诱发的LTP为NMDA受体依赖型。而NO或CO诱导LTP是不需要NMDA介导的。其次, H_2S 的信号转导途径很独特。生理浓度的 H_2S 可通过激活cAMP途径, 从而增强NMDA受体介导的反应。内源性 H_2S 浓度的高低会影响其诱导神经元和神经胶质细胞产生cAMP的水平, 因为NMDA受体是通过cAMP级联来调节的^[5]。而其他气体信号分子, 如NO和CO, 是通过激活鸟苷环化酶(GC)提高cGMP水平来调节NMDA受体水平的。第三, H_2S 是不是一种反向传递物质尚无定论。

2 CBS的结构和活性调节

收稿日期: 2005-04-22 接受日期: 2005-12-27

* 通讯作者。Tel: 0571-88320823, Fax: 0571-88320765, E-mail:

lxzhang@zjut.edu.cn

2.1 CBS 的结构

人类 CBS 是一个由 4 个亚基聚合而成的同型四聚体。每个亚基的分子量大约为 63 kDa, 由 551 个氨基酸残基组成。CBS 是唯一的 5'-磷酸吡哆醛 (PLP) 和亚铁血红素依赖性的酶。CBS 酶分子结构可分为 3 个部分, 即 N 末端、高度保守的催化区和调节区 C 末端, 它们分别是亚铁血红素、PLP 和 AdoMet 等的结合区^[6]。N 末端含有大约 70 个氨基酸残基。C 末端包含高度保守的 CBS1(415~468) 和保守度较低的 CBS2(486~543), 在 C 末端还含有一个由 19 个氨基酸残基组成的钙调蛋白结合区。

2.2 CBS 的活性调节

N 末端是亚铁血红素的结合区。亚铁血红素的作用还不是很清楚, 但是它对维持 CBS 的活力是很重要的, 因为去掉 N 末端的 1~70 个氨基酸残基, 酶活力会显著降低。

当 Ca^{2+} /钙调蛋白不存在时, C 末端的钙调蛋白结合区会弯曲并覆盖催化区, 这时 CBS 的活性维持在基础水平; 当钙调蛋白结合到该结合区后, CBS 的立体构像发生变化, 暴露出催化部位, CBS 从抑制状态转变为激活状态^[3]。AdoMet 结合到 C 末端的调节区域, 也会改变酶的立体构像, 可以将 CBS 活性提高 3 倍左右。羟胺和氨基氧乙酸则会抑制 CBS 的活性。如果用蛋白酶水解切除 C 末端, CBS 的酶活力反而比原酶提高了 2.7 倍, 产生类似于 AdoMet 的作用, 因此 Pazicni 等^[7]认为 C 末端是抑制性的(冗余)。

在还原性环境中, 当 NO 结合到 CBS 的亚铁血红素部分时, 会抑制酶的活性。但在非还原环境中, 并在 Ca^{2+} /钙调蛋白存在的条件下, 硝普钠 (SNP) 能将 CBS 的活力提高 3 倍; 而其他的 NO 供体, 如 S-亚硝基-N-乙酰青霉胺 (SNAP), 却对 CBS 的活力没有任何影响, 说明 SNP 的作用并不依赖于 NO。Eto 等^[8]认为, Ca^{2+} /钙调蛋白不存在时, SNP 不能接近亚铁血红素上的半胱氨酸残基。这些研究表明, SNP 的结合可能也会引起 CBS 立体构像的改变, 从而提高酶的活力。

3 H_2S ——神经保护剂

阿尔茨海默病 (AD) 是一种神经退行性疾病, 其病理特征是老年斑和神经元纤维缠结, 典型临床表现为大脑认知能力的降低。近年来的研究表明, H_2S 与 AD 有关。Clarke 等^[9]发现, AD 病人血清中

高半胱氨酸水平显著高于正常人。Eto 等^[10]对 13 例 AD 患者的尸检发现脑组织中内源性 H_2S 含量仅为 $(0.22 \pm 0.005) \text{ nmol/mg}$, 而正常脑组织中含量为 $(0.49 \pm 0.007) \text{ nmol/mg}$ 。研究发现, 患者脑中 AdoMet 的含量 $[(0.16 \pm 0.03) \text{ nmol/mg}]$ 大大地低于正常人 $[(0.53 \pm 0.04) \text{ nmol/mg}]$, 他们推测可能是由于 AD 病人脑中 AdoMet 的含量较低, 影响了 CBS 活性, 从而降低了 H_2S 的合成。

H_2S 对神经系统的毒性是众所周知的, 但是生理浓度的 H_2S 是否对神经细胞具有保护作用? 现已知道含硫化合物, 如二甲基硫丙酸盐 (DMSP) 及其酶解产物二甲基硫 (DMS), 是羟自由基 ($\cdot\text{OH}$) 和其他活性氧自由基的内源性清道夫^[11]。作为内源性的还原剂, 由于 H_2S 是通过氧化应激而产生的^[12], 因此它有可能具有抗氧化的功能。

NO 及 CO 能激活鸟苷环化酶 (GC) 从而产生 cGMP, 而 H_2S 会诱导细胞产生 cAMP。早期研究发现, cAMP 的很多生理功能都与 cGMP 相拮抗, 即所谓的“阴阳学说”, 是否可以推测 H_2S 和 NO 也可能起着“阴阳”两方面的作用? 过量的 NO 具有神经毒性, 它与超氧化物形成过氧亚硝基 ONOO^- ($\text{NO} + \cdot\text{O}_2^- \rightarrow \text{ONOO}^-$)。ONOO⁻ 是有毒性的自由基, 会造成大量的 DNA 损伤。聚 ADP-核糖-聚合酶 (PARP) 是 DNA 损伤的修复酶, 可被损伤的 DNA 片段激活。当存在大量的 DNA 损伤时, PARP 的合成会消耗大量的 NAD, 由 ATP 重新合成 NAD 会导致细胞 ATP 的减少, 由于能量的衰竭而导致细胞死亡。已经有研究表明, 在培养的 SH-SY5Y 细胞中, H_2S 起着和还原型谷胱甘肽 (GSH) 类似的作用, 能显著抑制 ONOO⁻ 介导的酪氨酸硝基化。 H_2S 也能抑制 ONOO⁻ 诱导的细胞毒性、细胞死亡、胞内蛋白的硝基化和氧化。而在 AD 患者脑中 H_2S 含量的减少可能是由于 H_2S 作为 ONOO⁻ 的清道夫而消耗了^[13]。Han 等^[14]发现, H_2S 可以改善周期性发生的热惊厥 (FS) 引起的海马区损伤。由于脑中胞外 GSH 的含量很低, H_2S 可能取代其作用而抑制次氯酸介导的脑氧化损伤^[13]。因此, H_2S 有拮抗过量 NO 的作用。那么, H_2S 和 GSH 之间存在什么关系呢?

谷氨酸的毒性分两种, 一种是受体介导的兴奋毒性, 另一种是非受体介导的氧化毒性^[15]。后者最近被重新命名为氧化凋亡 (oxytosis)^[16], 是指由于谷氨酸抑制了胱氨酸的摄入而引起氧化应激, 从而诱导细胞的程序性死亡, 是独立于离子型谷氨酸受体

的。氧化凋亡在皮质未成熟神经元原代培养细胞(没有离子型谷氨酸受体)和海马切片中都观察到。Kimura 等^[17]发现, H_2S 以一种剂量依赖型的方式保护细胞免受谷氨酸的氧化毒性作用。那么 H_2S 是以一种什么样的机制起作用的呢?

谷氨酸和胱氨酸共用一个氨基酸跨膜转运体, 二者存在竞争的现象。当胞外谷氨酸浓度较高时, 就会抑制胱氨酸进入胞内。进入胞内的胱氨酸可以转化为半胱氨酸, 然后合成 GSH, 因此胞外高浓度谷氨酸会降低胞内 GSH 的含量。研究发现, 在未处理的细胞和被谷氨酸耗尽了 GSH 的细胞中, H_2S 均能提高胞内 GSH 含量^[17], 而且胞内 GSH (1~8 mmol/L) 的含量大大地高于 H_2S (50~160 μ mol/L) 的含量, 这些都说明 H_2S 可能是通过诱导细胞产生 GSH 而使细胞具有抗氧化能力, 自身并不具备直接的抗氧化功能。进一步的研究表明, H_2S 是通过提高 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS)的活力从而提高了胞内 γ -谷氨酰半胱氨酸(γ -GC)的含量, γ -GC 解除了谷氨酸对细胞摄入胱氨酸的抑制作用, 从而提高了神经元内 GSH 的含量。

除了上述公用的转运体外, 还存在一个胱氨酸/谷氨酸反转运体 X_c^- , 该反转运体偶联胱氨酸的摄入和谷氨酸的输出^[18]。谷氨酸是该反转运体的抑制剂, 它会阻断反转运体从而导致氧化凋亡^[15]。研究表明, H_2S 能显著提高细胞摄入胱氨酸的效率,

即使在谷氨酸的存在下, H_2S 也能解除谷氨酸抑制的胱氨酸的摄入^[17]。因此, H_2S 能解除谷氨酸对反转运体的抑制作用, 促进胱氨酸的运输, 从而促使细胞合成 GSH。

综上所述, H_2S 能提高诱导 LTP, 拮抗过量 NO, 提高 γ -GCS 的活力, 能诱导细胞提高胞内 GSH 的含量, 因此对神经细胞具有保护作用。现对 H_2S 的研究刚刚开始, 更广泛和深入的研究将有助于了解其在神经方面的更多的功能和机制。

参考文献 (References)

- [1] Abe K *et al.* *J Neurosci*, 1996, **16**: 1066
- [2] Eto K *et al.* *J Neurochem*, 2002, **83**: 80
- [3] Eto K *et al.* *J Neurosci*, 2002, **22**: 3386
- [4] Dello Russo C *et al.* *J Neuroendocrinol*, 2000, **12**: 225
- [5] Kimura H *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **267**: 129
- [6] Jhee KH *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275**: 11541
- [7] Pazicni S *et al.* *Biochemistry*, 2004, **43**: 14684
- [8] Eto K *et al.* *J Biol Chem*, 2002, **277**: 42680
- [9] Clarke R *et al.* *Arch Neurol*, 1998, **55**: 1449
- [10] Eto K *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293**: 1485
- [11] Sunda W *et al.* *Nature*, 2002, **418**: 317
- [12] Kwak WJ *et al.* *FEMS Microbiol Lett*, 2003, **219**: 99
- [13] Whiteman M *et al.* *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **326**: 794
- [14] Han Y *et al.* *Neurosci Res*, 2005, **53**: 216
- [15] Murphy TH *et al.* *Neuron*, 1989, **2**: 1547
- [16] Tan S *et al.* *Curr Top Med Chem*, 2001, **1**: 497
- [17] Kimura Y *et al.* *FASEB J*, 2004, **18**: 1165
- [18] Cho Y *et al.* *J Neurochem*, 1990, **55**: 2091

Functions of Endogenous Gaseous Hydrogen Sulfide in Central Nervous System

Li-Xing Zhang*, Xiao-Xia Wang¹, Shui-Jiang Song², Wei-Jun Jin

(College of Biological and Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

¹College of Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada; ²Department of Neurology, the Second Hospital, College of Medical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China)

Abstract Endogenous hydrogen sulfide (H_2S) can increase the production of cAMP, potentiate the exciting postsynaptic potential mediated by NMDA receptor and enhance the induction of hippocampal long-term potentiation. In central nervous system, H_2S functions as a neuromodulator as well as a neuroprotectant. H_2S itself does not rescue cells from oxidative stress; instead it protects neurons by increasing the level of a major and potent antioxidant, reduced glutathione. The study of H_2S is very new. Understanding the mechanism of its physiological function may provide a new insight into its neurons protection.

Key words hydrogen sulfide; central nervous system; neuron protection

Received: April 22, 2005 Accepted: December 27, 2005

*Corresponding author. Tel: 86-571-88320823, Fax: 86-571-88320765, E-mail: lxzhang@zjut.edu.cn