

心房利钠因子 及其临床应用

徐永梁 赵梦华 于乃方 田子捷 编著



河北科学技术出版社

R=31.3
X.Y.L.

118931

PDG

前 言

目前,国内、外对心房利钠因子(Atrial Natriuretic factor, ANF)的研究正日趋深入。特别是在基础研究方面,表现更为突出,诸如对 ANF 的产生、人工合成、分泌调节的阐明,对 ANF 受体拮抗剂和激动剂的寻求,对 ANF 之构-效关系、生(药)理作用的剖析以及细胞作用机理的探讨等。另外,对 ANF 的临床研究也十分重视。

本书对 ANF 的发现、命名、生化、合成、分泌调节、药代动力学、生(药)理作用、细胞作用机理、生理状态下血浆 ANF 的存在形式和浓度变化及测定方法等进行了介绍,对疾病时 ANF 的变化、药物和非药物治疗对 ANF 的影响、ANF 的临床应用以及中医药对 ANF 的研究等方面的进展系统地加以叙述。重点放在 ANF 的临床意义及其应用方面。供医药科研工作者和临床医药师参考。希望对 ANF 的进一步研究有所裨益。

由于编著者水平有限,缺点和错误在所难免,请各位同道给予批评指正。

编著者

1990.9.1

目 录

第一章	ANF 的发现和命名	(1)
第二章	ANF 的生物化学	(5)
第三章	ANF 的合成	(15)
第四章	ANF 的分泌及其调节	(21)
第五章	ANF 的药代动力学	(33)
第六章	ANF 作用的细胞机理	(45)
第七章	ANF 的生理作用	(52)
第八章	ANF 的放射免疫测定	(85)
第九章	生理状态下血浆 ANF 的存在形式、浓度 及其昼夜节律	(91)
第十章	疾病时 ANF 的变化	(98)
第十一章	药物对 ANF 的影响	(134)
第十二章	非药物治疗对 ANF 的影响	(140)
第十三章	ANF 的临床应用	(146)
第十四章	中医对 ANF 的研究	(161)

第一章 ANF 的发现和命名

35 年来,人们花费了相当大的精力,集中研究调节利钠和细胞外液容积(ECFV),但又不同于醛固酮的体液因子。

作为这种体液因子之一的 ANF 的发现乃至人工合成,是对人类的重大贡献。

第一节 ANF 的发现

解剖学家 Kisch (1956 年)^[1]最先发现,豚鼠的心房肌细胞内含有的一些颗粒。同年,Henry 等^[2]也发现,当用气囊使猫的左房压(LAP)升高时,就会出现利尿反应,推测心房的这种作用可能是“利钠激素”所致。1959 年,Bompiani 亦观察到心房肌细胞内高尔基复合体附近有许多“致密体”。1961 年,Gauer 等观察到心房与 ECFV 的调节有关,并开始寻找利钠激素。Werdener 用交叉循环实验证明排钠信号能从 ECFV 增加的 1 条犬转移到另 1 条 ECFV 未增加的犬,而这种信号并非醛固酮等。Lichardus 推测 ECFV 增加时,不仅有作为肾小管转运的抑制因子——利钠激素,而且还有扩血管物质参与了利钠作用。Jamieson 和 Palade 等(1964 年)^[3]进一步观察到,这种特殊颗粒主要分布在心房肌细胞核的一侧或两侧,常呈密集的锥形排列,亦可散在于高尔基复合体之间。每个大鼠心房肌

细胞约含 600 个这种特殊颗粒,其直径为 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{m}$,外包一层厚约 800nm 的单位膜。不仅仅是大鼠,几乎所有的哺乳动物,包括蝙蝠、小鼠、猪、犬等以及人类的心房肌细胞都有这种特殊颗粒。这种颗粒在哺乳动物一般只存在于心房肌细胞。Boncosme 等发现,两栖类、爬行类和鸟类等动物的心室肌细胞亦有类似颗粒。Jamieson 等发现,高尔基复合体上有许多小囊泡,囊泡内充满着许多颗粒样物质。囊泡与高尔基复合体滑面之间有小孔相通。提示,这种特殊颗粒是由高尔基复合体形成的。蛋白酶可使这种特殊颗粒的内容物水解,证明它是肽类及蛋白蛋。这种特殊颗粒可与品红起反应,说明它可能是一种由含硫氨基酸所组成的蛋白质,与内分泌细胞的激素分泌颗粒十分相似;并于 1974 年确定了这种特殊颗粒是蛋白质。1975 年,Goetz 等研究心房扩张与利钠利尿之间的关系。1976 年,Marie 等注意到这种特殊颗粒与体内水、 Na^+ 平衡有关。他们发现让大鼠禁水 5d,右心房的这种特殊颗粒便明显增加;给大鼠盐负荷 或同时给醋酸脱氧皮质酮(DOCA),右心房的这种特殊颗粒便明显减少。加拿大的病理学家 De Blod 也观察到,失水时心房特殊颗粒数目增多。法国的 Hatt 通过动物实验观察到,这种特殊颗粒的含量与 ECFV 呈负相关。Lichardus 等观察到,ECFV 增多时有一种物质通过扩张肾血管而发挥利钠作用。Kramer 和 Gonick 等发现,在 ECDV 增加的大鼠血中有一种内源性 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶抑制因子。De Bold (1979 年)^[4]在观察到豚鼠心房内这种特殊颗粒的密度与水、盐代谢有关后又提出,心房是胸部循环血量的容量感受器(Volume receptor)。1980 年与 Donnenberg 进一步发现,给大鼠用心房提取物静脉注射(iv)后,可引起强烈的利尿和降压作用,第 1 次

证明其生理作用。并于 1981 年将引起这种作用的物质称之为心钠素(Cardionatrin)^[6]。

1983 年末,De Bold 等^[6]从大鼠的心房组织中分离、纯化出 ANF。1984 年初,美国的 Currie^[7]、日本 Misono 实验室的寒川贤治和松尾寿之^[8]又从人的心房组织中分离、纯化出 ANF,均分别确定了其氨基酸序列和蛋白质一级结构,并在同年人工合成了具有生物活性的 ANF,克隆了 ANF 的 cDNA,从而使 ANF 的研究进入了一个新阶段。

第二节 ANF 的命名

目前,ANF 的命名比较混乱。如:心钠素、心房利钠多肽(Atrial natriuretic polypeptides, ANP)、心房利钠肽(Atrial natriuretic peptide)、心房肽(Atriopeptin)、心耳素(Auriculin)、心房素(Atrin)和 ANF 等。据新英格兰医学杂志 1987 年 316 卷 20 期致编者文载,国际高血压学会、美国心脏病协会和 WHO 组成了一个 10 余人的委员会(包括发现该肽类的著名学者们),讨论了 ANF 的命名问题,并建议同行应用,简述如下:

由于这种肽类的生物特性及其定位尚未完全肯定,因此,以统称 ANF 为宜。人的不以“h”或“Met”表示,大鼠的不以“r”或“Ile”表示,而应分别冠以“human”和“rat”全称,即,人 ANF(human ANF)和大鼠 ANF(rat ANF)。其氨基酸序列数码均以 ANF 前体原(prepro-ANF)截去信号肽(signal peptide),从 N-端算起。如 α -hANF 应称为 α -human ANF-(99~126)。

human ANF 前体原(human prepro-ANF),包括信号肽和 ANF 原(pro-ANF)。human ANF 在心房颗粒中的主要贮存形

式是 γ -human ANF-(1~26), 又称为 human ANF 原(human pro-ANF), 它是 ANF 在血中的循环形式之前体。

Human ANF 和 rat ANF 在血中的循环形式大都是以 pro-ANF 的 C-端 28 个氨基酸, 即 α -ANF-(99~126) 为主。委员会建议, 血浆不经提取直接用放射免疫分析(radioimmunoassay, RIA)测定的结果可称为免疫活性 ANF (immunoreactive-ANF, IR-ANF); 血浆提取后的测定结果, 必须同时注明提取方法^[9]。

第二章 ANF 的生物化学

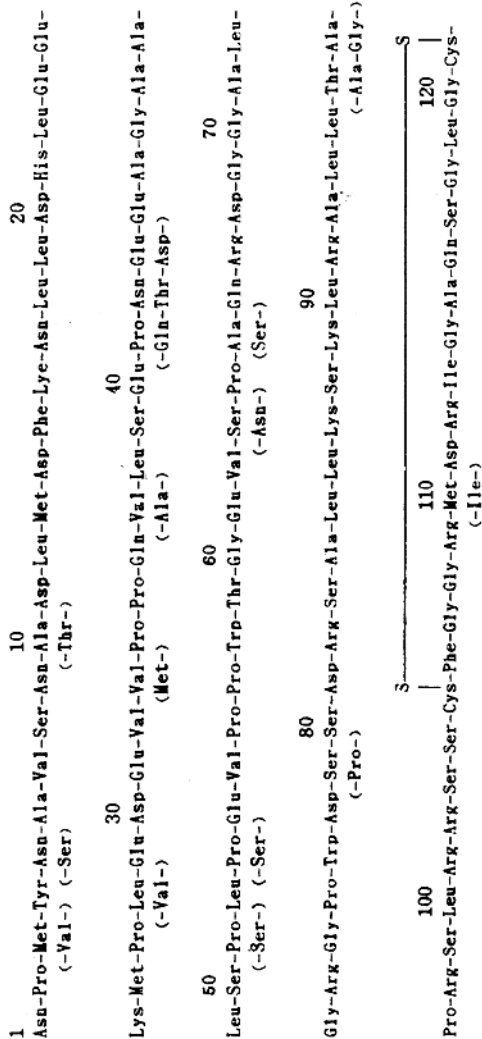
第一节 human ANF 的分类及构-效关系

ANF 是一类多肽。寒川贤治和松尾寿之等(1984 年)^[8]以鸡雏的直肠平滑肌松弛活性作为指标,将人心房组织的 ANF 进行分离后发现,human ANF 的分子量有:3 000、6 000 和 13 000 3 种,分别称之为 α 、 β 、 γ 3 型。决定它们结构的氨基酸序列(图 2-1)^[10]。

γ -human ANF-(1~126)是由 126 个氨基酸所组成的高分子蛋白质,即 human pro-ANF。其 C-端部分(99~126)具有 α -human ANF-(99~126)的结构。由二者的关系提示, γ -human ANF-(1~126)是 α -human -ANF-(99~126)的直接前体。 γ -human ANF-(1~126)一般只存在于心房组织中,也具有利尿、降压和松弛平滑肌的作用,但仅为 α -human ANF-(99~126)作用的 1/5。

α -human ANF-(99~126)是由 28 个氨基酸组成的肽链。其中的二硫键将肽链第 7 位和第 23 位的二个半胱氨酸连接成环状结构,是与 ANF 受体结合的部位,提示为活性中心。给麻醉状态下的大鼠用 α -human ANF-(99~126) 0.2nmol (0.6 μ g) iv 后,出现明显的利钠利尿作用。如剂量增加到

• (A) γ-human(rat)ANF-(1-126)



Asn-Ser-Phe-Arg-Tyr
126

0.4nmol(1.2 μ g)后,动脉压(BP)下降 2.66~3.99kPa。C-端 6 个氨基酸残基,并非活性所必需。但当第 12 位的甲硫氨酸被氧化或二硫键断裂后,上述各作用会消失。C-端部分氨基酸(门酰-丝-苯丙-精-酪)残基与活性的关系目前尚未明确,但 C-端氨基酸残基脱落或序列改变就会使作用发生变化。提示与受体的选择性有关。needleman 等^[11]系统地研究了 ANF 的 N、C-端氨基酸序列与活性的关系后发现,除去 C-端的精-酪氨基酸残基,对 ANF 的活性无明显影响;但是,若除去门酰-丝-苯丙-精-酪氨基酸残基后即为 ANF-(99~121),其活性只有 ANF-(103~126)的 1/1 000;若将 C-端的 L-苯丙氨酸置换成 D-苯丙氨酸后,ANF 的活性可降低 10 倍;若将 N-端的丝-丝氨基酸残基除去后即为 ANF-(105~126),其活性降低 50%。他们还发现,不同结构的 ANF 存有种属差异性。如: ANF-(101~124)对大鼠的作用与 ANF-(103~126)相似;但对犬的作用却比 ANF-(99~126)强 5~10 倍。

β -human ANF 是由两条相互平行、C-端和 N-端相互倒置的 α -human ANF-(99~126)经两对二硫键连接而成。其生理作用强度、方式与 α -human ANF-(99~126)不同。伊藤裕等^[12]给 5 例健康人用相同 mol 的 β -human ANF(100 μ g)和 α -human-(99~126)(50 μ g)依次分别 iv 后观察到, α -human ANF-(99~126)使平均动脉压(MAP)下降 1.16 ± 0.27 KPa,心率(HR)增加 21 ± 4 beats/min, $P < 0.05$;但以上二项指标在 β -human ANF 与 α -human ANF-(99~126)间差异无显著意义。另一方面 β -human ANF 的利尿(0.579 L)、排 Na⁺(56mmol)作用比 α -human ANF-(99~126)(0.396L, 5mmol)强($P < 0.05$),且慢(slow-onset)而持久(long-acting)。他们用 RIA 和高

效液相色谱(high pressure liquid chromatography, HPLC)观察到, β -human ANF 的一部分在外周血中迅速转换成 α -human ANF-(99~126)。

平田结喜绪等^[13]将¹²⁵I- β -human ANF 与来源于大鼠主动脉的离体血管之平滑肌细胞(SMC)在 4℃条件下结合 3h 后, 测定膜结合放射活性。又在 37℃条件下反应 10min 后测定细胞内 cGMP 浓度。再将人工合成的 β -human ANF 在 37℃条件下与血管 SMC 作用 1h 后, 进行逆相高效液相色谱(RP-HPLC)分析。其结果:¹²⁵I- β -human ANF 与血管 SMC 之结合同 α -human ANF-(99~126)一样, 均具有时间、温度依赖性。 β -human ANF 与 ANF 受体的结合解离常数(Kd)和 α -human ANF-(99~126)相同; 但最大结合量(B_{max})仅为 α -human ANF-(99~126)的 1/2。 β -human ANF 与受体的亲和力与鸟苷酸环化酶(guanylate cyclase, GC)的活性相同。但 β -human ANF 的最大作用仅为 α -human ANF-(99~126)的 1/2。2/3 与血管 SMC 起反应的 β -human ANF 转换为 α -human ANF-(99~126)。然而, α -human ANF-(99~126)对血管 SMC 的作用仅为 α -rat ANF-(99~126)的 1/3。

目前, 全世界已有 10 余个实验室克隆出 ANFcDNF, 确定了氨基酸序列, 从而分析出 prepro-ANF, 并认识到不同的 ANF 多肽都是来自于一个共同的 prepro-ANF。

human prepro-ANF 是由 151 个氨基酸所组成。N-端 25 个氨基酸是信号肽, 其后 126 个氨基酸是 human pro-ANF, 即 γ -human ANF-(1~126)^[10]。 γ -human ANF-(1~126)N-端的 30 个氨基酸, 即 human ANF-(1~30), 称为心舒血管素(Cardiodilatin)。根据遗传基因操作程序进行编码的 mRNA 碱基顺序分

	s1	s10	s20	s25 1				
human	MSSFS	TTTVS	FLFL	LA	FQLLGQTR	ANP	MY	NAV
dog	MG--S	PIAAS	FLFL	LA	VQLLGQTR	ANP	VY	GSV
rabbit	MGPFS	TTTVS	FLFC	LA	FWHPDQIG	ANP	VY	NAM
rat	MGSFS	-ITKG	FLFL	LA	FWLPGHIG	ANP	VY	SAV
mouse	MGSFS	-ITLG	FLV	LA	FWLPGHIG	ANP	VY	SAV

	10	20	30		
human	SNADLM	DFKNLLD	HLEEKMPLE	DEVVP	PQVLS
dog	SNADLL	DFKNLLD	RLLEDKMPLE	DEEAESP	QAALS
rabbit	SNADLM	DFKNLLD	HLEDKMPLE	DEEAESP	QAALS
rat	SNTDLM	DFKNLLD	HLEEKMPV	DEVVMP	PQAALS
mouse	SNTDLM	DFKNLLD	HLEEKMPV	DEVVMP	PQAALS

	40	50	60	70			
human	EPNEE	AGAALS	PLPE	VPPWTG	EVSP	AQRD	GGGA
dog	EQNAE	AGAALS	PLPE	VPPWTG	EVSP	AQRD	GGGA
rabbit	EQSDE	AGAALS	PLPE	VPPWTG	EVSP	AQRD	GGGA
rat	EQTDE	AGAALS	SSLS	EVPPWT	GEVN	PSQR	DGGA
mouse	EQTEE	AGAALS	SSLP	EVPPWT	GEVN	NPLR	DGSA

	80	90	100		
human	LGRGPWD	SSDR	SALLKSKLRALL	TA	PRSLRRS
dog	LGRSPWD	SSDR	SALLKSKLRALL	AA	PRSLRRS
rabbit	LGRSTWE	ASER	SALLKSKLRALL	TA	PRSLRRS
rat	LGRGPWD	PSDR	SALLKSKLRALL	AG	PRSLRRS
mouse	SRRSPWD	PSDR	SALLKSKLRALL	AG	PRSLRRS

	110	120	126
human	SCFGGR	MDRIGAQSGLGCNSFRY	*
dog	SCFGGR	MDRIGAQSGLGCNSFRY	*
rabbit	SCFGGR	IDRIGAQSGLGCNSFRY	RR *
rat	SCFGGR	IDRIGAQSGLGCNSFRY	RR *
mouse	SCFGGR	IDRIGAQSGLGCNSFRY	RR *

图 2-2 prepro-ANF 的氨基酸序列

γ -ANF: (1~126)

α -ANF: (99~126)

S₁~S₂₅: 信号肽

* 终止密码

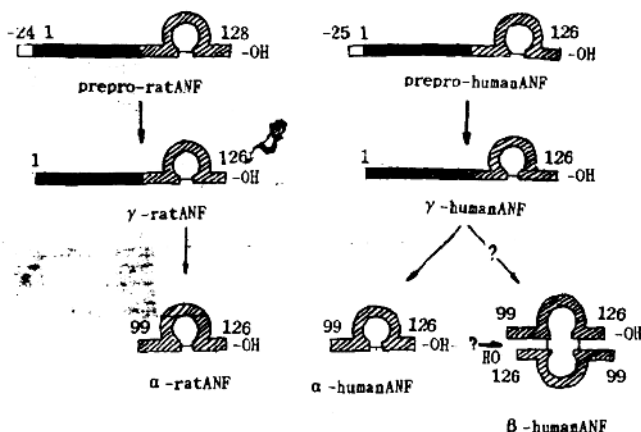


图 2-3 ANF 的生物合成模型

析, human prepro-ANF 的氨基酸序列(图 2-2)^[14]。

human ANF 的生物合成模型(图 2-3)。

根据 ANFmRNA 的转录, prepro-ANF 在心房肌细胞内合成。prepro-ANF 在高尔基复合体内脱落信号肽后转换为 pro-ANF——γ-ANF-(1~126)。由 γ-human ANF-(1~126)脱落下的 C-端 28 个氨基酸即为 α-human ANF-(99~126)(图 2-4)。

γ-ANF-(1~126)脱落 α-ANF-(99~126)后,剩下的 N-端 ANF 片段即 ANF-(1~98), 又称为 N-肽。human ANF-(1~98)的分子量为 10 000。血浆 human ANF-(1~98)与 α-human ANF-(99~126)浓度呈正相关。二者可能是从心肌细胞中协

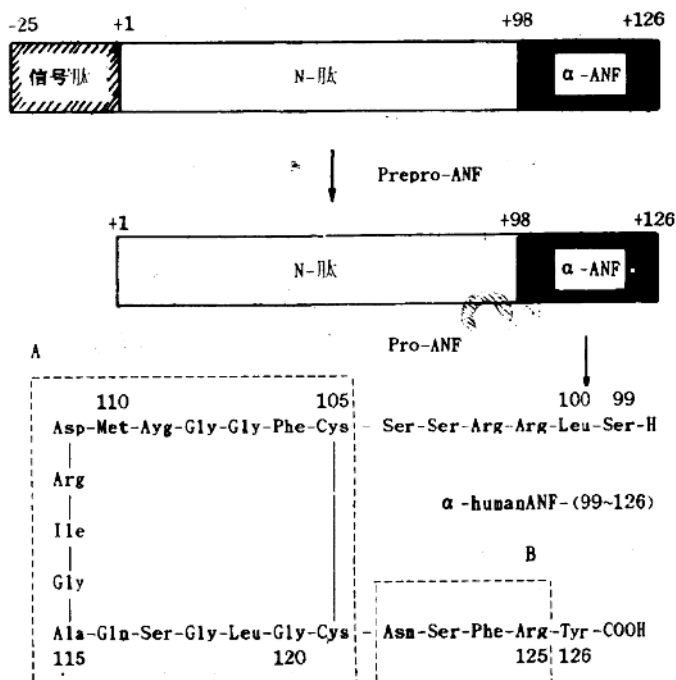


图 2-4 human ANF

点线围着的 A 部分是生物作用的必须部位；

如果 B 部分氨基酸残基脱落，生物作用就减弱

同分泌入血循环的。但是，ANF-(1~98)的清除率比 α-ANF-(99~126)缓慢。

现在普遍认为, pro-ANF 是基因翻译的产物, 而 γ -ANF-(1~126) 是储存形式。

第二节 rat ANF 的分类及构-效关系

关于 rat ANF, 许多实验进行了细致的研究, 起初虽然相当混乱, 但目前已得出如下统一的结论:

在大鼠的心房组织中仅存有 γ -rat ANF-(1~126)^[15]。在这点上与含有 α 、 β 、 γ -human ANF-(1~126) 的人心房组织不同。但是, γ -rat ANF-(1~126) 与 γ -human ANF-(1~126) 一样, 均由 126 个氨基酸所组成(图 2-1), 二者的氨基酸序列也非常相似。与 α -human ANF-(99~126) 相对应的 α -rat ANF-(99~126) 的第 12 位由异亮氨酸代替甲硫氨酸。 α -rat ANF-(99~126) 虽不是大鼠心房组织 ANF 的成分, 但是循环血中的主要成分。

rat prepro-ANF 是由 152 个氨基酸所组成, 比 human prepro-ANF 多 1 个氨基酸(图 2-2)。其 N-端的信号肽(24 个氨基酸)和 C-端的精-精氨基酸残基脱落即转换为 rat pro-ANF—— γ -rat ANF-(1~126), 储存于心房组织中。但是, γ -rat ANF-(1~126) 又如何转换成作为循环血中主要成分的 α -rat ANF-(99~126)? 目前尚不明确。

在最初的研究中, 从心房组织中分离出相当于 γ -rat ANF-(1~126) C-端的种种大大小小的多肽。因这些多肽均显示出程度不同的利钠利尿活性, 而被人们冠以种种名称。如: De Bold 等所谓的心钠素(99~126), 寒川贤治和松尾寿之所谓的 α -ANP-(99~126), Needleman 等所谓的心房肽 1(103

~123)、心房肽Ⅱ(103~125)、心房肽Ⅲ(103~126)(生理活性:心房肽Ⅲ>Ⅱ>Ⅰ)、还有所谓心耳素A(102~125)、心耳素B(102~126)以及心房素等^[7, 16~20]。

但晚近,寒川贤治和松尾寿之^[21]认为,这些并不是心房组织中的 rat ANF,只不过是分离、提取过程中,γ-rat ANF-(1~126)的 N-端和/或 C-端氨基酸残基脱落后的二次分解产物而已。

对于大鼠来说,心房组织所含 ANF 的存在形式为 γ-rat ANF-(1~126),而循环血中的存在形式为 α-rat ANF-(99~126)。

第三节 其它动物的 ANF 之分类和结构

继人、大鼠之后,人们又了解到小鼠、兔、犬、荷兰猪的 prepro-ANF 之氨基酸序列都与人和大鼠的 prepro-ANF 之氨基酸序列相似(图 2-2)。但兔、小鼠、大鼠等啮齿动物的 ANF 属大鼠型 ANF,而犬、猪等哺乳动物的 ANF 属人型 ANF。