

CONG FENZI DAO XINGWEI

从分子到行为

■ 主编 唐孝威 沈模卫 罗建红 孙 达



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大学出版社

从分子到行为

唐孝威 沈模卫 主编
罗建红 孙 达



ZHEJIANG UNIVERSITY PRESS

浙江大學出版社

图书在版编目(CIP)数据

从分子到行为 / 唐孝威等主编. —杭州: 浙江大学出版社, 2009. 3

ISBN 978-7-308-05857-5

I. 从... II. 唐... III. 神经心理学 IV. B845.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 036445 号

从分子到行为

唐孝威 沈模卫 罗建红 孙 达 主 编

责任编辑 沈国明

封面设计 刘依群

出版发行 浙江大学出版社

(杭州天目山路 148 号 邮政编码 310028)

(E-mail: zupress@mail. hz. zj. cn)

(网址: <http://www.zjupress.com>

<http://www.press.zju.edu.cn>)

电话: 0571—88925592, 88273066(传真)

排 版 杭州求是图文制作有限公司

印 刷 富阳市育才印刷厂

开 本 889mm×1194mm 1/16

印 张 24

字 数 690 千

版 印 次 2009 年 3 月第 1 版 2009 年 3 月第 1 次印刷

书 号 ISBN 978-7-308-05857-5

定 价 58.00 元

版权所有 翻印必究 印装差错 负责调换

浙江大学出版社发行部邮购电话 (0571)88925591

参编人员名单

主编

- 唐孝威 浙江大学理学院物理系
- 沈模卫 浙江大学理学院心理与行为科学系
- 罗建红 浙江大学医学院
- 孙 达 浙江大学医学院附属第二医院核医学科

参与编写人员

- 程邦胜 浙江大学理学院物理系
- 曹丙利 浙江大学理学院物理系
- 唐孝威 浙江大学理学院物理系
- 曹志彤 浙江大学理学院物理系
- 叶 伟 浙江大学理学院物理系
- 胡正晖 浙江大学理学院物理系
- 方加忠 浙江大学理学院物理系
- 顾杰斌 浙江大学理学院物理系
- 谢小平 浙江大学理学院物理系

- 杨 勇 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院
- 郑筱祥 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院
- 李 光 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院
- 封洲燕 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院
- 童勤业 浙江大学生物医学工程与仪器科学学院神经信息中心

- 刘华锋 浙江大学信息学院光电系

- 徐琴美 浙江大学理学院心理与行为科学系
- 何 洁 浙江大学理学院心理与行为科学系

- 祝一虹 浙江大学医学院医学心理教研室
- 翁旭初 浙江大学医学院
- 陈宜张 浙江大学医学院
- 王 伟 浙江大学医学院医学心理学教研室
- 孙国强 浙江大学医学院医学心理学教研室

- 周 晓 浙江大学医学院附属第一医院神经内科

罗本燕 浙江大学医学院附属第一医院神经内科
张鸣敏 浙江大学医学院附属第一医院放射科
徐晓俊 浙江大学医学院附属第一医院放射科
楼海燕 浙江大学医学院附属第一医院放射科

张宝荣 浙江大学医学院附属第二医院神经内科
殷鑫滨 浙江大学医学院附属第二医院神经内科
刘志蓉 浙江大学医学院附属第二医院神经内科
丁美萍 浙江大学医学院附属第二医院神经内科
张 进 浙江大学医学院附属第二医院神经内科
张建民 浙江大学医学院附属第二医院神经外科
祝 笠 浙江大学医学院附属第二医院神经外科
孙 达 浙江大学医学院附属第二医院核医学科
占宏伟 浙江大学医学院附属第二医院核医学科
许 唯 浙江大学医学院附属第二医院核医学科
刘洪彪 浙江大学医学院附属第二医院核医学科

前 言

唐孝威

物理世界的结构具有层次性。物理世界中有轻子、夸克等粒子,夸克和胶子组成核子(质子和中子),核子组成原子核,原子核和电子组成原子,原子形成分子,再到大分子,到宏观的物理世界,甚至宇宙,这就是无生命的物理世界的层次性。物理学在研究某一个物质层次时往往忽略比它更小的层次,比如说对超导体的研究就不涉及对原子核反应的研究,但物理世界的这些层次又是统一的。

正像物理世界具有许多层次那样,脑的结构和功能也具有许多层次。心理科学和神经科学研究脑的结构和功能,涉及从分子到行为的许多层次。分子指生物体内,特别是脑内的分子;行为指个体的各种反应、动作和活动。

从分子到行为,存在哪些不同的层次呢?从生物学角度来看,大脑有组织结构和功能分工。在宏观方面,我们对脑的组织结构已经认识得很清楚了。在微观方面,基因、各种蛋白质分子,与其他生物分子一道组成了神经细胞(神经元和胶质细胞)。神经元又通过突触形成连接,组成回路,进而按一定的分类组成不同的亚区,最终形成宏观的脑区,如大脑皮层、中脑、丘脑,以及脑干、脊髓等。

脑的结构与功能是相辅相成的,结构是功能的基础。神经元和神经回路结构和功能的多样性以及它们之间复杂的联系导致了脑功能的复杂性。可以想象,神经系统是一个非常复杂的网络系统,在结构和功能两个层面都可以不断地分为次级系统,各个次级系统之间有复杂的联系和相互作用。随着系统复杂性的提高,功能的复杂性也增加,并在一定条件下实现某种质的飞跃,如出现人类高级精神活动。神经系统的高级功能是通过脑内网络系统实现的。在这个意义上,分子和细胞的功能可以通过神经网络系统导致心理过程。

目前,心理科学和神经科学的研究是从不同层次来探讨人脑的活动的。神经生物学家把神经活动的表达和改变定位在神经回路的特定式样的电活动、化学过程及其改变上,认为任何一个行为都是建立在特定神经回路复杂活动的基础上的。例如,把一个短暂的心理过程解释为神经电活动和化学过程,一个持续的心理过程则引起神经细胞、轴突、树突之间连接的改变以及化学过程的变化。而心理学则更关注知、情、意等过程,认为心理活动与神经活动有区别,脑功能是不可能还原为分子的,只能讨论特定分子对心理活动的贡献。

心理科学和神经科学这两个学科能不能整合呢?整合的关键问题又是什么呢?我们认为,这两个学科是能够整合的,因为它们都研究脑的活动。但目前它

们研究的侧重点不同,心理科学着重研究脑的高级功能和行为,神经科学着重研究脑的结构和生理功能。把它们整合为统一的学科,还需要很大的努力。

心理科学和神经科学的整合涉及合理还原的问题:心理能不能还原到分子,或分子事件能不能说明心理?细胞或者分子和心理现象是不同的层次,寻找心理现象的基础并不需要追究到单个细胞或者分子水平。心理活动有物质基础,某些功能分子与特定行为可以建立相关性;但情绪、心理和行为却不能简单地还原为单个细胞和分子的活动,即使能够有某种程度的还原,对于心理现象来说也已经没有意义。这就像水泥和沙子对构成建筑物是不可缺少的,但把建筑物还原到水泥和沙子的特性时,已无法欣赏建筑物的美。又像把人看成是碳、氢、氧元素的组成体,对理解人体的化学组成是有意义的,但是对理解人的整体高级特性就毫无价值。因此,要根据理解什么样的功能,来确定还原的层次。从另一个角度看,如果把人看成一个智能的机器,有一定的初始状态,能否给定一个输入就对应有一个输出,从而建立起输入输出之间一一对应的联系呢?显然不能。人作为智能体,其初始状态及以后的状态是异常复杂和不能控制的,因为人有主观能动性。目前的科学认识水平还不能使我们从物质基础逆推到复杂的心理现象。

我们认为,心理科学和神经科学整合的方向是统一的心脑科学(Brain Mind Science),或神经-心理科学,它包括神经心理学和心理神经科学两个侧面。神经心理学着重从神经活动的角度阐明心理与行为的规律;而心理神经科学着重阐明心理与行为神经基础的规律。目前的认知神经科学只是心理神经科学中的一部分,还不能包括所有的心理问题。心理有广泛的内容,而认知仅仅是心理活动的一个方面。目前的认知神经科学可以缩短心理科学和神经科学的差距,但在整合的途径上仍有一定的局限性。例如,一定的心理现象可以通过 EEG、ERP 等脑电波表现出来,但相应的脑电波还不能说明心理过程的内容。

浙江大学是多学科的综合性大学,学科门类齐全。在理科和医科方面有心理科学和神经科学等学科,还有数学、物理学、化学,以及生物学、临床和基础医学等学科。在工科方面有计算机科学、信息科学、控制科学和生物医学工程等学科。在人文社科方面,也进行语言和认知科学的研究。浙江大学一直提倡多学科的交叉研究,“十五”规划“211 工程”设置了“脑与认知科学及其应用”项目,“985 工程”设置了“语言和认知”项目,开展心理科学和神经科学的交叉研究。

本书是“脑与认知科学及其应用”项目组织编写的一本心理科学和神经科学方面的著作。书中选择心理科学和神经科学中若干前沿科学问题,介绍当前从分子到行为不同层次研究的进展,同时也介绍浙江大学相关的一部分研究工作。心理科学和神经科学的研究领域非常宽广,本书介绍的只是其中的一小部分研究成果。

本书共四章。第一章:脑的神经基础;第二章:脑的高级功能;第三章:脑的疾病防治;第四章:脑的实验技术。

目 录

第一章 脑的神经基础	(1)
第一节 中枢神经系统一氧化氮的扩散反应动力学研究	(1)
第二节 神经突触与神经系统疾病	(18)
第三节 神经细胞同步活动的非化学突触介导的机制 ——低钙痫样活动及其在体模型的研究	(28)
第四节 神经信息学研究在浙江大学	(45)
第五节 理论神经信息学的研究	(85)
第二章 脑的高级功能	(93)
第一节 意识问题研究	(93)
第二节 情绪理解	(106)
第三节 随意运动的脑功能成像	(123)
第四节 汉语语言认知功能和脑显像研究	(140)
第三章 脑的疾病防治	(175)
第一节 老年性痴呆症发病机理、治疗措施及其动物模型研究进展	(175)
第二节 老年性痴呆与 Humanin	(200)
第三节 神经退行性和血管性疾病的磁共振功能成像研究	(209)
第四节 先天性眼球震颤的分子遗传学研究进展	(233)
第五节 亨廷顿舞蹈病	(240)
第六节 颅脑外伤与认知	(254)
第七节 焦虑障碍和抑郁症的功能性脑显像研究	(266)
第八节 人格与人格障碍:生物及环境基础	(290)
第四章 脑的实验技术	(310)
第一节 颞叶癫痫大鼠海马基因表达谱和蛋白质表达谱的研究	(310)
第二节 fMRI 数据神经信息的聚类分析	(321)
第三节 动物的 fMRI 研究	(339)
第四节 脑图像分割:自由网络主动轮廓模型	(356)

第一章 脑的神经基础

第一节 中枢神经系统一氧化氮的扩散反应动力学研究

一、NO 的基本特性及其在中枢神经系统中的生理作用

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种不带电荷的分子,含有一个未配对的电子而呈顺磁性,NO 大多数常见的化学反应特征都与这个未配对电子的稳定化相关。NO 有两个重要的亲核试剂靶——硫和氮。NO 以氮为亲核靶生成亚硝胺,以硫为亲核靶生成亚硝基硫醇。NO 可以与含血红素铁或非血红素铁以及铜的金属蛋白配位。NO 与含金属的酶作用后常使酶可逆或不可逆地受到抑制,这种情况常见于血红素作为酶催化反应的辅基时。NO 与金属作用也可使一些酶激活,比如鸟苷酸环化酶和环氧化酶。

自 1988 年 Garthwaite^[1]等提出 NO 可能作为一种信息传递物质在中枢神经系统中起作用以来,NO 在中枢神经系统中的作用引起了神经科学工作者的极大兴趣。经典的神经递质应该在突触前合成,贮存于神经末梢的突触小泡中,当神经冲动传至末梢,小泡内容物以“胞裂外排”方式释放到突触间隙,递质与突触后膜上受体结合从而激活受体,然后通过影响细胞内第二信使或突触后膜的离子通透性变化导致细胞生理功能改变。释放出来的神经递质通过酶降解或再摄取而消除。NO 不同于上述经典递质,它是一种脂溶性的气体型小分子,没有专门的贮存机制,NO 合成后立刻就向四周快速扩散,并能直接透过细胞膜作用于邻近区域。

1. 脑内一氧化氮合成酶(NOS)的分布

生物体内 NO 主要由左旋精氨酸(*L*-arginine, *L*-Arg)在一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)的作用下合成。根据原型酶的细胞或组织来源以及表达方式不同, NOS 分为神经元型 NOS(neuronal NOS, nNOS)、内皮型 NOS(endothelial NOS, eNOS)和诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS)。eNOS 和 nNOS 又称为结构性 NOS 或原型 NOS, 主要分布于血管内皮细胞、血小板、中枢神经元、星型胶质细胞等。eNOS 和 nNOS 依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白, 当 Ca^{2+} 浓度达到 $0.2 \sim 1 \mu\text{mol/L}$ 时酶活性最大。血管活性物质乙酰胆碱、缓激肽以及切应力的刺激使浆细胞内 Ca^{2+} 浓度升高, 通过氧自由基或钙依赖性磷脂代谢的其他物质可以激活这两类 NOS。但由 eNOS 和 nNOS 催化 *L*-Arg 引起的 NO 释放是短时性的。iNOS 又称为非钙依赖性 NOS 或巨噬细胞型 NOS, 主要存在于巨噬细胞、血管平滑肌细胞、中性粒细胞、肾小球细胞膜以及星型胶质细胞等。iNOS 可以诱导产生, 不依赖于 Ca^{2+} 和钙调蛋白, 能引起 NO 的长时间释放, 且 NO 产量较大。几乎所有有核细胞均可诱导产生 iNOS, 因其激动剂为内毒素和脂多糖, 所以 iNOS 与多种疾病的发生、发展有关。

1988 年, Garthwaite 首次证实脑组织中存在 NOS, 脑中 NO 主要来源于脑血管内皮细胞、

神经元和胶质细胞。nNOS 在大脑皮质、海马以及纹状体等区域中广泛分布,含 nNOS 的神经元占这些区域的 1%~2%。在海马中,nNOS 主要存在于 CA₁ 区的中间神经元和海马齿状回的颗粒细胞中,海马锥体细胞不含有 nNOS 而含 eNOS。在小脑中,nNOS 主要分布于颗粒细胞和水平纤维及框状细胞中。在中脑的上下丘表层也分布着 nNOS。在脑血管内皮细胞中存在 eNOS。星型胶质细胞及小胶质细胞经诱导可以产生 iNOS。

2. NO 在中枢神经系统中的生理作用

(1) NO 和学习记忆的关系

中枢神经系统的 NO 由 Ca^{2+} 依赖的一氧化氮合成酶(NOS)催化 L-精氨酸与氧气反应而产生。NOS 可分为神经元型(nNOS)、内皮型(eNOS)和诱导型(iNOS)三种,在海马的锥体细胞中存在 nNOS 和 eNOS。研究发现,使用 NOS 的抑制剂,如 N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME),能阻断长时程增强效应(LTP)的产生,而 NO 供体的应用能增加神经递质的释放。NO 的清除剂,如血红蛋白也能阻断 LTP 的产生。血红蛋白不能穿过细胞膜,所以它清除的应该是胞外的 NO,也就是说,如果突触后膜产生 NO 并逆行扩散到突触前膜的话,它将被血红蛋白所清除,从而证明细胞内产生并释放到胞外的 NO 影响 LTP。更进一步的实验证明,海马锥体细胞 eNOS 对 LTP 的诱导和表达起关键作用。基因敲除实验也证明,nNOS 敲除对 LTP 的影响不大,而 nNOS 和 eNOS 同时敲除时,LTP 不能被诱导。Arancio 等利用培养的海马细胞研究 NO 对 LTP 的作用,也证明 NO 逆行扩散到突触前膜而发挥作用。Doris Albrecht 等利用海马脑片实时检测 LTP 诱导期 NO 的变化,发现海马 CA₁ 区约 $40000\mu\text{m}^2$ 的区域 NO 增加,NO 的抑制剂 L-NAME 抑制 LTP 的诱导。

对 NOS 在单细胞内的空间分布研究也提示,NO 可作为逆行信使候选者之一,在突触后膜 nNOS 通过 PSD-95 与 NMDA 受体相耦联。令人感兴趣的是,通过 NMDA 受体介导的 Ca^{2+} 内流能引发 NO 的神经兴奋性毒性,而注射同等量的 Ca^{2+} 或通过电压依赖内流的 Ca^{2+} 却不能引起 NO 的神经兴奋性毒性。Burette 等用免疫组化方法证实,在突触刺内存在 NOS。对在细胞质内合成的 NOS 如何转运到突触后膜也已有研究报道。NOS 的空间分布提示,NO 为逆行信使。我们实验室也开展了 NO 实时检测研究,通过共聚焦显微镜和 NO 电极实时检测单个神经细胞受刺激时胞内 NO 的变化。我们的研究发现,培养的海马神经细胞受谷氨酸刺激时,树突和轴突中 NO 的变化不一样,这与免疫组化的结果相一致。

(2) NO 对脑血流的调节

NO 在脑血流的调节中起着十分重要的作用。脑血管的内皮细胞中存在 eNOS,与外周血管一样。在正常情况下,血管内皮细胞持续释放 NO,NO 激活鸟苷酸环化酶(sGC),使血管平滑肌处于舒张状态。NOS 抑制剂可抑制脑血管内皮细胞合成 NO,从而导致脑血管收缩。体内外实验均证实,人和动物大的脑血管对乙酰胆碱(Ach)的反应依赖于血管内皮,利用 NOS 抑制剂显示,这种反应依赖于 NO 的合成^[2-3]。体内实验表明,局部应用 NOS 抑制剂可导致脑血管收缩,脑血流量下降。但在这种情况下,影响脑血管张力的 NO 不是来源于血管内皮细胞而是来源于神经元和胶质细胞。

NO 还参与脑内 Meynert 基底核兴奋引起的皮质血流的增加。该核团发出的胆碱能神经通到大脑皮质,核团兴奋可释放乙酰胆碱,使得皮质血流增加。静脉注射 NOS 抑制剂可对抗 Meynert 基底核兴奋引起的皮质血流增加,从而推测该神经末梢释放的 Ach 可能作用于脾脏血管的内皮细胞,使内皮细胞释放 NO,从而舒张血管,增加血流。

由于 NO 具有高度弥散性,脑血管附近的神经元在激活时释放的 NO 也可影响血管张力。

某些星型胶质细胞也结构性地表达低水平的 NOS,可对受体介导的刺激起反应而产生 NO。由于某些星型胶质细胞的细胞足紧邻脑血管,它们也可能参与脑血管张力的调节。

二、NO 扩散反应的仿真建模研究

由于 NO 在体检测还面临着技术上和方法学上的困难,近年来 NO 合成后的扩散和反应的定量数学模型的研究得到了越来越多的重视。通过数学模型的研究,可以更好地了解 NO 的生物特性和在体变化规律:如 NO 合成后,通过扩散可以作用到靶点的有效浓度、有效浓度的维持时间等;缺血情况下 NO 与 O_2 相互反应的时间过程,NO 合成量的变化等。这些问题由于 NO 在体浓度低、能与多种物质发生反应、半衰期短等特点,用传统的生物医学研究方法无法解决。NO 定量数学模型的研究可以为基础研究提供指导,并能辅助临床研究的展开。

1994 年,Lancaster 从动力学出发分析了细胞内和细胞间的 NO 扩散,建立了溶液中 NO 的扩散与简单反应模型。之后,Lancaster 将单细胞模型扩展成多细胞模型,构建了一个细胞群仿真 NO 浓度变化的模型^[4,5]。Lancaster 的模型分析显示,细胞群释放的 NO 并不能引起 sGC 的活化,这一结论后来被证明是错误的。出现错误的原因在于,Lancaster 对生理模型做了过度的简化,同时也由于当时可供建模的实验数据太过有限。

同年,Wood 和 Garthwaite 建立了脑中源于神经细胞的 NO 扩散模型^[6]。他们以 NO 扩散动力学为基础,把单个神经元作为一个 NO 的点源,构建了单神经元 NO 扩散模型,并在单神经元模型的基础上建立了多神经元模型。通过这些模型,他们分析了神经元 NO 的扩散过程和作用范围。NO 扩散模型基于点源构建,模型中参数取自已发表文献,NO 的释放速率则为一估计数值。

Kanai 等以培养的牛动脉内皮细胞为研究对象,以平板流动小室实验为基础,构建了 NO 扩散-传递-氧化模型。在实验中,他们测量了流动小室不同位置处的 NO 浓度,通过实验探索了剪切力与 NO 释放速率之间的关系。Kanai 构建的模型仿真显示,以培养细胞实验为基础来模拟生理环境中的 NO 传递过程是可行的。但在 Kanai 的模型中没有包含 NO 与血红蛋白、 O_2 、硫醇及其他血流组分之间的相互作用。

1996 年,Micheal 等基于离体培养黏附细胞实验,构建了由 iNOS 催化合成 NO 的浓度时空分布模型^[7]。通过该模型分析,Micheal 等认为,在稳定态下,NO 浓度应该低于 $4\sim 5\mu\text{mol/L}$;他们还指出,通过测定一群细胞产生的硝基化合物来估计 NO 的合成速率,这一方法得到的结果会低于 NO 的实际合成速率。

1998 年,Bulter 等基于 Fick 定律建立了血管系统中 NO 传递模型。该模型把血管假设为中间层(内皮细胞层)为 NO 源的无限长圆柱,内皮细胞产生的 NO 向外扩散到平滑肌细胞层,向内扩散到血流中。内皮细胞附近的红细胞会降低 NO 的清除速率,因而也被考虑在内作为模型的一部分。该模型分析提示我们,与 NO 源的距离是某处 NO 能否激活 sGC 的一个重要指标。

Vaughn 等应用 Fick 定律构建了用于分析 NO 在微循环系统中有效扩散距离的数学模型^[8]。Vaughn 的模型主要由三个组分组成:血管内腔、内皮层和外腔平滑肌。在 Vaughn 的模型中,内皮层被考虑成一个细胞厚度的两个独立的表面,NO 在两个表面同时产生,并各自扩散到血管内腔和外腔平滑肌。Vaughn 分析了血管尺寸不同、血红蛋白对 NO 清除速率不同等情况下 NO 的有效扩散距离。与 Bulter 一样,为了获得与实验数据一致的仿真结果,Vaughn 在模型中也采用了非实验确定的反应速率。

Bo Chen 等则从化学工程学的角度出发,以 Lewis 等的巨噬细胞流动小室实验为基础,模拟了流动小室中 NO 的扩散与反应^[9]。该模型以单层细胞为 NO 释放源,NO 释放后向流动小室中自由扩散,并与不同物质(包括 O_2 , O_2^- , CO_2 等)反应。该模型考虑了 NO 与多种物质的反应,给出了 NO 在反应网络中的变化。但由于这个模型基于培养细胞的流动小室实验构建,而且模型参数均取自已有文献,其模拟环境与生理环境有一定差距。

2000 年,Andrew Phillippe 在 Wood 和 Garthwaite 的点源模型基础上,用 NOS 均匀分布的球模型代替点源模型,模拟了神经细胞合成的 NO 自由扩散到胞外这一过程^[10,11]。该模型考虑了神经细胞的大小和形态对 NO 扩散的影响,分析了不同神经元形态、不同 NO 清除速率下 NO 的扩散。但该模型以一个简单的一阶反应来表征 NO 与其他物质的反应,使得模型中反应信息缺失。

2001 年,Buerk 以分离肝细胞的离体实验为基础,用一维有限差分方程仿真了血流中 NO、 O_2 、血红蛋白的化学动力学过程^[12]。该模型以三层结构来模拟血管,对血流中血红蛋白与 NO 扩散、氧浓度与 NO 扩散的关系做了详细的讨论。

Thomas 以 Lancaster 在 1994、1997 年构建的模型为原型,构建了组织氧浓度对 NO 的生成、扩散的影响的模型^[13]。Thomas 的模型为一平板模型,模型中假定 NO 产生速率线性依赖于组织氧浓度。通过模型的分析显示,NO 可以抑制线粒体的呼吸氧化作用,并可以增加血管附近组织的氧浓度。但 Thomas 在模型中没有采用更接近生理情况的圆柱体为模型几何形状,采用的 NO 组织清除速率也比实验报道的数据要高得多。

2002 年,Kavdia 构建了一个小动脉中,有 HBOC(氧合血红蛋白)存在情况下的 NO 的扩散反应数学模型。通过该研究发现,当 HBOC 外渗时,血管平滑肌的 NO 浓度显著降低。这一模型为分析血红蛋白对 NO 传递的影响开辟了一种新的思路。但该模型中没有考虑 NO 对 O_2 的依赖关系,尤其是 O_2 对 NO 合成的影响。

Shin 构建了人体气管中 NO 与 GSNO 相互关系的数学模型。该模型应用已经报道的文献数据仿真了稳态时 NO 与 S-硝基谷胱甘肽的动力学关系和 NO 在支气管中的传输。该模型显示 GSNO 是 NO 在气道中的载体分子之一。这一研究中的某些数据和结论虽然由于生理场景不一样,不能直接用于血管或组织 NO 模型,但仍然不失为一个很好的参考。

综上所述,国际上不少学者已在 NO 建模方面做了大量工作,研究工作也有了很大进展。尤其在心血管系统方面,NO 扩散反应模型已经从简单的扩散模型发展到比较复杂,包括几个反应在内的扩散反应模型。国内在 NO 建模方面起步较晚,迄今还未见文献报道。通过模型的研究,人们得到了一些较有意义的结果,推动了对 NO 作用机制的理解。但目前所存在的模型依然存在着过于简化及与生理环境有一定差距等缺陷,还需后来者不断努力来推动 NO 建模的发展。

1. 扩散模型研究

由于 NO 扩散速度快,又与体内多种化学物质反应,在体 NO 的检测存在较大困难,因此自 NO 被确认为内皮舒张因子起,NO 建模的工作就没有间断过。

内皮细胞释放 NO 能明显地扩张血管,调节血流,影响组织供氧和其他营养物质的传递,因此在建模工作中,内皮细胞源的 NO 受到了较多的关注,以内皮细胞为中心的血流中 NO 建模是目前 NO 建模中较热门领域。Lancaster, Kanai, Vaughn, Bulter, Kavdia 等都研究了血流中内皮细胞源的 NO 扩散反应。关于神经细胞释放的 NO 的扩散反应行为研究相对较少,目前可查文献中,仅有 Wood 和 Garthwaite,以及 Andrew Phillippe 等少数学者曾对脑中神经细

胞源的 NO 扩散进行了建模。

1994 年, Wood 和 Garthwaite 首次对神经细胞源的 NO 进行了建模。该模型以 Carslaw 和 Jaeger 的热传导模型为原型, 将神经细胞看做没有大小的 NO 点源, 假设神经细胞给出一个时长为 T 、强度为 S 的 NO 释放脉冲, 则 T 时刻, 绕该点源的 NO 分布可表示为:

$$C = \frac{S}{4\pi Dr} \operatorname{erfc} \frac{r}{2\sqrt{DT}}$$

式中: D 为 NO 扩散系数, r 为空间一点到点源的距离。在时长为 T 、强度为 S 的释放脉冲结束 t_1 时间后的某时刻, 绕该点源的 NO 分布可表示为:

$$C = \frac{S}{4\pi Dr} \left(\operatorname{erfc} \frac{r}{2\sqrt{D(t_1 + T)}} - \operatorname{erfc} \frac{r}{2\sqrt{Dt_1}} \right)$$

考虑到 NO 会与体内其他化学物质反应, Wood 和 Garthwaite 以简单的一阶过程模拟了 NO 的消耗, 假设 NO 在扩散过程中的半衰期为 λ , 则时长为 t 、强度为 S 的 NO 释放脉冲在点源周围形成的 NO 分布可表示为:

$$C = \frac{S}{8(\pi D)^{\frac{3}{2}}} \int_0^t \frac{e^{-\frac{r^2}{4D\tau} - \lambda\tau}}{\tau^{\frac{3}{2}}} d\tau$$

基于上述数学模型, Wood 和 Garthwaite 对神经细胞源的 NO 在脑中的扩散进行了仿真, 并给出了脉冲型 NO 释放、连续型 NO 释放、单个点源释放 NO、多个点源释放 NO 等情况下 NO 的扩散结果。

2000 年, Andrew Phillippe 在参考 Wood 和 Garthwaite 的神经细胞点源模型的基础上, 考虑了神经细胞大小、形状对 NO 扩散的影响, 构建了神经细胞球模型。Andrew Phillippe 将神经细胞看成一个均匀分布着 NOS 的球体, 每一个 NOS 都是一个合成 NO 的点源, 这些 NOS 点源行为同步。对于瞬间冲击波型 NO 释放, NO 在细胞周围的分布函数为:

$$C(a, r, t) = \iiint_{(0,0,0)}^{(a,\pi,2\pi)} \frac{Q\rho r'^2 \sin\theta}{8(\pi Dt)^{\frac{3}{2}}} e^{-\frac{r'^2}{4Dt} - \lambda t} dr' d\theta d\varphi$$

式中: Q 为单位体积的 NO 释放强度, ρ 为 NOS 密度, a 为神经细胞半径。在极坐标中求解该积分式, 由于假设 NOS 分布均匀, 则根据球对称, 该式可简化为:

$$C(a, r, t) = Q\rho e^{-\lambda t} \left[\frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{a+r}{2\sqrt{Dt}} \right) + \frac{1}{2} \operatorname{erf} \left(\frac{a-r}{2\sqrt{Dt}} \right) - \frac{1}{r} \sqrt{\frac{Dt}{\pi}} \left(e^{-\frac{(a-r)^2}{4Dt}} - e^{-\frac{(a+r)^2}{4Dt}} \right) \right]$$

其中 $\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_0^x e^{-u^2} du$ 。考虑神经细胞连续释放 NO, 持续时间 t 的方波型 NO 释放, 该神经元周围的 NO 分布为:

$$C(a, r, t) = \iiint_{(0,0,0)}^{(a,\pi,2\pi)} \frac{Q\rho r'^2 \sin\theta}{8[\pi D(t-t')]^{\frac{3}{2}}} e^{-\frac{r'^2}{4D(t-t')} - \lambda(t-t')} dr' d\theta d\varphi dt'$$

Andrew Phillippe 还考虑了神经突触等神经细胞结构, 给出了神经细胞胞体、神经突触共同释放 NO 时的 NO 分布结果。对于 NO 在扩散过程中的反应消耗, Andrew Phillippe 与 Wood 一样, 将之看做一个简单的一阶反应, 以 NO 半衰期为衡量指标, 以一个指数型函数模拟了 NO 扩散过程中的消耗。

Wood 和 Garthwaite, Andrew Phillippe 从热传导模型出发, 根据 Fick 定律构建了脑内神经细胞源 NO 扩散的数学模型。在他们的模型中, 所有数据基本都来自自己出版的文献, 缺少

实验支持。反观 NO 在血流中的扩散模型,许多研究者已经做了不少离体实验来支持模型构建,如 Kanai 的牛动脉内皮细胞流动小室实验、Lewis 的巨噬细胞流动小室实验等。

2. 反应模型研究

NO 能与体内多种化学物质反应,在 NO 建模过程中,NO 的反应动力学已经越来越受到研究者们的重视。

在早期的 NO 建模研究中,研究者以简单的一阶反应来表征 NO 在扩散过程中的反应,以半衰期来衡量 NO 消耗速度的快慢,如 Lancaster, Wood 和 Garthwaite, Kanai 等的早期 NO 模型。之后,人们开始注意到 NO 所参与的对 NO 扩散有着重要影响,NO 的模型中出现了与 NO 相关的反应,如 Lancaster, Bulter, Thomas, Vaughn, Kavdia 等研究者的模型。这些模型多为循环系统,即血流中 NO 的扩散反应模型,人们主要考虑了血红蛋白、O₂ 与 NO 的反应。由于 NO 能与血红蛋白中的铁金属基团结合,因此血红蛋白能清除 NO 从而影响 NO 扩散。血流中存在大量的血红蛋白,因此几乎所有后期的模型都考虑了 NO 与血红蛋白的反应。O₂ 作为合成 NO 的底物之一,也受到了不少研究者的关注,Thomas, Buerk 在建模过程中都考虑了 O₂ 对 NO 释放、扩散的影响。Thomas 特别就不同氧浓度对 NO 的释放和半衰期的影响进行了研究。

Buerk 考查了 NO 生理研究和模型研究状况,总结了 NO 的生化特点,并对血流,脑、肺等组织的 NO 建模工作进行了探讨和分析^[12]。Buerk 认为,NO 的合成速率是氧浓度依赖性的,两者之间满足

$$R_{NO} = R_{NO_{max}} \times O_2 / (O_2 + K_m)$$

其中 K_m 是 Michalis 常数。Buerk 认为,NO 对线粒体呼吸即 O₂ 的代谢也有一定的影响,其关系可以用

$$R_{O_2} = R_{O_2_{max}} C_{O_2}^2 / (C_{O_2}^2 + K'_m)^2$$

描述,其中

$$K'_m = 16 \mu\text{mol/L} (1 + C_{NO} / 27 \text{nmol/L})$$

Buerk 总结了部分 NO 的反应,如 NO 的自氧化反应方程可表示为

$$\frac{dC_{NO}}{dt} = -4kC_{O_2}C_{NO}^2$$

NO 与 O₂⁻ 的反应可表示为:

$$\frac{dC_{NO}}{dt} = -kC_{NO}C_{O_2^-}$$

考虑 NO 与 ONOO⁻ 的反应,Buerk 总结 NO 的消耗速率为

$$\frac{dC}{dt} = -(k_1 C_{O_2^-} + 4k_2 C_{O_2} C_{NO} + k_3 C_{ONOO^-}) C_{NO}$$

对超氧阴离子、过氧亚硝酸根离子等的生化反应动力学,Buerk 未做讨论。

Bo Chen 等以 Lewis 的离体巨噬细胞实验为基础,从化学工程学的角度研究了 NO 扩散过程的反应动力学^[6]。Bo Chen 将流动小室看做由均一溶液填充的容器,巨噬细胞产生的 NO 和 O₂ 都穿过细胞膜进入溶液中,NO 与 O₂ 反应生成 NO₂ 之后转化为 N₂O₃,最终形成 NO₂; O₂⁻ 与 NO 反应形成 ONOO⁻,ONOO⁻ 部分裂解,并同时与 NO、CO₂ 等物质反应;进入溶液的 O₂ 部分被溶液中的 SOD 清除。Bo Chen 总结出各物质的反应速率为:

$$R_{NO} = -4k_1 C_{NO}^2 C_{O_2} - k_2 C_{NO} C_{O_2} - 2k_3 C_{NO} C_{per}$$

$$R_{O_2} = -k_2 C_{NO} C_{O_2} - k_4 C_{SO_2} C_{O_2} - k_5 C_{H_2O_2} C_{O_2}$$

$$R_{per} = k_2 C_{NO} C_{O_2} - (k_6 + k_7) C_{ONOO} - k_8 C_{CO_2} C_{ONOO} - k_9 C_{NO} C_{per}$$

Bo Chen 的模型考虑了各种化学物质之间的相互影响关系,给出了 NO 扩散过程中较全面的影响因素,还考虑了 ONOO⁻ 参与的反应,研究了 ONOO⁻ 的变化。但由于他是从化学工程学的角度出发的,因此在分析影响因素时忽略了某些生理细节,比如 NO-ONOO⁻ 之间的反应,尽管它们的反应速率不慢,但由于 NO、ONOO⁻ 的在体浓度很低,即使在缺氧态,NO 和 O₂⁻ 都大量产生,ONOO⁻ 合成增加的情况下,NO 也达不到与 CO₂ 竞争的 ONOO⁻ 程度,因此这一反应对实际生理情况的影响是十分微小的,将其考虑在模型内反而会使模型的 Jacobi 条件数增多,增加了方程组的求解难度。另外,由于 Bo Chen 模型的原型为流动小室,因此 Bo Chen 的模型中 O₂ 浓度为一恒定量,NO 和 O₂⁻ 的产生速率从单层培养的活化巨噬细胞的流动小室实验中获取,也取为常数,这与脑缺氧等生理情况是有一定差距的。

目前,脑内 NO 的反应动力学研究目前还鲜见文献,基于离体实验的脑内反应动力学模型还未见报道,而 NO 在脑缺血、缺血再灌注等过程中起着重要作用,因此建立脑内 NO 的反应模型是很有意义的。在脑缺血、再灌注等情况下,脑内 NO 主要来源于神经细胞而非内皮细胞,所以脑组织内 NO 反应动力学建模环境与循环系统中 NO 动力学建模环境有较大差异。在缺氧、再灌注等情况下,氧气的动态变化成为影响 NO 合成、反应的主要因素;同时由于细胞呼吸链电子漏形成的大量超氧阴离子能与 NO 快速结合产生 ONOO⁻,超氧阴离子也成为影响 NO 浓度的重要因素之一;ONOO⁻ 是缺氧、再灌注过程中 NO 的一个重要产物,有较强的细胞毒性,是缺氧等情况下产生神经细胞毒害的关键因子之一。为进一步研究缺氧、再灌注过程中 NO 的变化规律并探索其作用机制,我们以 O₂、NO、O₂⁻、ONOO⁻ 为主体构建了 NO 反应网络,由于 O₂ 难以穿过细胞膜扩散到胞外,相关反应主要在胞内进行,因此我们选择了神经细胞为反应环境进行 NO 反应动力学研究。应用激光共聚焦扫描技术和荧光标记技术,我们获得了离体培养的神经细胞在缺氧状态下 NO 和 O₂⁻ 的生成数据。应用这些数据,我们可调整基于实验条件构建的实验模型中的部分参数。理想模型基于神经细胞生理基础构建,结合参数的调整,我们可以以此来仿真缺血、再灌注情况下神经细胞内 O₂、NO、O₂⁻、ONOO⁻ 的变化。

三、脑缺血状态下 NO 的扩散动力学

在体研究表明,大脑缺氧 5min 将导致缺氧区脑细胞死亡。因此,舒张缺氧区域血管平滑肌,扩张血管,改善供血供氧,是机体对缺氧的急性反应之一。NO 作为一种血管舒张因子在血流调节中发挥着重要作用^[14]。在脑部缺氧早期,NO 有明显的一过性升高^[15]。研究表明,神经元产生的这个一过性升高的 NO 具有神经毒性作用^[16]。然而,因缺氧而产生的 NO 是否能扩散到缺氧部位邻近的脑血管平滑肌,使血管舒张并增加血流,从而具有神经保护作用功能,有关这方面的研究还未见文献报道。

大脑缺氧时 NO 升高的机制目前已经研究得比较清楚,即大脑缺氧时,谷氨酸释放增加,导致神经细胞 NMDA(N-甲基-D-天冬氨酸)离子通道开放,促使 Ca²⁺ 内流入胞内,内流的 Ca²⁺ 激活 NO 合成酶,合成大量 NO。已有研究表明,谷氨酸刺激会导致大脑血流增加^[17],因此我们推测缺氧情况下,由神经细胞产生的这部分一过性升高的 NO 有可能参与舒张血管、增加血流这一过程,从而具有神经保护作用。

要研究大脑缺氧时产生的 NO 是否具有通过扩散而舒张血管供应的功能,从在体实验角度,我们还面临技术和方法学上的困难。因此,我们从 NO 扩散的数学建模和仿真角度,结合

离体实验,对此问题进行了研究。基于扩散动力学,以 NO 扩散的点源模型为基础,结合静息态和缺氧态 NO 释放仿真函数,我们分别构造了静息态和缺氧态下 NO 扩散的平板模型。

通过模型,我们分别得到神经细胞在静息态和缺氧态下的扩散行为,模拟得到一些 NO 在脑组织中扩散的定量结果。基于这些数据,我们得以进一步分析 NO 在脑部缺氧时可能发挥的生理作用。

1. 模型假设

(1)NO 作为一种非极性的小分子,可以自由穿过细胞膜结构,在组织间迅速扩散。因此,我们忽略细胞结构和组织结构对扩散的影响,假定 NO 的扩散是均匀的,其扩散速度由扩散系数 D 决定。

(2)NO 在扩散过程中会与 O_2 反应并衰减,其半衰期与其所处环境的氧浓度相关,氧浓度越低,NO 半衰期越长。在实际生理环境中,NO 的半衰期还受到超氧阴离子及亚硝酸根离子等的影响,但在本模型中主要考虑 O_2 的影响。

(3)在正常状态下,海马区神经元以较低水平稳定地产生 NO,此时 NO 的产生与消耗处于动态平衡,我们定义这种状态为“静息态”。在缺氧情况下,海马神经元产生的 NO 显著增加,动态平衡被破坏,NO 分布发生改变,我们定义这种状态为“激活态”。根据我们的实验,给予缺氧刺激后 4.5min(270s),NO 荧光染料强度有显著增加,总荧光强度上升到刺激前的 168%,其后荧光强度基本持平。根据实验数据,经比较筛选,我们用高斯函数 $e^{-(\frac{r}{133})^2}$ 来模拟这一过程。

(4)海马与整个大脑相比体积很小,且 NO 由于快速衰减只能扩散很短距离,因此我们认为海马产生的 NO 的扩散没有边界限制,可以自由扩散到最远距离。

(5)海马区 NO 主要由 CA₁ 区神经元产生,假定 CA₁ 区为神经元单层、分布均匀,且每个神经元都看做一个独立的 NO 点源,如图 1-1-1 所示。

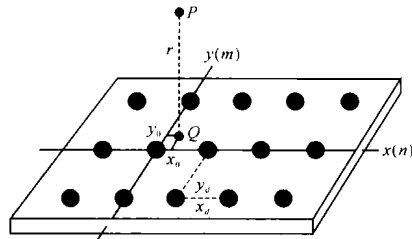


图 1-1-1 平板模型示意图

r : 空间一点 P 到平板源的距离。

x_d, y_d : 神经元间 x, y 方向的间隔。神经元均匀分布,根据文献[7],可以得到 $x_d = y_d = 60\mu\text{m}$ 。

n_0, n_1 : x 方向神经元计数的下限、上限。大鼠海马形状约为 $(8\sim 9)\text{mm} \times 3\text{mm}$ 。取长径方向为 x 方向,则 x 方向每行神经元总数为 150。取短径方向为 y 方向,则 y 方向每列神经元总数为 50。以距离 P 在平板上的投影点 Q 最近的神经元为计数零点。

m_0, m_1 : y 方向神经元计数的下限、上限。

x_0, y_0 : 投影点 Q 到最近神经元的 x, y 方向的距离。

(6)NO 衰减符合指数规律,有

$$T_{1/2} = e^{\frac{2}{\lambda}} \quad (\lambda \text{ 为衰减系数}, T_{1/2} \text{ 为 NO 半衰期}) \quad [1]$$

(7)激活态 NO 初始浓度假设为 0mol/L 。神经元被激活后释放大量的 NO,使其周围 NO 浓度迅速升高,尽管实际上激活态 NO 存在一个静息态遗留的浓度,但由于激活态初始 NO 释

放强度约为静息态 NO 释放强度的 10 倍且在几毫秒之内迅速扩散到邻近区域,此时原初始浓度对激活态模型的影响可以忽略,因此对激活态模型做此简化是可以接受的。

2. 建模过程

基于以上假设,根据 Fick 定律,我们可以得到 NO 扩散的基本微分方程:

$$\frac{\partial u}{\partial t} - D \nabla^2 u = S(x, y, z, t) - \lambda u \quad [2]$$

u : t 时刻 (x, y, z) 处的 NO 浓度;

D : NO 扩散系数, $3300 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ^[8];

λ : NO 衰减系数,由方程[1]决定;

$S(x, y, z, t)$: t 时刻 (x, y, z) 处 NO 的释放强度。

(1) 静息态模型

在静息态有

$$\frac{\partial u}{\partial t} = 0$$

故方程[2]可简化为

$$\lambda u - D \nabla^2 u = S(x, y, z, t) \quad [3]$$

对于点源,根据其球对称性,在球坐标系中解方程[3]可得如下解:

$$C_r(r) = \frac{S_r}{4\pi D r} e^{-r\sqrt{\frac{\lambda}{D}}} \quad [4]$$

r : 空间一点 P 到点源的距离;

S_r : NO 释放常数,即静息态 NO 的恒定释放速率;

λ : NO 衰减系数,取静息态 NO 半衰期为 5s ^[18], 则 $\lambda = 0.0134/\text{s}$ 。

对于静息态神经元平板,将各个神经元作用累加得到静息态海马神经元模型:

$$C_r(r) = \frac{S_r}{4\pi D} \sum_{j=m_0}^{m_1} \sum_{i=n_0}^{n_1} \frac{e^{-\sqrt{r^2 + (jy_d + y_0)^2 + (ix_d + x_0)^2} \sqrt{\frac{\lambda}{D}}}}{\sqrt{r^2 + (jy_d + y_0)^2 + (ix_d + x_0)^2}} \quad [5]$$

黄志农等通过实验得到静息态大鼠海马表面 NO 浓度约为 $1 \mu\text{mol}/\text{L}$ ^[19,20],我们通过实验测定大鼠海马神经元外径为 $(11.7 \pm 2) \mu\text{m}$ ($n=9$),取 $r=11.7 \mu\text{m}$,从方程[5]可以推算出 $S_r = 6.4 \times 10^{-17} \text{mol}/\text{s}$ 。

(2) 激活态模型

解方程[2]可以得到点源解:

$$C_a(r, t) = \frac{S_a}{8(\pi D t)^{\frac{3}{2}}} e^{-\frac{r^2}{4Dt}} e^{-\lambda t} \quad [6]$$

r : 空间一点到点源的距离;

S_a : 点源在 $t=0$ 时释放的 NO 量;

λ : NO 衰减系数, λ 取值由 NO 半衰期决定。

根据我们的实验,我们用高斯函数 $e^{-(\frac{t}{\tau})^2}$ 来模拟缺氧刺激后海马的 NO 释放。由于给予缺氧刺激后 4.5min (270s) 总荧光强度上升到刺激前的 168% ,其后荧光强度基本持平,荧光强度反映的即为 NO 量的变化,因此我们得到方程:

$$\int_0^{270} S_a e^{-(\frac{135}{t})^2} dt = 0.68 \times 30 \times 60 \times S_r \quad [7]$$