

2007 麻醉学新进展

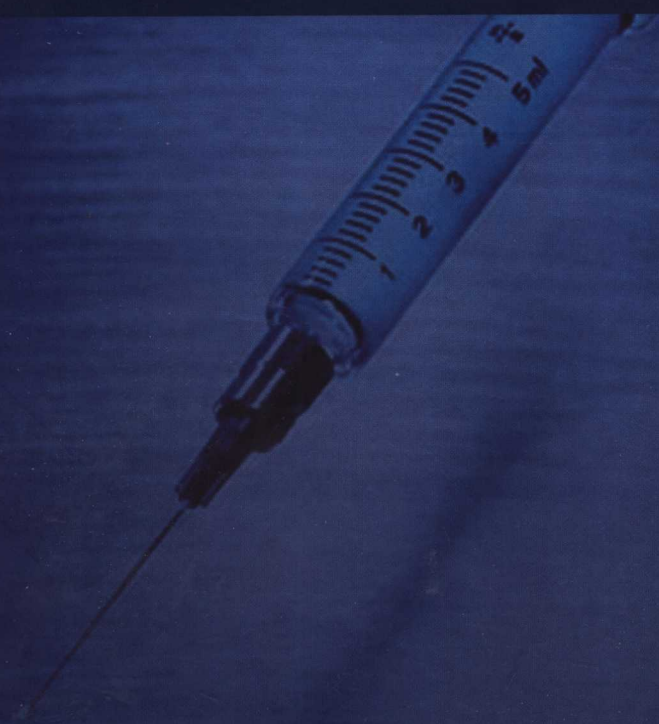
ADVANCES IN
ANESTHESIOLOGY

——2007——

主 编 曾因明 邓小明
副主编 姚尚龙 李文志



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



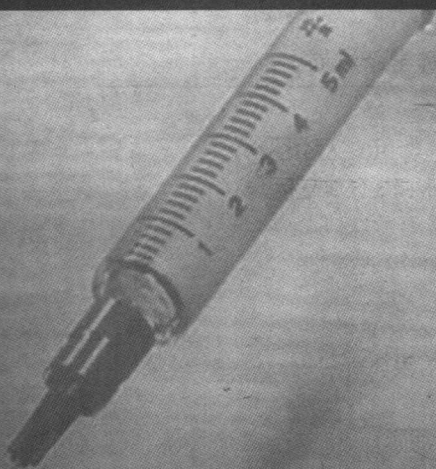
2007 麻醉学新进展

ADVANCES IN
ANESTHESIOLOGY
——2007——

主 编 曾因明 邓小明
副主编 姚尚龙 李文志
秘 书 邹文漪 汤 媛



人民卫生出版社
PEOPLE'S MEDICAL PUBLISHING HOUSE



图书在版编目(CIP)数据

2007 麻醉学新进展/曾因明等主编. —北京: 人民卫生出版社, 2007.4

ISBN 978-7-117-08552-6

I. 2... II. 曾... III. 麻醉学-进展-中国-2007
IV. R614

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 030949 号

2007 麻醉学新进展

主 编: 曾因明 邓小明

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E-mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 三河市富华印刷包装有限公司

经 销: 新华书店

开 本: 889×1194 1/16 **印张:** 19

字 数: 798 千字

版 次: 2007 年 4 月第 1 版 2007 年 4 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-08552-6/R·8553

定 价: 49.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

编者人名单

主要作者(以拼音字母为序)

安刚	毕严斌	陈杰	陈昆洲	陈锡明	陈煜	邓硕曾	邓小明
杜冬萍	傅志俭	古妙宁	郭曲练	杭燕南	何名熙	何绍明	黑子清
胡兴国	黄宇光	蒋豪	蒋耀光	蒋宗滨	江伟	姜楨	李敬远
李士通	林桂芳	刘进	刘宿	刘永哲	吕云落	马永丰	马正良
闵苏	欧阳葆怡	戚晓良	钱燕宁	卿恩明	余守章	谭冠先	陶军
屠伟峰	王国林	王俊科	王天龙	王焱林	王云	闻大翔	熊利泽
熊源长	鄢建勤	杨拔贤	杨承祥	杨建平	杨天德	姚尚龙	许鹏程
徐世元	薛富善	于布为	于金贵	余大松	喻田	俞卫峰	岳云
曾邦雄	曾因明	张野	招伟贤	郑利民	朱科明		

参编人员(以拼音字母为序)

薄禄龙	陈建颜	程智刚	池信锦	戴玥	方波	冯丹	丰浩荣
韩志国	何亮	嵇富海	季永	雷翀	李成龙	李春华	李金宝
李娟	李锐	刘薇	吕浩	吕欣	马虹	毛燕飞	缪雪蓉
彭捷	彭静	皮治兵	邱郁薇	任瑜	上官王宁	尚游	邵海军
沈晓芳	宋海波	谭虎	王超	王汉兵	王俊华	王玲玲	王志萍
王颖	吴长毅	吴飞翔	吴镜湘	吴新海	项红兵	杨柳青	杨卫红
肖玮	解立俊	徐建设	徐永明	许平	许学兵	许亚超	薛庆生
于军	于鹏	张鸿飞	张锦枝	张双银	张晓坤	张云翔	张维
赵丽云							

前言

经国内众多麻醉学专家的努力,《麻醉学新进展》第一辑和读者见面已经有一年多的时间了。诸多麻醉学前辈和同仁对该书的出版给予了充分的肯定和支持,也提出了许多中肯的意见和建议。大家一个共同的心愿,就是希望将麻醉学新进展一书编撰成为一套真正能及时、系统地反映国内外麻醉学新理论、新技术、新疗法和新观点的高级参考书。这也是我们编撰该书第二辑的最大动力。

麻醉学的新进展不仅是指新理论和新技术的出现,还有一个对既往的理论和观点再认识、再提高的问题。随着我们对外交流的不断扩大与深入,在信息科学日益发达的今天,及时获得“新知”已经比过去任何时候都要简单而容易得多。但是,在每年不断涌现的浩如烟海的文献面前,如何去系统地归纳、总结和掌握这些“新知”,往往又成了新的问题。为了尽量避免大家感到无所适从,根据我们自己的经验,请相关方面的专家就特定专题作知识更新讲座式的总结,或可达到兼顾选题的博大与精深的目的,起到提高效率、事半功倍的学习效果。

与麻醉学新进展的第一辑相比,在第二辑中我们基本上都作了全新的选题,并再次邀请目前国内外在临床和科研方面饶有建树的70余位专家亲自执笔,以期能真正达到向大家介绍“新知”的目的。

由于编写内容庞大,执笔人员众多,所涉猎文献的深度和广度有异,本书在内容上难免有重叠或出入之处,希望读者能在阅读过程中加以甄别,并欢迎提出批评和改进意见,以便再编时加以改进。

曾因明 邓小明

2007年2月

目 录

I 麻醉学基础	1
1. 中枢神经系统水通道蛋白 4 的研究进展	1
2. 神经生长因子前体的研究进展	4
3. 内源性大麻素系统的研究进展	7
4. BLA 与情绪相关记忆的最新研究进展	10
5. 挥发性吸入麻醉药的 5 埃理论、相加作用与联合应用	12
6. 全身麻醉药物与学习记忆的实验研究进展	14
7. 钙调素与全麻机制	17
8. 氙气麻醉作用机制研究进展	19
9. 细胞色素 C/心磷脂复合体与氧化心磷脂	21
10. 麻醉药对血管收缩反应性的影响	25
11. 外周型苯二氮草受体在心血管系统中的作用及其对心肌线粒体通透性转换的影响	27
12. 脑出血后脑水肿形成机制	31
13. 吸入麻醉药的脏器保护作用	34
14. 预处理对脑和脊髓保护作用的研究进展	39
15. 乌司他丁与脑保护	46
16. 吗啡预处理心肌保护作用的研究进展	48
17. 挥发性吸入麻醉药对肺的作用	50
18. 乌司他丁与肾功能保护的研究现状	53
19. 促红细胞生成素与脏器保护	56
20. 辣椒素-敏感感觉神经与胃粘膜细胞的保护	58
21. 肾剂量多巴胺肾脏保护再认识	61
22. 远端缺血预处理的研究进展	63
23. 研究麻醉药相互作用的意义与方法	65
24. 麻醉与 5-羟色胺综合征	68
25. 术后应激性高血糖的研究进展及对策	71
26. 基于机制的慢性疼痛治疗新靶点	74
27. 脊髓背根神经节交感神经芽生的分子机制	78
28. 背根神经节内降钙素基因相关肽与神经病理性疼痛研究进展	81
29. 带状疱疹后神经痛动物模型及其相关病理机制研究进展	84

II 临床监测	90
30. 理想麻醉状态与麻醉深度监测	90
31. 麻醉深度及其监测——如何改进我们的麻醉?	92
32. BIS 和 AAI 用于麻醉深度监测与调控的研究进展	95
33. 术中知晓与监测	98
34. 术中呼吸功能监测新进展	100
35. 肺动脉导管参数的分析与整合	107
36. 应用胸腔内血容量评价心脏前负荷	110
III 临床麻醉	113
37. 现代全麻的回顾与展望——纪念吸入麻醉诞生 160 周年	113
38. 避免麻醉中知晓的策略	115
39. 困难气道管理技术新进展	117
40. 食管引流型喉罩通气道及其临床应用	124
41. 气管插管型喉罩通气道及其临床应用技术	133
42. 双腔支气管导管的型号选择和管端定位	138
43. 氧化亚氮对气管导管和喉罩套囊内压的影响	141
44. 心肺手术和肺动脉高压	145
45. 婴幼儿发绀型先天性心脏病麻醉要点	152
46. 供心保护的新策略	155
47. 心脏手术中肌松药应用新进展	158
48. 肝移植术中血流动力学监测和肺通透性变化	161
49. 围肝移植期肺保护进展	165
50. 肝移植围术期肾功能损害的机制及保护策略	169
51. 围术期血液保护	174
52. 糖尿病患者围术期管理的相关问题探讨	176
53. 加速肌松药起效的研究进展	180
54. 非去极化肌松药的相互作用	183
55. 琥珀胆碱的作用机制和临床应用进展	185
56. 肌肉松弛药的残余阻滞作用及其拮抗	189
57. 局麻药周围神经毒性及其临床意义	193
58. 联合蛛网膜下腔与硬膜外腔阻滞的风险与并发症	198
59. 抗凝患者的椎管内麻醉	201
60. 产科椎管内麻醉神经并发症	207
IV 危重病医学	211
61. 机械通气所致肺损伤的研究进展	211
62. 急性肾功能损伤与衰竭的生物标志物	216
63. 创伤患者弥散性血管内凝血和多器官功能障碍的关系	218

64. 严重创伤后止血功能异常	221
65. 血糖控制与危重患者的预后	225
66. 危重病性神经肌肉异常	227
67. 围术期容量动力学	234
68. 低温治疗进展	237
69. 血管内热交换降温技术的临床应用	240
70. 围术期 α_2 肾上腺素受体激动剂应用进展	242
71. 围术期 β -受体阻滞剂的应用策略	244
V 疼痛诊疗学	247
72. 阿片类药物应用新进展：从基础研究到临床实践	247
73. 阿片类药物镇痛治疗的困惑——痛觉过敏作用及其机制研究进展	250
74. 癌痛的发生机制及治疗研究进展	253
75. 骨癌痛痛觉敏化机制的研究进展	257
76. 老年人疼痛的临床特点	259
77. 术后持续性疼痛	262
78. 糖尿病周围神经病变疼痛机制基础研究及治疗进展	266
79. 胸段硬膜外镇痛与术后患者转归	272
80. 椎管内镇痛与神经毒性	275
81. 鞘内给药镇痛的近况	278
82. 医用臭氧与临床疼痛	281
83. 新型镇痛药 COX-2 抑制剂的临床新用途	285
84. 三磷酸腺苷和腺苷在麻醉、危重症和疼痛治疗中的应用进展	288
VI 麻醉学科建设	291
85. 重视基础性工作 加速我国麻醉学科发展	291
86. 麻醉医师的职业危害及其防护	292

麻醉学基础

1. 中枢神经系统水通道蛋白 4 的研究进展

自 1988 年 Peter Agre 在红细胞膜发现第一个水通道蛋白, 揭开了水跨细胞膜快速转运的神秘面纱以来, 至今人类已在哺乳动物体内发现 11 种水通道蛋白(aquaporins, AQP)即 AQP0~AQP10, 构成水通道蛋白家族。水通道蛋白家族为临床水代谢障碍疾病的病理机制及治疗提供了重要的理论基础, 也使治疗新靶点的发现和临床新药的开发成为可能。近年来随着动物实验与离体细胞实验及分子生物学实验的研究, 对水通道家族成员的分子结构、生理学功能及其与疾病的关系均有了深入的理解。本文概述目前对 AQP4 的研究以及 AQP4 在中枢神经系统中的作用。

一、AQP4 的结构、亚型及在中枢的分布

(一) AQP4 的结构

与所有水通道蛋白一样, AQP4 是单一拷贝基因。AQP4 的基因定位于染色体 18q11.2 与 q12.1 之间的连接处, 由四个外显子组成, 它们分别编码 127、55、27、92 位氨基酸序列, 其中含有三个内含子, 其长度分别为 0.8、0.3 和 5.2Kb。较大的第一外显子编码氨基端, 而较小的第 2 至 4 外显子编码羧基端。AQP4 的一级结构也与其他水通道蛋白相似, 均为 6 跨膜的单肽链, 其氨基和羧基末端位于细胞内, 含 3 个细胞外环(A、C、E)和 2 个细胞内环(B、D)。其中, E 环对外界环境非常敏感, 通过其对外界环境改变的感应, 可激活 AQP4 功能; 而位于 B 环和 E 环的天冬酰胺-脯氨酸-丙氨酸基序(Asn-Pro-Ala, NPA)是家族成员的共有特征性结构与功能区, NPA 从膜的两侧吻合, 呈对称性镜像结构, B 环和 E 环下沉至双分子层内, 中心部分折叠形成狭窄的孔, 孔道仅允许一个水分子通过, 此结构即为沙漏模式(hourglass)。AQP4 四级结构是由每个具有活性的约 30kDa 独立亚单位组成的四聚体, 每个亚单位中空部分含有一个独立通道, 它们在功能上都可以作为一个独立活性的水通道。该四聚体在膜上组装是维持 AQP 的稳定及其正常功能所必

需的。由于 AQP4 在已知的汞结合位点第 189 氨基酸位点上缺乏半胱氨酸, 对汞的水通透抑制作用不敏感, 因而 AQP4 属于汞不敏感性水通道蛋白(mercurial-insensitive water channel, MIWC)。

(二) AQP4 亚型

AQP4 单体有两种亚型 M1 和 M23, 分子量分别为 34kDa 和 32kDa, 其颗粒排列成直方四聚体的几何结构, 由于转录起始于甲硫氨酸的不同位点而导致两者氨基末端不一致。在中枢神经系统同时存在 M1 和 M23, 但 M23 的含量远较 M1 丰富, 约是 M1 的三倍之多。内源性 AQP4 四聚体常同时含有 M1 和 M23 单体组成的异源四聚体, 而对 M1 和 M23 单体在功能上的区别仍在研究中。

最近研究表明, M1 和 M23 对细胞生长、细胞形态及水转运有着不同的作用。Nicchia 等利用 RNAi 技术发现 M23 过度表达将导致细胞体积明显增加; 而 M1 过度表达则将使细胞体积明显缩小。Silberstein 等通过对体外培养的肾小管上皮细胞研究表明, M23 与 AQP4 在膜内形成正交排列颗粒(orthogonal arrays of intramembranous particles, OAPs)相关, 而 M1 可调控 OAP 的组成结构; 由 M23 组成的 AQP4 同源四聚体的水通透性远大于由 M1 组成的 AQP4 同源四聚体。

(三) AQP4 在中枢神经系统的分布特点

AQP4 是中枢神经系统最早发现的水通道蛋白, 广泛分布于中枢胶质界膜、室管膜、海马齿状回、下丘脑的视上核与室旁核以及脑表面的软脑膜、小脑 Purkinje 细胞、脑微血管的细胞表面。其中与毛细血管、蛛网膜和软脑膜直接接触的星形胶质细胞及其终足上 AQP4 表达最为丰富, 称之为极性分布, 这也是 AQP4 在中枢分布上最为显著的特点。

血管周围的星形胶质细胞突起是水分子流动的主要部位, 提示 AQP4 的存在可以易化中枢神经系统血管周围和蛛网膜下腔的水转运, 从而调节中枢神经系统与外周组织的

水代谢平衡。同时,在星形胶质细胞伸向神经毡处的突起膜表面也高水平表达 AQP4,提示 AQP4 参与神经毡细胞内外水的转运,从而调节中枢神经系统内环境的水平衡。Rash 等用冻结破碎(freeze fracture)法研究证实 AQP4 可能是星形胶质细胞内的组成部分,并参与星形胶质细胞 K^+ 平衡的调节。

最近,Amiry 等通过免疫胶体金标记定量研究分析显示,不同脑区星形胶质细胞表达 AQP4 的水平并不一致。如小脑星形胶质细胞表达 AQP4 的水平远高于大脑新皮质或纹状体,且极性分布的方式也不尽相同;大脑新皮质 AQP4 主要表达在与软脑膜相接近的星形胶质细胞终足,而小脑则与之相反,AQP4 主要表达在深层的颗粒层。推测这种 AQP4 表达的差异可能是由不同的细胞锚定机制所决定的,该锚定机制正在进一步研究中。

二、AQP4 的细胞定位、水转运机制及活性调控

(一) AQP4 的细胞定位

长期以来对于 AQP4 是否存在于神经元细胞膜,还是既位于神经元细胞膜又存在于星形胶质细胞膜或(和)其他类型胶质细胞膜一直是争论的焦点。最近研究表明 AQP4 主要表达在星形胶质细胞,且在星形胶质细胞与血管接触的突起终足(血管周足)上呈高水平表达。星形胶质细胞血管周足高水平表达 AQP4 与细胞骨架蛋白-杜兴肌营养不良肌萎缩蛋白复合体(dystrophin-glycoprotein complex, DGC)密不可分。DGC 蛋白复合体与横纹肌纤维结构及肌细胞内钙离子的平衡关系密切。在中枢神经系统,DGC 蛋白复合体主要包括 α 肌聚糖、 β 肌聚糖、Dp71、 α -dystrobrevin、共栖蛋白和 α -共栖蛋白。研究表明 AQP4 的 C 末端通过与 DGC 蛋白复合体 α -共栖蛋白的 PDZ 结构域将 AQP4 蛋白锚定在星形胶质细胞膜上。

DGC 并不是特异性 AQP4 锚定蛋白。在星形胶质细胞膜还发现一种内向整流钾通道(inward rectifying potassium channel, Kir)。Kir4.1 的 C 末端也通过 DGC 蛋白复合体 α -共栖蛋白的 PDZ 结构域而锚定在细胞膜上。AQP4 和 Kir4.1 在 DGC 的作用下同时分布于星形胶质细胞的一侧(血管周足),为星形胶质细胞参与中枢神经系统内环境稳定的调节提供了重要的分子生物学基础。越来越多的研究表明 DGC 作为细胞骨架蛋白不仅参与细胞结构的维持,还参与细胞膜信号转导中脚手架蛋白(signaling scaffold)的作用。随着分子生物学的发展,对与通道蛋白 AQP4、Kir4.1 联接的结构域 PDZ 研究也越来越多。近来的研究表明 PDZ 结构域在细胞信号转导中不仅起着联接的作用,而且在调控通道蛋白的“门控”作用中也发挥着不可忽视的作用。

(二) AQP4 的水转运机制

AQP4 对水的通透作用表现为高度选择性和特异性,对水的选择性转运是由于其孔道大小的匹配性。AQP4 孔道最狭窄的部位在 B、E 环两个 NPA 基序形成的孔内,其孔道直径 2.8 Å,与一个水分子的平均范德华直径相似。其对质子的屏障作用体现在:①静电排斥作用:AQP4 第 195 位精

氨酸(Arg-195)残基能产生很强的正电荷,可造成对质子化水的排斥作用。分子动力学模拟实验研究显示,质子化的水链在临近 Arg 处遭到破坏。②水偶极的再定向性:位于半空环上的 NPA 基序可提供正电荷的偶极,当水分子跨过该点时,可不断调整方向,从而破坏水分子之间的氢键缔合作用,也就消除了质子流通过的可能性。此外,AQP4 所含的羰基氧只能使水合离子部分脱水,而不允许离子通过狭窄的水孔道。

AQP4 有高速转运水的能力,对水的通透性比其他水通道蛋白高 3~4 倍。有研究证实,AQP4 形成孔道的部位大部分呈疏水性,也存在分离的极性残基或主链的羰基,可与水分子形成氢键缔合的网络。该极性部位既可打破呈单行排列的水分子之间的氢键,防止质子流的产生;又能使水分子从氢键位点跳跃至另一个部位。这与郎飞结的跳跃性传导相似,能产生对水分子的超高速转运。

(三) AQP4 的活性调控机制

AQP4 的水通透性可以被多种蛋白可逆性磷酸化调控。AQP4 蛋白的测序分析也显示 AQP4 含有 PKA、PKC、CaMK II 和 CK II 磷酸化位点。目前认为 PKA 对 AQP4 磷酸化调控呈 cAMP 依赖性,即在某些因素作用下腺苷酸环化酶(AC)被激活,使细胞 cAMP 增加,进而活化 PKA,使 PKA 催化水通道蛋白上的 Ser¹¹¹ 磷酸化,从而增加膜对水的通透性。实验研究也发现 AQP4 在磷酸化状态下,膜对水的转运远大于非磷酸化状态;AVP、 β -肾上腺能受体激动剂通过激活 AC,增加胞内 cAMP 含量而提高 AQP4 对水的通透性。同时,Ser¹¹¹ 还是 CaMK II 磷酸化位点。PKC 则通过催化 AQP4 蛋白磷酸化来调节 AQP4 活性,主要是通过对 AQP4 分子中 Ser¹⁸⁰ 的磷酸化修饰而发挥调节作用。实验证明 PKC 特异性激动剂佛波酯可下调 AQP4 对水的通透性,而 PKC 抑制剂则能阻断 AVP 对 AQP4 的作用。Hajime 等通过离体细胞培养发现,高渗性甘露醇可增加大鼠星形胶质细胞 AQP4 的表达;在体实验研究表明,动物腹腔注射甘露醇也能增加皮质 AQP4 的表达。同时,腹腔注射丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)抑制剂可抑制 AQP4 的表达,而细胞外信号调节激酶(ERK)抑制剂和 c-Jun 氨基端激酶(JNK)抑制剂对 AQP4 的 mRNA 和蛋白质表达没有影响。

三、AQP4 与中枢神经系统疾病

(一) AQP4 与恶性胶质瘤

所有生命活动都离不开水的参与,肿瘤细胞的高代谢状态更是需要水的快速跨膜转运。许多研究报道在脑肿瘤,尤其是恶性胶质瘤中水通道蛋白表达明显上调。Saadoun 等证实 AQP4 在恶性胶质瘤变异的星形胶质细胞和血管内皮细胞中的表达明显高于正常组织。最新的观点认为,AQP 具有致癌特性,AQP 全长 cDNA 的异位表达可以引起细胞许多表现型的改变,包括细胞增殖活性的增强,非依赖生长的增殖细胞固定等。Badaut 等证实 AQP4 在水肿性脑肿瘤(恶性胶质瘤和转移性腺瘤)中表达增加,恶性程度较高的恶性胶质瘤和腺癌中 AQP4 的高度表达可能促进了水肿液的流动,且脑屏障的开放和 AQP4 的高度表达存在显著相关

性。水通道蛋白在肿瘤生长、侵袭和转移的病理过程中具有重要作用。通过水通道蛋白抑制因子来抑制功能亢进、表达过多的水通道蛋白,或通过控制水通道蛋白的调节机制来平衡液体的分泌与吸收,可能为治疗肿瘤提供了一种新的思路和方法。

(二) AQP4 与癫痫

癫痫是一种反复发作的神经元异常放电所致的短暂性脑功能障碍。近年研究表明,癫痫发作常可导致继发性脑水肿。这也使人们在研究癫痫发作病理生理机制时关注水通道蛋白在其中所扮演的角色。Amiry 等研究表明,AQP4 表达下调后实验小鼠癫痫诱发时间明显缩短,癫痫发作程度也明显增加,其机制与 AQP4 和 Kir4.1 在功能上的耦联密切相关。Kir4.1 主要表达于星形胶质细胞,主要生理功能是摄取由神经元兴奋后释放到细胞外多余的钾离子,维持细胞间隙钾离子的平衡,从而维持神经元静息膜电位的稳定。该作用称之为钾缓冲(K^+ siphoning)。星形胶质细胞膜 Kir4.1 的钾缓冲作用与 AQP4 的水转运作用密不可分,AQP4 功能下降或表达下调将影响 Kir4.1 的钾缓冲作用,从而破坏中枢神经系统细胞外液钾离子的平衡,影响神经元正常的静息膜电位。这为临床癫痫发作时的神经元异常放电和癫痫继发性脑水肿提供了重要的分子生物学理论依据。

(三) AQP4 与脑水肿

AQP4 参与介导调节水分子的跨膜转运,关系到脑水肿的发展进程,目前已成为医学研究的一大热点。大量研究表明,AQP4 的表达改变与脑水肿的病理生理进程密切相关。Taniguchi 等研究了大鼠大脑中动脉阻塞后 AQP4 mRNA 的表达,结果梗死灶周围皮质的 AQP4 mRNA 在缺血后第 1 天表达上调,第 3 天达高峰,第 7 天仍处于较高水平,与脑水肿的发生、进展和消退在时间上基本一致;提示缺血周边区高度表达的 AQP4 在脑水肿的发展过程中起到重要的作用,参与了缺血后脑水肿的形成。目前对于缺血后 AQP4 表达增强的确切原因尚不清楚,可能有以下几个方面:①病灶区细胞坏死导致胶质细胞和细胞间隙多种离子浓度发生改变,渗透压升高和酸碱度降低;②兴奋性氨基酸浓度升高,最终经胶质细胞内蛋白激酶 A、C 途径诱导 AQP4mRNA 表达升高。Vizuete 等研究发现,脑机械性创伤或向纹状体内注射 MNDA 受体激动剂喹啉酸后可诱发损伤区 AQP4 mRNA 表达增加。给予 6-羟基多巴胺或前脑内侧束切割伤可导致远距离的损伤,6 天后前者可引起 AQP4 mRNA 在受损灰质中高度表达,而后者只在切割伤处有高度表达。定位研究认为,创伤性脑损伤 AQP4 mRNA 的表达与血脑屏障的损伤有关。Manley 等对急性水中毒脑水肿动物模型的观察发现,AQP4 在水肿模型的脑组织内表达增强。应用基因敲除技术特异性抑制 AQP4 表达后发现,缺乏 AQP4 的大鼠生存能力强,且脑内水容量及星形细胞周围毛细血管水肿也明显减轻,说明 AQP4 参与脑水肿的形成,并在其中起到重要作用。Yamamoto 等观察到,在缺氧情况下,离体培养的星形胶质细胞膜上 AQP4、AQP5、AQP9 的表达短暂下降。给氧后,AQP4、AQP9 回到基础水平,而 AQP5 的表达升高约 3 倍,复氧 20h 后,其表达下降。并且发现 AQP4、AQP5、AQP9 的表达受转录因子激活蛋白 21

(AP21)的调节。所有这些研究表明 AQP4 在不同病因所致的脑水肿过程中发挥着极为重要的作用。研究水通道蛋白在不同脑水肿病理生理条件下的作用及机制,将有利于进一步探讨脑水肿的分子学基础,而水通道蛋白也将可能成为临床有效治疗脑水肿的新靶点。

四、存在问题与展望

水通道蛋白的发现和鉴定是人类细胞学上的一个里程碑。机体是由细胞组成;细胞膜不仅是细胞获取养分的窗口,更是维系机体健康的信息之窗。分布在细胞膜上的蛋白在细胞获取养分和收集信息中发挥着极其重要的作用。膜蛋白是所有生命物质生存的先决条件,对膜蛋白功能的深刻认识为理解疾病发生发展提供了一种基本思想。AQP4 作为脑内主要水通道蛋白,其表达机制及在病理生理条件下不同功能的表现是研究众多中枢神经系统疾病的关键,而目前尚缺乏对 AQP4 表达调控机制的研究,对 AQP4 介导快速水转运对细胞膜信息处理的作用和影响也亟待深入研究。相信随着对水通道蛋白研究的全面开展和深入,不仅可以为我们理解相关疾病提供更为丰富的理论支持,而且更期待它将为相关疾病如脑水肿、癫痫、恶性胶质瘤等临床治疗提供新的思路。

(吕云落)

参 考 文 献

1. Denker BM, Smith BL, Kuhajda FP. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J Biol Chem* 1988, 263: 15634-15642
2. Preston GM, Carroll TP, Guggino WB. Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science*, 1992, 256: 385-387
3. Koyama, Y. Molecular cloning of a new aquaporin from rat pancreas and liver. *J. Biol. Chem.* 1997, 272, 30329-30333
4. Borgnia, M., Nielsen, S., Engel, A. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels. *Annu. Rev. Biochem.* 1999, 68, 425-458
5. Lu M, Lee MD, Smith B. The human AQP4 gene: definition of the locus encoding two water channel polypeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(20): 10908-10912
6. Cheng A, van Hoek AN, Yeager M, et al. Three-dimensional organization of a human water channel. *Nature*, 1997, 387 (6633): 627-630
7. Badaut J, Lasbennes F, Magistretti PJ, et al. Aquaporins in brain: distributions, Physiology, and pathophysiology[C] *International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2002, 22(4): 367-3781
8. Neely JD, Christensen BM, Nielsen S. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*, 1999, 38: 11156-11163
9. Furman CS, Gorelick-Feldman DA, Davidson KGV, et al. Aquaporin-4 square array assembly: opposing actions of M1 and M23 isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 13609-

13614

10. Nicchia GP, Frigeri A, Liuzzi GM, et al. Inhibition of aquaporin-4 expression in astrocytes by RNAi determines alteration in cell morphology, growth, and water transport and induces changes in ischemia-related genes. *FASEB J*, 2003, 17: 1508-1510
11. Silberstein, Claudia, Richard Bouley, Yan Huang, Pingke Fang, Nuria Pastor-Soler, Dennis Brown, and Alfred N. Van Hoek. Membrane organization and function of M1 and M23 isoforms of aquaporin-4 in epithelial cells. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287: F501-F511
12. Jung JS, Bhat RV, Preston GM, et al. Molecular characterization of an aquaporin cDNA from brain: candidate osmoreceptor and regulator of water balance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, 91: 13052-13056
13. Nielsen S, Nagelhus EA, Amiry-Moghaddam M, et al. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 1997, 17: 171-180
14. Rash J E, Yasumura T, Hudson CS, et al. Direct immunogold labeling of aquaporin-4 in square arrays of astrocyte and ependymocyte plasma membranes in rat brain and spinal cord. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(20): 11981-11986
15. Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, et al. Alphasyn-trophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB J*, 2004, 18: 542-544
16. M. Amiry-Moghaddam, D. S. Frydenlund, O. P. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *J Neurosci*, 2004, 24: 999-1010
17. Chakkalakal, J. V., Thompson, J., Parks, R. J., et al. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. *FASEB J*, 2005, 19: 880-891
18. Amiry-Moghaddam M, Frydenlund DS, Ottersen OP. Anchoring of aquaporin-4 in brain: molecular mechanisms and implications for the physiology and pathophysiology of water transport. *J Neurosci*. 2004; 24(4): 999-1010
19. Wang, S., Yue, H., Derin, R. B., et al. Accessory protein facilitated CFTR-CFTR interaction, a molecular mechanism to potentiate the chloride channel activity. *Cell*, 2000, 103, 169-179
20. Raghuram, V., Mak, D. D., Foskett, J. K. Regulation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator single-channel gating by bivalent PDZ-domain-mediated interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 1300-1305
21. Kozono D, Yasui M, King L S, et al. A quaporin water channels: atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. *J Clin Invest*, 2002, 109(11): 1395-1399
22. E. Gunnarson, M. Zelenina, A. Aperia. Regulation of brain aquaporins. *J Neurosci*. 2004; 24(4):947-955
23. Hajime A, N aoki Yamamoto, Sobue K, et al. Hyperosmolar mannitol stimulates expression of aquaporin 4 and 9 through a p38 mitogen activated protein kinase-dependent pathway in rat astrocytes. *J. Biol. Chem*, 2003, 278: 44525-44534
24. Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, et al. Aquaporin-4 expression is increased in oedematous human brain tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2002 Feb; 72(2): 262-265
25. Moon C, Soria JC, Jang SJ, et al. Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis. *Oncogene*. 2003, 22(43): 6699-6703
26. Badaut J, Brunet JF, Grollmund L, et al. Aquaporin-1 and aquaporin-4 expression in human brain after subarachnoid hemorrhage and in peritumoral tissue. *Acta Neurochir Suppl*, 2003, 86: 495-498
27. Briellmann RS, Wellard RM, Jackson GD. Seizure-associated abnormalities in epilepsy: evidence from MR imaging. *Epilepsis*. 2005, 46(5): 760-766
28. Amiry-Moghaddam M, Williamson A, Palomba M, et al. Delayed K⁺ clearance associated with aquaporin-4 mislocalization: phenotypic defects in brains of alpha-syntrophin-null mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003, 100(23): 13615-13620
29. Taniguchi M, Yamashita T, Kumura E, et al. Induction of aquaporin-4 water channel mRNA after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res Mol Brain Res*, 2000, 78(1-2): 131-137
30. Vizuete M L, Venero J L, Vargas C, et al. Differential upregulation of aquaporin 24 mRNA expression in reactive astrocytes after brain injury: potential role in brain edema. *J. Neurobiol Dis*, 1999, 6(4): 245-258
31. Manley G T, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin 24 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *J. Nat Med*, 2000, 6(2): 159-163
32. Yamamoto N, Yoneda K, Asai K, et al. Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 90(1): 26-38

2. 神经生长因子前体的研究进展

以往的研究结果未认识到神经生长因子前体(proNGF)独立于 NGF 以外的作用, 所以人们一直不重视对 proNGF 的研究。直到 Lee 等发现了 proNGF 可独立地与 p75NTR 结合, 对 proNGF 的研究才开始多了起来。在介导细胞凋亡的作用方面, proNGF 似乎要比 NGF 更为主要, 细胞生存或是死亡取决于 proNGF 和 NGF 的力量对比。

一、proNGF 的分子生物学

作为 NGF 的前体, 编码 proNGF 的基因与所有的神经生长因子的基因一样, 都位于第一对染色体的近端短臂上。NGF 基因转录后生成 NGF mRNA, 由于存在两种转录的启动子和转录中的两种选择剪接, 所以会有四种 NGF 基因的

转录产物,其中有二种为主要产物。mRNA 翻译后首先合成 NGF 的前体蛋白,有长短两种,在其 N 端依次存在着糖基化部位和水解部位,成熟 NGF 的起始部在 proNGF 的中部,水解后即生成 NGF。有研究显示 proNGF 中成熟 NGF 的部分对会被裂解的部分有稳定作用。由上述可以看出由基因编码产生的 proNGF 有多种表现形式,其分子量从 16 到 60kd 不等,更由于转化酶和糖苷酶的作用底物的多样化,使得不同组织内 proNGF 的形式呈现多种类型。每一种 proNGF 的稳定性、结合特性、生理作用都不相同,有待进一步研究。

proNGF 是否能被分泌至细胞外,是其是否能够起生理作用的关键一步。以前的研究均显示,proNGF 在胞内合成并水解为 NGF,然后分泌至胞外。如果胞外不存在 proNGF,其生理作用就无从谈起。最近有研究证明猪少突胶质细胞可以通过摄取胞外的 proNGF 合成 NGF,并且通过使用可以抑制纤溶酶、MMP、弗林蛋白酶的物质证明 NGF 的合成过程位于胞内而不是胞外。但需注意的是,猪少突胶质细胞本身没有合成 proNGF 的能力。而 Lee 对上皮细胞的研究却提示 pro-BDNF 的裂解发生在胞外,而且提示 pro-BDNF 的裂解大约发生在距离 N 端 90 个氨基酸左右的地方,由纤溶酶和 MMP 介导。在大鼠的大脑皮质神经元上进行的实验证明,proNGF 是神经元分泌的营养因子的主要形式,proNGF 进一步裂解为 NGF 以及 NGF 的降解都发生在胞外。该研究同时还探讨了 proNGF 的释放调节机制,促进 proNGF 释放的主要因子是来源于胞内的钙离子。tPA (组织纤溶酶原激活物)对 proNGF 释放后的转换起着关键作用,它可以催化纤溶酶原变为纤溶酶,而纤溶酶则为将 proNGF 裂解为 NGF 的主要转化酶,Neuropersin (神经源性丝氨酸蛋白酶抑制剂)可抑制 tPA 的作用从而抑制 proNGF 的转化。

二、proNGF 的分布

proNGF 的分布很广泛,在很多组织和细胞中均有表达,包括肥大细胞、甲状腺、前列腺、骨骼肌、坐骨神经、毛囊、海马等。Hasan 等对经典的 NGF 依赖性交感神经细胞的研究表明,交感神经所得到的 NGF 有两个来源,一是靶源性的,二则来自于自身合成;而自身合成并分泌的则是 proNGF。以往的研究发现在人和大鼠的脑组织中存在广泛的 NGF mRNA 的表达,以海马、大脑皮质表达最多,免疫学技术更证明了脑内 NGF 的广泛存在。而最近 Fahnestock 等利用针对 proNGF 的抗体证明了在大脑中主要存在的是 32-kd 的 proNGF 而不是 NGF,以往的 NGF 的阳性反应实际上是由 proNGF 引起的。这同时也提示 proNGF 可能不仅仅是一种前体蛋白,它可能具有更重要的生理功能。利用免疫组化方法的研究证明,人类大脑大部分额部皮质、海马以及围绕海马的内嗅皮层中,proNGF 可在胞质和大的树突处呈颗粒样沉积,额部皮质和海马中还可以观察到核沉积。另外在人类大脑白质中也发现了大量的 proNGF 阳性免疫反应;利用双标技术已证明星形胶质细胞中存在 proNGF。对大鼠大脑皮层细胞的研究还显示,给予谷氨酸、KCl、碳酸酐酶抑制剂等刺激条件下,皮质细胞主要分泌的为 proNGF,而

不是 NGF。

三、受体及信号传导

(一) p75NTR

以往的研究认为,当细胞表面不表达 TrkA (TrkA 受体)时,NGF 与 p75NTR (神经生长因子受体 p75)的结合可以诱导凋亡,也就是说 TrkA 和 p75NTR 在细胞表面的存在状况决定了细胞对 NGF 的反应是生存还是死亡。但是当 Lee 发现了 proNGF 可以在无视 TrkA 存在的情况下与 p75NTR 结合并诱导凋亡后,细胞的命运似乎就取决于 proNGF 与 NGF 的比率。Lee 的研究证明,proNGF 与 p75NTR 的结合力明显高于前者与 TrkA 的结合力,更高于 NGF 与 p75NTR 的结合力。在海人草酸制作的大鼠癫痫模型上直接证实 proNGF 可通过 p75NTR 介导 BFCN (基底前脑胆碱能神经元)凋亡;并且证明 proNGF 的 p75NTR 通路和 NGF 结合 p75NTR 后的通路一样,也需要 JNK (C-Jun 氨基末端激酶)的激活以及内源性 caspase-9、6、3 的激活。Pedraza 等从患有阿尔茨海默病的人脑中提取 proNGF,对大鼠颈上神经节和 3T3-p75 细胞进行了研究,证明 proNGF 诱导细胞凋亡的作用中必须要有 p75NTR 的参与。

(二) TrkA

NGF 通过其 N 端带正电荷的赖氨酸残基以及亲水环状结构与 TrkA 结合,proNGF 的 N 端并没有发现类似的结构,但是 Fahnestock 等利用免疫共沉淀技术证实了 proNGF 和 TrkA 的结合,其结合的具体机制尚需进一步探讨。Fahnestock 和 Lee 对于同样 PC12 细胞的研究却得出完全不一致的结论。前者发现抗裂解的 proNGF 可以诱导 TrkA 的磷酸化和促进细胞的生长,虽然其活性较 NGF 弱。其实验还显示 PC12 表面 p75NTR 的存在有助于 proNGF 与 TrkA 的结合。而 Lee 等的研究结果正好相反,显示抗裂解的 proNGF 在某些浓度下只能激活 p75NTR 而不能与 TrkA 反应。以上结论互为矛盾的原因可能在于两者使用的抗裂解 proNGF 的结构不一样或是实验技术不同导致。Pedraza 认为提取 proNGF 的技术不同可能导致实验结果的不一致,利用胰蛋白酶处理 proNGF 可能导致 NGF 的生成,而利用层离法提取 proNGF 则可以避免由于 NGF 所造成的影响。

TrkA 受体激活后可引起 Ras/MAPK 通路的激活,这条通路在 TrkA 激活后的效应中占有重要地位。对猪少突胶质细胞的研究证明,proNGF 可以直接激活 ERK 通路。Fahnestock 使用同时表达 TrkA 和 p75NTR 的 PC12 细胞和仅表达 TrkA 的 3T3-TrkA 细胞进行研究,发现 proNGF 可以与 TrkA 结合而激活 Ras/MAPK 通路,其活性约为 NGF 的四分之一。对 BFCN 的研究则显示,分别对其给予 NGF 和 proNGF,TrkA 均可以发生磷酸化,而且 TrkA 的磷酸化并不能阻碍 proNGF 通过 p75NTR 介导的凋亡作用。但是 PI3K/AKT 和 MEK/ErK 通路的激活却可以拮抗 proNGF 的诱导凋亡作用,提示 proNGF 可能通过调节这两条通路来决定 BFCN 的生存和死亡。

(三) 神经死亡因子(Sortilin)

Sortilin 约 95kDa,是新近发现的 Vps10P 域受体家族一员,见于各种组织中,特别是大脑、脊髓和肌肉。作为神经

降压肽的受体,却主要存在于既不合成,也不对这种神经肽反应的神经系统部位,提示 Sortilin 具有其他功能。在对 293 细胞系的研究中发现并非所有表达 p75NTR 的细胞均对 proNGF 反应,提示另有膜蛋白诱导细胞死亡。其研究证明 proNGF 可同时结合 p75NTR 及 Sortilin 形成一种信号传导复合物。因而,Sortilin 起到辅助受体及分子开关的作用,控制 p75NTR,介导 proNGF 诱导的凋亡前信号。研究显示 proNGF 结合 TrkA 与 p75NTR 的能力相同,所以 proNGF 与 Sortilin 的结合可能决定了细胞的生存或死亡。还有研究证实了在人类少突胶质细胞上存在 sortilin。在 BFCN 上,proNGF 同样也需要结合 Sortilin 和 p75NTR 才能诱导凋亡。

四、生物学效应

(一) proNGF 的促凋亡和营养效应

类似于其他神经肽,NGF 成熟体的正确折叠也是在它的前体辅助下完成的,这是较早发现的 proNGF 生理作用。proNGF 还可影响 NGF 的释放方式,决定其为自发性释放还是调节性释放。而 Lee 的发现促使研究者开始探讨 proNGF 的其他效应。Lee 在只表达 p75NTR 而不表达 TrkA 的血管平滑肌细胞上,观察该细胞对 proNGF 和 NGF 的不同反应,结果 proNGF 诱导凋亡的能力约为 NGF 的 10 倍。在对大鼠妊娠过程中子宫神经支配的研究中发现,随着妊娠的发展,在子宫肌层中表达的 NGF 逐渐减少,而 proNGF 则逐渐增多,说明 proNGF 也许对支配子宫的交感神经的退行性变化有作用。

对胶质细胞的研究结果不同于以上实验。在猪少突胶质细胞上使用 proNGF,即使是抗裂解和抗弗林蛋白酶的 proNGF,也可以诱导细胞的突起发生,并不会导致凋亡。Fahnestock 等利用弗林蛋白酶抑制剂来抑制 proNGF 的裂解,研究 proNGF 的作用,结果显示虽然 proNGF 的活性弱于 NGF,但仍可以促进生长。另有研究证明从昆虫细胞中提取的抗裂解 proNGF 可以促进颈上神经节细胞和 PC12 细胞的生存和分化。Peters 的实验显示在毛发生长初期,毛囊周围 TrkA 和 NGF 呈高度表达,其对毛发的生长起促进作用,而到了毛发生长中期,在毛根内鞘周围存在 proNGF 和 p75NTR 的高度表达,说明 proNGF 的促进毛发生长作用。proNGF 对于神经元效应的相关研究也有相互矛盾的结果。有研究显示 proNGF 可以导致培养的颈上神经节细胞的死亡,而另外的研究却表明 proNGF 可有利于脊髓背根神经节的存活,其效应与 NGF 类似。而这两种神经元都可以同时表达 TrkA 和 p75NTR。

这些结果与另外一些结果的差异原因可能在于不同种系的少突胶质细胞受体表达的区别以及细胞发育不同时期受体表达的区别,而引起对同样配体的生物学效应不同。细胞表面 TrkA 和 p75NTR 的比率对于细胞的存活与凋亡至关重要。另外 sortilin 的存在也对 proNGF 的生物学效应有重要影响。Beattie 的实验显示无论在离体培养还是活体状态下,大鼠少突胶质细胞均不表达 TrkA。而猪少突胶质细胞表面可同时表达 TrkA 和 p75NTR,而且 proNGF 在猪少突胶质细胞中转化为 NGF 的速度可能非常快,proNGF 自身的生

物学活性难以表达,proNGF 可以起到一种 NGF 的放大效应。

(二) proNGF 在神经损伤和炎症后的反应

神经系统的创伤、退行性疾病、缺血性疾病通常都会导致神经细胞的丧失。一直认为 p75NTR 在神经细胞的死亡中具有重要作用,但与其作用的配体一直存在争论。很多研究显示 proNGF 很可能具有这个作用。大鼠脊髓损伤和内囊损伤后 proNGF 和 p75NTR 在中枢的表达均明显增加,并且可以诱导少突胶质细胞的死亡。而使用 proNGF 特异性抗体后,细胞死亡明显减少。对 BFCN 的研究也显示在癫痫模型中,proNGF 和 p75NTR 都有明显增多而且有助于引起 BFCN 的凋亡。有研究证实,当 CNS 发生炎症时,NGF 合成减少,TrkA 与 p75NTR 的比率减小,这时 proNGF 的增加即可导致细胞的死亡。利用原位杂交技术发现,中枢神经损伤后损伤处 p75NTR mRNA 合成增加,而给予 p75NTR 抗体可以挽救损伤后神经元的死亡。对大鼠的活体研究证明,proNGF 在神经损伤后的分泌与 p75NTR 的表达增加在时间一致。

(三) proNGF 阿尔茨海默病中的变化

阿尔茨海默病以基底前脑区的胆碱能神经元退行性病变为特征,以往的研究更多地关注 NGF 在基底前脑区的减少。而 proNGF 在阿尔茨海默病中的作用正在逐渐引起重视。研究者发现在阿尔茨海默病的脑实质中 proNGF 的含量很多,而且其含量随着病情的进展而呈增长趋势,不同的大脑皮质区其 proNGF 的种类和含量亦存在区别。从阿尔茨海默病患者大脑皮质中提取的 proNGF 在体外实验中可与 p75NTR 结合而诱导神经细胞凋亡。Peng 等的研究提示,早在阿尔茨海默病的亚临床阶段,脑皮质 proNGF 就已经开始增加,病情严重程度与 proNGF 含量呈正比,提示 proNGF 含量的改变有可能为其病因之一。此项研究还发现 proNGF 的增加与认知障碍的程度相关,而不和精神状态的改变相关。也有相反的观点认为,proNGF 在阿尔茨海默病中的作用为营养性,而不是促凋亡,细胞表面 TrkA 的缺失和随之而来的配体结合障碍可能是引起阿尔茨海默病的原因。

五、结 论

proNGF 的作用已不仅仅是 NGF 的前体,这一点已得到共识,但其与 TrkA 和 p75NTR 的结合而导致的凋亡或营养性作用却有着不同的结论。由于在神经损伤后的细胞死亡和阿尔茨海默病中都有 proNGF 的参与,确定那些参与 proNGF 裂解的蛋白酶并加以干预,阻止 proNGF 和 p75NTR 的结合,或对两者结合后的信号传导进行干预都可能成为临床治疗的新手段。随着对 proNGF 的研究手段的成熟和统一化,proNGF 的作用将会进一步明了。

(王 超 王国林)

参 考 文 献

1. Lee R, Kermani P, Teng KK, et al. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*, 2001, 294(5548): 1945-1948

2. Ibanez CF. Jekyll-Hyde neurotrophins: the story of proNGF. *Trends Neurosci*, 2002, 25(6): 284-286
3. Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron*, 2002, 33(1): 9-12
4. Ullrich A, Gray A, Berman C, et al. Human beta-nerve growth factor gene sequence highly homologous to that of mouse. *Nature*, 1983, 303(5920): 821-825
5. Edwards RH, Selby MJ, Rutter WJ. Differential RNA splicing predicts two distinct nerve growth factor precursors. *Nature*, 1986, 319(6056): 784-787
6. Kliemann M, Rattenholl A, Golbik R, et al. The mature part of proNGF induces the structure of its pro-peptide. *FEBS Lett*, 2004, 566(1-3): 207-212
7. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, et al. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*, 2001, 276(16): 12660-12666
8. Althaus HH, Kloppner S. Mature pig oligodendrocytes rapidly process human recombinant pro-nerve growth factor and do not undergo cell death. *J Neurochem*, 2006, 98(2): 506-517
9. Seidah NG, Mowla SJ, Hamelin J, et al. Mammalian subtilisin/kexin isozyme SKI-1: A widely expressed proprotein convertase with a unique cleavage specificity and cellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(4): 1321-1326
10. Lessmann V, Gottmann K, Malcangio M. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog Neurobiol*, 2003, 69(5): 341-374
11. Bruno MA, Cuello AC. Activity-dependent release of precursor nerve growth factor, conversion to mature nerve growth factor, and its degradation by a protease cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103(17): 6735-6740
12. Hasan W, Pedchenko T, Krizsan-Agbas D, et al. Sympathetic neurons synthesize and secrete pro-nerve growth factor protein. *J Neurobiol*, 2003, 57(1): 38-53
13. Fahnstock M, Michalski B, Xu B, et al. The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci*, 2001, 18(2): 210-220
14. Fahnstock M, Yu G, Coughlin MD. ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule?. *Prog Brain Res*, 2004, 146: 101-110
15. Pedraza CE, Podlesniy P, Vidal N, et al. Pro-NGF isolated from the human brain affected by Alzheimer's disease induces neuronal apoptosis mediated by p75NTR. *Am J Pathol*, 2005, 166(2): 533-543
16. Volosin M, Song W, Almeida RD, et al. Interaction of survival and death signaling in basal forebrain neurons: roles of neurotrophins and proneurotrophins. *J Neurosci*, 2006, 26(29): 7756-7766
17. Fahnstock M, Yu G, Michalski B, et al. The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor. *J Neurochem*, 2004, 89(3): 581-592
18. Nykjaer A, Lee R, Teng KK, et al. Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death. *Nature*, 2004, 427(6977): 843-848
19. Martin S, Vincent JP, Mazella J. Involvement of the neurotensin receptor-3 in the neurotensin-induced migration of human microglia. *J Neurosci*, 2003, 23(4): 1198-1205
20. Lobos E, Gebhardt C, Kluge A, et al. Expression of nerve growth factor(NGF)isoforms in the rat uterus during pregnancy: accumulation of precursor proNGF. *Endocrinology*, 2005, 146(4): 1922-1929
21. Peters EM, Hendrix S, Golz G, et al. Nerve growth factor and its precursor differentially regulate hair cycle progression in mice. *J Histochem Cytochem*, 2006, 54(3): 275-288
22. Rattenholl A, Lilie H, Grossmann A, et al. The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Eur J Biochem*, 2001, 268(11): 3296-3303
23. Beattie MS, Harrington AW, Lee R, et al. ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury. *Neuron*, 2002, 36(3): 375-386
24. Harrington AW, Leiner B, Blechschmitt C, et al. Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(16): 6226-6230
25. Srinivasan B, Roque CH, Hempstead BL, et al. Microglia-derived pronerve growth factor promotes photoreceptor cell death via p75 neurotrophin receptor. *J Biol Chem*, 2004, 279(40): 41839-41845
26. Giehl KM, Rohrig S, Bonatz H, et al. Endogenous brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 antagonistically regulate survival of axotomized corticospinal neurons in vivo. *J Neurosci*, 2001, 21(10): 3492-3502
27. Peng S, Wu J, Mufson EJ, et al. Increased proNGF levels in subjects with mild cognitive impairment and mild Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(6): 641-649

3. 内源性大麻素系统的研究进展

大麻在医药上已经应用了数千年,它也是当今西方社会滥用最多的成瘾性药物。大麻的活性化合物是大麻素,目前,已鉴定了60多种大麻素类似成分,其中以 Δ^9 -四氢大麻酚(Δ^9 -tetrahydrocannabinol, Δ^9 -THC)为主。自20世纪90年代初期发现了内源性的大麻素类系统(endocannabinoid system, ECS)以来,人们对其进行了大量的研究,发现ECS

在体内起到广泛的生理学作用,本文将介绍其研究进展。

一、大麻素受体

通过合成的大麻素物质与受体的结合,发现机体存在大麻受体,这促进了ECS的研究。目前证实体内存在两种大麻素受体:CB1和CB2。基因克隆研究发现这两种受体有

44%的氨基酸序列同源。它们都是G蛋白耦联受体。

CB1受体主要位于脑、脊髓与外周神经系统中,脑内CB1受体主要分布于基底神经节(黑质、苍白球、外侧纹状体)、海马CA锥体细胞层,小脑和大脑皮层。CB1受体的这种分布可能与大麻素对记忆、认知、运动控制的调节有关;此外,在延髓、中脑导水管周围、脊髓后角等疼痛传导通路也有大量分布。外周神经系统比中枢神经系统表达的CB1受体量少,它们分散地表达于诸如神经末梢等处,介导神经递质的释放。

CB2受体不存在于中枢神经系统,它主要分布于外周免疫细胞,如脾脏边缘区、免疫细胞、扁桃体等,与免疫调节有关;近来研究发现CB2受体也参与镇痛。

二、内源性大麻素样物质的合成与代谢

目前已被证实的内源性大麻素样物质(endogenous cannabinoids, EC)有两种: N-花生四烯酸氨基乙醇(anandamine)和2-花生四烯酸甘油(2-AG);它们均具有与THC极为相似的三维结构,都能作用于CB1和CB2受体;但他们对受体的亲和力是不同的,如2-AG与CB1的亲和力小,主要作用于CB2,而小剂量的anandamine主要作用于CB1。

生理状态下,EC产生部位可能在CB附近,由细胞膜表面的脂质前体在某些酶的催化下合成的,其合成通路由I型代谢性谷氨酸(mGlu)受体和 Ca^{2+} 激活。当突触后神经元兴奋时,mGlu受体兴奋,细胞膜去极化, Ca^{2+} 内流,二者作用于细胞膜上的脂质前体,激活磷脂酶C,产生甘油二酯,然后被甘油二酯脂肪酶裂解,产生2-AG;如果二者作用于细胞膜上的磷脂,则激活酰基转移酶裂解为N-花生四烯酸磷脂酰乙醇胺,再被磷酸二酯酶裂解,产生anandamide。2-AG与anandamide释放到突触间隙后作用于突触前膜上的相应受体产生作用,而释放到突触间隙中的多余EC被其他的神经元或胶质细胞上特殊转运蛋白重摄取而清除,EC的重摄取与代谢都极为迅速。

三、ECS与疼痛

早期的研究显示,刺激中脑导水管灰质(periaqueductal grey, PAG)可以产生镇痛,说明大脑内自身存在镇痛回路;刺激PAG腹侧产生的镇痛被证实是内源性的阿片类物质介导的;而刺激PAG背侧和外侧产生的镇痛是未知的非阿片类介导的。后来被证实这种未知的非阿片类物质是EC。Walker JM等研究发现,周围神经、鞘内和侧脑室注射anandamide,可产生镇痛作用,电刺激PAG背外侧区能诱导anandamide的释放,CB1特异性拮抗剂SR141716A能阻断电刺激PAG的镇痛作用,说明EC镇痛作用是通过直接激活CB1受体或者是通过其他一些机制激活CB1受体而起作用的。Ledent将小鼠的CB1受体基因敲除,小鼠出现痛觉过敏;此外,皮下注射福尔马林引起的炎性痛可引起PAG细胞外anandamide水平的升高。最近研究发现EC也参与应激性镇痛,Hohmann AG制作非阿片途径的应激性镇痛大鼠模型,然后给大鼠注射CB1受体拮抗剂利莫那班,发现模型大鼠的抗伤害作用消失,而且,当大鼠对大麻素的抗伤害效应产生耐受后,大鼠又会重新感到疼痛;Hohm-

ann AG等进一步证实,当给予疼痛刺激后,应激性镇痛大鼠的中脑的2-AG和anandamide浓度升高。

在调节痛信号转导的大麻素受体中,CB1受体起着极其重要的作用,EC作用于中枢和外周神经的CB1受体,介导神经递质的释放直接产生镇痛作用;早期研究认为CB2主要调节免疫,不参与镇痛,近来研究发现CB2在镇痛中也有作用,选择性的CB2受体激动剂AN1241能作用于外周免疫细胞上的CB2受体,抑制炎症因子的释放发挥镇痛作用,且没有中枢神经系统的副作用。

四、ECS与免疫调节

Klein TW等研究发现,大麻的使用增加病毒感染和过敏性疾病的发生率,减少T淋巴细胞的增殖;离体研究证实,THC抑制LPS刺激的脾细胞和B细胞的增殖,而且THC和anandamide和2-AG能抑制T淋巴细胞的增殖。CB2受体不仅仅在T细胞上表达,它还能在巨噬细胞、中型粒细胞、肥大细胞等其他免疫细胞上表达;所以EC对机体免疫有广泛的调节作用。

EC能调控免疫细胞的形态和功能。Stefano等证实,anandamide(10^{-6} M)快速作用于巨噬细胞,导致细胞变圆和静止,这一作用能被预先加入CB1受体拮抗剂SR141716A阻断;而慢性(6h)作用则导致细胞的无规则运动。而且,anandamide和2-AG能阻止D-Alq2-Met5脑啡肽酶和IL-1诱导的巨噬细胞的趋化。

病毒感染时,机体释放的主要细胞因子是IFN;而细菌感染时,巨噬细胞通过产生TNF和IL等细胞因子杀灭细菌。大麻素类通过影响免疫细胞产生细胞因子调节机体的免疫功能。动物试验证实,预先注射THC的小鼠单纯疱疹病毒感染时体内产生的IFN的量低于对照组;而用THC预处理的人巨噬细胞,细菌感染时产生TNF的量低于对照组,它主要是通过抑制TNF前体转变成分泌型的活性肽。2-AG能下调活化T细胞的核因子抑制其产生IL-2产生免疫调节作用,而anandamide与IL-3具有协同作用,通过CB2受体刺激造血细胞的增殖。

五、ECS与心血管

(一) ECS对心血管的作用

早在1986年Dewey等研究就发现,给麻醉的兔和狗注射外源性大麻素THC,先是出现短暂的高血压,接着长时间的低血压和心动过缓。注射anandamide麻醉大鼠,产生类似的反应,这一作用可以被CB1受体拮抗剂SR141716A阻断,而将大鼠的CB1受体基因敲除,这一效应也将缺失;说明CB1受体介导了大麻素系统的这一心血管效应。

Hillard认为大麻素对心血管的作用主要是:①抑制外周血管交感神经的活性:大麻素类能直接作用中枢神经心血管中枢,并且能抑制外周交感神经末梢去甲肾上腺素的释放,这一作用是CB1受体介导的。②作用于血管平滑肌细胞:脑血管的平滑肌细胞表达CB1受体,EC作用CB1受体抑制L-钙离子通道,阻止钙离子内流,产生血管扩张作用;anandamide作用兔肠系膜动脉,产生不依赖内皮细胞的血管舒张的作用,这一作用能被高浓度的钾离子削弱,可能与



血管平滑肌细胞的超级化有关,至于 CB1 和钾离子是否参与了作用还有待进一步研究。③作用于内皮细胞:研究证实 anandamide 通过多种机制影响内皮细胞舒张因子的释放;anandamide 能诱导肾血管内皮细胞产生 NO, NO 合酶抑制剂 L-NAME 能抑制 anandamide 的血管舒张作用, CB1 受体在 anandamide 对 NO 合酶影响中的作用尚不清楚,人们用 CB1 受体抑制剂干预 anandamide 对内皮细胞舒张的作用得出的结论很不一致; Jarai 等研究认为 anandamide 通过一种不同于 CB1 的受体影响 NO 合酶的合成 NO, 这一新的受体未得到证实。

(二) ECS 与心肌缺血

2001 年 Lagneux C 等首先发现 EC 参与 LPS 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用,认为这一作用通过 CB2 受体起作用。一个月后, Krylatov AV 等发现大麻素受体激动剂 HU-210 在大鼠缺血再灌注时有抗心律失常作用, CB2 受体拮抗剂能阻断这一作用。一年后, Joyeux M 等报道, EC 通过 CB2 受体参与热应激预处理对心肌梗死的保护作用。近来的一些在体研究进一步证实了大麻素对心肌缺血的保护作用,如 Di Filippo 等发现在麻醉的小鼠左冠状动脉结扎前 30min 注射大麻素类激动药 WIN552122,能显著减少小鼠心肌梗死的面积, CB2 受体拮抗剂能部分拮抗这一效应。Lamontagne D 等发现,结扎左冠状动脉前降支前预先给麻醉的大鼠注射大麻素受体激动剂 CP55940,可显著减少心肌梗死面积。

大麻素对心肌保护的机制目前尚不清楚,可能与其对内皮细胞功能的作用有关。CB1 或 CB2 受体拮抗剂都能消除缺血预处理对内皮细胞功能的保护作用,而且从缺血前 15 分钟开始用 PEA 或 2-AG 灌注大鼠能产生同缺血预处理相似的内皮细胞保护作用。Wagner 等发现, CB1 受体拮抗剂能恢复心肌梗死大鼠的血压,但是损害内皮功能,增加早期的死亡率,相反用 CB1 受体激动药治疗心肌梗死大鼠 12 周,能防止内皮细胞的功能障碍。

(三) ECS 与休克

Wagner 给失血性休克大鼠注射 CB1 特异性的受体拮抗剂 SR141716A,能提升其血压,但是给正常大鼠注射不影响其血压。失血性休克大鼠的血能引起正常大鼠血压降低,证实是休克大鼠的巨噬细胞活化后产生了 anandamide,作用于 CB1 受体引起了血压下降。Varga 等证实内毒素休克时, LPS 活化巨噬细胞产生 anandamide 和血小板产生 2-AG,降低血压,而 SR141716A 能拮抗这一作用,提高内毒素休克大鼠的存活率。Kadoi 等研究发现大麻受体拮抗剂 AM281 能阻止内毒素休克大鼠的血流动力学和颈内动脉血流的变化,减少细胞因子 TNF- α 和 IL-1 β 的产生,提高大鼠的存活率。这些发现证明 ECS 在休克的病理机制中发挥了重要作用,对其机制的研究可为这类疾病的治疗找到新的靶点。

六、其 他

(一) 能量代谢

大麻素可导致食欲旺盛、饮食过多的行为,这一作用主要通过 CB1 受体实现。CB1 基因剔除 (CB1^{-/-}) 的小鼠对禁食的反应减弱,在禁食后没有摄食增多的表现。而 CB1 阻

断剂并不会影响 CB1^{-/-}小鼠的摄食行为,由此进一步证实 CB1 确实参与了食欲和摄食的调节。在相同饮食条件下,与野生型的小鼠比较, CB1^{-/-}小鼠的体重和脂肪分别减少了 24% 和 60%;同时血清胰岛素和瘦素水平降低,脑室内瘦素注射的效应增强;即使在致肥胖的饮食条件下, CB1^{-/-}小鼠也不会出现肥胖,并且不出现胰岛素抵抗。

大麻素在脑内和外周的 4 个环节调节能量代谢和摄食:①大脑边缘系统②下丘脑③肠道④脂肪组织。在这些不同的水平,大麻素与这些部位的瘦素、脑肠肽和黑皮质素等相互作用,调节食欲和体重。由于大麻素有刺激食欲的特性,可用于艾滋病患者、癌症和神经性厌食症,以改善患者全身健康状况恶化和营养不良症状。近期研究显示, CB1 阻断剂可通过中枢和外周两方面机制,减轻体重,改善代谢,而没有明显的不良反应,在治疗肥胖和相关代谢性疾病方面有着广阔的临床应用前景。

(二) EC 与其他神经递质系统的相互作用

EC 与 GABA、谷氨酸相互作用而调节 GABA、谷氨酸的释放。已证明在海马, CB1 受体与 GABA 位于同一突触前神经元中而直接抑制 GABA 的释放。CB1 受体激动剂 WIN552122 可减少突触前 GABA 的释放,进而改善海马内由 GABA 释放增加所引起的记忆功能缺陷,提示海马部位的 EC 主要是调节 GABA 的释放。纹状体-黑质内 GABA 能神经元上 CB1 受体的激活也可抑制 GABA 的释放与重摄取。在大鼠纹状体脑片中, WIN552122 抑制皮层-纹状体的谷氨酸能突触传递,而 CB1 受体拮抗剂 SR141716 使这种作用消失。同时应用膜片钳技术证实 CB1 受体的激活还可以抑制纹状体内的谷氨酸释放,表明 EC 可以调节纹状体的功能,进而提示作用于 CB1 受体的药物可以作为一种潜在的药物治疗基底神经节疾病如 Parkinson's disease、Huntington disease。

七、小 结

CB1 和 CB2 受体广泛分布于中枢神经和外周的各种组织和器官,内源性和外源性的大麻素物质通过受体介导而在镇痛、免疫调节、心血管、能量代谢等多方面发挥作用。通过对大麻素代谢以及与其受体的研究,可为临床上疼痛、感染、代谢综合征、心血管疾病、神经系统性疾病等提供新的治疗途径。

(吴新海 郑利民)

参 考 文 献

1. Quartilho A, Mata HP, Ibrahim MM, et al. Inhibition of inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology*, 2003, 99(4): 955-960
2. Walker JM, Huang SM, Strangman NM, et al. Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(21): 12198-12203
3. Ledent C, Valverde O, Cossu G, et al. Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science*, 1999, 283(5400): 401-404
4. Hohmann AG, Suplita RL, Bolton NM, et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, 2005, 435