·综 述·

内源性硫化氢在神经系统的生理功能及病理生理意义

程友琴 WANG Rui

一氧化氮(NO)的发现,不仅揭示了内皮依赖舒张因子的化学本质,更重要的是发现了简单的气体分子作为机体内源性信号分子的事实,迄今,将内源性NO和一氧化碳(CO)从传统的神经转导信使和体液转导信使中区别出来,命名为"gasotransmitters,气体信使"[1],已为科学界接受。

硫化氢(H_2S)是一种无色气体,有很强的臭鸡蛋味。能被人嗅出的浓度是中毒浓度的1/400。H_2S氧化产生元素硫、二氧化硫(SO_2)、硫酸盐。H_2S水解生成HS^-和S^{2-},即使在水溶液中,约1/3的H_2S仍不被分解(pH 7.4)。由于它在脂溶液中溶解度比水中大5倍,H_2S可渗入浆膜。

不仅某些细菌能产生并利用H_2S,哺乳动物细胞也能。不同组织可产生不同量的H_2S,比如,脑组织H_2S的生理含量是50~160 μmol/L。胱硫醚-β-合成酶(cystathionine β-synthase,CBS)和胱硫醚-γ-裂解酶(cystathionine γ-lyase,CSE)是在哺乳动物组织中产生内源性H_2S的两个主要的酶,均以L-半胱氨酸为主要底物。在某些组织中两者是必须的,在另一些组织中,仅有一个酶即可。因此,CBS和CSE的表达是组织特异的。已确定,在许多人类和其他哺乳动物细胞中有CBS和CSE的表达,包括肝、肾、脑、皮肤成纤维细胞和血液淋巴细胞。作为CBS和CSE的终产物,H_2S对这些酶有负反馈调节作用[2]。另外不太重要的来源是非酶产生的,在糖的氧化中由元素硫到H_2S。这一非酶途径的所有基本组成部分都在体内存在,包括还原型硫的提供,已有报道,在人类和鼠血液循环中有1.3 mmol/L含量的硫[3,4]。

H_2S的第一个生理作用的证据是1989年获得的。当时测定大鼠脑组织中硫的内源性水平为1.6 μg[5],通过人类尸检得知脑硫正常含量为0.7 μg,小鼠脑内源性硫的水平与大鼠类似,但比牛脑皮层少3倍[5,6]。1995年Awata等[7]的实验证实了内源性H_2S的酶学产生机制,在6个不同的脑区中测定了CBS和CSE的活性。此后Abe和Kimura[8]进一步用Northern印迹法分析证实了CBS在脑内的转录表达(海马、小脑、大脑皮层、脊髓脑内段),但没有发现CSE mRNA。抑制CBS后,降低了H_2S的产生量,进一步确定CBS是脑中产生H_2S的主要酶。同时证实CBS在海马高度表达,CBS抑制剂降低了脑内H_2S的产生,而CBS激活剂增加了H_2S的产生,生理含量的H_2S特异地增强了N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体调节的反应,诱导海马长时程增强。这些发现提示了H_2S在脑内作为内源性神经调节物的功能。

20世纪90年代,生理含量的H_2S在脑中的作用被揭示。把婴鼠慢性暴露于H_2S,随着鼠小脑、额叶皮层复合胺和去甲肾上腺水平的增加,改变了神经递质的释放,在脑的视床下部给予硫氢化钠(NaHS,H_2S的供体)并不影响促肾上腺皮质释放激素(corticotropin-releasing hormone,CRH)的释放,但却诱导了由氯化钾刺激而产生的CRH的释放[9,10]。内源性H_2S的这一作用,与以下的观察是一致的,清醒鼠肌肉内给予一种内源性H_2S的前体S-腺苷甲硫氨酸(SAM),降低了由低温诱导的血浆H_2S在神经和心血管系统的皮质酮水平的增加[11]。

电压依赖钠通道和TTX敏感钠通道在神经系统可能是H_2S的靶位[12]。在培养的神经细胞瘤细胞,NaHS或牛磺酸单独均不改变钠通道电流,用NaHS预处理这些细胞后,牛磺酸以一种可逆的方式抑制了钠通道。NaHS的这一作用可被二硫代苏糖醇(dithiothreitol)和β-巯基乙醇(β-mercaptoethanol)模仿,因此推测H_2S结合在钠通道亚单位使二硫化还原。由于牛磺酸是神经介质的抑制剂,短暂暴露于NaHS(< 2 min),可在脑干引起牛磺酸水平增加2倍[13]。NaHS和牛磺酸的相互作用提示,H_2S的某些神经作用可被牛磺酸水平的改变所调节。但这一研

收稿日期:2003-11-24

作者单位:100700 北京市,北京军区总医院干部病房一科(程友琴);加拿大 Saskachewen 大学生理系(WANG Rui)

作者简介:程友琴,女,1951年4月生,辽宁省辽阳县人,主任医师。Tel:010-66721264

万方数据

究的意义是有限的，因为所用的 NaHS 的浓度（10 mmol/L）超出了生理范围。

NaHS 诱导了浓度依赖（27～200 μmol/L）的超极化并降低了 CA1 神经或背缝神经的输入抵抗[14]，这一含量在生理范围内。由于细胞外钡和细胞内铯的存在能取消由 NaHS 诱导的膜超极化，说明钾电导的改变是这些作用的主要的离子基础。NaHS 诱导的神经的超极化被高浓度（50 mmol/L）的四乙铵（tetraethylammonium，TEA），特异性钙激活钾通道（K_{Ca}）阻滞剂所阻断，但未被低浓度（10 mmol/L）的 TEA 或 4-氨基吡啶（4-aminopyridine，电压依赖钾通道（K_v）阻滞剂，1 mmol/L）所阻断。因此，没有证据支持在 NaHS 的作用中涉及 K_{Ca} 或 K_v。在这些实验中，提出了这样的假设：作为 ATP 耗竭的结果，NaHS 激活 ATP 敏感钾通道（K_{ATP}），而 ATP 的耗竭是由于氧化磷酸化中二硫化的抑制[14]。这一假设有些含糊，由于在同样的实验中，细胞内 ATP 浓度的处理并没有影响 NaHS 诱导的膜超极化，也未直接测量到 K_{ATP} 电流。在 NaHS 和 H_2S 存在的情况下，用封闭法控制细胞内的 ATP 水平，在神经内用电生理的方法测定钾通道电流，有助于确定 H_2S 和神经的 K_{ATP} 通道的相互作用。已有实验证实，H_2S 在大鼠主动脉和肠系膜动脉是 K_{ATP} 通道的开放剂[15]。

除了 K_{ATP} 通道，NMDA 受体可能是 H_2S 的作用位点。在鼠海马切片，通过增加 NMDA 诱导的内向电流，在很弱的痉挛性刺激存在时，10～130 μmol/L 的 NaHS 增强了海马长时程增强的产生[8]。H_2S 和 NMDA 受体的相互作用，可能是由 cAMP 依赖蛋白激酶旁路的激活。在鼠大脑和小脑神经或选择的脑神经和神经胶质细胞系，NaHS（1～100 μmol/L）增加 cAMP 的产生。通过增加 cAMP 的产生，在卵母细胞内，NaHS 增加了 NMDA 受体的表达和 NMDA 受体对刺激的敏感性[16]。

产生 H_2S 的酶在脑内的定位及 H_2S 在脑内作用位点的确定提示 H_2S 在神经系统的生理和病理生理意义。这正是人们的兴趣所在[17]。

如前所述，H_2S 作为脑内的神经调节因子，可以特异地增加 NMDA 受体调节的反应，改变海马长时程增强。2002 年 Eto 等应用 CBS 敲除鼠清楚显示：在脑内，通过激动性神经递质 L-麸氨酸或通过电刺激，神经末端的 CBS 可以产生 H_2S，这种 CBS 活性的增加，是通过 Ca^{2+}/调 Ca^{2+} 蛋白途径调节的。作者认为，尽管 H_2S 是毒气，大量毒理作用已在整体动物实验中被证实，但对细胞的直接作用很少有人知道。因为神经的兴奋是局部和暂时的，因此，H_2S 含量的增高可能是无毒的，而且，脑内 H_2S 含量的调节是很精确地维持在生理含量范围内，作者提供了这样的实验结果：电刺激超过 2 min，H_2S 的产生不再增加。此外，海马长时程强化在 CBS 敲除鼠被减弱了。这一结果提示，H_2S 可以在神经元兴奋时由 CBS 在脑内产生，它可以调节突触某些方面的活动[18]。H_2S 在脑内的增加除这些快速反应方式外，还有慢性反应形式，是通过睾酮和 SAM 调节的[19]。鼠脑中的内源性 H_2S 在出生后开始增高，在 8 周时达到最高水平，然后开始降低。在年龄匹配的大鼠，雌性鼠脑所含的 H_2S 少于雄性。给予雌鼠单剂量睾酮，能增加内源性 H_2S 和 SAM，其水平能与雄性鼠类似。相反，阉割雄性鼠降低睾酮的水平，也降低了 SAM 和 H_2S 的水平。给予 SAM 1 次/d，连续 3 d，未改变睾酮的水平，但增加了脑内 H_2S 的含量。这说明在鼠脑内 H_2S 的产生分别可以由睾酮和 SAM 调节[19]。

最近已经发现，H_2S 在脑内含量的改变可能与某些疾病的发生发展有关。Alzheimer 病是一个原因未明的痴呆症，随着人口老龄化进程的加快，日渐成为倍受关注的社会卫生问题。2002 年，日本的一个研究组对 13 名 Alzheimer 患者和 6 名年龄匹配的正常人大脑前皮层的 H_2S 含量进行研究发现，与年龄匹配的正常个体相比，Alzheimer 患者脑中的 H_2S 水平严重降低，（0.22 ± 0.05）μmol/g 蛋白比（0.49 ± 0.07）μmol/g 蛋白（$P < 0.01$）。作者认为这一结果有三种可能，一是 CBS 的底物半胱氨酸不足，二是 CBS 的数量不足，三是 CBS 的活性不足。前两种可能被他们的研究否定，但他们发现 Alzheimer 患者脑皮层中 SAM 含量非常低，（0.16 ± 0.03）μmol/g 蛋白比（0.53 ± 0.04）μmol/g 蛋白（$P < 0.001$），如前所述 SAM 是一个 CBS 的激活剂，由此推测，Alzheimer 患者脑皮层 H_2S 生成减少是由 CBS 的激活剂 SAM 减少使 CBS 的活性减低造成的；而 CBS 活性减低造成两个结果：一是血中同型半胱氨酸积聚，二是内源性 H_2S 产生减少；作者推测低水平的 H_2S 可能与 Alzheimer 患者的认识力衰落的某些部分有关[20]。

最近的一份研究报告指出，在 Ca^{2+} 和调 Ca^{2+} 蛋白存在的情况下，CBS 的 4 个半胱氨酸残端与它的活性调节有关，硝普钠可以修饰这 4 个半胱氨酸残端中的 2 个，因此，可以增加 CBS 的活性，反之，N-乙基马来酰亚胺（N-ethymaleimide），一种羟化药，在半胱氨酸

万方数据

还原中,完全取消了硝普钠的作用。这一研究还观察到,由硝普钠增加的CBS的活性与NO的产生无关。在葡萄球菌α溶血素(staphyloccus aureus alpha-hemolysin)存在的情况下,硝普钠可以穿过细胞膜[21]。这是一个新确定的调节CBS活性的机制,对于临床医师,这的确是一个令人激动的好消息,因为这一发现可能为那些因CBS活性不足引起的疾病(如上面提到的Alzheimer病)提供一个可能的治疗方法:通过外源性给予硝普钠去激活CBS。

而低下综合征是以进行性智力障碍为特征的神经系统疾病,这些患者出生时智力正常,但在出生后的前几年开始发病,伴随苯基丙氨酸和苯酮尿,因此与代谢中毒是一致的。这一毒性混合物可能是H_2S。而H_2S的增高可能是CBS活性增高的结果[22]。当然这一启发式的假设还有待实验和临床证实。

人类了解并不断深入地研究H_2S的毒性作用已有300多年,而对它的生理作用的研究才十几年,H_2S的生理作用最早是在神经系统发现的,以后在消化、心血管、泌尿生殖、血液、新陈代谢等系统也有发现,但毕竟时间太短,对于大多数人,特别是临床医生,这可能是一个从未听说的新课题,但从目前有限的研究资料可以预见,这将是一个有着广阔前景的新领域,有可能揭示某些疾病的发病机制并提出新的治疗途径。

参考文献

1 Rui W. Two's company, three's a crowd: can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter? FASEB J, 2002, 16: 1792-1798.

2 Kredich NM, Foote LJ, Keenen BS. The stoichiometery and kinetics of the inducible cysteine desulfhydrase from Salmonella typhimurium. J Biol Chem, 1973, 248: 6187-6197.

3 Westely AM, Westley J. Biological sulfane sulfur. Biochemistry J, 1991, 195: 63-67.

4 Buuzaleh AM, Vazquez ES, Del Carmen B. Cyanide intoxication-Ⅲ. On the analogous and different effects provoked by non-lethal and lethal challenged doses. Gen Pharmacol, 1990, 21: 27-32.

5 Warenycia MW, Goodwin LR, Benishin CG, et al. Acute hydrogen sulfide poisoning: demonstration, of selective uptake of sulfide by the brainstem by measurement of brain sulfide levels. Biochem Pharmacol, 1989, 38: 973-981.

6 Goodwin LR, Francom D, Dieken FP, et al. Determination of sulfide *in brain tissue by gas dialysision chromatography*; postmortem studies and two case reports. J Anal Toxicol, 1989, 13: 105-109.

7 Awata S, Nakayama K, Suzuki I, et al. Changes in cystathionine *gammol/La-lyase in various regions of rat brain during* development. Biochem Mol Biol Int, 1995, 35: 1331-1338.

8 Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. J Neurosci, 1996, 16: 1066-1071.

9 Skrajny B, Hannah RS, Roth SN. Low concentrations of hydrogen sulfide alter monoamine levels in the developing rat central nervous system. Can J Physiol Pharmacol, 1992, 70: 1515-1518.

10 Roth SH, Skrajny B, Reiffenstein RJ. Alteration of the morphology and neurochemistry of the developing mammol/Lalian nervous system by hydrogen sulfide. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1995, 22: 379-380.

11 Dello RC, Tringali G, Ragazzoni E, et al. Evidence that hydrogen sulphide can modulate hypothalamo-pituitary-adrenal axis function: *in vitro* and *in vivo* studies in the rat. J Neuroendocrinol, 2000, 12: 225-233.

12 Warenycia MW, Steele JA, Karpinski E, et al. Hydrogen sulfide in combination with taurine or cysteic acid reversibly abolishes sodium currents in neuroblastoma cells. Neurotoxicology, 1989, 10: 1912-1919.

13 Kombian SB, Warenycia MW, Mele F, et al. Effects of acute *intoxication with hydrogen sulfide on central amino acid* transmitters systems. Neurotoxicology, 1988, 9: 587-596.

14 Reiffenstein RJ, Hulbert WC, Roth SH. Toxicology of hydrogen sulfide. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1992, 32: 109-134.

15 Zhao W, Zhang J, Lu Y, et al. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K_{ATP} channel opener. EMBO J, 2001, 20: 6008-6016.

16 Kimura H. Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 267: 129-133.

17 Kimura H. Hydrogen sulfide as a neuromodulator. Mol Neurobiol, 2002, 26: 13-19.

18 Ko E, Miki O, Ken U, et al. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation. J Neurosci, 2002, 22: 3386-3391.

19 Eto K, Kimura H. The production of hydrogen sulfide is regulated by testosterone and S-adenosyl-L-methionine in mouse brain. J Neurochem, 2002, 83: 80-86.

20 Eto K, Asada T, Arima K, et al. Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 293: 1485-1488.

21 Eto K, Kimura H. Anovel enhancing mechanism for hydrogen sulfide-producing activity of cystathionine beta-synthase. J Biol Chem, 2002, 277: 42680-42685.

22 Kamoun P. Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hpothesis. Med Hypotheses, 2001, 57: 389-392.

万方数据