

the European depression in diabetes(EDID) research consortium[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2009, 5(2): 112-119.

- [15] Lustman PJ. The course of major depression in diabetes [J]. *Gen Hosp Psychiatry*, 1997, 19(2): 138-143.
- [16] Lustman PJ. Depression and poor glycemic control: a meta-analytic review of the literature [J]. *Diabetes Care*, 2000, 23(7): 934-942.
- [17] Talbot F. Relations of diabetes intrusiveness and personal control to symptoms of depression among adults with diabetes[J]. *Health Psychol*, 1999, 18(5): 537-542.
- [18] Morran MP. Humoral autoimmunity against the extracellular domain of the neuroendocrine autoantigen IA-2 heightens the risk of type 1 diabetes[J]. *Endocrinology*,

2010, 151(16): 2528-2537.

- [19] Goodnick PJ, Henry JH, Buki VM. Treatment of depression in patients with diabetes mellitus[J]. *J Clin Psychiatry*, 2005, 56(2): 128-136.
- [20] Cheer SM, Goa KL. Fluoxetine: a review of its therapeutic potential in the treatment of depression associated with physical illness[J]. *Drugs*, 2001, 61(1): 81-110.
- [21] O'Kane M, Wiles PG, Wales JK. Fluoxetine in the treatment of obese type 2 diabetic patients[J]. *Diabet Med*, 2006, 11(1): 105-110.

(收稿日期: 2012-03-09 修回日期: 2012-05-21)

· 综 述 ·

## NO、CO 和 H<sub>2</sub>S 与缺血性脑损伤关系研究进展

彭雪梅 综述, 晏 勇 审核

(重庆医科大学附属第一医院神经内科 400016)

**关键词:** 一氧化氮; 一氧化碳; 硫化氢; 缺血性脑损伤

doi: 10. 3969/j. issn. 1671-8348. 2012. 29. 046

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)29-3122-03

20 世纪 80 年代以后学者相继发现动物和人体内也存在一定浓度的一氧化氮(NO)、一氧化碳(CO)和硫化氢(H<sub>2</sub>S)等气体。这些气体分子可由生物体自身合成, 均具有神经递质和调质作用, 它们的生物作用有所不同, 但可以单独或者联合的形式, 在多个系统及其多种疾病的生理及病理过程中起调节作用。它们的产生及传感机制引起了学者的兴趣。中风已成为中老年人致残的主要原因并成为世界第 3 大死亡原因<sup>[1]</sup>。在缺血性中风的发生、发展过程中, 发现 NO、CO 和 H<sub>2</sub>S 均参与其中。本文就这 3 种气体信号分子在缺血性脑损伤中的作用及相互关系的研究进展作一综述。

### 1 NO 与缺血性脑损伤

在鸟氨酸循环过程中, 一氧化氮合酶(NO synthase, NOS)催化 L-精氨酸胍基末端的氮原子与分子氧结合形成一种自由基气体, 即内源性 NO。NOS 在中枢神经系统广泛存在, 多位于大脑皮质、海马 CA<sub>1</sub> 和 CA<sub>3</sub> 区、杏仁核、纹状体。NOS 活性因所在部位不同而明显不同, 活性较高的 NOS 存在于大脑皮质灰质中, 无活性或活性低下的 NOS 存在于白质中。目前, 已知的 NOS 有 3 种亚型: 内皮细胞型 NOS(eNOS), 它定位于血管内皮细胞, 在血管舒张中起作用; 诱导型 NOS(iNOS), 它定位于免疫细胞、神经胶质细胞, 负责巨噬细胞的活化作用; 神经元型 NOS(nNOS), 它定位于神经元, 涉及神经元细胞信号传递。eNOS 和 nNOS 称为结构型 NOS(cNOS), 在病理条件下因钙通道开放钙离子内流, 细胞内的钙离子增加被激活产生 NO, 最初 NO 具有神经保护作用, 随着持续刺激产生大量的 NO 具有神经毒性作用。iNOS 不依赖钙离子, 在免疫激发和神经元损伤时, iNOS 激活持续产生大量的 NO 发挥细胞毒性。

过去的研究表明在脑缺血性再灌注损伤中 NO 具有神经保护<sup>[2]</sup>及神经细胞毒性双重作用。在脑缺血的极早期阶段(小于 2 h), eNOS 被激活产生 NO 和 NO<sub>x</sub>, 在 10 min 达到高峰期, 在 60 min 逐渐恢复到基线水平。NO 作为血管舒张因子对脑缺血神经元实施神经保护作用<sup>[3]</sup>, 其机制包括: (1) NO 扩张脑血管改善微循环, 减轻缺血半暗带的损伤<sup>[4]</sup>。(2) NO 能够

亚硝化氧化还原剂巯基, N-甲基-L-门冬氨酸(NMDA)受体毒性因二硫键形成, 钙离子内流被抑制而减轻。(3) NO 与活性氧基团反应, 减轻了脑缺血时自由基对神经元的炎性反应<sup>[5]</sup>。随着脑缺血时间延长, 由 eNOS 来源的 NO 的神经保护作用消失, 而代之以 nNOS 及 iNOS 来源的 NO 发挥其神经毒性作用, 包括: (1) NO 与氧自由基迅速结合生成过氧亚硝酸阴离子(ONOO<sup>-</sup>), 其降解物 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 可造成细胞蛋白质、核酸及脂质膜的损伤。(2) NO 可损伤线粒体酶系统抑制能量合成<sup>[6]</sup>。(3) NO 通过抑制核苷酸还原酶(即 DNA 合成限速酶)及碱基脱氨基作用抑制 DNA 的复制及损伤 DNA, 导致细胞凋亡<sup>[7]</sup>。(4) NO 浓度升高可致微循环衰竭, 细胞组织炎症反应, 加重脑损伤。

### 2 CO 与缺血性脑损伤

哺乳动物内源性 CO 是血红素氧化酶(heme oxygenase, HO)降解血红素大量产生的一种气体, 同时产生二价铁(Fe<sup>2+</sup>)和胆绿素。这反应是通过烟酰胺腺嘌呤(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)和细胞色素 P450 还原酶(cytochrome P450 reductase)供应电子给 O<sub>2</sub> 完成的。HO 是血红素降解反应的起始酶和限速酶, 在体内分布广泛。HO-1 为诱导型, 在应急状态下可表达激活起抗氧化作用, 主要分布于脾脏、肝脏、骨髓和网状内皮细胞。HO-2 为结构型, 无诱导性, 是生理状态下的主要存在形式, 主要分布于脑和睾丸中。HO-3 分布于脾脏、胸腺、前列腺、心脏、肾脏和睾丸, 其活性很低, 可能对血红素依赖的细胞结构蛋白具有调节作用。

HO/CO 系统是神经血管调节器, 研究表明缺氧缺血时脑内 HO-1 表达增强, 降解血红素导致血浆 CO 水平显著增高。更多的证据表明 CO 是依赖 BKCa 通道活性激活, 调节血管平滑肌扩张血管, 增量调节脑血流量, 降低血液的黏附性, 对脑组织的缺血缺氧状态得到改善, 从而起保护作用<sup>[8]</sup>。Imuta 等<sup>[9]</sup>研究表明缺氧缺血 4 h 时脑内 HO-1 表达增强, 血浆 CO 水平显著增高, 在缺血 12 h 时达高峰。产生的 CO 能活化鸟苷酸, 增加环磷酸鸟苷(cGMP), 舒张血管平滑肌。韩遵义和杨光

田<sup>[10]</sup>建立大鼠全脑缺血再灌注模型,发现脑缺血再灌注 1 h 时 HO-1 的活性、CO 及 cGMP 含量明显升高,但海马 CA<sub>1</sub> 区单位面积神经元存活数目并无明显减少,推测在病变早期 HO-1 的活性的升高、CO 含量升高是对大脑的保护作用。但随着 CO 增加的高峰期到来,脑血管过度扩张,脑血流量灌注过度,可因循环障碍出现脑水肿加重缺血性脑损伤。

### 3 H<sub>2</sub>S 与缺血性脑损伤

内源性 H<sub>2</sub>S 主要由胱硫醚合成酶(cystathionine synthetase, CBS)与胱硫醚裂解酶(cystathionine lyase, CSE)对含硫氨基酸如 L-半胱氨酸(L-cysteine)的酶解催化产生。CBS 是产生内源性 H<sub>2</sub>S 的主要酶系,是惟一属于 5'-磷酸吡哆醛依赖性酶的血红蛋白。在人类它主要分布于大脑和肺部中,其在脑的海马组织中高度表达。脑内的 CBS 含有血红素结合区和 S 腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM)调控点,其由约 551 个氨基酸残基组成。血红素结合区是 CBS 的功能性亚基,它主要是负责 CBS 与其作用底物的结合以及改变和维持 CBS 的空间结构。SAM 调控点能控制 CBS 的激活或抑制,它主要通过 SAM 结合改变酶的立体构象来完成。CBS 活性的调节还受 Ca<sup>2+</sup>/钙调素的影响,当神经元受到刺激兴奋时, Ca<sup>2+</sup>内流增加,促使钙调素结合并激活 CBS,从而增加 H<sub>2</sub>S 的生成。

证据显示 KATP 通道是硫化氢作用的核心靶点, KATP 通道兴奋开放,是硫化氢作用于血管舒张平滑肌细胞的主要机制。Hu 等发现格列本脲(KATP 抑制剂)可以抑制 H<sub>2</sub>S 的舒张效应。电生理研究直接证明外源性 H<sub>2</sub>S 能增 KATP 电流,这种作用同样能被格列本脲抑制<sup>[11]</sup>。另外,研究发现 NMDA 受体可能是 H<sub>2</sub>S 的作用位点。近期研究发现生理浓度的硫化氢具有抗氧化自由基的作用<sup>[12]</sup>,能阻止神经元避免受兴奋性氨基酸(如谷氨酸)、过氧化亚硝基等导致的氧化应激。Kimura 等发现 H<sub>2</sub>S 能显著减少氧化应激所致的细胞死亡。任彩丽等<sup>[13]</sup>研究结果显示,缺血再灌注 12 h 前脑皮质组织 H<sub>2</sub>S 含量、CBS 酶活性均明显升高,缺血再灌注 24 h 时又显著降低,缺血再灌注 48 h 恢复至正常。周银燕等<sup>[14]</sup>在实验中发现脑缺血再灌注后, CBS-mRNA 表达和 H<sub>2</sub>S 生成量在大鼠海马组织中均增加;应用羟氨(CBS 抑制剂)预处理, CBS-mRNA 表达和 H<sub>2</sub>S 生成明显减少,进一步进行电镜观察神经细胞线粒体变形率增高,提示内源性 H<sub>2</sub>S 在缺血再灌注脑损害中对神经细胞可能有保护作用。还有研究表明, H<sub>2</sub>S 能降低体温和代谢率,从而减轻缺血再灌注损伤<sup>[15-16]</sup>。此外,一定程度的 H<sub>2</sub>S 增高,能够扩张血管,增加供血,起到代偿作用。但同时内源性 H<sub>2</sub>S 过高的表达,可增强 N-甲基-D-天门冬氨酸(NMDA)受体介导的钙超载而导致细胞损伤。

### 4 NO、CO 和 H<sub>2</sub>S 在缺血性脑损伤中的相互作用

HO、NOS 和 CBS 是分别产生 CO、NO 和 H<sub>2</sub>S 的酶,也是一种血红素蛋白。血红素蛋白分子是 NO、CO 和 H<sub>2</sub>S 气体分子产生、运输和传感的关键载体,并且是气体分子相互作用的重要场所。血红素蛋白第一个功能是气体运输,有代表性的就是运输氧气(O<sub>2</sub>)的肌红蛋白和血红蛋白。这些含铁血红素蛋白质有广泛的配体,其中包括 CO、NO 及 H<sub>2</sub>S。气体配体和血红素之间的结合是可逆的,在它们的结合和释放过程中气体配体之间进行了竞争。血红素蛋白第 2 个功能是转移电子,有代表性的就是线粒体的细胞色素 C。这类蛋白传递单电子到真核细胞线粒体呼吸链的细胞膜化合物上。电子的传递发生在非卟啉基亚铁血红素蛋白含铁部分,使铁离子转换在 2 个氧化态: Fe<sup>2+</sup>和 Fe<sup>3+</sup>。血红素蛋白的第 3 个功能是促进发生在特定酶的氧化还原反应催化部位的抗氧化反应。在这种情况下,

血红素蛋白通过 O<sub>2</sub> 和电子氧化或 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在非卟啉基亚铁血红素还原反应来调解酶反应。加氧酶是可以催化 O<sub>2</sub> 作用于酶底物的一类酶, HO 和 NOS 就属于这类酶。血红素蛋白的第 4 个功能是气体的传感器。与上述 3 种功能不同的是,只有位于气体传送蛋白功能性亚基中的血红素蛋白有此作用,血红素蛋白可以传递信号给蛋白的功能区, CBS 和 sGC 属于这一类酶。尽管 HO、NOS 和 CBS 这些酶有自行的途径识别特定的载体和辅助因子,并避免因气体类似的极性和配体形状出现生理混乱,但气体信号分子间的交互作用确实存在。在脑缺血过程中,缺血后氧化应激可导致 HO-1/CO、iNOS/NO 和 CBS/H<sub>2</sub>S 系统的激活, CO、NO 和 H<sub>2</sub>S 大量产生,三者均参与缺血性脑损伤的病理生理过程,它们相互促进或相互抑制,形成一个复杂的调控网络。

**4.1 HO-1/CO 与 iNOS/NO 相互关系** 在缺血性脑损伤早期, HO-1 活性增强作用于血红素产生 CO, CO 作用于血管平滑肌扩张血管,增量调节脑血流量,降低血液的黏附性,对脑组织的缺血缺氧状态得到改善。同时 CO 弥散入血与细胞胞浆中鸟苷酸环化酶(sGC)血红素基团上的 Fe<sup>2+</sup>结合,形成 CO<sup>-</sup>亚铁血红素配位复合体而激活,催化三磷酸鸟苷(GTP)生成环磷酸鸟苷(cGMP); cGMP 作为第二信使可促进 Ca<sup>2+</sup>内流,激活 Ca<sup>2+</sup>依赖性的 eNOS,产生 NO, NO 可激活可溶性 GC,增加 cGMP,舒张血管平滑肌。神经元损伤后, iNOS 不依赖 Ca<sup>2+</sup>自行激活持续产生大量的 NO 发挥神经细胞毒性作用, NO 在中枢神经系统内激活鸟苷酸环化酶,引起 cGMP 合成的增加, cGMP 激活细胞外信号调节激酶(ERK)1/2/P<sup>90</sup>RSK 信号转导通路诱导神经元发生凋亡<sup>[17-18]</sup>,是缺血性脑损伤中主要机制。另外, CO 可竞争取代结合在血红蛋白上的 NO,进一步释放出过量 NO 发挥神经细胞毒性作用。并在脑缺血晚期,因 CO、NO 的血管舒张作用,脑血管持续过度扩张,血液淤积血流缓慢,循环内的有效血流量减少,进一步加重缺血缺氧性脑损伤。因此, HO-1/CO 与 NOS/NO 系统在脑缺血早期是保护作用,在脑缺血中晚期可能具有相互促进作用,加重了缺血后脑损伤。

**4.2 iNOS/NO 与 CBS/H<sub>2</sub>S 相互关系** 在缺血性脑损伤时, iNOS 因神经元损伤被激活大量产生 NO。一些亚铁血红素包括曾被认定为 CO 信号传感器细胞色素 P450,这些酶中的亚铁血红素对 CO 和 NO 都敏感<sup>[19]</sup>。因此,作为类似于细胞色素 P450 的 CBS 酶可因 NO 与其血红素结合区结合激活,导致 H<sub>2</sub>S 生成增加;另一方面 CBS 酶可因缺血缺氧直接激活增量调节 H<sub>2</sub>S 的生成。有人曾提出 H<sub>2</sub>S 可抑制 NOS 的合成<sup>[20]</sup>。除气体信号分子调节酶的活性外,化学反应也被认为参与了调节机制。Whiteman 等<sup>[21]</sup>在实验中体外培育供体硫化氢钠(sodium hydrosulfide, NaHS)和 NO 可形成 RSNO,由此推测 H<sub>2</sub>S 和 NO 之间可反应产生 RSNO;相反地,发现 H<sub>2</sub>S 可以降低 GSNO,进而释放 NO。但 H<sub>2</sub>S 作为一种还原剂,其生成增加又可抑制 NO 产在还原性环境中。周银燕等<sup>[14]</sup>在实验中发现 H<sub>2</sub>S 和 NO 在脑缺血-再灌注后大鼠模型海马中表达增加,但应用 CBS 抑制剂后 H<sub>2</sub>S 表达减少而 NO 表达明显增加,证明缺血缺氧可激活 iNOS 和 CBS 产生大量的 NO 和 H<sub>2</sub>S, NO 可进一步激活 CBS 增加 H<sub>2</sub>S 生成量, H<sub>2</sub>S 生成增加又可抑制 NO 产生。NOS/NO 体系在早期是以 eNOS/NO 为主,则和 CBS/H<sub>2</sub>S 体系在脑缺血早期是保护作用;在中晚期以 iNOS/NO 为主则起损害作用,而 CBS/H<sub>2</sub>S 体系对神经细胞起保护作用,两体系之间可能是损害与抗损害的关系。

**4.3 HO-1/CO 和 CBS/H<sub>2</sub>S 相互关系** 在缺血性脑损伤早

期,缺血缺氧致 HO-1 和 CBS 活性增高,进一步产生 CO 与 H<sub>2</sub>S。在活体内多项实验支持 CBS 是 CO 的传感器,CO 可以抑制 CBS 的活性,减少 H<sub>2</sub>S 的生成<sup>[22-23]</sup>。其机制可能是 CO 与 CBS 结合替换含硫的配体,抑制了硫化氢生成过程中转硫途径,减少 H<sub>2</sub>S 的过量生成<sup>[24]</sup>。目前,近期研究发现 CO 与 CBS 血红素区的 Fe<sup>2+</sup> 结合可抑制其活性,减少 H<sub>2</sub>S 的生成。邵建林等<sup>[25]</sup> 实验中建立大鼠全脑缺血再灌注模型,发现应用 CBS 抑制剂羟氨后大鼠海马组织 CBS mRNA 表达减少,H<sub>2</sub>S 生成减少,GSH 含量降低,应用 HO-1 抑制剂锌原卟啉大鼠海马组织 HO-1 mRNA 表达减少,CO 生成减少,但 H<sub>2</sub>S 生成增加,GSH 含量明显增高。这表明 HO-1/CO 和 CBS/H<sub>2</sub>S 两体系对脑缺血再灌注损伤可能有拮抗作用。

#### 参考文献:

- [1] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. Heart disease and stroke statistics-2010 update; a report from the american heart association[J]. *Circulation*, 2010, 121(2): 212-215.
- [2] Mun CH, Lee WT, Park KA, et al. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by agmatine after transient global cerebral ischemia in rat brain[J]. *Anat Cell Biol*, 2010, 43(3): 230-240.
- [3] 连瑜, 李泽宇, 张国华, 等. 一氧化氮及其合成酶在脑缺血中的作用[J]. *中国药物临床*, 2007, 7(10): 779-780.
- [4] Hua Q, Zhu X, Li P, et al. Refined Qing Kai Ling, traditional Chinese medicinal preparation, reduces ischemic stroke-induced infarct size and neurological deficits and increases expression of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(4): 633-637.
- [5] Mehta SL, Manhas N, Raghubir R. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics[J]. *Brain Res Rev*, 2007, 54(1): 34-66.
- [6] Rao S, Lin Z, Drobyshevsky A, et al. Involvement of neuronal nitric oxide synthase in ongoing fetal brain injury following near-term rabbit hypoxia-ischemia[J]. *Dev Neurosci*, 2011, 33(3-4): 288-298.
- [7] Kikuchi K, Kawahara K, Tanchareon S, et al. The free radical scavenger, 14 edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of MDA, high mobility group box1 in neuron cells[J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(3): 865-874.
- [8] Wang B, Cao W, Biswal S, et al. Carbon monoxide-activated Nrf2 pathway leads to protection against permanent focal cerebral ischemia[J]. *Med Hypotheses*, 2010, 75(2): 235-237.
- [9] Imuta N, Hori O, Kitao Y, et al. Hypoxia-mediated induction of heme oxygenase type I and carbon monoxide release from astrocytes protects nearby cerebral neurons from hypoxia-mediated apoptosis[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(5): 543-552.
- [10] 韩遵义, 杨光田. HO-1 及内源性 NO 在全脑缺血再灌注大鼠损伤中的作用[J]. *中国康复*, 2008, 23(4): 223-225.
- [11] Pan TT, Neo KL, Hu LF, et al. H<sub>2</sub>S preconditioning induced PKC activation regulates intracellular calcium handling in rat cardiomyocytes[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2008, 294(1): 169-171.
- [12] Szabo C. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 917-933.
- [13] 任彩丽, 李东亮, 赵红岗, 等. 全脑缺血-再灌注大鼠脑组织内源性硫化氢的动态变化[J]. *中国脑血管病杂志*, 2008, 5(4): 177-181.
- [14] 周银燕, 邵建林, 梁荣华, 等. 内源性 H<sub>2</sub>S 和 NO 在大鼠脑缺血-再灌注损伤中的相互作用[J]. *昆明医学院学报*, 2008, 10(1): 31-36.
- [15] Buga AM, Bălăceanu A, Popa-Wagner A, et al. Strategies to improve post-stroke behavioral recovery in aged subjects[J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2009, 50(4): 559-560.
- [16] Volpato GP, Searles R, Yu B, et al. Inhaled hydrogen sulfide: a rapidly reversible inhibitor of cardiac and metabolic function in the mouse[J]. *Anesthesiology*, 2008, 108(4): 659-668.
- [17] Brune B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it on? [J]. *Cell Death and Differ*, 2003, 10(7): 864-869.
- [18] 李薇, 赵光瑜, 邵建林. 一氧化氮诱导海马神经元凋亡信号通路的研究[J]. *临床麻醉学杂志*, 2008, 24(4): 334-336.
- [19] Hill M, Pereira V, Chauveau C, et al. Heme oxygenase-1 inhibits rat and human breast cancer cell proliferation; mutual cross inhibition with indoleamine 2,3-dioxygenase[J]. *FASEB*, 2005, 19(16): 1957-1968.
- [20] Whiteman M, Moore PK. Hydrogen sulfide and the asculture; a novel vasculo protective entity and regulator of nitric oxide bioavailability? [J]. *Cell Mol Med*, 2009, 13(3): 488-507.
- [21] Whiteman M, Li L, Kostetski I, et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343(3): 303-310.
- [22] Shintani T. Cystathionine β-synthase as a carbon monoxide-sensitive regulator of bile excretion[J]. *Hepatology*, 2009, 49(2): 141-150.
- [23] Kajimura M, Fukuda R, Bateman RM, et al. Interactions of multiple gas-transducing systems; hallmarks and uncertainties of CO, NO, and H<sub>2</sub>S gas biology[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 13(2): 157-192.
- [24] Yamamoto T, Takano N, Ishiwata K, et al. Carbon monoxide stimulates global protein methylation via its inhibitory action on cystathionine β-synthase [J]. *Biochem*, 2011, 48(1): 96-100.
- [25] 邵建林, 朱俊超, 王俊科, 等. 胱硫醚合酶/硫化氢和血红素氧合酶-1/一氧化碳体系在大鼠脑缺血再灌注损伤中的作用[J]. *中华麻醉学杂志*, 2006, 26(5): 439-442.