

方面,人们对微生物的遗传学和细胞学做了深入的研究,在文献中表现尤为突出,如研究大肠杆菌遗传学的文献有89篇,葡萄球菌有75篇,在其各自的文献中所占比重较大;同时表2中22种期刊也有所表示。人们已经开始运用DNA重组技术研究微生物的遗传特性,如DNA插入技术有60篇文献报告,突变研究有26篇文献,这些都反映了人们对耐药菌株抗药机理的研究方法。与此同时,人们尚对革兰氏阴性菌的染色体、 β -内酰胺酶基因ampc进行分析和研究,文献主题为 β -内酰胺酶有46篇报告。在药物研究方面,人们也正在寻求最佳的药理学作用,以期扩大抗菌菌谱,增加药理功能。如庆大霉素、万古霉素、青霉素的药代动力学文献较多,同时人们也试图应用联合用药,通过药物的协同作用增强药效,杀灭耐药菌株。制药工业应努力发展以细菌耐药机理为基础的新型抗生素,如阻断特异耐药机理的酶抑制剂,最终以分子遗传学手段,选择耐药性的基因,用基因工程方法制备抗细菌耐药性的新型制剂。

2. 文献来源数据表明各个国家均重视微生物抗药性的研究,其专门刊物Plasmids亦出版发行。这些刊物主要以感染疾病期刊

为主,微生物学和药学期刊次之,说明临床医务人员和制药人员都在研究微生物的耐药性。有22种杂志刊载了50%以上的文献,信息量大、集中,因此是本研究领域的重要期刊,专业研究人员经常浏览这些刊物可获得大部分的有用信息。文献的分布分散也说明了科学研究的本质,即各学科的交叉和渗透,是促进科研前进的动力。

小 结

1. 文献来源分析可确定本研究领域重要期刊,掌握这些主要信息源所刊载的文献可获得大量的有用信息,文献来源的分析可帮助专业人员了解本专业的文献。

2. 文献内容的分析,可通过其主题词的数量变化揭示其研究内容和技术方法,有助于了解和掌握世界范围内微生物耐药性研究与发展的准确情报,以便更有效地加以控制,文献计量学分析可提供准确的数据,供科研人员参考。

参考文献

- [1] 宋金福,唐明忠,王美荣. 中华内科杂志,1992;9:556
- [2] 姚勤,陈小英,陈如本. 中国药科大学学报,1992;4:243

内皮素(Endothelins)

—血管作用及临床应用

孙连娜 译 芮耀诚 校

在局部血管张力调节方面,血管内皮的重要作用已被充分认识。内皮细胞可产生几种血管活性物质,如现已推测为氧化氮的内皮松弛因子,以及诸如血栓素 A_2 (TXA $_2$)和内皮素-1(ET-1)的血管收缩剂。

最初认为ET-1是由血管内皮细胞产生的一种强效含21个氨基酸残基的血管收缩肽,但后来发现它对血管及非血管组织均有广泛作用。最值得注意的是,ET-1是最强的血管收缩肽并且具有特征性。此外,ET-1

活性特别持久,一次静注低剂量时,升压反应可持续几小时。ET-1这种药理特性在心血管领域引起了极大兴趣。现在认为内皮素(ET)与心血管和其他非血管系统的功能调节有关。

本文概述ET药理、生化及分子方面的内容,并讨论了它们的病生作用,尤其是对血管作用的特点。

1. ET家族

目前认为每种哺乳动物基因组中均有编码ET异构肽(ET-1,-2,-3)的3种不同基因。ET-2和ET-3分别是2位和6位氨基酸残基与EF-1不同。大鼠和小鼠ET-2的4位丝氨酸在人或猪则被天冬酰胺替代。ET家族3个成员分子中都含有两个二硫键及疏水的C—末端,与从以色列穴居蛇毒液中提取的sarafotoxin的特征相同,提示二者起源于共同家族。

3种ET以不同组织分布类型在各种组织中出现。血管内皮细胞中仅发现有ET-1,ET-2和ET-3分布于脑、肾、肾上腺、肠等其他组织。ET-3相对集中于神经组织,是ET神经系统分布形式。ET-1不仅存在于内皮细胞,在脑、肾、肺和其他组织的各种非血管细胞中也有分布。

2. ET受体

ET的3种异构肽的发现促进许多研究,提示ET肽引起的药理反应至少有两种受体亚型介导,因为在不同系统观察到3种ET的药理反应有两种不同类型。

后来,采用基因克隆技术分离了编码ET受体的三种cDNA克隆。每种受体的编码多肽链含7个片断,每个片断由20至27个疏水氨基酸残基组成,可能是代表跨膜的组成部分。此结构表现了一种特征顺序,解剖学上与蛋白偶联的七螺旋受体相似。

按3种ET异构肽对转导的哺乳细胞表达的受体亲和力的相对顺序,受体可分为两类。第一类受体,命名为ET_A,ET对它亲和

能力为ET-1>ET-2>>ET-3。ET-1与此受体亚型亲和力约为ET-3的100倍。第二类受体亚型,称为ET_B,三种ET和sarafotoxin与其亲和力相似。这些结论与药理及配基结合实验结果一致。

ET_A和ET_B受体有相似的主要序列,在人体相同的氨基酸约63%。人基因的南方吸印杂交分析表明,每种编码ET受体的cDNA仅能识别相当于ET_A和ET_B受体的两种不同基因,即使在低杂交强度条件下也同样。因此人基因组中仅有两组编码ET受体的密切相关基因。如果存在第三种ET受体基因,它可能与前两组克隆的受体基因几乎没有相似性。

北方吸印杂交和原位杂交的组织化学研究表明,大鼠的脑、肺、心和肾等许多组织中都可检测到ET受体mRNA。但是,血管壁与细胞分布的受体类型却有很大差异,ET_A受体主要分布于血管平滑肌细胞,可能与血管收缩有关。已证实ET_B受体存在于内皮细胞,可能与ET诱导NO和前列腺素产生有关。

两种药理性质的ET受体的cDNA克隆实验结果,无疑证明了多种ET受体亚型的存在,并提供了较早的药理学综合资料。

3. 内皮细胞中ET的形成

内皮细胞分泌ET-1在ET合成水平可调节(也就是转录、翻译和加工),而在释放水平不能调节,因为内皮细胞不含贮存及受刺激反应引起释放的致密分泌颗粒。

在培养的内皮细胞中,ET-1的mRNA受几种血管活性物质诱导,包括凝血酶、血管紧张肽-II和加压素。这些因子通过激活磷脂酶C形成1,2-二乙酰甘油,导致蛋白激酶C活化及通过肌醇-1,4,5-三磷酸酯生成使得Ca²⁺动用。TGF-β(转化生长因子β)也诱导ET-1的mRNA。因此,人ET-1基因5'区核苷酸序列含有几个AP-1(活化蛋白-1)结合成分的主要部分,其他基因中也存在

并由佛波醇酯诱导影响, NF- κ B (核因子-1)结合的成分, 参与TGF- β 1的反应调节。

人ET-1前体的基因也有六个核脱氧序列, 与急性期反应调节成分有关, 这些成分参与急性生理应激情况如手术、急性心肌梗塞时ET-1的诱导。

ET-1是由近200个氨基酸组成的前体(前体ET-1), 通过形成含38或39个氨基酸残基(随物种而定)的中间体形成所谓的“大ET-1”, 此物可能是由内皮细胞分泌的。在内皮素转换酶(ECE)催化下, 大ET-1的Trp³¹和Val³²残基间发生一种特殊的蛋白水解, 断裂产生ET-1和C-末端碎片。虽然大ET-1收缩血管作用仅为ET-1的1%, 但它在体内升压方面却与ET-1一样强。这是因为体内大ET-1受ECE催化可以迅速转化为有活性的ET-1。ECE是一种膜结合的中性金属内肽酶, 可被金属蛋白酶抑制剂phosphoramidon抑制。

4. ET的血管作用

静注ET, 最初引起动物全身性血压降低, 随之是一持久的升压反应。与最初血压降低有关的受体看来是非异肽选择性的ET_B受体, 可能定位于内皮。可能通过NO及PGI₂的释放介导血管舒张。因此, ET_A受体专特性拮抗剂BQ-123不影响最初短暂的降压反应。

升压反应可能主要由血管平滑肌ET_A受体介导。然而, 据报道, 在麻醉大鼠体内ET_A受体专特性拮抗剂BQ-123不能完全抑制ET-1引起的升压作用。因此ET-1的升压反应不是完全通过ET_A受体作用。剩余的活性可能由ET_B受体和/或未知的第三种受体亚型参与。最近有报道指出, 在几个部位的血管平滑肌细胞如猪的肺和冠状动脉, 兔肺动脉, 狗、猴及兔的隐静脉, 存在ET_A和ET_B两种受体。

局部ET诱导的反应较大程度取决于ET的剂量和选用的血管。例如, 一次静注ET在动物后肢主要引起血管扩张, 但在大鼠肠系

膜动脉出现注射后短暂血管扩张以及随后收缩的双相效应。另外, 小剂量ET一般可使所有血管床扩大。这种ET诱导的血管扩张可能有NO的参与, 它是通过内皮细胞的ET激活ET_B受体而释放的。两型受体分布不同导致ET诱导的局部血管反应不同。除血管作用外, ET在各种组织还引起广泛的非血管作用。

在猪冠状动脉制备ET诱导的血管收缩主要由两个细胞内信号转导系统介导: 分别通过对白鼠咳病毒不敏感及敏感的G蛋白引起磷脂酶C的激活和电位依赖性L-型Ca²⁺通道的开放。然而, 电位依赖性钙离子通道是否参与其他区域ET诱导的血管反应尚不清楚。另外, ET激活磷脂酶A₂产生花生四烯酸类, 可能对ET诱导活性进行调节。

如上所述, ET与受体相互作用的结果之一是通过G蛋白激活磷脂酶C。磷脂酰肌醇在磷脂酶C作用下水解, 经1,2-二乙酰甘油激活蛋白激酶C, 通过生成肌醇-1,4,5三磷酸酯使细胞内Ca²⁺动用。可是诱导二乙酰甘油生成是双相和持久的, 而磷脂酰肌醇的生成是短暂的。二乙酰甘油生成的后期可能是激活磷脂酶D水解磷脂酰胆碱而得。二乙酰甘油的不断生成可能使蛋白激酶C持续激活, 这为ET促血管长期收缩的机理提供了解释。蛋白激酶C的激活也与ET的促有丝分裂作用有关。

多数动脉平滑肌主要分布ET_B受体, 因而ET-1的升压活性强于ET-3。但如上所述, 一些事实说明某些部位的血管平滑肌尤其是静脉平滑肌分布着ET_B受体。因为ET_B受体对ET反应也能促进磷脂酰肌醇的降解, 所以平滑肌细胞的ET_B受体活化也可引起细胞内Ca²⁺动用, 导致血管收缩。

内皮细胞的ET_A受体也可引起细胞内Ca²⁺动用, 从而激活NO_B的合成。

5. 构效关系

促血管收缩的ET类似物构效关系的研

究已有报道,ET-1的C-末端Trp²¹残基和分子内两个二硫键桥是发挥血管收缩活性的必需基团。Trp²¹的移去将使ET-1的血管收缩活性降低至原来的1/1000。若进一步去除C-末端,收缩作用将更加降低。

ET-1的N-末端改变也使血管收缩作用大幅度下降,如ET-1N-乙酰化合成的N-乙酰-Cys¹-ET-1作用显著降低。

四个Cys残基经还原及烷基化将使ET-1血管收缩的克分子效能以100多倍的速度下降。如果用Ala残基取代四个Cys残基(Ala^{1,3,11,15}ET-1),强度降低200倍。这些事实证明,ET_A受体识别ET分子的包括N端及C端在内的三千特征结构。

相反,ET-1直线型的肽类似物,Ala^{1,3,11,15}ET-1(4-AlaET-1),据报道可与猪小脑膜(富含ET_B受体)结合,只有天然ET-1活性的1/3。切除N端的直线肽4-Ala-ET-1(6-21),4-Ala-ET-1(8-21)和N-乙酰基-4-Ala-ET-1(10-21),对ET_B受体仍有很高的亲和力,比对ET_A受体亲和力强1000至1800倍。而且,这些肽在猪动脉壁具有内皮依赖的血管扩张作用,表明它们是ET_B选择性的激动剂。选择性更好的ET_B受体激动剂IRL1620[Suc-(Glu⁹,Ala^{11,15})-ET-1(8-21)]业已设计完成(ET_B受体Ki=16 pmol/L,ET_A受体Ki=1.9 mmol/L)。

这些观察结果表明ET_B受体只识别ET分子中C末端结构,尤其是Glu¹⁰-Trp²¹一段氨基酸序列。Cys¹残基的游离α-氨基和N-端三级结构(包括二硫键)不是ET和ET_B受体高亲和力结合的必需基团,这一事实与ET_A受体的要求对比鲜明。此结论可以解释ET_B受体对异构肽没有选择性的原因,因为三种ET异构肽主要区别在于它们的N端结构。

6. 受体拮抗剂

最近已报导了几种竞争性的ET受体拮

抗剂。

BQ-123(环CD-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-L-Len-D-Trp),分离链霉菌属misakiensis发酵产物而得的一种肽的衍生物,是较强的ET_A受体选择性的拮抗剂,IC₅₀约为22 nmol/L。有意义的是,此肽和ETC端结构相似。猪离体冠状动脉实验中,BQ-123可拮抗ET-1诱导的血管收缩,PA₂值为7.4。

近期发现体内试验IRL1038[lys¹¹⁻¹⁵-ET-1(11-21)]为ET_B受体专属拮抗剂。

PD142893[Ac-(β-苯基)-D-Phe-Leu-Asp-Ile-Ile-Trp]是ET-1C端衍生的直线型六肽类似物,在兔肾及肺动脉制备中表现为无选择性的竞争性受体拮抗剂,PA₂值分别为5.93和6.31。

最近报导的Ro-462005,口服有效,为一非肽无选择性的拮抗剂,可以用于治疗严重的肾血流不足和脑血栓。

7. ET在血管系统中可能的病理生理作用

很多材料表明,ET参与了血管的许多病理生理过程。

7.1 高血压

血浆ET-1水平与原发性高血压间是否有联系,这一论题仍处于争论状态。然而,有报告表明原发性高血压病人的血浆ET-1水平比正常人高。高血压病人进行血液透析后血浆ET水平高于血压正常的对照组。

并发症方面,用高血压动物模型实验所得结果也有矛盾。据报道,戈德布拉特II型大鼠和自发性高血压大鼠(SHR)血浆ET-1没有升高。但这两型实验大鼠的血管制备却表明对ET-1的敏感性和最大反应能力都有增强。同样,用醋酸脱氧皮质甾酮诱发的高血压大鼠也增强了对ET的反应活性。与Wister-kyote大鼠相比,SHR对ET的高度敏感至少部分取决于动脉已去极化的静息膜

电位。另外几篇文章却认为高血压与正常对照大鼠的主动脉对ET-1敏感性无差异。

另一方面,服用 phosphoramidore 后 SHR 的血压下降,而血压正常的大鼠仍维持正常。相似的,也有报道认为 ET-1 抗体可使 SHR 的血压降至血压正常大鼠的水平。

最重要的报道是两个患恶性血管内皮瘤的病人,他们血浆 ET-1 水平升高并兼有高血压。肿瘤手术切除后,两人血浆 ET-1 水平和血压都恢复到正常。有一人肿瘤复发,又引起血浆 ET-1 和血压的上升。

这些结果表明 ET-1 在维持血压方面起着一定作用。

7.2 肺动脉高压

几篇调查报道由各种心肺疾病引起的肺动脉高压的病人血浆 ET-1 水平升高。

也有报道,原发肺动脉高压大鼠肺部 ET-1 水平和前体 ET-1 mRNA 的表达远高于对照组。这些现象说明 ET-1 在肺动脉高压发生中也有一定作用。Giaid 等曾指出肺动脉高压患者肺内皮 ET-1 分布增多。而且,连续注射 BQ-123 可显著抑制由单响尾蛇毒诱导的大鼠的肺动脉高压。

7.3 缺血性心脏病

心绞痛和心肌梗塞病人经常发生冠脉痉挛。ET 药理特性显示 ET 可能是一种诱导冠脉痉挛的因子。另外,发生血栓和动脉粥样硬化时,受伤的内皮细胞可能释放 ET。

据报道,Langeydorf 大鼠制备缺血时会显著增加心肌膜上 ET 结合位点,从而增加了对 ET 的敏感性。重灌将进一步增加结合位点的分布密度。并且,缺血可促进 ET 合成。这些结果提示,ET 可能参与心肌缺血这一病理过程。

7.4 蛛网膜下出血

ET 在蛛网膜下出血引起的大脑血管长期痉挛中可能有着重要作用。据报道,同样为蛛网膜下出血的实验狗,未经给药的对照

组一周后发生血管痉挛,而服用放线菌素 D 后,可以完全抑制血管痉挛的发生。这一事实表明,mRNA 翻译的某些蛋白与蛛网膜下出血引起的血管痉挛有关。这是否是前体 ET-1 的 mRNA? 虽然脑脊液中 ET-1 水平与血管痉挛无明显联系,但这仍是一个值得注意的问题。

7.5 急性肾衰

ET 在引起病理现象中起重要作用的最有可能的模型是急性肾衰。它对肾有多种作用,如持续增加肾血管阻力,降低肾血流量和肾小球滤过率,减少钠的排泄,增加血浆肾素活性。通常 ET 使入球及出球小动脉阻力均增加。这些作用在急性肾衰中都能观察到,尤其在多种原因(比如中毒、心肌缺血、休克等)引起的急性肾小管坏死中更为明显。

已经知道急性肾衰病人血浆 ET 水平上升,肾两侧动脉梗塞可促进肾实质产生 ET。而且,注射抗 ET 的抗体可减轻肾单位缺血时特征性的血管收缩,保护肾防止发生肾小管坏死。

免疫抑制剂环孢霉素能引起肾毒性。预先用环孢霉素处理的大鼠,肾动脉内给 ET 抗体,可通过调节入球及出球小动脉阻力使单个肾单位肾小球滤过率由下降状态渐渐恢复。

这些结果表明 ET 在急性肾衰进程中起着重要作用。

8. 结论

现有许多证据提示 ET 参与了其他许多病理生理过程,比如哮喘和胃溃疡。

这些现象的病理生理意义还不清楚。较好的是合成了几种 ET 专特性拮抗剂。我们期望它们能帮助我们更好地理解 ET 和各种病理现象之间的关系。很有可能最终药物会对某些疾病取得临床疗效。

[Drugs 1993,46(5):795-804]