

体内一氧化氮和过氧亚硝酸的生成及其生物学效应

周 玫 陈 瑗

(第一军医大学自由基医学研究室, 广州 510515)

摘要 在一氧化氮合酶催化下生成的一氧化氮与超氧阴离子进一步反应可生成过氧亚硝酸,它与一氧化氮一起在体内发挥多种生物学效应,通过对线粒体钙外流去极化的诱导和对线粒体电子传递与呼吸酶的抑制等作用,使线粒体损伤,导致细胞凋亡和死亡。同时一氧化氮具有抗脂质过氧化作用,而这种作用是通过与脂氧基和脂过氧基结合来终止脂质过氧化反应的,以上为动脉粥样硬化疾病的治疗和预防提供了新的思路。

关键词 一氧化氮; 过氧亚硝酸阴离子; 线粒体; 抗脂质过氧化

近年来随着一氧化氮(nitric oxide, NO)与超氧阴离子(O₂⁻)反应生成的一种强氧化剂—过氧亚硝酸(peroxynitrous acid, ONOOH)的发现,以及对一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)分子结构与基因表达调控的不断阐明,NO的病理和生理学意义越来越引起科研工作者的关注。本文就NO和ONOOH的生成及其生物学效应有关内容作一综述。

1 一氧化氮合酶

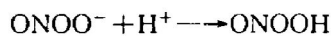
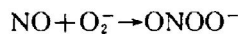
一氧化氮合酶催化L-精氨酸的胍基氮与5电子氧化生成NO和胍氨酸,其中L-羟基精氨酸作为中间体,与酶紧密结合。这两步反应都依赖于Ca²⁺和钙调素,并且可被四氢叶酸增强^[1]。NOS活性能被L-精氨酸类似物L-NMMA(N^G-monoethyl-L-arginine)等抑制,同时应用过量的L-精氨酸又可逆转该抑制作用,这与它们竞争酶的活性中心有关^[1]。

一氧化氮合酶分成两种类型,一种存在于内皮细胞和神经细胞,能不断地表达,称为组成型NOS(constitutive NOS, cNOS),其活性依赖于Ca²⁺和钙调素。另一种存在于巨噬细胞,称为诱导型NOS(inducible NOS, iNOS),其活性不依赖于Ca²⁺和钙调素。iNOS表达主要在基因转录水平上接受调控。现已发现小鼠巨噬细胞iNOS基因的启动子含有结合多种转录因子的顺式作用元件,包括激活蛋白1(Ap-1)和核因子κB

(NF-κB)的作用位点、γ-干扰素(IFN-γ)反应元件(YIRE)、IFN调节因子结合元件(IRFE)和核因子白介素6(NF-IL6)反应元件^[2]。Xia等^[3]最近以神经元cNOS基因转染的人肾细胞为模型,用电子顺磁共振(ESR)技术揭示NOS能同时催化NO和O₂⁻的生成,两者进一步反应生成过氧亚硝酸阴离子(peroxynitrite anion, ONOO⁻),这是因为NOS分子中的还原酶结构域与细胞色素P₄₅₀还原酶结构相似,具有该酶的许多功能特性。O₂⁻的生成需要NOS的激活并受精氨酸含量的调节。

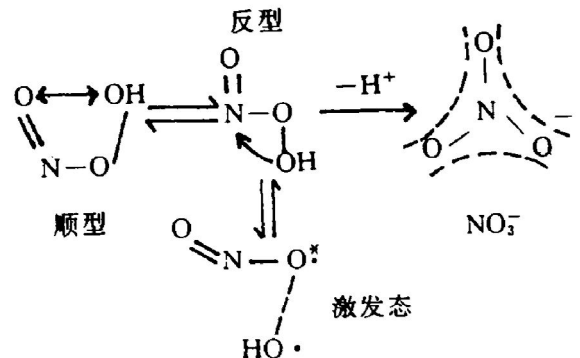
2 过氧亚硝酸的生成

过氧亚硝酸按下式生成:



一氧化氮与O₂⁻间的反应很快,其速率常数为每秒7×10⁹ mol/L,因此NO能有效地与超氧化物歧化酶(SOD,速率常数为每秒2×10⁹ mol/L)竞争与O₂⁻反应^[4]。

一氧化氮扩散至靶细胞或靶细胞器后形成ONOO⁻,ONOO⁻在酸性条件下质子化后生成ONOOH^[5]。ONOOH分子中O-O键通常不会均裂成自由基,以致·OH清除剂在ONOOH对基质的氧化反应中无作用。因此,Beckman等^[6]最近提出激发态ONOOH^{*}的概念,即ONOOH能异构成反型构象,成为更活泼的ONOOH^{*},也能转变为NO₃⁻。ONOOH^{*}与靶分子能发生象·OH和NO₂样反应。



3 一氧化氮和过氧亚硝酸与靶分子的作用

一氧化氮作为铁离子的配体能可逆性地与血红素铁、非血红素铁和铁硫蛋白结合。NO 与鸟苷酸环化酶的血红素铁结合,使其构象发生改变而被激活。NO 与 NOS 的血红素辅基结合是 NO 对 NOS 反馈调节的机理^[1]。此外,NO 更多的是对含血红素铁酶的抑制作用,如对细胞色素氧化酶^[6,7]、NADPH-氧化酶^[8]和细胞色素 P₄₅₀^[6,9,10]有抑制作用。且对含非血红素铁的脂加氧酶以及含铁硫的乌头酸酶、NADH:泛醌氧化还原酶和 NADH:琥珀酸氧化还原酶也有抑制作用^[1,7]。已有报道,NO 能可逆性地改变核黄素辅基位点,抑制黄嘌呤氧化酶活性^[11]。值得提出的是,NO 与血红素铁、非血红素铁和铁硫蛋白的结合需要较高浓度,而体内 NO 浓度较低(<1 μmol/L)^[12]。最近的研究提出细胞中铁硫中心的灭活是由于 ONOOH,而不是 NO^[4,6]。

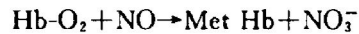
过氧亚硝酸是一种强氧化剂,以氧化硫醇为标准,其氧化能力比 H₂O₂ 大 2 000 倍^[5]。它有多方面的作用,能对靶分子进行单电子或双电子氧化^[4],如通过单电子氧化过程使酚羟基化和脱氧鸟苷(dG)氧化成 8-氧脱氧鸟苷,以及使硫醇 RS⁻转变为硫醇自由基 RS·;RS·与 NO 反应生成亚硝酸硫醇(RSNO)^[4]。有人认为亚硝酸硫醇能使 NO 在体内更稳定和更有效地扩张血管^[5]。也有报道^[13],SOD 能催化 NO 和 NO⁻(nitrosyl anion)间可逆性转变,是体内稳定和保护 NO 活性的另一种形式。

激发态 ONOOH* 在过渡金属离子和包括 SOD 在内的金属中心催化下异裂为 OH⁻和 NO₂⁺,NO₂⁺能使酪氨酸硝基化生成硝基酪氨酸。酪氨酸残基硝基化能影响蛋白的功能,硝基酪氨酸成为 ONOOH 细胞毒的介导分子^[14]。酪氨酸羟化酶是儿茶酚胺合成的限速酶,其分子中的酪氨酸硝基化后使酶失活,可能与帕金森氏病的发生有关^[15]。ONOOH 还易使结构蛋白硝基化,当神经纤维中酪氨酸硝基化后疏水残基变为带阴电的亲水性残基,使这些蛋白分解成长的多聚体结构而失去功能^[6]。用单克隆抗体检测到硝基酪氨酸的存在是组织受到以氮为中心的氧化剂损伤的佐证^[6]。

激发态 ONOOH* 能诱导不饱和脂肪酸的过氧化,与 O₂⁻和 H₂O₂ 不同,其催化作用不需要过渡金属的存在。Hogg 等^[16]用化学合成的 ONOOH 与低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)反应,观察到被处理的 LDL 电泳迁移率增加和维生素 E 含量降低;且能被巨噬细胞清道夫受体识别和吞噬。

一氧化氮有亲脂性,主要分布在细胞含脂的部分,在脂和水中的分配系数为 8 : 1^[12]。它的分子量小,不带

电荷,具有很强的扩散性,在组织中远达 100 μm,1 秒钟内能往返细胞膜数千次,能很快地聚集在一些产生 NO 的局部细胞^[6]。组织细胞内包括 O₂ 等生物分子都不易与 NO 反应,只有含单电子的自由基或过渡金属能很快地与它反应^[6]。但当其进入血管内,能被红细胞氧合血红蛋白分解生成 NO₃⁻:



因此,在体内 NO 通过与氧合血红蛋白和其它大分子反应而恒定地被消除和限制了 NO 聚集,使 SOD 能有效地降低和调节 ONOOH 形成。但 NO 与 O₂⁻ 的反应速率比 SOD 歧化 O₂⁻ 的速率快 3 倍,比 NO 与血红素铁的反应速率快 700 倍,因此 ONOO⁻ 的形成是机体内 NO 反应的主要通路,说明 ONOOH 在许多疾病的病理生理过程中起着重要的作用。

4 一氧化氮和过氧亚硝酸对线粒体的损伤

线粒体是细胞 O₂⁻ 产生的主要部位。在病理情况下,O₂⁻ 产生过量可导致线粒体损伤,过去把这种损伤归结于 O₂⁻ 生成的·OH 和 H₂O₂。近年来随着对体内 NO 自由基特性的研究,有人提出 NO 通过对细胞线粒体呼吸链的抑制而显示细胞毒作用,但现在认为 O₂⁻ 与 NO 反应生成 ONOOH 是造成线粒体损伤的主要原因。

Packer 等^[17]证实线粒体在 NO 存在下产生 O₂⁻,O₂⁻ 和 NO 反应形成 ONOOH,说明线粒体是细胞内 ONOOH 产生的主要场所。氧应激能引发对 cyclosporin A 敏感的线粒体 Ca²⁺ 外流和去极化,引起细胞损伤。同时给以 NO 和 O₂⁻ 可使线粒体受到类似于氧应激一样的损伤;在同样的条件下,单独给以 NO 或 O₂⁻ 不发生上述变化。结果说明,当线粒体 O₂⁻ 生成增加时(如缺血再灌注损伤、神经毒素作用),可与同时存在的 NO 反应生成 ONOOH,诱导对 cyclosporin A 敏感的线粒体 Ca²⁺ 外流和去极化,使线粒体受损,导致细胞凋亡和死亡^[18]。

Cassina 等^[19]研究了 NO 和 ONOOH 对大鼠心脏线粒体电子传递的抑制作用,发现 NO 通过与细胞色素 a₃ 可逆性地结合而轻度地抑制电子传递,对复合物 I 电子传递作用不明显,对复合物 I 电子传递无作用;ONOOH 对复合物 I 和 II 依赖的氧消耗产生强烈的抑制作用,并明显地抑制琥珀酸脱氢酶和 ATP 酶活性,但对复合物 IV 依赖的呼吸和细胞色素 C 氧化酶活性无影响;ONOOH 对线粒体呼吸的抑制谱与 NO 对完整细胞继发性作用所得的抑制谱很相似。因此提出 NO 首先与细胞色素 a₃ 结合,暂时性抑制正常电子流,促进电子流向 O₂ 生成 O₂⁻,O₂⁻ 与扩散到线粒体的 NO 分子反应

生成 ONOOH, 进一步抑制电子流和增加 O_2^- 形成, 不断地增强 ONOOH 依赖的损伤过程。

Poderoso 等^[20]研究了生理浓度 NO 对大鼠心肌线粒体呼吸酶的抑制作用, 提出在生理条件下 NO 抑制电子传递, 导致 O_2^- 生成和 ONOOH 形成, 从而调控着线粒体对氧的摄取。 O_2^- 和 NO 是线粒体功能的生理调节剂, 当它们过量时具有毒性作用^[21]。

5 一氧化氮的抗脂质过氧化作用

Laskev 等^[22]以磷脂酰胆碱脂质体为模型, 以氢过氧基和羟基二十碳四烯酸(HETE)和 isoprostanes 为指标, 观察到不同源的 NO 对 Fe^{2+} 和 ONOOH 诱导的脂质过氧化都有明显的抑制作用。Hayashi 等^[23]也以磷脂酰胆碱脂质体为模型, 但以水溶性或亲脂性偶氮化合物生成的亲水性或亲脂性的过氧基作为脂质过氧化的诱导剂, 发现 NO 能穿入多层细胞膜阻止脂质过氧化和防止膜内维生素 E 的耗损。

一氧化氮不但能抑制 Cu^{2+} 和过氧基诱导的 LDL 氧化^[24, 25], 而且对巨噬细胞诱导的 LDL 氧化也有明显的抑制作用。Jessup 等^[7]研究表明小鼠腹腔巨噬细胞经 IFN- γ 和 LPS 激活后 iNOS 表达增强, 分泌 NO_2^- 增加; 与未激活的细胞相比, 激活的巨噬细胞对 LDL 的氧化作用明显减轻。精氨酸类似物抑制 NO 合成, 使激活的细胞恢复氧化 LDL 的能力, 但对未激活的细胞氧化 LDL 的能力无影响。在无精氨酸的 Ham's F10 培养基中激活的巨噬细胞与未激活的细胞对 LDL 的氧化能力一样, 加入精氨酸后, 激活的巨噬细胞分泌 NO_2^- 增加, LDL 氧化受抑制; NOS 抑制剂 diphenylene iodonium 与精氨酸类似物一样, 抑制 NO 合成, 增强对 LDL 氧化。说明 NO 的合成是激活巨噬细胞对 LDL 氧化受抑制的原因。Bolten 等^[26]对泡沫细胞的研究也支持这一观点。巨噬细胞通过与乙酰化修饰 LDL (Ac-LDL) 和氧化 LDL 温育形成泡沫细胞。细胞经 IFN- γ 和 LPS 刺激后, 与正常巨噬细胞(非负载细胞)相比, 负载 Ac-LDL 细胞分泌 NO 无改变, 负载氧化型 LDL 细胞分泌 NO 减少 68~99%, 与非负载细胞和负载 Ac-LDL 细胞相比, 负载氧化型 LDL 的泡沫细胞对 LDL 细胞氧化修饰作用增加 2 倍; 与未受刺激的非负载细胞和负载 Ac-LDL 细胞相比, 未受刺激的负载氧化型 LDL 细胞对 LDL 也有较大的氧化能力, 且明显地大于受 IFN- γ 和 LPS 刺激的负载氧化型 LDL 细胞。

Rubbo 等^[12]以黄嘌呤氧化酶衍生的 O_2^- 与 NO 反应生成的 ONOOH 诱导磷脂酰胆碱脂质体过氧化为模型, 研究了 NO 和 NO/O_2^- 浓度比对脂质过氧化速率的

影响。结果显示 NO 诱导或抑制脂质过氧化主要取决于 NO/O_2^- 的相对浓度。对 NO 抑制亚麻酸过氧化反应体系进行液相色谱-质谱分析发现, 有脂氢过氧化物的均裂产物脂氧基和脂过氧基的 NO 加成物如 LONO (nitritolinolenate), LOONO (nitrasoperoxolinolenate), LOONO(OOH) (hydroperoxonitrosoperoxolinolenate) 等形成。Rabbo 等^[27]进一步以 15-脂加氧酶诱导亚油酸、亚麻酸、磷脂酰胆碱、极低密度脂蛋白(very LDL, VLDL)和 LDL 过氧化为模型, 也观察到 NO 能明显地抑制 15-脂加氧酶诱导的过氧化作用, 并呈剂量依赖关系。液相色谱-质谱分析也显示有脂氧基和脂过氧基 NO 加成物存在。有报道认为 NO 对脂质过氧化的抑制作用可能与脂质加氧酶受到 NO 抑制或培养基中铁离子与 NO 螯合有关^[7]。但在 NO 抑制黄嘌呤氧化酶诱导的脂质过氧化反应体系中用 ESR 进行检测, 未发现铁或脂质和 NO 的复合物形成, 在脂加氧酶体系中检测不出 NO 与脂加氧酶活性中心反应的铁亚硝基复合物信号^[12]。因此 NO 的抗脂质过氧化作用, 不是通过抑制脂加氧酶诱导的起始反应, 而是通过与脂加氧基和脂过氧基结合终止脂质过氧化扩增反应。NO 是体内产生的强脂质过氧化链式反应阻断剂, 保护维生素 E 免受过氧基介导的氧化^[28]。

参考文献

- 1 Brecht DS, Snyder SH. Nitric oxide: A physiologic messenger molecule. *Ann Rev Biochem*, 1994, **63** : 175~195.
- 2 Sheffler LA, Wink DA, Melillo G, et al. Exogenous nitric oxide regulates IFN- γ plus lipopolysaccharide induced nitric oxide synthase expression in mouse macrophages. *J Immunol*, 1995, **155** : 886~894.
- 3 Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, et al. Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine depleted cells leading to peroxynitrite mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 6 770~774.
- 4 Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with O_2^- . *Am J Physiol*, 1995, **268** : L699~722.
- 5 Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide: looking at the dark. *Chest*, 1994, **105**(Suppl) : 79S~84S.
- 6 Beckman JS, Hoppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: The good, the bad and the ugly. *Am J Physiol*, 1996, **271**(cell physiol 40) : C1 424~437.
- 7 Jessup W, Dean Rt. Autoinhibition of murine macrophage mediated oxidation of low density lipoprotein by nitric oxide synthesis. *Atherosclerosis*, 1993, **101** : 145~155.
- 8 Iha S, Orita K, Kanno T, et al. Oxygen-dependent inhibi-

- tion of neutrophil respiratory burst with nitric oxide. *Free Radic Res*, 1996, **25**(6) : 489~498.
- 9 Gergei D, Misik V, Riesz P, et al. Inhibition of rat and human cytochrome P450 2E1 catalytic activity and reactive oxygen radical formation by nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 1997, **337**(2) : 239~250.
 - 10 Minamiyama Y, Takemura S, Tamimoto Y, et al. Irreversible inhibition of rat liver microsomal cytochrome P450 by nitric oxide. Proceedings of the 5th international meeting on the biology of nitric oxide. *Jpn J Pharmacol*, 1997, **75**(Suppl 1) : 149.
 - 11 Fukahore M, Iohimori K, Ishida H, et al. Nitric oxide reversibly suppresses xanthine oxidase activity. *Free Radic Res*, 1994, **21**(4) : 203~212.
 - 12 Rubbo H, Radi R, Tryjillo M, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation, formation of novel nitrogen containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem*, 1994, **269** : 26 066~075.
 - 13 Sies H, de Groot H. Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol Lett*, 1992, **64/65** : 547~551.
 - 14 Seo HG, Tannenbaum SR. Identification of a stress-inducible protein containing nitrotyrosine in RAW264. 7 cells activated by IFN- γ and LPS. Proceedings of the 5th international meeting on the biology of nitric oxide. *Jpn J Pharmacol*, 1997, **75** (Suppl 1) : 105.
 - 15 Gow A, Malcolm S, Ischiropoulos H. Pathophysiological reactivities of nitric oxide. Proceeding of the 5th international meeting on the biology of nitric oxide. *Jpn J Pharmacol*, 1997, **75**(Suppl 1) : 105.
 - 16 Hogg N, Darley-Usmar VM, Graham A, et al. Peroxynitrite and atherosclerosis. *Biochem Sci Trans*, 1993, **21** : 358~362.
 - 17 Packer MA, Porteous CM, Murphy MP. Superoxide production by mitochondria in the presence of nitric oxide forms peroxynitrite. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, **40**(3) : 527~534.
 - 18 Packer MA, Murphy MP. Peroxynitrite formed by simultaneous nitric oxide and superoxide generation causes Cyclosporin A sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarisation. *Eur J Biochem*, 1995, **234**(1) : 231~239.
 - 19 Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*, 1996, **328**(2) : 309~316.
 - 20 Poderoso JJ, Carreros MC, Lisdero C, et al. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondria particles. *Arch Biochem Biophys*, 1996, **328**(1) : 85~92.
 - 21 Richter C, Gogvadze V, Laffranchi R, et al. Oxidants in mitochondria: From physiology to disease. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1 271**(1) : 67~74.
 - 22 Laskev RE, Matchews WR. Nitric oxide inhibits peroxynitrite induced production of hydroxyeicosatetraenoic acids and F₂-isoprotane in phosphatidylcholine liposomes. *Arch Biochem Biophys*, 1996, **330**(1) : 193~198.
 - 23 Hayashi K, Noguchi N, Niki E. Action of nitric oxide as an antioxidant against oxidation of soybean phosphatidylcholine liposome membranes. *FEBS Lett*, 1995, **370**(1~2) : 37~40.
 - 24 Hogg N, Struck A, Goss SPA, et al. Inhibition of macrophage-dependent low density lipoprotein oxidation by nitric oxide donors. *J Lipid Res*, 1995, **36** : 1 756~762.
 - 25 Maggi MF, Cristol JP, Guerin MC, et al. Protection of oxidation of LDL by nitric oxide: implication in atherosclerosis. *CR Seances Soc Biol Fil*, 1995, **189**(3) : 375~387.
 - 26 Bolton EJ, Jessup W, Stanley KK, et al. Enhanced LDL oxidation by murine macrophage foam cells and their failure to secrete nitric oxide. *Atherosclerosis*, 1994, **106** : 213~223.
 - 27 Rubbo H, Parthasarathy S, Barnes S, et al. Nitric oxide inhibition of lipoxygenase-dependent liposome and low density lipoprotein oxidation; termination of radical chain propagation reaction and formation of nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *Arch Biochem Biophys*, 1995, **324**(1) : 15~25.
 - 28 Rabbo H. Nitric oxide and α -tocopherol mediate inhibition of lipoperoxidation; termination of propagation reactions and recovery of α -tocopherol. Proceedings of the 5th international meeting on the biology of nitric oxide. *Jpn J Pharmacol*, 1997, **75**(Suppl 1) : 122.

(1997-12-20 收到, 1998-04-30 修回)