

血红素蛋白的亚硝酸盐还原酶功能及其生物学意义

林英武^{1,2}

(南华大学 1. 化学化工学院, 2. 衡阳医学院蛋白质结构与功能实验室, 湖南省衡阳市 421001)

[专家简介] 林英武, 博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事金属蛋白化学生物学研究。湖南省 121 人才第三层次人选。曾在美国伊利诺伊大学香槟分校从事博士后研究、日本奈良先端科学技术大学从事 JSPS 访问学者研究。主持国家自然科学基金面上项目、青年项目和湖南省自然科学基金项目等 4 项。已在《Nature》《PNAS》《JACS》《Angew Chem》《ACS Catal》《Chem Commun》《Coord Chem Rev》和《中国科学: 化学》等国内外知名刊物发表 SCI 论文 120 余篇, 其中第一作者或通信作者 70 余篇。

[关键词] 血红素蛋白; 亚硝酸盐还原酶; 生物催化; 一氧化氮; 心血管系统

[摘要] 血红素蛋白在生物体系中执行重要的生物功能。在缺氧状态下, 一系列血红素蛋白, 如血红蛋白(Hb)、肌红蛋白(Mb)、细胞色素 C(CytC)、神经红蛋白(Ngb)和胞红蛋白(Cgb)等, 表现出不同的亚硝酸盐还原酶(NIR)活性, 催化 NO_2^- 还原成 NO, 这与生物体在常氧状态下由 L-精氨酸氧化产生 NO 的通路形成互补。研究表明: 蛋白质构象、血红素的配位状态、分子内二硫键以及氢键网络等, 可以调控其 NIR 催化活性, 同时受生物体内微环境的影响, 如 NO_2^- 浓度和 pH 等。文章对不同血红素蛋白的 NIR 催化活性进行了分析比较, 探讨了其生物学意义, 特别是 NO_3^- - NO_2^- -NO 通路在调节心血管系统内稳态平衡中的重要作用。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A



Nitrite reductase activities of heme proteins and their biological significances

LIN Yingwu^{1,2}

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, 2. Laboratory of Protein Structure and Function, Hengyang Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] heme protein; nitric reductase; biocatalysis; nitric oxide; cardiovascular system

[ABSTRACT] Heme proteins play vital roles in biological systems. In hypoxia conditions, a series of heme proteins, such as hemoglobin (Hb), myoglobin (Mb), cytochrome C (CytC), neuroglobin (Ngb) and cytoglobin (Cgb), exhibit nitrite reductase (NIR) activities, by catalyzing the reduction of NO_2^- to NO, which is complementary to the pathway of NO generation via the oxidation of L-Arg in normoxia conditions. It showed that the protein conformation, the heme coordination state, intramolecular disulfide bond, and H-bond network may regulate the NIR activity, which was also affected by microenvironment, such as the concentration of NO_2^- and pH values. This review compared the NIR activities of different heme proteins and discussed their biological significances, especially for the important role of the nitrate-nitrite-nitric oxide (NO_3^- - NO_2^- -NO) pathway in mediating the homeostasis of cardiovascular system.

金属蛋白(metalloproteins)几乎占到所有蛋白质总量的一半, 在生物体系中执行重要的生物功能^[1]。血红素蛋白(heme proteins)是金属蛋白中备受关注的一大类含有血红素辅基(heme)的蛋白质分子, 其生物功能包括氧分子贮存和运输如血红蛋白(hemoglobin, Hb)和肌红蛋白(myoglobin, Mb)、电

子传递如细胞色素 C(cytochrome C, CytC)和细胞色素 B5(CytB5)、生物催化如细胞色素 P450(CYP450)和小分子生物传感如 CO 传感器(CooA)等^[2]。在有关血红素蛋白结构与功能研究中, 存在一些备受国内外研究者关注的问题。例如, 相同的血红素如何被不同的血红素蛋白所利用, 执行不同的生物功能? 不同

的血红素蛋白如何利用血红素,执行相同的生物功能?同一种血红素蛋白如何在不同生理条件下执行不同的生物功能等^[3-5]?

自然界中的氮循环对于维持生命活动至关重要。去硝化(denitrification)是一系列细菌在厌氧条件下完成呼吸链的一种方式,其过程包括四步五电子还原反应:硝酸根(NO_3^-)→亚硝酸根(NO_2^-)→一氧化氮(NO)→一氧化二氮(N_2O)→氮气(N_2)。其每一步还原反应被一种金属蛋白酶所催化,分别为硝酸盐还原酶(nitrate reductase, NAR)、亚硝酸盐还原酶(nitrite reductase, NIR)、一氧化氮还原酶(nitric oxide reductase, NOR)和一氧化二氮还原酶(nitrous oxide reductase, N_2OR)^[6-7]。

作为一种重要的生物信号分子,NO 在神经生物学、免疫缺陷以及在调节心血管内稳态平衡中发挥至关重要的作用^[8]。在心血管系统中,内皮型一氧化氮合酶(endothelial NO synthase, eNOS)会通过氧化 L-精氨酸产生 NO。然而,在缺氧状态(hypoxia)下,eNOS 的功能丧失,取而代之的是一系列血红素蛋白分子,包括 Hb、Mb、CytC、神经红蛋白(neuroglobin, Ngb)和胞红蛋白(cytoglobin, Cgb)等^[9-12],均表现出一定的 NIR 催化功能,在生物体系中发挥着不可忽视的作用。因此,本文重点分析比较不同血红素蛋白的 NIR 催化活性,特别是其结构与功能之间的关系,以及在生物学尤其在心血管系统中的意义,从而为心血管系统相关疾病的发生发展及治疗提供一些分子水平的重要信息。

1 亚硝酸盐还原酶功能

亚硝酸盐还原酶(NIR)催化 NO_2^- 转变成 NO,完成氮元素由液态向气态的转变。在不同细菌中,根据辅基的不同,NIR 分为血红素型亚硝酸盐还原酶(cd1)和铜型亚硝酸盐还原酶(Cu-NIR)^[13]。以绿脓杆菌 NIR 为例,蛋白肽链包含 543 个氨基酸残基,由一个血红素 c(电子传递中心)和一个血红素 d1(催化中心)构成,形成同源二聚体^[14]。众多的血红素蛋白除执行其正常的生理功能外,在缺氧状态下不同程度表现出 NIR 催化活性。最初在 2005 年,美国 Gladwin 教授团队研究发现,氧载体 Hb 在氧合(Oxy)到脱氧(Deoxy)状态转变时(即 R-到 T-状态),表现出 NIR 催化功能,催化 NO_2^- 还原,生成 NO^[15]。其还原速率受 Hb 四聚体 R-和 T-状态的调控,同时也受温度的调控(表 1)^[16]。2006 年,Castello 等^[17]研究发现,细胞色素 C 氧化酶(CytC

oxidase, CCO)也表现出 pH 依赖的 NO_2^- 还原性能,这一蛋白具有血红素-铜双金属中心。2007 年,Shiva 等^[18]发现脱氧 Mb 具有 NIR 催化活性,能产生 NO 并调节线粒体呼吸作用。随后 2008 年,Hendgen-Cotta 等^[19]通过 Mb 基因敲除小鼠研究发现,Mb 直接参与催化 NO_2^- 还原至 NO,以及心肌细胞中血红素蛋白铁的亚硝基化。所生成的 NO 自由基会抑制细胞的呼吸作用,限制活性氧(reactive oxygen species, ROS)物质的产生,从而减少心脏缺血再灌注所造成的氧化损伤,可以防止约 60% 心肌梗死发生。同年,Basu 等^[20]研究表明,线粒体电子载体 CytC 能够有效催化 NO_2^- 还原至 NO,其催化活性受血红素中心铁的配位状态调控,特别是当 CytC 与脂质体相互作用后,血红素中心铁变成五配位状态,表现出较高的催化活性。进一步研究发现,当心磷脂(cardiolipin)与 CytC 形成复合物后,可使 CytC 的催化活性提高约 35 倍(表 1),从而说明脂细胞膜中脂质体类物质的调控作用^[12]。

表 1. 文献报告的血红素蛋白及其催化亚硝酸盐还原的二级反应速率比较

Table 1. Comparison of bimolecular rate constants of nitrite reduction catalyzed by different heme proteins from the literature

血红素蛋白	NO_2^- 反应速率/ [mol/(L·s)]	温度/ ℃	参考文献
Hb(T-state)	0.12	25	Huang 等 ^[15]
Hb(T-state)	0.2	37	Gladwin 等 ^[16]
Hb(R-state)	6	25	Huang 等 ^[15]
Hb(R-state)	12	37	Gladwin 等 ^[16]
马心 CytC	0.073±0.007	20	Ascenzi 等 ^[12]
心磷脂-CytC复合物	2.6±0.3	20	Ascenzi 等 ^[12]
马心 Mb	5.5	25	Yi 等 ^[21]
马心 H64V Mb	0.35	25	Yi 等 ^[21]
抹香鲸 Mb	5.6±0.6	25	Wu 等 ^[22]
抹香鲸 I29H Mb	0.1±0.1	25	Wu 等 ^[22]
抹香鲸 F43H/H64A Mb	49.8±1.5	25	Wu 等 ^[22]
抹香鲸 V21C/V66C Mb	13.7±0.5	25	Yin 等 ^[23]
Ngb(S-S)	0.12±0.02	25	Tiso 等 ^[11]
Ngb(S-H)	0.062±0.005	25	Tiso 等 ^[11]
Cgb(S-S)	32.2±0.9	25	Reeder 等 ^[24]
Cgb(S-H)	0.63±0.05	25	Reeder 等 ^[24]
人源 sGC	0.42±0.02	25	Pan 等 ^[25]
人源 CBS	0.66±0.03	37	Carballal 等 ^[26]
人源 IDO1	5.4±0.2	23	Lim 等 ^[27]

为了探究血红素活性结构对 NIR 催化活性的调控作用,2009 年 Richter-Addo 教授团队研究了 Mb 血红素中心远端 His64 在催化功能中的作用(图 1A)^[21]。结果表明,His64 能够通过氢键作用调控 NO₂⁻ 与血红素中心铁的结合方式(O-结合模式),若将 His64 突变成 Val64,NO₂⁻ 会以 N-结合模式,还原速率下降至野生型(Wild-type, WT)Mb 蛋白的 1/16(表 1)。2016 年,我们通过血红素中心的重新设计,可以正调节或负调节 Mb 的 NIR 催化活性。例如,在血红素中心内部引入第 2 个组氨酸(His29),后者与 His64 一起形成更稳定的水分子氢键网络,可以使 Mb 的催化活性降低约 56 倍(表 1);若用丙氨酸替换 His64,同时引入远端 His43 后,突变体蛋白 F43H/H64A Mb 会形成水分子通道,其 NIR 催化活性约是 WT Mb 的 9 倍(图 1B、表 1)^[22]。由此可见,我们可以通过氢键网络设计人工调控血红素蛋白的 NIR 催化功能。

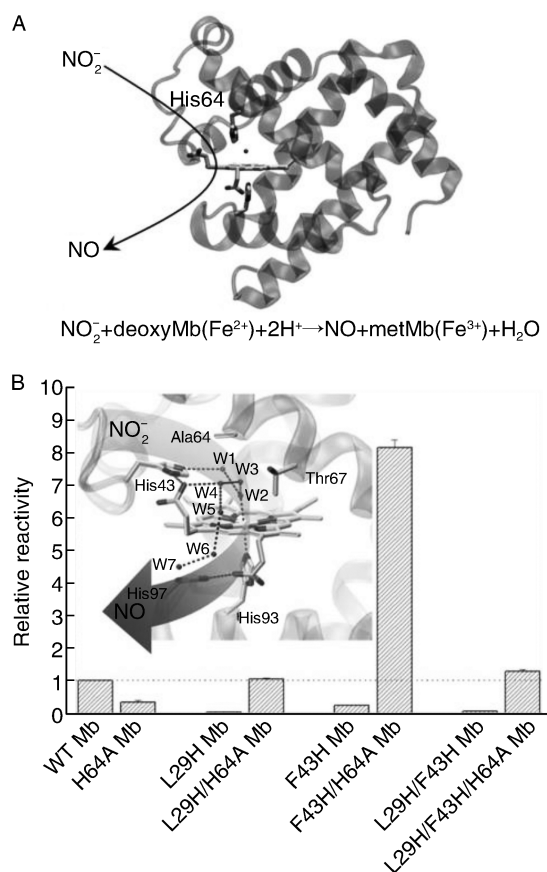


图 1. 肌红蛋白(Mb)亚硝酸盐还原酶催化功能 A 为肌红蛋白晶体结构及其催化亚硝酸盐还原至一氧化氮活性示意图;B 为肌红蛋白突变体催化亚硝酸盐还原相对活性的比较,B 中插图 F43H/H64A Mb 的晶体结构,显示其血红素活性中心氢键网络^[22]。

Figure 1. Nitrite reductase activity of myoglobin

美国伊利诺伊大学 Lu 教授团队曾利用 Mb 构建了金属 Cu 和 Fe 结合位点,成功设计出 CCO 和 NOR 分子模型^[28-29]。在此基础上,本课题组研究了 Cu 中心对 Mb 的 NIR 催化活性影响,结果发现,Cu²⁺的结合可以提高其催化初始速率至少 3 倍以上,这也为天然酶 CCO 表现出 NIR 催化功能提供了重要的信息^[30]。此外,我们基于 Mb 蛋白框架,还设计了双催化中心,即保持血红素中心不变,在远离血红素中心处构建了 Cu²⁺结合位点(R118H Mb 和 R118M Mb)。研究发现,原有的血红素 Fe²⁺中心和新构建的 Cu²⁺中心同样具有 NIR 催化活性,从而实现了同一蛋白分子具有不同金属的双催化中心^[31]。

与 Hb 和 Mb 一样,Ngb 和 Cgb 也属于血红素球蛋白(Globins)家族中的成员,具有类似的三维空间结构。然而不同的是,Ngb 和 Cgb 均具有双组氨酸配位的血红素中心结构,而且蛋白中具有一个分子内二硫键,分别为 Cys46-Cys55 和 Cys38-Cys83^[32-33]。研究发现,Ngb 和 Cgb 分子内二硫键的氧化还原状态能够调控血红素中心的配位结构,进而调控其 NIR 催化活性。例如,Ngb 分子中二硫键形成后可将 NIR 催化活性提高约 2 倍^[11];而 Ngb 分子中二硫键形成后可将 NIR 催化活性提高约 50 倍^[24]。需要指出的是,Cgb 形成分子内二硫键的晶体结构目前仍没有文献报道。最近,我们通过 Mb 分子中构建出类似 Cgb 中的分子内二硫键,并通过晶体结构进行了证实^[23]。研究表明,突变体蛋白 V21C/V66C Mb 形成分子内二硫键后,其 NIR 催化活性约是 WT Mb 的 2.4 倍(表 1),进一步证实了分子内二硫键的调控作用。

除此之外,一些其他不同功能的血红素蛋白也被陆续报道具有 NIR 催化活性。例如,2013 年复旦大学谭相石教授团队和我们课题组合作,第一次研究证实:人源可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC)作为 NO 传感器,同时还具有 NIR 催化功能(表 1),从而揭示了这一重要血红素蛋白的双重生物学功能^[25]。2016 年,Carballal 等^[26]研究发现,人源胱硫脒 β-合成酶(cystathionine β-synthase, CBS),一种体内催化产生 H₂S 气体以及参与硫代氨基酸代谢的生物酶,也表现出 NIR 催化活性(表 1)。最近,Lim 等^[27]研究发现,人源吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-Dioxygenase 1, IDO-1)在常氧状态下,催化氧化 L-Trp 氧化;而在乏氧状态下,表现出 NIR 催化功能,其活性与 Mb 类似(表 1)。

2 亚硝酸盐还原酶生物学意义

正如引言中提及, NO 作为生物信号分子在生物体中发挥重要的作用。在乏氧状态下, 生物体内传统的由 eNOS 催化氧化 L-Arg 产生 NO 的通路受到抑制, 此时 NO 主要来源于 NO_2^- 的还原(图 2)。不同血红素蛋白具有不同的催化活性(表 1), 而且其催化速率还受组织中 NO_2^- 的浓度以及 pH 的影响(图 1A)。因此, 不同血红素蛋白对体内 NO 的生成贡献不同。Kim-Shapiro 等^[9]曾对一些血红素蛋白在体内催化 NO_2^- 生成 NO 的速率进行了估计。例如, Hb 在 50% O_2 、0.01 mol/L 血红素、100 nmol/L NO_2^- 、pH 6.5 时, 生成 NO 的速率估计是 8 nmol/(L·s)。而当血清中 NO_2^- 增高时(例如口服甜菜果汁时会摄入高浓度 NO_3^- , 后者在口腔中微生物 NAR 酶作用下生成 NO_2^- , 图 2, 右上), NO 的生成速率可高达 80 nmol/(L·s)。当心脏组织在 1% 乏氧状态下, 约

30% Mb 将处于脱氧状态, 此时 NO 的生成速率约为 10 nmol/(L·s), 同样相当可观。

需要指出的是, 在红细胞中产生的 NO 会很快被氧合态 Hb 所捕获, 生成氧化态 Hb 和硝酸根离子($\text{NO} + \text{O}_2\text{-HbFe}^{2+} \rightarrow \text{HbFe}^{3+} + \text{NO}_3^-$, 图 2, 左)。由于 NO 存在的时间极短(1 μs), 其迁移的距离会小于 0.1 μm , 因此红细胞内所产生的 NO 只有少数能逃离出细胞; 另一种途径可能是生成其他类型的分子如 N_2O_3 后逃离红细胞, 从而执行 NO 的生物学功能(图 2, 左), 例如可以抑制血小板的活化等^[34]。与血红细胞中的 Hb 不同, 心肌细胞中 Mb 的浓度约为 300 $\mu\text{mol/L}$, 其产生的 NO 存在的时间能长达 70 μs , 其迁移的距离估计为 0.3 μm , 在平滑肌细胞中迁移的距离将更长。因此, 由 Mb 催化产生的 NO 可以调节线粒体呼吸作用、心脏功能、缺血再灌注过程中的细胞保护作用, 以及系统性缺氧所致血管舒张等^[18-19, 35]。

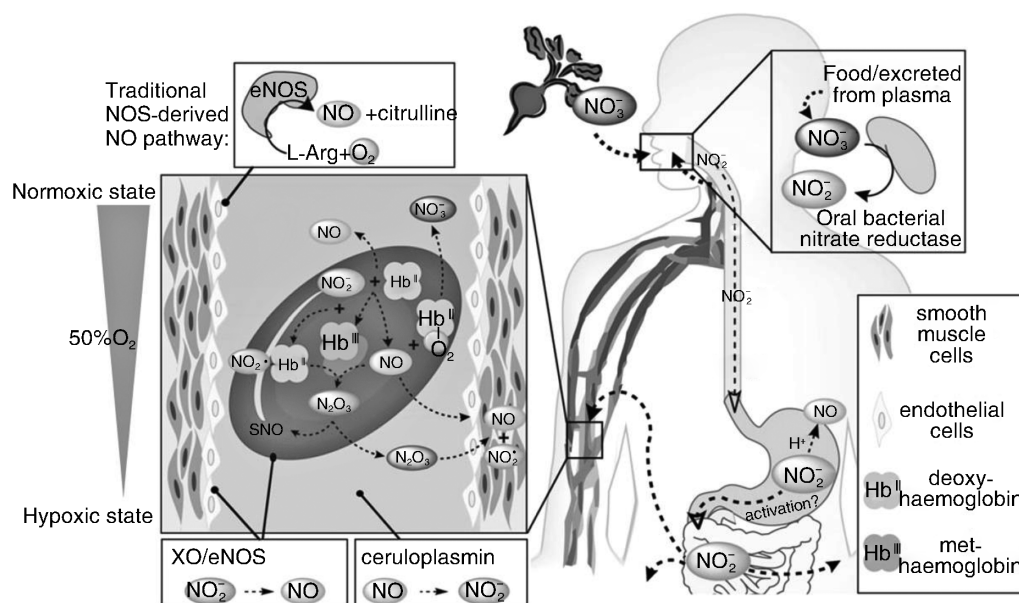


图 2. 硝酸盐-亚硝酸盐-一氧化氮通路及心血管系统中一氧化氮化学生物学简化示意图^[8]

Figure 2. The nitrate-nitrite-NO pathway and simplified nitrite chemical biology in the vasculature^[8]

相对于 Hb 和 Mb 而言, Ngb 和 Cgb 的 NIR 催化功能的生物学意义研究较少。Ngb 主要分布于大脑细胞(约为 1 $\mu\text{mol/L}$)和视网膜细胞(可达 100 $\mu\text{mol/L}$), 根据其催化速率可估算出 NO 的生成速率分别为 0.005 nmol/(L·s) 和 0.5 nmol/(L·s)^[9]。与 Ngb 类似, 在生理相关的乏氧或酸中毒条件下, Cgb 催化生成 NO 的速率估计约为 0.35 nmol/(L·s)^[36]。然而, Ngb 和 Cgb 的 NIR 催化活性受分子内二硫键

的调控(表 1), 尤其是对于 Cgb 直到 2018 年才得到阐明^[24]。因此, 有关 Cgb 催化生成 NO 的速率很可能被低估, 其生物学功能还值得深入研究。

作为线粒体电子载体的 CytC, 虽然其血红素中心 Fe 通常处于六配位状态, 很多因素会使其配位状态发生改变, 如轴向 Met80 的氧化、酪氨酸的硝基化以及与线粒体内膜的磷脂相互作用等, 从而产生过氧化物酶(peroxidase)和 NIR 催化活性等^[37]。例

如, Basu 等^[20] 计算显示, CytC 催化 NO_2^- 还原至 NO 的速率可达 $14 \text{ nmol}/(\text{L} \cdot \text{s})$ 。而作为 CytC 的生物氧化还原伴侣蛋白 CCO, 其 NIR 催化活性相对较低, 在组织缺氧时催化 NO 的生成速率为 $1.5 \text{ nmol}/(\text{L} \cdot \text{s})$, 约为 CytC 的十分之一^[38]。

特别需要强调的是, 人源 sGC 和 CBS 的 NIR 催化活性具有重要的生物学意义。由于在通常状态下这两种蛋白分别作为信号分子 NO 和 H_2S 气体的传感器, 而且在乏氧状态下表现出 NIR 催化活性, 必然参与维持 NO 和 H_2S 的生理水平及其信号通路。此外, 心血管内皮细胞和红细胞表面的黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO) 和 eNOS, 均可在乏氧和高酸值条件下催化 NO_2^- 还原生成 NO, 而血清中的铜蓝蛋白(ceruloplasmin) 则可氧化 NO 生成 NO_2^- (图 2, 左下), 从而维持心血管系统中氮物种的内稳态平衡。

3 结论与展望

综上所述, 目前已经证实一系列血红素蛋白在乏氧状态下均具有一定的 NIR 催化活性, 其催化活性受一系列因素的调控, 如蛋白的构象、血红素的配位状态、分子内二硫键以及氢键网络等。同时, 受生物体内细胞微环境的影响, 如局部 NO_2^- 的浓度和 pH 等, 血红素蛋白可表现出不同的 NO 生成速率, 最快可达 $80 \text{ nmol}/(\text{L} \cdot \text{s})$, 甚至更快。因此, 这些速率可提供足够的 NO 并影响其信号通路。与常氧状态下由 L-Arg 氧化产生 NO 的通路形成互补, 在乏氧状态下由一系列血红素蛋白催化 NO_2^- 还原生成 NO, 使得 NO_3^- - NO_2^- -NO 通路至关重要(图 2)。在动物模型研究中也得到证实, 例如 NO_3^- 对于缺血再灌注损伤以及其他心血管疾病具有一定的保护作用^[39]。此外, 人的饮食中适当补充 NO_3^- 也会有助于心血管健康^[40], 进一步说明该通路具有重要的生理学和病理学意义。而且重要的是, 可以通过蛋白质分子设计, 人为调控其血红素蛋白的 NIR 催化活性(图 1B 和表 1), 从而使得人工干预该通路成为可能。因此, 可以预见, 通过人工干预体内 NO_3^- - NO_2^- -NO 通路, 调控生物体内氮物种的内稳态平衡, 将会有助于心血管系统循环, 促进人类健康。

[参考文献]

- [1] Lu Y, Yeung N, Sieracki N, et al. Design of functional metalloproteins[J]. *Nature*, 2009, 460(7257): 855-862.
- [2] Lin YW, Wang JY. Structure and function of heme proteins

in non-native states: a mini-review[J]. *J Inorg Biochem*, 2013, 129: 162-171.

- [3] Lin YW, Sawyer EB, Wang JY. Rational heme protein design: all roads lead to rome[J]. *Chem Asian J*, 2013, 8(11): 2534-2544.
- [4] Lin YW. Rational design of metalloenzymes: From single to multiple active sites[J]. *Coord Chem Rev*, 2017, 336: 1-27.
- [5] Zhang P, Yuan H, Xu J, et al. A catalytic binding site together with a distal Tyr in myoglobin affords catalytic efficiencies similar to natural peroxidases[J]. *ACS Catal*, 2020, 10: 891-896.
- [6] Zumft WG. Cell biology and molecular basis of denitrification[J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, 61(4): 533-616.
- [7] Albertsson I, Sjöholm J, Ter BJ, et al. Functional interactions between nitrite reductase and nitric oxide reductase from *Paracoccus denitrificans*[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17234.
- [8] Demartino AW, Kim-Shapiro DB, Patel RP, et al. Nitrite and nitrate chemical biology and signalling[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176(2): 228-245.
- [9] Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. Mechanisms of nitrite bioactivation[J]. *Nitric Oxide*, 2014, 38: 58-68.
- [10] Basu S, Grubina R, Huang J, et al. Catalytic generation of N_2O_3 by the concerted nitrite reductase and anhydrase activity of hemoglobin[J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3(12): 785-794.
- [11] Tiso M, Tejero J, Basu S, et al. Human neuroglobin functions as a redox-regulated nitrite reductase[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 18277-18289.
- [12] Ascenzi P, Marino M, Polticelli F, et al. Cardiolipin modulates allosterically the nitrite reductase activity of horse heart cytochrome c[J]. *J Biol Inorg Chem*, 2014, 19(7): 1195-1201.
- [13] Rinaldo S, Giardina G, Castiglione N, et al. The catalytic mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* cd1 nitrite reductase[J]. *Biochem Soc Trans*, 2011, 39(1): 195-200.
- [14] Nurizzo D, Silvestrini MC, Mathieu M, et al. N-terminal arm exchange is observed in the 2.15 Å crystal structure of oxidized nitrite reductase from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *Structure*, 1997, 5(9): 1157-1171.
- [15] Huang Z, Shiva S, Kim-Shapiro DB, et al. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control[J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(8): 2099-2107.
- [16] Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. The functional nitrite reductase activity of the heme-globins[J]. *Blood*, 2008, 112(7): 2636-2647.

- [17] Castello PR, David PS, McClure T, et al. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions; Implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes[J]. *Cell Metab*, 2006, 3(4): 277-287.
- [18] Shiva S, Huang Z, Grubina R, et al. Deoxymyoglobin is a nitrite reductase that generates nitric oxide and regulates mitochondrial respiration[J]. *Circ Res*, 2007, 100(5): 654-661.
- [19] Hendgen-Cotta UB, Merx MW, Shiva S, et al. Nitrite reductase activity of myoglobin regulates respiration and cellular viability in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(29): 10256-10261.
- [20] Basu S, Azarova N, Font MD, et al. Nitrite reductase activity of cytochrome c[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(47): 32590-32597.
- [21] Yi J, Heinecke J, Tan H, et al. The distal pocket histidine residue in horse heart myoglobin directs the O-binding mode of nitrite to the heme iron[J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131(50): 18119-18128.
- [22] Wu LB, Yuan H, Gao SQ, et al. Regulating the nitrite reductase activity of myoglobin by redesigning the heme active center[J]. *Nitric Oxide*, 2016, 57: 21-29.
- [23] Yin LL, Yuan H, Du KJ, et al. Regulation of both the structure and function by a de novo designed disulfide bond: a case study of heme proteins in myoglobin[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2018, 54(34): 4356-4359.
- [24] Reeder BJ, Ukeri J. Strong modulation of nitrite reductase activity of cytoglobin by disulfide bond oxidation: Implications for nitric oxide homeostasis[J]. *Nitric Oxide*, 2018, 72: 16-23.
- [25] Pan J, Xu Q, Lin YW, et al. Human soluble guanylate cyclase as a nitric oxide sensor for NO-signalling reveals a novel function of nitrite reductase[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2013, 49(67): 7454-7456.
- [26] Carballal S, Cuevasanta E, Yadav PK, et al. Kinetics of nitrite reduction and peroxynitrite formation by ferrous Heme in human cystathionine β -Synthase[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(15): 8004-8013.
- [27] Lim YJ, Foo TC, Yeung A, et al. Human indoleamine 2, 3-Dioxygenase 1 is an efficient mammalian nitrite reductase[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(7): 974-986.
- [28] Sigman JA, Kwok BC, Lu Y. From myoglobin to heme-copper oxidase: Design and engineering of a CuB center into sperm whale myoglobin[J]. *J Am Chem Soc*, 2000, 122: 8192-8196.
- [29] Yeung N, Lin YW, Gao YG, et al. Rational design of a structural and functional nitric oxide reductase[J]. *Nature*, 462(7276): 1079-1082.
- [30] Sun MH, Li W, Liu JH, et al. Structural and nitrite reductase activity comparisons of myoglobins with one to three distal histidines[J]. *RSC Advances*, 2013, 3: 9337.
- [31] Shu XG, Su JH, Du KJ, et al. Rational design of dual active sites in a single protein scaffold: a case study of heme protein in myoglobin[J]. *Chemistry Open*, 2016, 5(3): 192-196.
- [32] Guimarães BG, Hamdane D, Lechauve C, et al. The crystal structure of wild-type human brain neuroglobin reveals flexibility of the disulfide bond that regulates oxygen affinity[J]. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70(Pt4): 1005-1014.
- [33] Sugimoto H, Makino M, Sawai H, et al. Structural basis of human cytoglobin for ligand binding[J]. *J Mol Biol*, 2004, 339(4): 873-885.
- [34] Srihirun S, Sriwantana T, Unchern S, et al. Platelet inhibition by nitrite is dependent on erythrocytes and deoxygenation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(1): e30380.
- [35] Totzeck M, Hendgen-Cotta UB, Luedike P, et al. Nitrite regulates hypoxic vasodilation via myoglobin-dependent nitric oxide generation[J]. *Circulation*, 2012, 126(3): 325-334.
- [36] Li H, Hemann C, Abdelghany TM, et al. Characterization of the mechanism and magnitude of cytoglobin-mediated nitrite reduction and nitric oxide generation under anaerobic conditions[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(43): 36623-36633.
- [37] Lin YW. Structure and function of heme proteins regulated by diverse post-translational modifications[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 641: 1-30.
- [38] Castello PR, Woo DK, Ball K, et al. Oxygen-regulated isoforms of cytochrome c oxidase have differential effects on its nitric oxide production and on hypoxic signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(24): 8203-8208.
- [39] Mills CE, Khatri J, Maskell P, et al. It is rocket science-why dietary nitrate is hard to 'beet'! Part II: further mechanisms and therapeutic potential of the nitrate-nitrite-NO pathway[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2017, 83(1): 140-151.
- [40] Kapil V, Weitzberg E, Lundberg JO, et al. Clinical evidence demonstrating the utility of inorganic nitrate in cardiovascular health[J]. *Nitric Oxide*, 2014, 38: 45-57.
- (此文编辑 朱雯霞)