

蛋白质硝基化修饰在组织纤维化中的作用

薛可¹, 陈帅¹, 王英², 王雯^{1,3}

(1. 首都医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 北京市 100069; 2. 中国航天科工集团七三一医院, 北京市 100074; 3. 代谢紊乱相关心血管疾病北京市重点实验室, 北京市 100069)

[专家简介] 王雯, 教授, 博士研究生导师, 2004年毕业于中国协和医科大学, 获得理学博士学位。2007—2008年在美国纽约州立大学布法罗分校做访问学者。现任代谢紊乱相关心血管疾病北京市重点实验室副主任, 首都医科大学基础医学院生理学与病理生理学系副主任, 中国病理生理学会动脉硬化专业委员会委员, 北京生理学会理事。主持国家自然科学基金项目5项, 北京市自然科学基金重点项目1项、面上项目2项及多项省部级基金项目, 以通信作者在 *Cardiovascular Research*、*Free Radical Biology & Medicine* 及 *Atherosclerosis* 等期刊上发表学术论文60余篇。2008年获得教育部霍英东教育基金会第十一届高等院校青年教师奖, 2012年入选北京市属高等学校青年拔尖人才培养计划。



[关键词] 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 硝基化; 纤维化

[摘要] 应激是指机体在感受到各种因素的强烈刺激时, 为满足其对应需求, 内环境稳态发生的适应性变化与重建。氧化应激是活性氧(ROS)作为主要效应物参与的应激反应, 通过氧化作用参与组织与细胞的适应及修复反应, ROS在该过程中可以作为细胞信号转导的第二信使。参与氧化应激的自由基包括ROS和活性氮(RNS)。而有RNS参与的应激反应也可称为硝化应激, 其具体表现为一氧化氮合酶(NOS)表达增加, 一氧化氮(NO)生成增加, 最终使RNS水平升高, 而RNS的升高可使蛋白质发生硝基化修饰。应激表现为细胞的适应性反应以及组织的修复。纤维性修复是应激反应后期组织不完全修复的一种, 是含有永久细胞的组织的主要修复方式, 也是炎症反应后期组织对外界刺激的适应性反应, 表现为组织或器官的纤维化。本文就近期国内外关于蛋白质硝基化修饰在组织纤维化中的作用的研究进展进行综述。

[中图分类号] R363;R5

[文献标识码] A

The role of protein nitration modification in tissue fibrosis

XUE Ke¹, CHEN Shuai¹, WANG Ying², WANG Wen^{1,3}

(1. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. China Aerospace Science and Industry Corporation 731 Hospital, Beijing 100074, China; 3. Beijing Key Laboratory of Cardiovascular Diseases Related to Metabolic Disorders, Beijing 100069, China)

[KEY WORDS] nitric oxide; nitric oxide synthase; nitration; fibrosis

[ABSTRACT] Stress refers to the adaptive changes and reconstruction of the homeostasis of the body in order to meet the corresponding needs when the body feels the strong stimulation of various factors. Oxidative stress is a stress response involving reactive oxygen species (ROS) as the main effector. Through oxidation, it participates in the adaptation and repair response of tissues and cells. ROS can be used as the second messenger of cell signal transduction in this process. Free radicals involved in oxidative stress include ROS and reactive nitrogen species (RNS). The stress response involving RNS can also be called nitrate stress, which is specifically manifested as increased expression of nitric oxide synthase (NOS), and increased expression of nitric oxide (NO), which ultimately leads to activity nitrogen levels increase, and the increase in reactive nitrogen can nitrate proteins. Stress is manifested as the adaptive response of cells and the repair of tissues. Fibrotic repair is a kind of incomplete repair of tissues in the late stage of stress response. It is the main repair

[收稿日期] 2021-03-30

[修回日期] 2021-04-28

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(91839107)

[作者简介] 薛可, 博士研究生, 研究方向为纤维化与心血管疾病, E-mail 为 kex190637@163.com。通信作者王雯, 教授, 博士研究生导师, 主要从事衰老相关心血管疾病研究, E-mail 为 wangwen@ccmu.edu.cn。

method of tissues containing permanent cells. It is also the adaptive response of tissues to external stimuli in the late stage of inflammatory response, which is manifested as fibrosis of tissues or organs. This review summarized the recent progress on the relationship between protein nitration and fibrosis.

蛋白质翻译后修饰 (protein post-translational modification, PTM) 是调节蛋白质功能、增加蛋白质功能多样性的重要方式。PTM 主要包括磷酸化、糖基化、泛素化、硝基化、亚硝基化、甲基化、乙酰化、脂质化等。自 20 世纪 90 年代初以来,蛋白质硝基化被确立为一种氧化型翻译后修饰,并从生物化学和生物医学的角度得到了广泛研究。多种疾病的发生和发展可以概括成一系列炎症反应过程,例如动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 为渗出性炎症,慢性肝炎为增生性炎症。活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 是炎症反应的产物,而蛋白质硝基化的发生主要依靠 RNS 实现。随着研究进展,在不同的疾病动物模型和人类生理和病理条件下,被鉴定出的可以发生硝基化的蛋白数量不断增加。蛋白质硝基化主要发生在酪氨酸等芳香族氨基酸残基。蛋白质硝基化过程大致为一氧化氮自由基 ($\cdot\text{NO}$) 经过一系列电子传递后生成二氧化氮自由基 ($\cdot\text{NO}_2$), $\cdot\text{NO}_2$ 取代酚环第三位的氢进而使氨基酸发生硝基化修饰。 $\cdot\text{NO}$ 的生成是蛋白质发生硝基化的必要前提,而一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是 $\cdot\text{NO}$ 的主要来源。本文对 NO 的产生、功能、蛋白质硝基化的具体过程及其与相应疾病的关系进行了详细介绍。

1 NO 的产生

NO 是 $\cdot\text{NO}$ 的主要来源,主要通过一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 非依赖性和依赖性两种途径产生。NOS 是促进氨基酸代谢的主要酶类之一,能够催化精氨酸至瓜氨酸的代谢反应。其催化反应底物为精氨酸、氧气 (O_2)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH), 产物为瓜氨酸、NO 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP^+), 在此过程中,NO 的生成依赖 O_2 。实验证明,血管紧张素 II (angiotensin II, AngII) 长时间或短时间刺激均能够促进 NO 的生成增加^[1], 但只有长时间 Ang II 刺激才能够促进 NOS 增加^[2], 提示存在不依赖 NOS 的 NO 生成方式。

1.1 非 NOS 依赖途径

非 NOS 依赖生成 NO 途径中,在黄嘌呤氧化酶

或具有亚硝酸盐或硝酸盐还原酶活性的蛋白质存在的条件下,硝酸盐 (NO_3^-) 和亚硝酸盐 (NO_2^-) 可以直接还原为 NO^[3]。研究初期实验证明,在早期灌注前和灌注期间短暂暴露于近红外线可保护心肌不发生梗死^[4], 提示存在一种光敏性物质能够促进血管扩张。随着研究的进展,这种物质的产物被定义为内皮源性舒张因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF), 随后,EDRF 被证明是 NO。而 NO 在当时被认为主要由 NOS 催化而来。在接下来的实验中,研究者证明,在缺氧条件下,近红外线的的心脏保护作用能够被 NO 抑制剂完全逆转却只能被 NOS 抑制剂部分逆转^[5-6], 提示在缺氧条件下,NO 的产生不依赖 NOS。随后研究人员发现,在缺氧条件下产生的大部分 NO 来自于体内多种具有亚硝酸盐还原酶活性的生物化学物质,包括血红蛋白、肌红蛋白、珠蛋白、细胞色素 C 等^[7]。这些蛋白中,具有光敏性蛋白细胞色素 C,在近红外线照射后,NO 释放,NO 结合鸟苷酸的位点,具有促进血管舒张作用,证明光暴露下的由 NO 引起的血管舒张不受 NOS 影响^[8]。而珠蛋白在缺氧条件下能够还原硝酸盐至 NO 依赖其亚硝酸盐酶的可还原性^[9]。

1.2 NOS 依赖途径

NOS 为体内合成 NO 的主要酶类,属加氧酶类。一般认为, NOS 是一种二聚体,但这种二聚体没有催化活性;因此,严格来说,具有活性的 NOS 通常为四聚体,包括两个 NOS 和两个钙调蛋白^[10]。辅酶包括四氢生物蝶呤、血红素黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD)、黄素单核苷酸 (flavin mononucleotide, FMN) 等,催化 O_2 、NADPH 以及精氨酸合成 NO、瓜氨酸和 NADP^+ 。NOS 具有三种异构体,分别为神经元型一氧化氮合酶 (neuronal nitric oxide synthase, nNOS)、诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 和内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS), 这三种异构体基因序列具有 51% ~ 57% 的同源性。一般认为 nNOS 和 eNOS 具有钙依赖性,但 iNOS 没有钙依赖性。① nNOS, 即 NOS1, 在神经元组织中首次被发现;② iNOS, 即 NOS2, 普遍表达在各种细胞和组织中。值得注意的是,在心肌细胞中, NOS2 的作用可能为钙依赖性^[11];③ eNOS, 即 NOS3, 在血管内皮细胞中被首次发现,生理情况下

能够维持血管的紧张度及抑制血小板聚集;与其他的 NOS 不同,它可以定位于细胞膜^[12]。三种 NOS 中以 NOS2 的催化活性最强。热休克蛋白(heat shock protein, HSP)、陷窝蛋白(caveolin)、动力蛋白(dynamin)能够对 NOS 活性进行调节。NOS 与 caveolin 耦联后被激活,发挥作用,因此 caveolin 可以作为调节 NOS 活性的重要物质。

在 NOS 诱导的 NO 产生中,有学者认为 NOS 的直接产物并不是 NO,而是 RNS,包括硝酰基阴离子(NO^-)、过氧亚硝基阴离子(ONOO^-)、亚硝基硫醇(s-nitrosothiol, SNO)及其相应质子化产物。尽管在 NOS 作用后的细胞中检测到 NO,但在产物中也检测到超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), SOD 能够将含氮的活性物质催化为 NO,因此认为 NO 是 RNS 经 SOD 催化后的二级产物^[13]。同样持此观点的还有 Schmidt 等^[14],他们认为只有在加入 SOD 后由 NOS 催化而来的 RNS 才能形成 NO。

2 NO 的功能

根据其不同的存在形式 NO 的作用大致可分为两种。作为气体,NO 能够通过扩散的形式进入细胞,或与细胞表面受体结合进而调节细胞功能。NO 的另一种存在形式为 $\cdot\text{NO}$,在一系列电子传递过程中转变为 $\cdot\text{NO}_2$,最终使蛋白质发生硝基化进而影响蛋白质的功能。

作为气体形式存在的 NO 对血管的调节分为血管依赖性和非血管依赖性两种。血管依赖性即为 NO 舒张血管、调节血管张力、影响血栓形成、促进血管内皮细胞和平滑肌细胞增殖以及促进血管细胞间连接^[15]。在大小动脉中,Ang II 能够通过促进 NOS3 的合成进而促进 NO 的分泌。而 NO 能够通过负反馈的作用减弱 Ang II 引起的血管收缩^[16]。在 Ang II 诱导的成纤维细胞增殖的效应中,NO 也能够对抗这种作用^[17]。NO 的非血管依赖性作用体现在其对兴奋-收缩耦联以及突触后神经递质传导的调节。NO 对兴奋收缩耦联的调节表现为其对肌浆网 Ca^{2+} 通道的影响^[18-19],对突触后神经递质传导的调节作用体现为 NO 本身可以作为神经递质参与神经信号的转导^[20]。因此,NO 具体发挥的作用还依赖其浓度, NOS 以及不同的细胞类型。

NO 的另一种存在形式为 $\cdot\text{NO}$,是蛋白质发生硝基化时 $\cdot\text{NO}_2$ 的主要供体,整个过程有赖于超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)的参与,其作用为提供电子,

从而使 $\cdot\text{NO}$ 通过一系列电子传递过程形成 $\cdot\text{NO}_2$ ^[21-22],进而使蛋白质发生硝基化。

3 硝基化

蛋白质的硝基化主要发生在酪氨酸(tyrosine, Tyr)等芳香族氨基酸残基。蛋白质硝基化可以引起蛋白质结构和功能的变化,表现为蛋白原有功能的丧失或者获得新的功能^[23]。硝基化的具体效应取决于其修饰的蛋白^[24-25],因此,需对硝基化进行更加深入地研究以明确其在不同病理生理学过程中的作用和意义。蛋白质酪氨酸残基的硝基化反应是由酚环上 3 号位置的硝基取代一个氢,生成 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT)。蛋白质酪氨酸硝基化是一种自由基介导的途径,需要两种自由基,一种是酪氨酸自由基($\cdot\text{Tyr}$),另一种为 NO_2^- 。在 CO_3^- 、 NO_2^- 、氧化基自由基($\text{LOO}\cdot$)和烷氧基自由基($\text{LO}\cdot$)的作用下,酪氨酸苯环 2 号位脱氢形成 $\cdot\text{Tyr}$ ^[26]。而 NO_2^- 的形成则依赖 NO 的一系列电子传递过程。蛋白质的硝基化具有高度选择性。通常,只有 1/10 000 ~ 6/10 000 的酪氨酸残基能够发生硝基化。能够发生硝基化的蛋白质多为含有大量酪氨酸的蛋白质、线粒体与细胞骨架蛋白^[27]、靠近产生活性氧和氮的位点的蛋白质。但是酪氨酸数量与硝基化与否并无较强相关性。随着计算机技术的发展,通过建模、序列分析等方式以及先进的算法能够预测,与非硝基化酪氨酸相比,硝基化的酪氨酸定位于含有 α -螺旋结构(特别是赖氨酸和谷氨酸)的周围。在空间结构中,环状结构的酪氨酸更容易被硝基化,而在线性结构中的不易被硝基化。与带正电荷的氨基酸相比,带负电荷的更容易被硝基化^[28-29]。

蛋白质的硝基化主要通过 ONOO^- 依赖和非 ONOO^- 依赖两种途径,其差别在于 $\cdot\text{NO}$ 转化为 $\cdot\text{NO}_2$ 的过程中是否依赖 ONOO^- 。

3.1 ONOO^- 依赖途径

过氧亚硝基是 ONOO^- 和过氧亚硝酸(ONOOH)的总称,但在一般情况下,过氧亚硝基也指代 ONOO^- 。由氧化 $\cdot\text{NO}$ 和 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 合成。 ONOO^- 依赖的蛋白质硝基化大致可以概括为:在精氨酸代谢成为瓜氨酸的过程中生成的 $\cdot\text{NO}$ 与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 形成 ONOO^- , ONOO^- 转化为 $\cdot\text{NO}_2$,随后使酪氨酸硝基化(图 1)。在 ONOO^- 依赖途径中, $\cdot\text{Tyr}$ 有两种命运,其中一种是在 ONOO^- 存在的条件下, NO_2^- 与 $\cdot\text{Tyr}$ 直接反应

生成 3-NT; 另一种是在 NO^- 和 $\text{O}_2^{\cdot -}$ 诱导下形成 3-NT, 而 NO^- 的形成需要 ONOO^- 的参与^[30]。

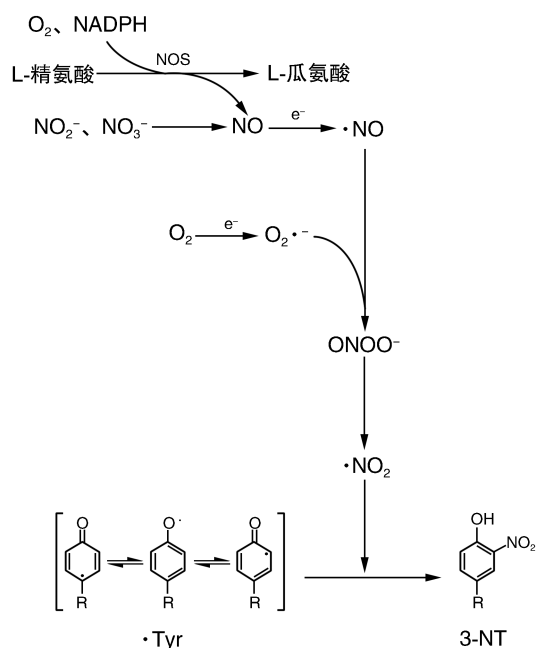


图 1. ONOO^- 依赖途径

Figure 1. ONOO^- -dependent pathway

3.2 非 ONOO^- 依赖途径

另外一条通路为酶依赖性, 关键酶为髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO), 在 NO^- 和过氧化氢 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 存在的情况形成硝酰氯 (nitryl chloride, NO_2Cl) 和 NO_2^- , 进而促进酪氨酸硝基化^[31-32] (图 2)。这种方式主要为炎症反应阶段发生在中性粒细胞中的蛋白质硝基化^[33]。细胞色素 C 是一种生物过程中的电子传递体, 通过非 ONOO^- 依赖的方式发生硝基化^[34]。同样通过 MPO 途径发生硝基化的蛋白质还有含血红素的蛋白质。

除了上述酪氨酸硝基化的主要途径外, 科学家发现 $\cdot\text{NO}$ 也能够直接使酪氨酸残基发生硝基化, $\cdot\text{NO}$ 直接取代苯环第三位氢后发生两次电子传递, 最终形成 3-NT^[35]。此外, 红细胞内的氧合血红蛋白 (oxyhemoglobin, HbO_2) 和其他蛋白的硝基化机制也与上述机制不同。它能够通过 NO_2^- 与酪氨酸残基的直接作用进而使酪氨酸残基发生硝基化。一百多年前, 人们就已经知道 NO_2^- 很容易通过复杂的自催化过程将 HbO_2 氧化为高铁血红蛋白 (hemoglobin, metHb), 产生各种各样的活性中间体, 如 $\cdot\text{NO}_2$ 、 H_2O_2 和氧铁酞 (oxo-ferryl) 等。这些物质可以介导 HbO_2 和其他几种红细胞蛋白酪氨酸残基的

氧化和硝基化。考虑到正常的人类血浆低浓度微摩尔的 NO_2^- , 而红细胞平均寿命是 120 天, 通过这样的方式产生的硝基化酪氨酸含量极低, 但其可能代表了另一个导致酪氨酸残基硝基化的重要途径^[36]。

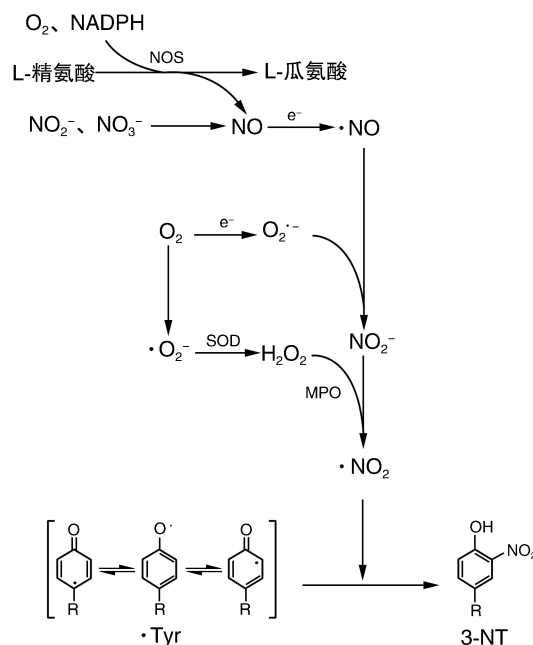


图 2. 非 ONOO^- 依赖途径

Figure 2. ONOO^- -independent pathway

4 硝基化与磷酸化的关系

纤维化是一种疾病终末期器官及组织的病理表现, 特征为胶原蛋白的异常分泌与沉积, 而在调节胶原分泌的信号通路中, 大部分通路依靠蛋白激酶使信号通路中的蛋白磷酸化从而激活通路而引起胶原蛋白分泌增多。同时, 纤维化也是一种慢性炎症, 在该过程中 $\cdot\text{NO}$ 增多, 发生硝基化的蛋白质增多, 那么在纤维化中, 发生磷酸化的蛋白是否会发生硝基化, 以及发生了硝基化的蛋白功能是否受影响, 即蛋白质的磷酸化与硝基化之间的关系如何? 目前认为, 酪氨酸残基的硝基化作用阻碍了特定酪氨酸激酶的磷酸化, 理论依据为针对 Tyr 和硝基酪氨酸 (nitrotyrosine, $\text{NO}_2\text{-Tyr}$) 的物理化学结构分析^[33]。但在在体水平和细胞水平还尚未明确。有研究表明, 硝基化对于磷酸化的影响取决于 ONOO^- 的浓度, 但随后的研究发现, 血红蛋白 SRC 家族中不存在浓度依赖性现象^[37-38]。根据结构和功能的不同, 大部分蛋白质或肽链能够被分为多个结构域, 这些结构域承担不同的生物学功能, 例如蛋白-

蛋白间的结合、蛋白-核酸间结合以及蛋白活性中心的暴露等,因此推测,硝基化与磷酸化之间的相互作用可能还依赖其磷酸化以及硝基化位点所在的蛋白结构域。

5 硝基化与纤维化疾病的关系

纤维性修复是不完全修复的一种,表现为组织或器官的纤维化。上文中提到,在不同细胞中,由 NOS 催化生成的以及由 NO_2^- 或 NO_3^- 还原而来的 NO 转化为 $\cdot\text{NO}$ 后,通过一系列电子传递过程使蛋白质发生硝基化进而调节多种生物学功能。在不同的纤维化疾病中,均发现 3-NT 水平升高,提示 NO、NOS 可能通过影响蛋白质的硝基化过程而发挥相应的作用。在实际应用中,由于技术的限制,无法对 RNS 水平进行直接检测,但根据硝化应激时的电子传递过程以及最终效应,3-NT 水平的升高能够体现蛋白质已经发生硝基化。

5.1 衰老

在一项利用 FBN 大鼠衰老心室组织的研究中,研究者利用质谱的方式分析了衰老后蛋白的变化情况。结果显示,随着年龄的增加,蛋白的表达差异为渐进性,但 24 月龄鼠蛋白质硝基化水平突然升高^[39]。24 月龄鼠为老年鼠,各器官组织功能明显下降,尤其以心脏功能下降最为明显,但硝基化水平的突然升高与机体功能下降是否存在直接关系还有待进一步研究。

5.2 炎症性肺疾病

呼出气体检测作为一种无创性的检测手段,被广泛应用于临床。慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)作为一种常见的炎症性肺疾病,具体表现为在长期刺激下气道上皮细胞出现慢性炎症反应,肺泡损伤,肺间质纤维化。研究证明,呼出气体检测中 NO 的增多可能与气道上皮中 NOS2 激活有关。在 COPD 加重期,嗜酸性粒细胞中 NOS2 升高,提示蛋白质的硝基化在慢性缺氧过程中可能发挥重要作用;另外,在肺特异性纤维化中,中性粒细胞和巨噬细胞中 NOS2 表达升高;在结核病中,肺泡巨噬细胞中 NOS2 表达升高^[40-41]。提示在炎症性肺疾病中 NOS2 表达的改变可能通过影响蛋白质硝基化进而影响纤维化的进展。

5.3 心肌纤维化相关疾病

研究证明,在多种非缺血性心脏病的心肌组织中,均检测到了 3-NT 的升高,包括糖尿病性心脏病、

肺动脉高压等^[42-43]。人类和动物研究均表明,由 ROS 和 RNS 分别介导的氧化应激和硝化应激是影响糖尿病心脏重构和功能异常的因素。糖尿病引起的心肌重构包括心肌纤维化、心肌肥大以及不同程度的心肌细胞坏死。除了检测到 3-NT 升高外,研究发现,在糖尿病性心脏病中,硝基化肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶 2 (sarco endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA2) 与心肌纤维化呈正相关,而 SERCA2 的上调能够减轻非缺血性心脏病引起的纤维化。SERCA2 是一种定位于心肌肌浆网的 Ca^{2+} -ATP 酶,能够促进肌浆网钙离子内流^[44]。金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种能够抑制蛋白质硝基化的化合物。在一些实验中,加入 MT 之后能够改变 3-NT 的表达情况以及纤维化指标的表达情况^[45-46],提示蛋白质的硝基化能够影响糖尿病引起的心肌纤维化过程。在糖尿病引起的视网膜病变中,硝基化抑制剂可用于延缓糖尿病视网膜病变和微血管并发症的辅助治疗^[47]。因此,运用基于蛋白质硝基化的理论进行治疗还需进一步深入研究。肺动脉高压是一种肺动脉压持续、缓慢升高的疾病,由于血管阻力增加,回流至右心房的血液无法通过右心室进入肺循环,其最终结局表现为右心室扩张,右心室纤维化。研究人员在尸检的肺标本中检测到 3-NT 升高^[48],提示在肺动脉高压中,硝化应激水平增高,蛋白质发生硝基化。肺动脉高压为慢性缺氧过程,其作用加强了由内皮细胞提供的 NOS3 与 caveolin 的解耦联,从而使蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 活性下降。研究证明,PKG 能够抑制心力衰竭的过程^[49]。在肺动脉高压中,NOS3 表达升高,NO 含量增多,随后 NO_2^- 升高, NO_2^- 能够促进蛋白质发生硝基化,因此推测,是 PKG 的硝基化使其活性下降,最终效应表现为心力衰竭。

缺血性心脏病主要包括冠状动脉粥样硬化、心绞痛、心肌梗死等,而这些过程可以概括为机体在受到缺血缺氧刺激后的一系列炎症反应,而炎症反应往往伴随 3-NT 的升高。但还未有研究证明在这些疾病中是否有 3-NT 水平的升高以及疾病相关蛋白的硝基化。

5.4 肝纤维化

肝组织具有较强的自我修复能力。在急性肝损伤中,坏死的肝细胞能够通过完全再生的方式进行修复,而在病毒性肝炎、酒精肝、脂肪肝、自身免疫性疾病等疾病中,由于刺激因子长期存在,使肝脏出现纤维化。在多种慢性刺激因子包括四氯化

碳、果糖等诱导的肝纤维化疾病模型中,3-NT水平升高^[50-51],同时,在慢性肝硬化患者的肝脏组织中3-NT水平也出现了升高^[52],提示蛋白质硝基化的发生。肝脏是重要的内分泌器官,能够分泌凝血因子、前列腺素以及促红细胞生成素等细胞因子;同时,肝脏也是重要的代谢器官,能够灭活雌激素、醛固酮、抗利尿激素并代谢同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy),因此3-NT的升高与肝脏的内分泌以及代谢功能相关,还是与肝脏本身纤维化相关亦或是与二者都相关还有待进一步研究。

6 小结与展望

综上,在机体受内在及外在刺激后,能够通过NOS依赖或非依赖的方式生成NO,这其中,一部分NO通过与相应受体结合进而影响血管功能,而另一部分NO在O₂^{·-}的存在下通过一系列级联电子传导后使蛋白质发生硝基化进而通过PTM的方式影响机体的生理与病理功能。硝基化是蛋白质翻译后修饰的一种,不同功能的蛋白在硝基化后的效应也不同,但总体来说,硝基化修饰后蛋白质原有功能通常被抑制。蛋白质的硝基化受多种因素影响,而在不同疾病的不同时期,这些因素都会发生变化,因而也不能通过简单的硝化应激水平升高进而判断硝基化与纤维化的关系。纤维化是疾病终末期组织修复的主要表现,能够维持组织的形态以及在一定程度上维持器官功能。在组织纤维化的过程中,一些影响纤维化过程的蛋白质发生硝基化,而其对纤维化的具体影响依赖于发生硝基化的蛋白在纤维化中的作用。在众多研究中,蛋白质硝基化通常都体现为3-NT的升高或利用放射性同位素标记过的N原子的硝基化酪氨酸增多。但这只能反映疾病情况下特定器官或组织硝化应激水平的升高,而不能在分子水平明确发生硝基化的具体蛋白质。总之,参与纤维化的蛋白质在发生硝基化之后,其功能是否改变并最终影响纤维化的过程还有待进一步的研究加以阐明。

[参考文献]

- [1] DENG X, WELCH W J, WILCOX C S. Role of nitric oxide in short-term and prolonged effects of angiotensin II on renal hemodynamics[J]. *Hypertension*, 1996, 27(5): 1173-1179.
- [2] MORENO C, LÓPEZ A, LLINÁS M T, et al. Changes in NOS activity and protein expression during acute and prolonged Ang II administration[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2002, 282(1): R31-R37.
- [3] SABADASHKA M, NAGALIEVSKA M, SYBIRNA N. Tyrosine nitration as a key event of signal transduction that regulates functional state of the cell[J]. *Cell Biol Int*, 2021, 45(3): 481-497.
- [4] KESZLER A, BRANDAL G, BAUMGARDT S, et al. Far red/near infrared light-induced protection against cardiac ischemia and reperfusion injury remains intact under diabetic conditions and is independent of nitric oxide synthase[J]. *Front Physiol*, 2014, 5(5): 305.
- [5] ZHANG R, MIO Y, PRATT P F, et al. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2009, 46(1): 4-14.
- [6] PLASS C A, LOEW H G, PODESSER B K, et al. Light-induced vasodilation of coronary arteries and its possible clinical implication [J]. *Ann Thorac Surg*, 2012, 93(4): 1181-1186.
- [7] 林英武. 血红素蛋白的亚硝酸盐还原酶功能及其生物学意义 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(12): 1020-1025.
- [8] BATH A S, GUPTA V. Cardio-light: nitric oxide uncaged[J]. *Lasers Med Sci*, 2019, 34(2): 405-409.
- [9] LI H, HEMANN C, ABDELGHANY T M, 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.
- [10] ALDERTON W K, COOPER C E, KNOWLES R G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition [J]. *Biochem J*, 2001, 357(3): 593-615.
- [11] ISENOVIĆ E, LAPOINTE M C. Role of Ca²⁺-independent phospholipase A2 in the regulation of inducible nitric oxide synthase in cardiac myocytes[J]. *Hypertension*, 2000, 35(1 Pt 2): 249-254.
- [12] YEH D C, DUNCAN J A, YAMASHITA S, et al. Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca²⁺-calmodulin [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(46): 33148-33154.
- [13] MURPHY M E, SIES H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991, 88(23): 10860-10864.
- [14] SCHMIDT H H, HOFMANN H, SCHINDLER U, et al. No . NO from NO synthase[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(25): 14492-14497.
- [15] 姜志胜. 气体信号分子心血管效应的基础与转化研究应加快推进[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(6): 541-542.
- [16] HENNINGTON B S, ZHANG H, MILLER M T, et al. Angiotensin II stimulates synthesis of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Hypertension*, 1998, 31(1 Pt 2): 283-288.
- [17] RIZVI M, MYERS P R. Nitric oxide modulates basal and endothelin-induced coronary artery vascular smooth muscle cell proliferation and collagen levels [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1997, 29(7): 1779-1789.
- [18] HARE J M. Nitric oxide and excitation-contraction coupling[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(7): 719-729.
- [19] TAMBASCIA R C, FONSECA P M, CORAT P D, et al. Expression and distribution of NOS1 and NOS3 in the myocardium of angiotensin II-infused rats[J]. *Hypertension*, 2001, 37(6): 1423-1428.
- [20] JAFFREY S R, SNYDER S H. Nitric oxide: a neural messenger [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995, 11(11): 417-440.

- [21] STROES E, HIJMERING M, VAN ZANDVOORT M, et al. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase[J]. *FEBS Lett*, 1998, 438(3): 161-164.
- [22] XIA Y, ROMAN L J, MASTERS B S, et al. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(35): 22635-22639.
- [23] PIEPER G M, KHANNA A K, KAMPALATH B N, et al. Inhibition of nitrosylation, nitration, lymphocyte proliferation, and gene expression in acute and delayed cardiac allograft rejection by an orally active dithiocarbamate[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, 43(4): 522-530.
- [24] YANG S, XU W, DONG Z, et al. TPEN prevents rapid pacing-induced Calcium overload and nitration stress in HL-1 myocytes[J]. *Cardiovasc Ther*, 2015, 33(4): 200-208.
- [25] SOUZA J M, PELUFFO G, RADI R. Protein tyrosine nitration--functional alteration or just a biomarker[J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45(4): 357-366.
- [26] RADI R. Protein tyrosine nitration: biochemical mechanisms and structural basis of functional effects[J]. *Acc Chem Res*, 2013, 46(2): 550-559.
- [27] CASTRO L, DEMICHELI V, TÓRTORA V, et al. Mitochondrial protein tyrosine nitration[J]. *Free Radic Res*, 2011, 45(1): 37-52.
- [28] LIU Z, CAO J, MA Q, et al. GPS-YNO₂: computational prediction of tyrosine nitration sites in proteins[J]. *Mol Biosyst*, 2011, 7(4): 1197-1204.
- [29] FERRER-SUETA G, CAMPOLO N, TRUJILLO M, et al. Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration[J]. *Chem Rev*, 2018, 118(3): 1338-1408.
- [30] RADI R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(12): 4003-4008.
- [31] BALINT B, KHARITONOV S, HANAZAWA T, et al. Increased nitrotyrosine in exhaled breath condensate in cystic fibrosis[J]. *Eur Respir J*, 2001, 17(6): 1201-1207.
- [32] EISERICH J P, HRISTOVA M, CROSS C E, et al. Formation of nitric oxide-derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils[J]. *Nature*, 1998, 391(6665): 393-397.
- [33] BARTESAGHI S, RADI R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration[J]. *Redox Biol*, 2018, 14(14): 618-625.
- [34] CASTRO L, EISERICH J P, SWEENEY S, et al. Cytochrome C: a catalyst and target of nitrite-hydrogen peroxide-dependent protein nitration[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2004, 421(1): 99-107.
- [35] STURGEON B E, GLOVER R E, CHEN Y R, et al. Tyrosine iminoxyl radical formation from tyrosyl radical/nitric oxide and nitrosotyrosine[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(49): 45516-45521.
- [36] SCHWARZ A, MODUN D, HEUSSER K, et al. Stable-isotope dilution GC-MS approach for nitrite quantification in human whole blood, erythrocytes, and plasma using pentafluorobenzyl bromide derivatization; nitrite distribution in human blood[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(17/18): 1485-1495.
- [37] DI STASI A M, MALLOZZI C, MACCHIA G, et al. Peroxynitrite induces tyrosine nitration and modulates tyrosine phosphorylation of synaptic proteins[J]. *J Neurochem*, 1999, 73(2): 727-735.
- [38] MACMILLAN-CROW L A, GREENDORFER J S, VICKERS S M, et al. Tyrosine nitration of c-SRC tyrosine kinase in human pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 377(2): 350-356.
- [39] RICHARDSON M R, LAI X, MASON S B, et al. Differential protein expression during aging in ventricular myocardium of Fischer 344 x Brown Norway hybrid rats[J]. *Exp Gerontol*, 2008, 43(10): 909-918.
- [40] KHARITONOV S, BARNES P J. Biomarkers of some pulmonary diseases in exhaled breath[J]. *Biomarkers*, 2002, 7(1): 1-32.
- [41] KHARITONOV S, BARNES P J. Exhaled markers of inflammation[J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2001, 1(3): 217-224.
- [42] RAJESH M, MUKHOPADHYAY P, BÁT KAI S, et al. Cannabidiol attenuates cardiac dysfunction, oxidative stress, fibrosis, and inflammatory and cell death signaling pathways in diabetic cardiomyopathy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 56(25): 2115-2125.
- [43] RAJESH M, BÁT KAI S, KECHRID M, et al. Cannabinoid 1 receptor promotes cardiac dysfunction, oxidative stress, inflammation, and fibrosis in diabetic cardiomyopathy[J]. *Diabetes*, 2012, 61(3): 716-727.
- [44] LIANG Q, WANG B, PANG L, et al. Application of citrate as a tricarboxylic acid (TCA) cycle intermediate, prevents diabetic-induced heart damages in mice[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2016, 19(1): 43-48.
- [45] CAI L, WANG Y E, ZHOU G H, et al. Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2006, 48(8): 1688-1697.
- [46] BOWERS R, COOL C, MURPHY R C, et al. Oxidative stress in severe pulmonary hypertension[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 169(6): 764-769.
- [47] ELSHAER S L, LEMTALS I T, EL-REMESSY A B. High Glucose-Mediated tyrosine nitration of PI3-Kinase: a molecular switch of survival and apoptosis in endothelial cells[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2018, 7(4): 47.
- [48] CRUZ J A, BAUER E M, RODRIGUEZ A, et al. Chronic hypoxia induces right heart failure in caveolin-1^{-/-} mice[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2012, 302(12): H2518-H2527.
- [49] TOYA T, ITO K, KAGAMI K, et al. Impact of oxidative post-translational modifications of SERCA2 on heart failure exacerbation in young patients with non-ischemic cardiomyopathy: a pilot study[J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2020, 26: 100437.
- [50] MUKHOPADHYAY P, RAJESH M, CAO Z, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 is a key mediator of liver inflammation and fibrosis[J]. *Hepatology*, 2014, 59(5): 1998-2009.
- [51] CHO Y E, KIM D K, SEO W, et al. Fructose promotes leaky gut, endotoxemia, and liver fibrosis through Ethanol-Inducible cytochrome P450-2E1-Mediated oxidative and nitrate stress [J]. *Hepatology*, 2019. DOI: 10.1002/hep.30652.
- [52] ANNIE-JEYACHRISTY S, GEETHA A, SURENDRAN R, et al. Level of nitrated proteins in the plasma, platelets and liver of patients with liver cirrhosis[J]. *Redox Rep*, 2009, 14(6): 259-266.