

- 12 Zhao B-L, Li X-J, Xin W-J. ESR studies on active oxygen radicals produced in the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Biol Inten Report*, 1989;**13**:529
- 13 Zweier J L, Flaherty J T, Weisfeldt M L. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987;**84**:1404
- 14 赵保路, 忻文娟, 杨卫东等. 用电子自旋共振直接检测兔心肌梗死再灌注产生的活性氧自由基. 科学通报, 1989; **34**:780
- 15 Westenberger U, Thanner S, Ruf H H *et al*. Formation of free radicals and nitric oxide derivative of hemoglobin in rats during shock syndrome. *Free Rad Res Comms*, 1990;**11**:167
- 16 Lamas S, Marsden P A, Li G K *et al*. Endothelial nitric oxide synthase: Molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;**89**:11285
- 17 O'Dell T J, Hawking R D, Kandel E R *et al*. Test of the role of two diffusible substances in long-term potentiation: Evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; **89**: 6348
- 18 Traylor T G, Sharma V S. Why NO? *Biochemistry*, 1992;**31**:2847

组织细胞一氧化氮含量测定的几种方法

张灵芝 谭敦勇 周爱儒

(北京医科大学心血管基础研究所, 北京 100083)

提 要

一氧化氮 (nitric oxide, NO) 是一种新型的细胞信使分子, 它在调节心血管系统、神经系统和免疫功能方面起着重要的作用. 测定组织细胞 NO 的含量对于探讨 NO 的生理功能具有重要的意义. 该文简要介绍了应用化学发光法、微盘测定法、放射强度测定法和分光光度法检测组织细胞 NO 的含量.

关键词 一氧化氮, 一氧化氮合成酶, 内皮舒张因子

近年的研究证明, 血管内皮舒张因子 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) 的主要成分是 NO 和前列腺环素 (prostacyclin, PGI₂), 其中 NO 的作用更为重要. 现在认为, NO 是一种新的生物信息传递体, 它作为调节心血管、神经和免疫的主要细胞信使分子而发挥其生物学作用, 因此受到普遍关注. NO 的测定是探讨 NO 生物学作用的一个关键.

1 NO 的生成及其代谢^[1,2]

NO 在体内必须通过一氧化氮合成酶 (nitric oxide synthase, NOS) 的作用才能生成. NOS 以 L-精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 和分子

氧为底物, 还原型尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH) 作为辅助因子提供电子, 由黄素单核苷酸 (flavin mononucleotide, FMN), 黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide, FAD) 和四咪唑传递电子, 生成中间体对羟基 L-精氨酸, 最终形成 NO 和 L-胍氨酸 (L-citrulline, L-Citr), 其中 NOS 是 NO 生成的最主要的限速因子.

NO 是一种自由基气体, 带有不成对电子, 即具有“顺磁性”, 其化学性质非常活泼, 因此

它能迅速与分子氧、超氧阴离子以及铁、铜、镁等发生反应。NO 与鸟苷酸环化酶 (guanylate cyclase, GC) 活性基团上的铁结合, 激活该酶促进磷酸鸟苷环化而产生环一磷酸鸟苷 (guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate,

cGMP), cGMP 再刺激 cGMP 依赖的蛋白激酶而发挥舒张血管、抑制平滑肌细胞 (SMC) 增殖、抑制血小板粘附、集聚和神经传递作用。NO 氧化生成终末代谢产物硝酸盐 (NO_3^-) 和亚硝酸盐 (NO_2^-) 如图 1 所示。

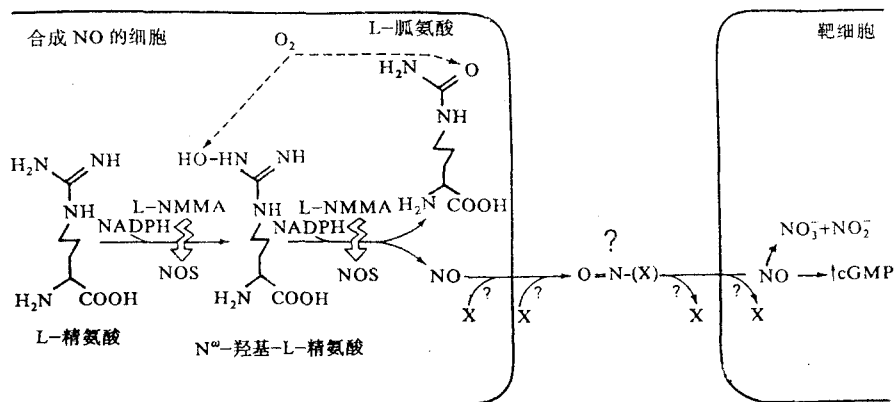


图 1 NO 的合成与代谢途径

分子氧 (O_2) 掺入 NO 和 L-胍氨酸中, L-NMMA 为 NOS 抑制剂, X 代表 NO 假定的载体分子

从图 1 可以看出,除了直接测定 NO 的含量外,可以通过测定 NO 的生理功能^[3]、测定组织细胞 cGMP 含量^[4]、NOS 活性和硝酸盐、亚硝酸盐含量等反映组织细胞 NO 的含量。但是,NO 的半衰期很短,难以直接检测,而仅测定 NO 的生理功能或组织细胞 cGMP 的含量并不能代表组织细胞 NO 的含量,需要排除缓激肽、 PGI_2 、心钠素等的影响。因此,目前常用的测定组织细胞 NO 含量的方法为利用 NO 的化学性质,测定其终末代谢产物亚硝酸盐的含量以及测定 NOS 的活性反映组织细胞 NO 的含量。

2 亚硝酸盐的测定

2.1 化学发光法

2.1.1 测定原理^[5] 生物样品通过酸化或/和加入还原剂可以使样品中亚硝酸盐释放 NO, 一氧化氮与臭氧反应生成二氧化氮的同时释放光子 ($\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2 + \text{hv}$), 测定光子的量, 代表组织细胞 NO 的含量, 此方法可以用 NO 分析仪测定。

2.1.2 测定程序 生物样品加入盐酸酸

化或/和加入还原剂如碘化钠可以使样品中亚硝基化合物, 无机和烷基亚硝酸盐和亚硝酸氨释放 NO, 然后应用 NO 分析仪测定 NO 含量。应用 NO 饱和溶液或亚硝酸钠水溶液测定 NO 的标准曲线, Menon 等的方法测定 NO 的范围为 $300\text{pmol} - 35\text{nmol}$ ^[6], Termin 等的方法为 $50 - 250\text{pmole}$ 亚硝酸钠^[5]。该测定方法敏感, 但是测定的 NO 含量并不完全代表组织细胞实际的 NO 含量。

2.2 微盘测定法

2.2.1 测定原理^[7] NO 氧化生成硝酸盐和亚硝酸盐, 硝酸盐通过镉柱还原为亚硝酸盐, 后者与 Greiss 试剂在微盘中反应生成粉红色化合物。

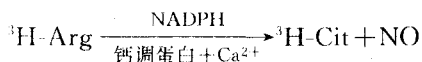
2.2.2 测定程序^[8] 收集生物液 $50\mu\text{l}$ 或 $100\mu\text{l}$ 加入等量的 Greiss 试剂 [1% 对氨基苯磺酰胺 (sulfanilamide), 0.1% N-(1-萘基)-乙二胺 (N-(1-naphthyl)-ethylenediamine), 5% H_3PO_4], 室温放置 10min, 应用酶标仪在 550nm 波长下测定样品的吸光度。亚硝酸钠作为标准。本测定方法简便易行, 但因为仅测定

了生物液中的亚硝酸盐成分,不能完全反映样品 NO 的含量,如果将生物液通过镉柱后再测定 NO 含量,测定结果更准确。

3 NOS 活性测定

3.1 放射强度测定法^[9]

3.1.1 测定原理 1 mol 的精氨酸在 NOS 的催化下生成 NO 的同时,产生 1 mol 的胍氨酸,应用液体闪烁计数器测定同位素标记的精氨酸生成同位素标记的胍氨酸的量,代表 NOS 的活性。



3.1.2 测定程序 组织匀浆,离心(100 000×g, 30min),上清为酶提取物。反应液(含有 NADPH, 钙调蛋白和 Ca^{2+})加入 $^3\text{H-Arg}$ 再加入酶提取物,孵育(22℃或 37℃ 5min 或 10min),然后加入终止液[20mmol/L 羟乙基哌嗪乙烷磺酸(N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid, HEPES), pH5.5 2mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)]。应用阳离子树脂 Dowex 50W X-8 (钠型)分离胍氨酸,洗脱(2ml 蒸馏水)后,在液体闪烁计数器上测定流出液中的放射强度。NOS 有两种类型:一种是结构型 NOS,另一种是诱导型 NOS,结构型 NOS 活性依赖于钙离子,诱导型 NOS 活性不依赖于钙离子,结构型 NOS 活性为不含乙二醇双乙胺醚-N, N'-四乙酸(ethyl-ene glycol-bis-(β-aminoethyl-ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid, EGTA)和含有 1mmol/L EGTA 样品间胍氨酸产生量差异值。诱导型 NOS 活性为含有 1mmol/L EGTA 样品与含有 1mmol/L EGTA, 1mmol/L NG-单甲基-L-精氨酸(NG-monomethyl-L-arginine, L-NMMA, NOS 的抑制剂)间胍氨酸生成量的差异值^[10]。本方法的测定最低限为 $0.05\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ 组织。该测定方法受许多因素的影响,如反应体系中底物 L-Arg 的浓度、钙离子浓度、pH 值、孵育温度和孵育时间,以及各种影响精氨酸

与胍氨酸通过阳离子树脂分离时的因素,但是,这些都可以通过使反应条件和分离过程标准化加以避免。

3.2 分光光度测定法

3.2.1 测定原理^[11] 由 NOS 催化生成的 NO 与氧合血红蛋白(oxyhemoglobin, HbO_2)反应生成高铁血红蛋白(methemoglobin, MetHb),此反应 2s 内完成,并且吸光度发生变化。

3.2.2 测定程序^[12] 酶的提取过程同上,反应体系中含有 $1.6\mu\text{mol/L}$ HbO_2 , $200\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 , 1mmol/L MgCl_2 , $100\mu\text{mol/L}$ L-Arg, $100\mu\text{mol/L}$ NADPH, $50\mu\text{mol/L}$ L-缬氨酸(L-valine), 40mmol/L KPO_3 pH7.2,加入 20% (V/V) 组织提取物。在 37℃ 条件下,应用双波长分光光度计在 401nm 与 421nm 波长下测定吸光度差异的变化代表 NOS 的含量。该测定方法的原理是非直接的,不能完全代表 NOS 的含量。因为其它因素也影响氧合血红蛋白的转化。

综上所述,到目前为止,尚无一种理想的方法测定组织细胞及生物液的 NO 含量。但是,上述方法联合使用可以防止出现假阳性结果,如果分别使用 NO 生成的激动剂和抑制剂则提高测定方法的特异性。

参 考 文 献

- 1 Lowenstein C J, Snyder S H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell*, 1992;**70**(5):705
- 2 Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*, 1992;**6**(12):3051
- 3 Palmer R M J, Ferrige A G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987;**327**(1):524
- 4 Brest D S, Snyder S H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989;**86**:9030
- 5 Termin A, Hoffmann M, Bing R J. A simplified method for the determination of nitric oxide in biological solutions. *Life Sciences*, 1992;**51**(20):1621
- 6 Menon N K. An improved chemiluminescence assay suggests non nitric oxide-mediated action of lysophos-

- phatidylcholine and acetylcholine. *Proceed Soc Exp Med Biol*, 1989; **191**:316
- 7 Green L C, Wagner D A, Glogowski J *et al*. Analysis of nitrate, nitrite, and [^{15}N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, 1982; **126**:131
 - 8 Ding A H, Nathan C F, Stuehr D J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol*, 1988; **141**:2407
 - 9 Bredt D S, Snyder S H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990; **87**:682
 - 10 Knowles R G, Merrett M, Salte M *et al*. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. *Biochem J*, 1990; **270**(3):833
 - 11 Feelish M, Noack E A. Correlation between nitric oxide formation during degradation of organic nitrate and activation of guanylate cyclase. *Eur J Pharmacol*, 1987; **139**(1):19
 - 12 Knowles R G, Salter M, Broods S L *et al*. Anti-inflammatory glucocorticoids inhibit the induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the lung liver and aorta of the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990; **172**(3):1042

简单而又神秘的生物信使——NO

董华玲 沈 政

(北京大学心理系和视觉、听觉信息处理国家实验室, 北京 100871)

提 要

新近发现一氧化氮(NO)广泛分布于生物体各处, 包括中枢及周边神经系统。NO可作为突触前递质从神经末梢释放, 也可作为逆信使从突触后膜释放。另外, NO还参与心血管调节、免疫调节、性行为调节等过程。NO分子的发现为神经系统突触可塑性、神经发育及某些疾病的药物治疗等问题提供了一种可能的解释和线索。NO可能代表了一类新型的生物信使分子。

关键词 NO, NO合成酶, 黄递酶, 非肾上腺素能非胆碱能神经元, 神经发育

自Humphrey Davy 1935年在研究“笑气”(N₂O)时发现一氧化氮(nitric oxide, NO)以来, NO一直被看作是对生物有毒的简单无机分子, 曾在战争中作为生物毒剂(芥子气)使用, 成为声名狼藉的有毒物。NO常温下为气体, 水中溶解度很有限(1 mmol/L), 极易透过细胞膜扩散。NO拥有额外电子, 具有高度化学反应能力, 在生物组织中半衰期只有几秒钟。NO的这些性质与我们所熟知的神经递质分子特性相去甚远。但几年来大量的研究已表明: NO作为可能的突触前递质和突触后逆信使在神经系统信息传递和发育中起作用, NO作为生物信使分子也在机体免疫和血流血压调节中

起着重要作用^[1]。

1 NO是周边神经系统中的新递质

Hope的实验表明, 新近命名的NO合成酶(NO synthase, NOS)与文献中早有记载的黄递酶(NADPH diaphorase)是同一种蛋白质^[2], NOS已经被纯化、克隆和表达了^[3], 并制成了专一性很强的NOS抗体^[4]。对黄递酶与NOS的统一性认识, 澄清了一个长久以来存在的谜, 即尿素循环中“迷失的一环”。因为NO合成机制, 为左旋精氨酸(L-Arginine, L-Arg)向瓜