

综述与专论

NO· 自由基的性质及其生理功能

赵保路

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

陈惟昌

(中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029)

提 要

综述和讨论了NO· 的自由基性质和生理功能。NO· 分子轨道上有一个未成对电子, 是一个典型的自由基, 它的半寿期为6—50s, 反应性极强, 遇氧反应生成另一个自由基NO₂·, 可以和超氧阴离子反应生成氧化性极强的超氧亚硝基阴离子(ONOO⁻)。NO· 与一些重要生物功能有关, 它是内皮细胞松弛因子, 可使血管平滑肌松弛, 防止血小板凝聚。细胞免疫活化和组织缺血再灌注也产生NO·。它还和神经传导及光接受器的信号发射等有关。

关键词 NO·, 自由基, 内皮松弛因子, 缺血再灌注损伤, 神经传导

NO· 自由基被美国科学杂志选为1992年明星分子, 一时名声大振, 关于NO· 的文章象雪崩一样在世界各有名杂志上争相发表出来。归纳起来有四个方面: a. NO· 与几个重要生物功能有关, 即血管平滑肌的松弛, 防止血小板的凝聚, 神经传导和光接受器的信号发射^[1-4]等; b. NO· 的产生与含血红素的鸟苷酸环化酶催化GTP→cGMP反应的活化有关^[5]; c. 吞噬细胞、内皮细胞和其它细胞的免疫活化或刺激释放NO· 作为杀伤外来微生物和肿瘤细胞的毒性分子^[6], 且受损的酶都含有铁和硫原子; d. NO· 合成酶可以将L-精氨酸转换成NO·^[7]。这四个方而实际上反映了NO· 的两大功能, 这就是NO· 在细胞内的信使功能和细胞毒性因子功能。这二者都与NO· 的自由基性质有关。因此, 本文就NO· 的自由基性质和它的生物功能做一综述和讨论, 提出我们一些看法。

1 NO· 的自由基性质

在NO· 分子中, N原子外层有五个电子,

O原子外层有六个电子, 形成共价键后, 在分子轨道上含有一个不成对电子($:\dot{\text{N}}::\ddot{\text{O}}:$), 因此它是自由基。用ESR可以检测气体NO· 的自由基信号, 但在液体中用ESR检测这一自由基信号就遇到了很大困难。它不稳定, 半寿期

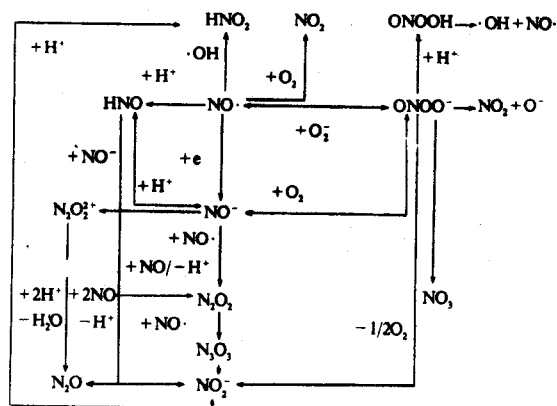


图1 与NO· 反应产生的有关自由基和化合物

收稿日期: 1993-05-03

修回日期: 1993-06-08

为6—50s. 与氧极易反应, 生成 NO_2 . NO_2 也是自由基($\cdot\ddot{\text{O}}::\ddot{\text{N}}::\ddot{\text{O}}\cdot$). $\text{NO}\cdot$ 还可以与 O_2 反应生成过氧亚硝基阴离子 ONOO^- , 质子化后很快分解生成 $\cdot\text{OH}$ 和 NO_2 自由基. 它们还可以相互反应在生物体内生成一系列具有重要生物功能的自由基和硝基化合物(图1).

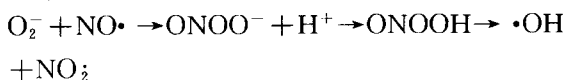
2 $\text{NO}\cdot$ 自由基和内皮细胞松弛因子

1986年Grylewshiki等人首次在*Nature*上发表文章, 提出内皮细胞松弛因子(EDRF)可能是一种不稳定的自由基, 但其化学结构不清楚, 推测它可能是一种过氧或花生四烯酸衍生物自由基^[8]. 1987年Palmer等人正式提出EDRF就是 $\text{NO}\cdot$ ^[9]. 以后经过很多实验室大量工作证实了这一点. 到目前为止, 虽然还有很多问题没有搞清楚, 但是对 $\text{NO}\cdot$ 作为细胞松弛因子和信使分子已经有了一个基本概念. 血管扩张剂, 如乙酰胆碱, 硝酸甘油, ATP和舒缓激肽等起动一个 Ca^{2+} 调节的受体, 在 $\text{NO}\cdot$ 合成酶催化和NADPH参与下, L-精氨酸的胍基被氧化生成 $\text{NO}\cdot$ 并且释放到细胞外. 接着活化可溶性的含血红素的鸟苷酸环化酶, 使血管平滑肌和血小板中的cGMP水平增加, 增加的cGMP促进血管平滑肌松弛, 抑制血小板凝聚和粘附到内皮细胞上. 现在已经克隆出两类 $\text{NO}\cdot$ 合成酶, 即脑中的 $\text{NO}\cdot$ 合成酶和巨噬细胞中的 $\text{NO}\cdot$ 合成酶^[10], 这对搞清楚 $\text{NO}\cdot$ 的产生机理将是很有意义的.

3 $\text{NO}\cdot$ 和 O_2^- 反应生成 ONOO^-

实验发现超氧化物歧化酶(SOD)可以增加EDRF的松弛效应, 延长 $\text{NO}\cdot$ 的寿命^[11]. SOD在体内的唯一功能就是催化歧化 O_2^- 生成 H_2O_2 和 O_2 . 因而表明 $\text{NO}\cdot$ 自由基可以和 O_2^- 反应. 以后的实验又证明, 二者的反应产物是 ONOO^- . 这在吞噬细胞呼吸爆发时表现的尤为突出. 因为巨噬细胞, 多形核白细胞受刺激或吞噬过程中释放大量 O_2^- ^[12], 同时也产生大量 $\text{NO}\cdot$ 自由基. O_2^- 可以通过Harber-Weiss反应产生 H_2O_2 和 $\cdot\text{OH}$ 自由基, 这在杀伤入侵

微生物和肿瘤细胞及在炎症损伤方面起着重要作用. 但同时 O_2^- 和细胞产生的 $\text{NO}\cdot$ 反应生成 ONOO^- . ONOO^- 在碱性条件下相当稳定, $\text{pK}_a = 7.40 \pm 0.6$ (在37℃). 它在302nm有一个明显的吸收峰. 一旦酸化, 立即分解, 半寿期仅为1.9s, 分解产物为更强的氧化剂($\cdot\text{OH} + \text{NO}_2$):



从自由基分子毒理学的角度来看这一反应机理是非常有意义的. O_2^- 和 $\text{NO}\cdot$ 都是自由基, 但二者的氧化性都不很强, 细胞毒性也不十分明显, 它们在体内都具备一定生物功能. 二者结合以后生成 ONOO^- 阴离子. 在略高于生理pH时(即碱性条件下), ONOO^- 相当稳定. 在这种状态, 允许它由生成位置扩散到较远的距离. 一旦在低于生理pH(即酸性)条件下(病理条件下往往如此), 立即分解为 $\cdot\text{OH}$ 和 NO_2 自由基, 这两种自由基的氧化性都非常强, 且具有很大的细胞毒性. 这对于杀伤外来微生物和肿瘤细胞非常有意义.

4 在缺血再灌注过程产生的 $\text{NO}\cdot$ 自由基

很多实验证据表明氧自由基在心肌缺血再灌注损伤中起着重要作用^[13,14]. 那么 $\text{NO}\cdot$ 自由基会不会也在组织缺血再灌注过程中出现呢? 我们在做肾缺血、移植和再灌注实验时, 在体内缺血1h的下腔静脉血和离体缺血24h的肾组织及离体缺血24h移植后再灌注2min的肾组织中检测到了一个结合到血红蛋白上的典型ESR信号(在 $g=2.079$ 处有一个最大峰, 在 $g=2.0200$ 处有最小峰, 且每个又被分裂成三重峰. 超精细分裂常数为16—17G), 这是在缺血再灌注过程中产生 $\text{NO}\cdot$ 自由基的直接证据. 而且我们还发现, 在缺血再灌注过程中, 组织损伤越严重, 这一信号强度就越大. 加入SOD后, 肾组织损伤减轻, 产生的 $\text{NO}\cdot$ 也就少一些. 另外, 实验也发现了休克大鼠及大鼠器官移植排斥反应也检测出了 $\text{NO}\cdot$ 自由基^[15]. 这说明在缺

血再灌注过程中,或者是组织的损伤促使 $\text{NO}\cdot$ 自由基的产生,或者表明 $\text{NO}\cdot$ 自由基参与了组织损伤. 这还需要深入研究.

5 $\text{NO}\cdot$ 的生理功能

$\text{NO}\cdot$ 由细胞内的 $\text{NO}\cdot$ 合成酶催化 L-精氨酸生成. Iamas^[16] 自牛脑纯化并克隆出牛脑的 $\text{NO}\cdot$ 合成酶,有 1205 个氨基酸残基,分子量为 133 000. 牛脑的 $\text{NO}\cdot$ 合成酶和鼠脑的 $\text{NO}\cdot$ 合成酶及大鼠巨噬细胞的 $\text{NO}\cdot$ 合成酶^[10] 约 50%—60% 的氨基酸是相同的. 脑和内皮细胞的 $\text{NO}\cdot$ 合成酶具有信息传导功能;神经递质作用于神经元膜表面的受体之后,其 $\text{NO}\cdot$ 合成酶活性即迅速增加,反应极快,且受钙离子/钙调蛋白系统的调控和激活,在信息传递过程中没有合成新的蛋白质. 但巨噬细胞的 $\text{NO}\cdot$ 合成酶主要受细胞因子的作用. 在 α -TNF (肿瘤坏死因子) 的作用下,要经过几个小时之后才出现 $\text{NO}\cdot$ 合成酶的活性增强,反应缓慢,不受钙离子与钙调蛋白系统的影响,其后有蛋白质的合成. 由此可见, $\text{NO}\cdot$ 在信息传递和细胞毒杀作用中可能经历不同的过程和机制.

$\text{NO}\cdot$ 在学习和记忆过程中的作用也是目前研究的热点. O'Dell^[17] 提出, $\text{NO}\cdot$ 在突触后生成,逆行扩散至突触前区,对海马突触的长时程增强 (LTP) 效应起维持作用,称为“逆行使”(retrograde messenger). 这是继 LTP 和 N-甲基-D-天门冬氨酸 NMDA 受体发现之后的又一重要进展. $\text{NO}\cdot$ 自由基与学习记忆过程中突触调变关系的研究,将为脑信息加工原理展示新的发展前景. $\text{NO}\cdot$ 的其它生理功能和药理作用,此处不再重复.

6 $\text{NO}\cdot$ 为什么这样特殊?

为什么是 $\text{NO}\cdot$ 而不是 NO_2 或 CO 或其它分子能起动这样多的生物功能. 一个可能的答案是 $\text{NO}\cdot$ 是自由基,容易参与传递电子反应,同时,它可以同血红素铁或非血红素铁形成强的配位结合. 它可以结合到 Fe (II) 血卟啉和 Fe (III) 结合位置上把 CO 或 O_2 取代出来. 最近有

人报道,血红蛋白-NO 可以失去它附近的碱基而变成自由的原血红素-NO^[18]. 这就意味着自由的碱基可以自由地参与催化反应,自由的蛋白质可以自由地改变构象,自由的血红素可以自由地从蛋白中扩散出去. 这三种变化的任何一个或它们的组合将在鸟苷酸环化酶的活化过程中起重要作用.

参 考 文 献

- 1 Palmer R M J, Ashton D S, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988;**333**(3):664
- 2 Garthwaite J, Charles S L, Chess-Williams R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests as intercellular message in the brain. *Nature*, 1988;**336**:385
- 3 Knowles R G, Palacios M, Palmer R M J *et al.* Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989;**86**:5159
- 4 Horio Y, Murad F. Solubilization of guanyl cyclase from bovine rod outer segments and effects of lowering Ca^{2+} and nitron compound. *J Biol Chem*, 1992;**266**:3411—3415
- 5 Hill R, Olson J S, Palmer G. Spectral transitions of nitrosyl hemes during ligand binding to hemoglobin. *J Biol Chem*, 1979;**254**:12110
- 6 Hibbs J B, Taintor R R, Vavrin Z. Macrophage cytotoxicity: Role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*, 1987;**235**:473
- 7 Bredt D S, Snyder S H. Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990;**87**:682
- 8 Gryglewski R J, Palmer R M J, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 1986;**320**:454
- 9 Palmer R M J, Ferrige A G, Moncada S. Nitric oxide release account for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987;**327**:524
- 10 Lowenstein C, Hwang P M, Glatt C E *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature*, 1991;**351**:714
- 11 Murphy M E, Sies H. Reversible conversion of nitroxyl anion to nitric oxide by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991;**88**:10860

- 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