

4.6 一氧化氮自由基



❖ NO·的性质

在NO分子轨道上含有一个未配对电子，所以它是自由基，故特采用NO·表示。

物性：气体，难溶于水（1mmol/L），具脂溶性

化性：活泼，与Fe²⁺有很高亲和力，能与Cu、Mg发生反应。与O₂极易生成NO₂（也是自由基）。

NO·可与O₂·⁻生成过氧亚硝基阴离子（ONOO·）质子化后很快分解成·OH和NO₂。还可相互作用生成一系列有重要生物功能的自由基和硝基化合物。

体内NO·的生成及代谢

（1）在体内NO·主要通过NO·合成酶（NOS）催化才能生成。NOS是以L-精氨酸（L-Arg）和O₂为底物，NADPH做为辅助因子提供电子，由FMN、FAD或四氢喋呤传递电子，催化L-精氨酸末端胍基中的一个氮原子和氧分子反应，生成中间体对羟基L-Arg，最终形成NO·和L-胍氨酸（L-Cit）。

（2）黄嘌呤氧化酶 黄嘌呤氧化酶具有硝酸还原酶的活性，可以将硝酸还原成NO·。

（3）硝基血管舒张剂，如硝普钠，硝基甘油都可以产生NO·。

结构型NOS:单体酶，催化活性需要钙调素/钙离子($\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$)、NADPH、FAD/FMN。还是一种高度可调节蛋白质，能被cAMP和 Ca^{2+} 依赖性蛋白激酶（蛋白激酶A和C）磷酸化，结果使不同的信息传递过程紧密联系起来。

主要分布在神经系统等处，在受到物理刺激或受体被激活后此酶迅速被激活，合成并释放 $\text{NO}\cdot$ 去发挥信使分子作用。

诱导型NOS:在巨噬细胞等被激活后，在其细胞核内表达合成的。它主要受细胞因子的作用，如在肿瘤坏死因子作用下，要经过几个小时后才出现酶活性增强，反应缓慢。它的活性不依赖 $\text{CaM}/\text{Ca}^{2+}$ ，而需要四氢喋呤等辅助因子。它一旦产生就会长期合成 $\text{NO}\cdot$ 。

NO·的半寿期很短，难以直接检测。一般可通过测定NO·的生理功能、cGMP含量、NOS活性和硝酸盐、亚硝酸盐含量等来反映组织细胞NO·的含量。

目前常用的方法是测定NO·的终末代谢产物亚硝酸盐含量及测定NOS活性来反映组织细胞NO·的含量。

1. 化学发光法

原理是生物样品通过酸化或加入还原剂可使样品中的亚硝酸盐释放NO·，NO·与O₃反应生成NO₂的同时释放光子，测定光子的量，代表组织细胞NO·的含量。

此法敏感，但是测得的NO·量并不完全代表组织细胞实际的NO·含量。

2. 微盘测定法

原理是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，应用酶标仪在550nm波长下测其吸光度，亚硝酸钠做为标准。



3. 放射强度测定法

原理是等摩尔量Arg在NOS催化下生成NO·的同时会产生等摩尔量的Cit。应用液体闪烁剂计数仪测定同位素标记的Arg生成同位素标记的Cit的量来代表NOS的活性。

4. 分光光度法

原理是NOS催化生成的NO·可与氧合血红蛋白反应生成高铁血红蛋白并且吸光度发生变化。应用双波长分光光度计在401和421nm波长下测定吸光度差异的变化代表NOS的含量。此法的干扰因素较多。

NO·在脊椎动物体内广泛分布，它是一种新型的细胞信使分子，在调节心血管系统、神经系统和免疫功能方面起着重要作用。

NO·作为信使分子的最大特点是，它不需要任何中介机制而快速扩散通过生物膜，将一个细胞产生的信息传递到它周围的细胞中去。

1. 在心血管系统中心的调节作用

NO·就是EDRF(内皮舒张因子)。在心血管系统中，NO·释放作为血管内皮对环境变化的一般适应机制，通过对血管平滑肌的作用调节血流和血压。

给人和动物施用NOS抑制剂后，血压迅速升高，高血压及其它血压不正常可能与此机制有关。血小板中的NO·可能是一种内源性抗血栓剂，可通过cGMP抑制血小板的凝聚和粘附，形成一种自体分泌负反馈系统。

NO·在大脑血循环调节中似乎也起关键作用。实验表明，GC(鸟苷酸环化酶)存在于脑部微血管中，能受SNP作用调节血脑屏障通透性。

脑的能量代谢乃至认知活动与脑部血液循环密切相关，NO·对脑血流循环的调节意义更为重大。



2. 免疫系统中的功能

当内毒或T细胞激活巨噬细胞时，会和成诱导NOS。NOS催化生成大量NO·，同时巨噬细胞也大量释放 $O_2 \cdot^-$ 。 $O_2 \cdot^-$ 可通过H-W反应产生·OH，·OH可杀伤入侵微生物和肿瘤细胞及在炎症损伤方面起重要作用。

同时 $O_2 \cdot^-$ 和NO·反应生成ONOO·，ONOO·碱性条件下十分稳定，酸化则立即分解成更强氧化剂·OH和 $NO_2 \cdot$ 。这两种自由基具有很大的细胞毒性，对于杀伤外来微生物和肿瘤细胞很有意义。

3. 在神经系统信息传递和发育中的作用

(1)NO·可能在哺乳动物类消化、生殖、呼吸和循环四个系统的自主神经调节中起重要作用，可能是其中一些神经元的新递质。

NO·在感觉传入和神经内分泌中也起重要作用。

(2)NO·可能在成体中兴奋性氨基酸引起的短期突触可塑性效应和神经发育、学习、记忆等长期效应中都有重要作用。

❖ 谷氨酸能使神经元参与脑缺血时的神经毒性作用。许多实验表明，NO·介导谷氨酸的神经细胞毒性作用。在正常情况下，神经元合成并释放出适量的NO·并不产生毒性作用。但有过量谷氨酸时，神经元和小胶质细胞就产生过多的NO·，足以致死周围的神经细胞。

免疫刺激产生的NO·对那些表达NOS的细胞自身及其附近细胞也有毒性作用，一些与免疫系统有关的局部或系统组织损伤，病态血管扩张等可能与NO·释放有关。