

余 跃 等 编 著

一氧化氮与疾病



科学出版社

一氧化氮与疾病

余 跃 等编著

科 学 出 版 社

1 9 9 8

内 容 简 介

一氧化氮研究是目前国际上医学领域十分活跃的领域,进展迅速。本书介绍一氧化氮的基础医学理论与研究进展,重点阐述一氧化氮与临床各科疾病如心血管疾病、肺脏疾病、肾脏疾病、肝脏疾病、胃肠疾病、神经精神疾病、眼耳疾病、炎症和免疫性疾病、肿瘤等的关系及应用。

全书共十五章。可供从事生化、生物物理、酶学、生物学、基础医学与临床医学工作者阅读参考。

一 氧 化 氮 与 疾 病

余 跃 等编著

责任编辑 牛海卫

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

中国科学院武汉分院科技印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1998年元月第 一 版 开本: 850×1168 1/32

1998年元月第一次印刷 印张: 9

印数: 1~1000 字数: 227 000

ISBN 7-03-006521-2/O · 995

定价: 18.00 元

《一氧化氮与疾病》编委会

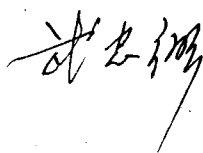
主 编	余 跃	陈新加			
副主编	贺降福	谭 红	吕永红		
编 委	邓学军	王建文	刘红光	吕永红	李明祥
	邹光荣	余 跃	陈新加	吴耀贵	金 阳
	范 曲	张丕利	贺降福	聂国辉	黄仕和
	黄自平	谭 红	薛 蔚		
审 阅	茹立强	侯晓华			

序 一

在自然科学迅猛发展的今天,我们不得不遗憾地承认,医学科学的进展却一直处于相对滞后的状态,以致对许多疾病尚缺乏足够的认识,对其病因和发病机制尚未能彻底阐明,因而阻碍着对它们的有效防治。

近年来,随着科学技术的进步和环境医学的发展,一氧化氮,一种带有未配对电子的气体分子,已引起了人们的重视。然而,对于一氧化氮的理化特性及其在机体内的内源性产生和清除过程,对其在机体内诸多疾病中的作用,一般尚知之不多或知之不详,因而影响了对有关疾病的认识和防治。

当前,随着我国经济建设的迅速发展,从理论和实践角度提供一本较系统地介绍一氧化氮的专著,以帮助疾病防治和研究工作者加深对一氧化氮的认识,是十分必要的。有鉴于此,同济医科大学等单位一批莘莘学子,一批博士后、博士和硕士青年医学科学工作者,在进行繁重的教学、医疗和科研工作的同时,排除困难,群策群力,共同编撰了这本《一氧化氮与疾病》专著,无疑是对当前一氧化氮所致疾病的防治和研究的一项喜人的贡献。深信本书在我国有关疾病的防治研究中将发挥有益的作用,会受到广大读者的欢迎。欣喜之余,爰为之序。



1997年12月12日于武汉

序 二

一氧化氮(NO)是一种神经介质和信使分子,广泛分布于各种组织器官,有很强的生物活性,具有重要的生理功能,尤其在神经信息传递、心肺功能、脏器血流调节、胃肠保护和动力调控、内分泌调节、机体防御免疫功能以及细胞凋亡等等很多方面起重要作用。NO与许多疾病的发生关系密切,NO供体药或NO合酶抑制剂在临床上也有重要的治疗价值。NO在机体内的生理和病理生理方面的作用已经受到极大关注。但目前许多报道意见还不一致,而且还有很多问题还未完全阐明,诸如NO在体内代谢及其作用、NO在许多疾病发生机制中的确切地位、NO在治疗中的量效关系与毒副作用等等,尚有待深入研究。NO在机体内作用非常复杂而又十分重要,因此成为当今医学最为活跃的研究领域。

余跃等十多位作者,结合他们各自的博士或硕士课题对NO进行了研究,加深了对NO在机体内重要性的认识,并综合国内外有关文献写成了这本书。本书概括了NO在体内的产生和分布、NO与各系统疾病的关系及其诊治应用,将有助于读者方便而快速地了解近些年来有关NO的研究进展情况。我相信这本书将对NO的科学研究和临床应用起一定的促进作用,而且我希望随着他们的继续工作以及国内外对NO的研究进展,这本书也将得到更进一步的充实和提高。

王家骥

1997年11月

前 言

一氧化氮(Nitric Oxide, NO)是一种半衰期很短、带有未配对电子的气体分子,其化学性质非常活泼。在生理条件下,机体内处于产生和清除动态平衡状态的NO浓度是极低的,但它们在机体内却发挥着重要而又独特的生理作用;在病理条件下,各种外源性物质直接和间接诱导产生的NO若得不到及时的清除,则高浓度的NO常会造成机体的损伤。这些极为重要的科学奥秘长期以来一直未被揭示出来。自从1980年Furchgott等首先在血管内皮中发现了EDRF以来,生物体内EDRF和NO的关系才逐渐得到阐明。近十余年来,这方面的进展十分迅速,它不仅推动了NO研究的飞速发展,而且还使NO的学术领域不断扩大,随之NO的应用亦越来越广泛。

为了准确、较快地传播先进技术及知识,为我国医学科学的发展贡献绵薄之力,我们不揣冒昧编著了《一氧化氮与疾病》这本书。本书为十余位作者集体智慧的结晶,是在基础和临床第一线进行NO研究的博士后、博士及硕士,结合自己的体会并综合国内外有关最新资料撰写而成。本书共十五章,前五章阐述了NO的基础理论,对NO的产生、性质、作用机制、NOS的研究状况、NO和NOS在机体内的分布以及定性、定量检测方法作了较全面的叙述;后十章分别就NO与心、肺、肾、肝、胃肠、神经、眼、耳等器官疾病的关系,较详细地介绍了有关疾病的病因、发病机制及相应的治疗进展。

在本书编写过程中,得到了许多专家和同道的热情关心和帮助。首先我要衷心感谢辛勤培育我的恩师张锦坤教授、侯晓华教授,是他们引导我跨入医学科学的大门,我的每一项工作成绩,每一篇论文,几乎都凝聚了他们的心血。感谢德高望重的武忠弼、王

家骏教授在繁忙的临床、教学及科研工作中为本书作序。NO 研究的前辈茹立强教授、恩师侯晓华教授在百忙之中审阅了全书,更是对我们巨大的鼓舞。感谢湖北省黄石市第五医院全体党政领导及 Astra 公司武汉办事处黄诚义同志在本书出版过程中所给予的经济支持。没有他们的支持与帮助,这本著作是难以问世的。

尽管我们已尽心尽力,但由于水平有限、时间仓促及经验不足,定有不足或错误之处,恳请同道们指教!

余 跃

1997 年 7 月于武汉

目 录

序一	(i)
序二	(iii)
前言	(v)
第一章 一氧化氮基本概念	(1)
第一节 一氧化氮的产生	(2)
第二节 一氧化氮的理化性质	(8)
第三节 一氧化氮的作用机制	(12)
第四节 一氧化氮的生物学作用	(21)
第二章 一氧化氮合酶	(25)
第一节 一氧化氮合酶的分型	(25)
第二节 一氧化氮合酶的酶学特征	(27)
第三节 一氧化氮合酶 cDNA 的克隆和表达	(32)
第四节 一氧化氮合酶基因结构及染色体定位	(33)
第五节 一氧化氮合酶的表达调节	(35)
第六节 一氧化氮合酶的活性调控	(37)
第三章 一氧化氮的测定方法	(41)
第一节 一氧化氮的定量测定方法	(41)
第二节 一氧化氮合酶的定性定位测定方法	(56)
第四章 一氧化氮在全身的分布	(64)
第一节 心血管系统中一氧化氮合酶的分布	(64)
第二节 呼吸系统中一氧化氮合酶的分布	(65)
第三节 泌尿系统中一氧化氮合酶的分布	(66)
第四节 消化系统中一氧化氮合酶的生成与分布	(67)
第五节 生殖系统中的一氧化氮与一氧化氮合酶	(68)
第六节 神经系统中一氧化氮合酶的分布	(69)

第七节	感觉系统中一氧化氮合酶的分布	(72)
第五章	一氧化氮与心血管疾病	(74)
第一节	一氧化氮的心血管生理效应	(74)
第二节	高血压	(78)
第三节	高脂血症	(80)
第四节	动脉粥样硬化	(82)
第五节	心肌缺血	(83)
第六节	缺血-再灌注损伤	(85)
第七节	充血性心力衰竭	(87)
第六章	一氧化氮与肺脏疾病	(94)
第一节	一氧化氮对肺脏生理功能的影响	(94)
第二节	一氧化氮与慢性阻塞性肺病	(96)
第三节	一氧化氮与成人呼吸窘迫综合征	(97)
第四节	一氧化氮与肺动脉高压	(98)
第五节	一氧化氮与哮喘	(99)
第六节	一氧化氮与其他肺部疾病	(100)
第七章	一氧化氮与肾脏疾病	(103)
第一节	一氧化氮对肾脏血流动力学的影响	(103)
第二节	一氧化氮与肾小球肾炎	(105)
第三节	一氧化氮与急性肾功能不全	(107)
第四节	一氧化氮与慢性肾功能不全	(109)
第八章	一氧化氮与肝脏疾病	(111)
第一节	一氧化氮与肝硬化门脉高压	(111)
第二节	一氧化氮与肝脏损害及抗肿瘤作用	(122)
第九章	一氧化氮与胃肠疾病	(132)
第一节	胃肠道内一氧化氮的来源	(132)
第二节	一氧化氮与胃肠粘膜保护	(132)
第三节	一氧化氮与胃肠运动	(145)
第十章	一氧化氮与神经精神疾病	(163)
第一节	一氧化氮在神经系统中的功能	(163)

第二节	一氧化氮与脑血管病·····	(166)
第三节	一氧化氮与血管性头痛·····	(173)
第四节	一氧化氮与感觉异常·····	(175)
第五节	一氧化氮与癫痫·····	(177)
第六节	一氧化氮与多发性硬化·····	(179)
第七节	一氧化氮与精神疾病·····	(181)
第十一章	一氧化氮与眼、耳疾病 ·····	(183)
第一节	一氧化氮与眼科疾病·····	(183)
第二节	一氧化氮与内耳疾病·····	(188)
第十二章	一氧化氮与炎症、免疫 ·····	(192)
第一节	一氧化氮与炎症·····	(192)
第二节	一氧化氮与免疫·····	(199)
第三节	一氧化氮在炎症、免疫性疾病中的作用 ·····	(216)
第十三章	一氧化氮与肿瘤 ·····	(220)
第一节	一氧化氮的抗肿瘤作用·····	(220)
第二节	过量一氧化氮促发肿瘤的作用·····	(225)
第三节	肿瘤细胞自身产生的一氧化氮的作用·····	(227)
第十四章	一氧化氮与麻醉 ·····	(230)
第一节	中枢神经 NO-cGMP 通路与麻醉机理 ·····	(230)
第二节	一氧化氮与疼痛·····	(238)
第十五章	一氧化氮在疾病诊疗中的应用 ·····	(242)
第一节	在诊断中的应用·····	(242)
第二节	在疾病治疗中的应用·····	(244)
第三节	一氧化氮的吸入疗法·····	(252)
参考文献	·····	(261)

第一章 一氧化氮基本概念

自从 1935 年 Humphrey Davy 在研究笑气(N_2O)时发现一氧化氮(nitric oxide, NO)以来, NO 一直被看作是一种有毒气体分子, 如汽车排出的废气及吸烟者的烟雾中均含有 NO, 它能污染空气, 且损害大气层中的臭氧层, 对人畜有毒害作用。1977 年 Miki 等发现 NO 能激活小鼠肝脏和大脑匀浆中的鸟苷酸环化酶, 3 年后, Furchgott 和 Zawadzki(1980)观察到血管内皮细胞可产生并释放一种舒血管活性物质——内皮细胞衍生舒张因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF), 而且许多内、外源性活性物质的舒血管作用均由 EDRF 介导。1986 年 Furchgott 等又根据 NO_2 衍生而来的 NO 的药理作用与 EDRF 存在相似性, 提出 EDRF 可能是 NO。1988 年 Moncada 等采用瀑布式淋浴去内皮细胞的血管条进行生物检测 EDRF, 并同时采用化学发光法定量测定 NO, 发现血管内皮细胞释放 NO, 且 NO 与 EDRF 的作用是不可分的, 从而肯定了 EDRF 的化学本质是 NO。以后人们又发现左旋精氨酸(L-Arginine, L-Arg)是血管内皮细胞合成 NO 的前体物质。至此, NO 的生物学、医学的研究飞速发展。

1992 年, NO 被美国著名自然科学杂志 Science 选为明星分子, 甚至将 1992 年称为“NO 分子年”; 1994 年, 美国的 Life Science 杂志列出了本世纪生命科学的主要成就, 其中最新的一项就是 NO 被发现可能是一种新型的神经递质; 1996 年 10 月 4 日, NO 研究的先驱者 Furchgott 和 Murad 获得了拉斯克基础医学研究奖。至此, 人们对 NO 的研究热情几乎达到了顶点, 且日益重视其在生物学及医学中的应用。

NO 的基础理论及其在生物学和医学中应用的研究进展十分迅速, 有关的研究报告越来越多。为了熟悉这方面的文献, 了解

NO 的生物学与医学,有必要首先掌握 NO 的基本概念。

第一节 一氧化氮的产生

从表面上看,NO 是氮和氧的简单化合物,但其在生物体内的合成却是一个复杂的过程。目前至少已知生物体内有两种途径产生 NO。

一、左旋精氨酸-一氧化氮通路

左旋精氨酸-一氧化氮通路(L-arginine/nitric oxide pathway),目前尚未完全弄清楚其代谢途径(Moncada and Higgs, 1993)。生物体内许多细胞是通过此通路来合成 NO 的,如:非肾上腺素能非胆碱能神经元、中枢神经元、内皮细胞、炎性中性粒细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、血小板、肝细胞、胰腺 β 细胞及肿瘤细胞等等。

1. NO 的生物合成

左旋精氨酸(L-Arg)在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS,参见第二章)作用下与 O_2 结合生成左旋瓜氨酸(L-citrulline, L-Cit)及 NO。右旋精氨酸无此作用。L-Arg 是哺乳动物合成 NO 的前体。鼠 NOS II 与 ^{15}N 标记胍基的 L-Arg 作用时,显示 NOS II 使 2 个等价胍基氮原子中的一个发生氧化,鼠 NOS II 与 $^{18}O_2$ 及 $H_2^{18}O$ (水)作用时亦发现尿中左旋瓜氨酸中的氧原子来源于分子氧而非水。

1988 年最先将 N^G 羟基精氨酸(L- N^G -hydroxyarginine, NOH Arg)作为 NO 生物合成的中间体,但无实验室资料支持。1991 年,NOH Arg 及其 ^{15}N 胍基类似物的合成过程被发现了,随后的研究亦认为 NOH Arg 是鼠 NOS II 介导的 NO 生物合成的一种中间体。这些研究均表明 1 分子 L-Arg 转变成 1 分子 NOH Arg,需要 1 分子还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine

dinucleotide phosphate, NADPH), NOHArg 转成为 NO 及左旋胍氨酸还需要 0.5 分子的 NADPH, 而且 NOH Arg 中发生了羟基化的氮原子与 NO 中的氮原子是等同的, NOHArg 中的氧原子存留于 NO 中。最近的化学计量学资料表明 1 分子的 L-Arg 转化成 NO 的循环中, 需耗 2 分子的氧气。虽然这些资料来源于鼠 NOS II, 但 NOS I、III 作用的结果与 NOS II 是一致的。L-Arg 合成 NO 的总的过程简略于图 1-1。

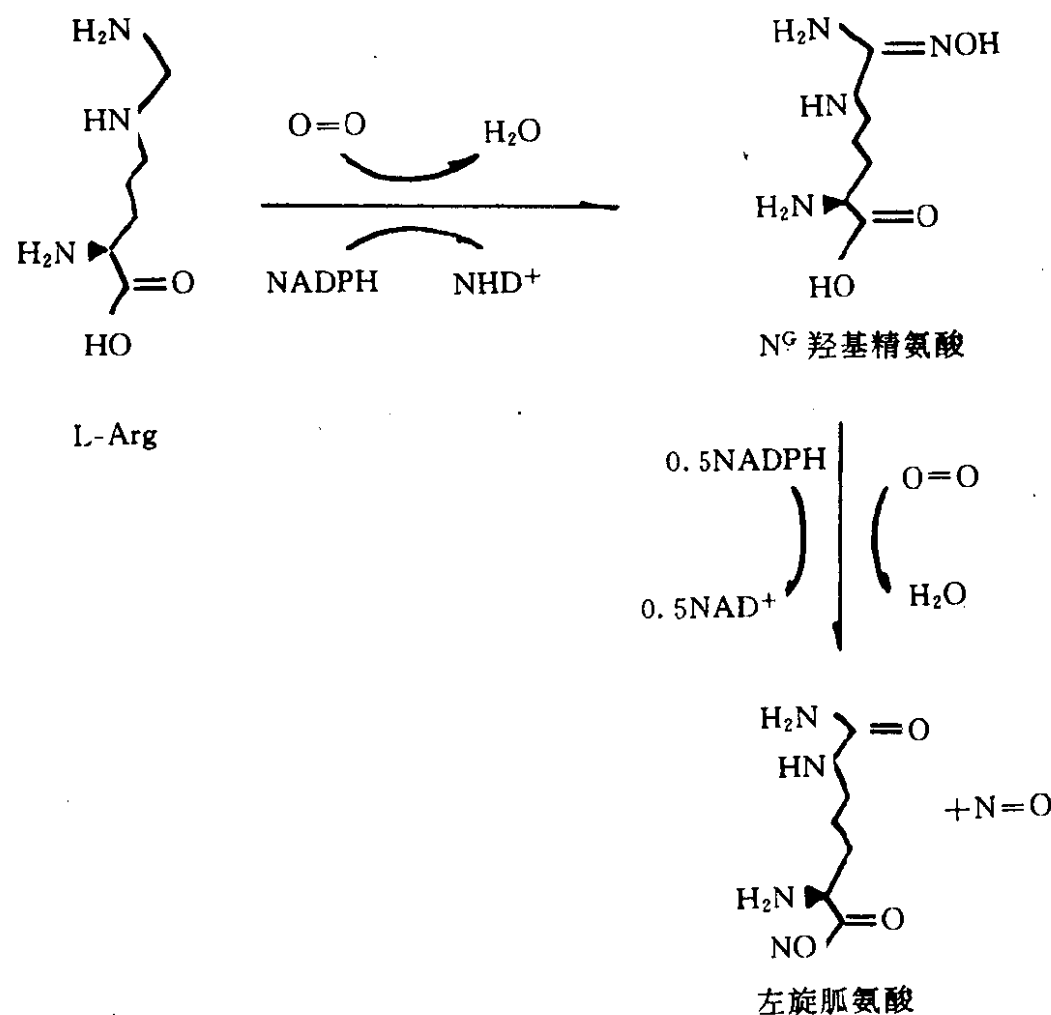
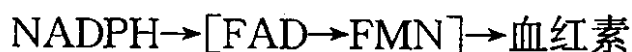


图 1-1 左旋精氨酸来源的 NO 合成总过程

NOS I 蛋白由两部分构成: 还原酶结构域, 氧化酶结构域。氧化酶结构域中有钙调蛋白 (camodulin, CaM) 结合位点, NOS I C-末端区域与 NADPH 细胞色素 P₄₅₀ 还原酶具有序列同源性, 其

中具有 NADPH、黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)、黄素核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)结合位点,作为转移至血红素的电子来源和贮藏处。尽管 NOS 氧化酶结构域与其他哺乳动物蛋白质无同源性,但在 NOS 的几种异构体中均发现一高度保守的含 320 个氨基酸残基的序列,其可能具有 L-Arg、血红素、四氢生物喋啉(tetrahydro biopterin, BH₄)的结合位点,因而可推测出可能的电子流向为:



黄素在介导 NADPH 与血红素之间的电子传递过程中起重要作用。在 NO 合成的不同阶段中,血红素需要单个电子,黄素能作为单电子供体, NADPH 则不能,而且在 L-Arg 与 NOS 氧化过程中,每分子 NO 合成需 1.5 分子 NADPH(3 个电子)。但在每步催化过程中, NADPH 只能提供偶数量电子,故为了完成整个氧化过程, NOS 可能贮藏一个在连续的 NO 合成循环中来源于 NADPH 的电子。FAD、FMN 各自能接受、贮存来源于 NADPH 的 2 个电子,故其亦能作为催化循环过程中的电子贮藏处。因而在第一轮 NO 合成循环中,耗费 2 个 NADPH,其供应的 4 个电子贮存于下一轮 NO 合成要使用的黄素中。在下一轮循环中,上一轮贮存的电子将与另外的 NADPH 供应的 2 个电子一起被使用。故每个 L-Arg→NO 循环中要耗费 1.5NADPH。事实上,鼠肝微粒体细胞色素还原酶中的黄素在氧化循环过程中是能够贮存电子的。

基于以上资料, NO 的生物合成机制目前倾向于 L-Arg→NO 的两步机制(Feldman, 1993):

第一步骤: L-Arg 氧化生成 NOHArg、NOS 血红素结合体需接受 2 个电子以激活氧气;此反应可能由 [FeO]³⁺ 开始进行。通过 L-Arg 胍基 N—H 的氢抽提反应而形成胍阴离子自由基,然后胍阴离子自由基与 [FeOH]²⁺ 的结合,而形成 NOHArg 及铁血红素。

第二步骤: NOHArg 转变成 NO、L-Cit。此反应需 1 个电子从 NOHArg 中传递至血红素,化学计量学资料亦证实了未配对电子产物 NO 的生成, NOHArg 氧化还原电位测定及热动力学研究也

发现一个氢原子从 NOHArg 转移至 $[\text{FeOO}]^{2+}$ 中。有可能,底物的一个电子氧化过程发生在 NO 生物合成的某一点上,但目前尚不清楚 NOHArg 或中间体是何时被氧化的。

图 1-2 描述的 NO 合成机制尽管与 Feldman 等(1993)报道有相似之处,但尚有少许差异,其考虑到了此种可能性:通过氢抽提反应 NOHArg 供给 NOS 一个电子。

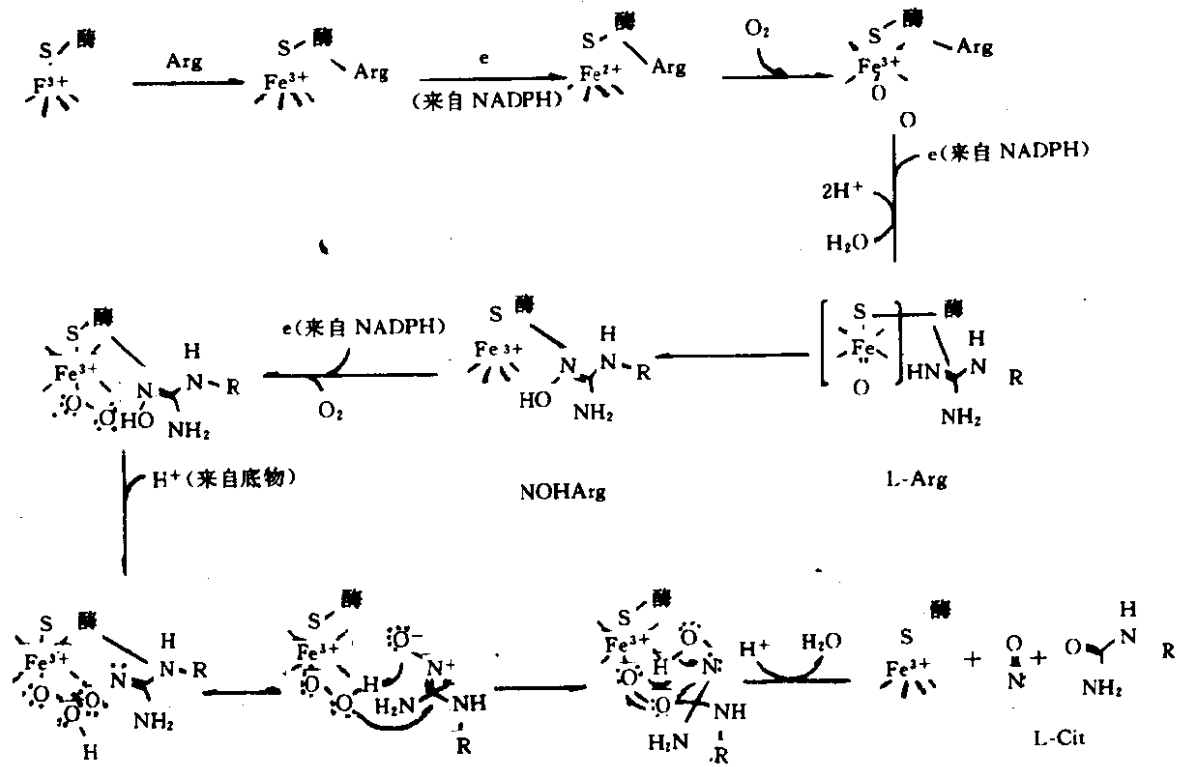


图 1-2 NOS 介导的 NO 合成过程

此机制的另一个有趣的环节是:在 L-Arg 转化成 NOHArg 过程中,发生氧化的物质是亲电子的 $[\text{FeO}]^{3+}$,而在 NOHArg 转化成 NO、L-Cit 过程中,发生氧化的物质是 $[\text{FeOOH}]^{2+}$ 。原因之一是两种底物有不同的化学活性,NOHArg 通过氢抽提反应而被氧化生成 ONArg(具强亲电子活性),而 NOHArg 本身亦具强亲电子活性,在 23℃1 当量氢氧化钠作用下,NOHArg 快速转变成 L-Cit,然而此时的 L-Arg 是稳定不变的。使用羟基胍、N-(N-羟咪基)六氢吡啶[N-(N-hydroxyamidino)piperidine, NHAP],动物实验发现亲核的过氧酸于室温下氧化 NHAP 成为氮氧化物,有可能

胍对过氧酸的反应能力低得多,因而在 NOS 活性位点于过氧化铁离子进一步反应之前,亲核性 $[\text{FeOOH}]^{2+}$ 快速地与 ON Arg 反应而生成 $[\text{FeO}]^{3+}$,故在整个 NO 生物合成过程中,NOS 结合位点上的血红素化学特征并没有变化,然而 $[\text{FeOOH}]^{2+}$ 在氧化过程的第二部分被亲电子的 ONArg 所截取。

从细胞色素 P_{450} 还原酶及其底物诱导的血红素激活过程,我们可类推出:在 NOS 作用下,L-Arg 介导的电子传递($\text{NADPH} \rightarrow \text{黄素} \rightarrow \text{血红素}$)过程也是一个合理的过程。不过, Ca^{2+} 合于 NOS I 中心部位的 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$,作为变构机制,使 NOS I C 末端还原酶结构域与 N 末端氧化酶结构域发生重排,而促进电子从黄素传递至血红素。若 Ca^{2+} 与 CaM 是分开的,则 NOS 的结构域就不能发生重排,也就不会出现电子传递。 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 调节电子传递的机制,完美地说明了 NOS I、NOS II 是如何被细胞内 Ca^{2+} 流动所调控的:细胞内 Ca^{2+} 水平升高,导致 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 复合体形成,并与 NOS I、II 结合而启动 NO 生物合成过程。

2. NO 合成的重要抑制剂

左旋精氨酸类似物与左旋精氨酸发生竞争性抑制作用,而使 NO 合成减少。如: N^G -单甲基-L-精氨酸(N^G -monomethyl-L-arginine, L-NMMA)、 N^G -nitro-L-精氨酸(N^G -nitro-L-arginine, L-NNA)、 N^G -L-精氨酸甲酯(N^G -nitro-L-arginine methyl ester, L-NAME)、 N^G -氨基-L-精氨酸(N^G -aminino-L-arginine, L-NAA),其结构式如图 1-3 所示。

离体研究发现 L-NNA 对血管组织的抑制作用与 L-NMMA 相似,而且在离体和活体研究中,L-NIO (N-iminoethyl-L-ornithine),L-NNA 及它们的甲酯对血管组织的作用从数量上来讲与 L-NMMA 相似。L-NIO 是一种强力、快速作用、不可逆的抑制剂,而 L-NNA、L-NAME、L-NMMA 则作用较慢、较弱,且只能发挥可逆性的抑制作用;L-NMMA、L-NIO 及 L-NAME 均抑制内皮细胞的 NOS,尽管 L-NIO 比其他类似物的作用强约 5 倍,作用效果的差异可能与它们在血管组织上不同程度的吸收、分布或代