

· 专论与综述 ·

一氧化氮合酶与脓毒症的研究进展 *

史衍辉 夏璐 闫兵 张军 张永久[△]

(兰州军区乌鲁木齐总医院 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 脓毒症在外科临床工作中较常见,治疗相当困难。本文主要概述了一氧化氮合酶的基因定位、结构特点以及一氧化氮合酶与脓毒症的关系,进一步说明由一氧化氮合酶介导的一氧化氮生成与脓毒症关系密切,而选择性一氧化氮合酶抑制剂在脓毒症各阶段恰当的应用可能是有效治疗脓毒症、降低病死率的一个重要途径,也将成为今后研究的热点。

关键词 一氧化氮合成酶(NO synthase NOS) 脓毒症

中图分类号 R631.2 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273 (2011) 07-1366-03

The research progress of NOS and Sepsis*

SHI Yan-hui, XIA Lu, YAN Bing, ZHANG Jun, ZHANG Yong-jiu[△]

(Urumuqi General Hospital of Lanzhou Military Region of PLA Urumuqi 830000, China)

ABSTRACT: Sepsis is commonly seen in clinical surgery, it is very difficult to be cured. The genic location and the structure features of NOS (nitric oxide synthase) and the relationship between NOS and sepsis were reviewed in this article, we found that sepsis was related closely with the producing of nitric oxide induced by selective nitric oxide synthase inhibitors, and appropriate using of selective nitric oxide synthase inhibitors in each phase of sepsis might be an important way to cure sepsis and cut down its mortality, which could be a focus in future study.

Key words: NOS; sepsis

Chinese Library Classification: R631.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)07-1366-03

脓毒症(sepsis)是全身炎症反应的表现。当脓毒症合并有器官灌注不足的表现,如乳酸中毒、少尿、急性神志改变等,则称为脓毒综合征(sepsis syndrome)。脓毒综合征在外科较常见,而且在治疗上相当困难。关于脓毒症的相关细胞因子的研究已有不少进展,自从1987年Palmer和Ignarro证实一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种内皮源性舒张因子,大量的动物及临床实验已确NO在脓毒症中有重要作用。NO是一氧化氮合酶(NO synthase NOS)催化L-精氨酸合成的。近年来研究表明,由NOS介导的NO生成与脓毒症的发展及预后关系密切。本文将NOS在脓毒症中的作用作一综述。

1 NOS 基因定位及特点

由于NO的半衰期极短,体内NO生成的主要限速因素是NOS,故通过对NOS的研究来了解NO的分布和量就极为重要。NOS在体内分布广泛,散在于血管内皮细胞、平滑肌细胞、神经细胞、肾上腺细胞、胰腺细胞、血小板、中性粒细胞和巨噬细胞等。NOS是多功能氧化还原酶系,有3种同工酶。最先被发现的一氧化氮合酶是在神经组织内,即神经型一氧化氮合酶,故称为NOS1(neuronal NOS, nNOS)而存在于血管内皮等处的内皮型一氧化氮合酶则是第三种被发现的,故称为NOS3(endothelial NOS, eNOS)。nNOS和eNOS合称为构成型NOS(constitutive NOS, cNOS),它们受钙离子调节。诱导型一氧化氮

合酶NOS2(inducible NOS, iNOS)最早在粒细胞中发现,它在细胞受到刺激而被激活后才发挥功效,并且所生成的一氧化氮数量亦较多。其中nNOS和iNOS分布于胞浆,eNOS在于细胞膜。

NOS的3种同工酶氨基酸顺序有50%~60%是同源的^[1]。人nNOS基因位于第12号染色体长臂(12q24.2-12q24.31)上,由5'端不同的外显子剪接到一个共同的第外显子,29个外显子,编码经不同剪接的mRNA,共同翻译成约160kDa的蛋白质^[2-3]。人eNOS基因位于第7号染色体长臂(7q36)上,全长约21kDb,含有26个外显子和25个内含子,其编码的mRNA有4052nt,其表达产物-eNOS为135kin酶蛋白^[4]。人iNOS基因位于第17号染色体长臂(17q11.2-17q12.)上,全长37kb,含26个外显子和25个内含子^[5]。其分子量约为131KDa,推测其编程的多肽链是由1153个氨基酸残基组成,在TATA盒序列位于转录起始点上游30b处^[6]。人iNOS基因的所有内含子/外显子的界限严格遵守已知的GT/AG,供体/受体规则。尽管其编码区(尤其辅因子结合位点)的结构与nNOS和eNOS非常相似,但iNOS基因在外显子22~26上有多个带^[7]。

2 NOS 的结构及表达

NOS为黄素类蛋白质,是由两个相同亚基组成二聚体。NOS单体N端有L-Arg、血红素、四氢叶酸结合位点,C端有黄

* 基金项目 兰州军区医药卫生科研基金资助项目(LXH-2005019)

作者简介 史衍辉(1972-),男,硕士,主治医师,研究方向:普外.Tel:13899918933 E-mail: pwksyh@126.com

[△]通讯作者 张永久(1970-),男,主任医师,硕士生导师,研究方向:普外基础与临床。Tel: 13999936053

(收稿日期 2010-09-23 接受日期 2010-10-30)

素等辅基结合位点。N 端为氧化酶区, C 端为还原酶区。NOS 酶蛋白需要 5 种辅因子, 即腺嘌呤二核苷酸(NADPH)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、黄素单核苷酸(FMN)、四氢叶酸(FH_4)、Ca。NOS 的三种亚型都有一个共通的羧基末端还原酶区和一个共通含有原血红素辅基的氨基末端加氧酶区, 在中间连接着蛋白质及钙调素结合区。这个结合就好像是一个分子的开关, 容许电子由还原酶区的黄素辅基流动至原血红素, 这样可以帮助将 O_2 及精氨酸转化为一氧化氮及胍氨酸。每一种异构体的加氧酶区都包含一个四氢叶酸(FH) 辅基, 是有效产生一氧化氮的重要因素。

最早认为 cNOS 仅在神经元、血管内皮细胞表达, 而现在发现 cNOS 是许多正常组织中基本存在的一种酶, 无活性状态存在。当细胞内钙离子水平升高时被激活。随着钙离子进入细胞, 钙与钙调素结合激活 NO 合酶。这些同工酶不断地合成低水平的 NO, 直到细胞内钙离子水平下降。其中 eNOS 产生的 NO 可扩张血管、调节压力、改变局部血流、抑制血小板聚集、抗平滑肌细胞增殖。相反, 诱导型 NO 合酶(iNOS) 存在于应激细胞中, Llorens 等^[8] 认为脓毒症休克时过多的 NO 主要由血管内皮、肥大细胞、巨噬细胞和白细胞等产生。Visigalli 等^[9] 发现肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素- 1β 、 γ -干扰素或脂多糖通过激活 NF- κ B 促进 L-Arg 的转运、上调 iNOS 基因表达、激活 iNOS, 这时 NO 合成依赖于转录调节而不是钙离子进入细胞; 包括内毒素、白介素-1、干扰素-R 和肿瘤坏死因子在内的刺激原可以诱导 iNOS 的表达。如果有足够的作用底物, iNOS 可以持续合成高水平的 NO, 参与病理生理过程, 在炎症、免疫反应中起细胞毒与细胞抑制作用。

3 NOS 与脓毒症

nNOS 来源于神经细胞, 其产生的 NO 以递质形式参与神经信号传导和内分泌调节, 目前尚未证实与脓毒症有密切关系。然而, iNOS 以及 eNOS 在脓毒症病理生理过程中起十分关键的作用。一般来说, 脓毒症总是伴随着 iNOS 蛋白表达的上调 and 随之而来的 NO 的升高^[10]。大量文献证实, 源于 iNOS 高表达所产生的过量 NO 与脓毒症时呼吸循环障碍密切相关^[11-12]。脓毒症休克大鼠实验中, 主动脉外膜 iNOS 的活性较对照组高约 2.8 倍, 外膜 iNOS mRNA 水平较对照组高约 6 倍, 血浆和血管外膜 NO 含量均明显增高, 推测 iNOS 升高导致了血流动力学紊乱及心功能抑制^[13]。临床研究亦表明脓毒症患者血浆中 NO 的代谢产物-硝酸盐和亚硝酸盐的浓度显著升高^[14-15]。进一步研究证实, 内毒素、TNF α 及其它一些细胞因子能显著增 iNOS mRNA 及蛋白质的表达^[16-17]。另一方面, 抑制 iNOS 的活性可显著提高脓毒症休克动物及病人血管低反应性, 纠正低血压。将小鼠 iNOS 基因敲除, 内毒素将不能引起严重低血压^[18]。由此可见, iNOS 诱导所释放过量 NO 是引起脓毒症血管低反应性及严重低血压的原因^[19]。

与 iNOS 作用不同, 内皮细胞源性 NO 合成酶(eNOS) 被认为对机体具有保护作用^[20]。eNOS 通过一个复杂的氧化-还原反应将左旋精氨酸上的胍基氮催化形成 NO, 这一过程中需要氧分子和还原型辅酶 II 以及许多辅因子, 包括: 焦磷酸化酶(FAD), 黄素单核苷酸(FMN), 血红素和四氢蝶呤[参与^[21]。可溶性鸟苷酸环化酶(cGMP) 可在许多组织中表达, 包括血管平滑肌细胞, 心肌细胞和血小板, 它是 NO 的重要靶分子^[22]。NO 由

血管内皮细胞弥散至血管平滑肌细胞, 并与可溶性鸟苷酸环化酶的亚铁血红素结合, 结果亚硝酰基血红素激活可溶性鸟苷酸环化酶, 使环鸟苷酸(cGMP) 增多, 引起血管平滑肌细胞舒张^[23]。血小板中的 cGMP 浓度升高可抑制血小板的聚集。

所以 eNOS 的适量表达具有调节血管张力、维持血管内皮功能及内环境稳定的作用。然而, 近年来研究证实, eNOS 密切参与感染性休克病理生理过程。Szabo 等研究指出, 在脓毒症休克中后期, eNOS 的表达被显著下调^[24]。不仅如此, Wang 等报道, 在感染性休克时, eNOS 蛋白质出现功能异常, 不但与 L-精氨酸结合生成 NO, 相反与 NADPH 结合增加, 产生大量超氧自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)^[25]。Tiefenbacher 等亦指出, 感染性休克时 eNOS 重要的辅因子四氢生物蝶呤(BH4) 合成减少, 细胞 BH4 浓度下降可引起 eNOS 合成 NO 不足, 相反生成大量的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ^[26]。细胞内 NO 与 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 平衡被打破, 大量活性氧可引起广泛组织细胞损伤并扩大全身炎症反应。令人感兴趣的是, eNOS 高表达的转基因动物对内毒素休克具有保护作用^[27]。由此可见, eNOS 蛋白质表达不足并且出现功能异常与脓毒症的发生发展及出现多器官功能障碍综合征具有密切的关系^[28]。

近年来, 基础和临床都对一氧化氮合酶抑制剂进行了大量研究。研究表明, NO 合成酶抑制剂能有效逆转脓毒症时血管低反应性和严重低血压, 其中 L-NMMA 是研究较多的 NOS 抑制剂。然而遗憾的是, 三期临床实验证实, L-NMMA 等非选择性 NO 合成酶抑制剂并不能有效降低感染性休克病死率^[29]。这可能与 L-NAME 同时抑制 iNOS 与 eNOS, 虽然缓解了高浓度的 iNOS 带来的低血压, 但同时抑制了 eNOS 对血管内皮保护性的作用, 加重脓毒症对血管内皮损伤, 总体上没有使脓毒症预后改善; AG 选择性抑制 iNOS, 而对 eNOS 影响少, 保留了 eNOS 的保护内皮功能作用, 故提脓毒症大鼠生存率。由此推断, 体内 iNOS 与 eNOS 之间表达水平的平衡可能是维持血管正常生理功能所必需, 脓毒症打破了体内 iNOS 与 eNOS 之间的平衡, 导致全身血管内皮损伤, 严重低血压, 多器官功能衰竭甚至死亡。

目前困难在于如何改进对 NO 合酶同工酶的选择, 通过一些药物来抑制 iNOS 的表达, 以便在脓毒症中有针对性地阻断 iNOS 的作用, 这样既能减轻或消除由 iNOS 合成的大量 NO 的病理损害, 又不影响 eNOS 合成调节正常生理功能的 NO。研究表明可以在 NO 合酶基因的表达(也许只是 iNOS) 和抑制 NO 合酶的活性两个层面阻断或减少 NO 的生成。近年来有研究表明胺基胍、褪黑素能降低 iNOS 的表达及活性, 减少 NO 和脂质过氧化物的水平^[30,31]。Chiao 等观察到, 给大鼠 iNOS 抑制剂 N-Allylsecoboldine, 可以缓解内毒素血症导致的急性肾功能衰竭, 从而提高大鼠的生存率^[32]。Wang^[34] 等采用临床上用来治疗类风湿性关节炎和其他自身免疫炎症性疾病的中药雷公藤的乙酸乙酯萃取部分, 在体内和体外分别检测其对于 NO 及 NO 合酶基因表达、转录的影响。结果表明雷公藤乙酸乙酯萃取部分及其主要活性成分雷公藤内酯在体外能显著抑制活化的腹膜巨噬细胞中产生的 NO, 反应了 iNOS mRNA 水平的下调。同时发现雷公藤内酯抑制了 iNOS 基因的启动子活性和 iNOS 转录调控因子 Oct-1 活性的诱导作用。

4 结语

脓毒症的不同发展阶段, 来源不同的 NO 可能在发病机理

上也可能有不同甚至相反的作用。脓毒症的不同阶段产生不同程度的 eNOS 和 iNOS。在相似脓毒症病人中,可能有一些病人因体内 iNOS 被诱导高表达产生过量 NO 并引起休克,而另一些病人情况却相反。另外,在脓毒性休克病人中,eNOS 结构和功能改变的程度在个体间可能存在差异,这可能是多器官功能障碍发生与否的重要影响因素。换言之,临床上,哪些病人需要在恰当的时机抑制 iNOS 活性,而另一些病人则需要改善 eNOS 功能。对这些问题的探索并根据 iNOS/eNOS 基因遗传变异特点将病人分类,对不同类型病人采取特异性治疗对策,可能是有效治疗脓毒症、降低病死率的一个重要途径。

参考文献 (References)

- [1] Forstermann U, Gath I, Schwarz P, et al. Isoform of nitric oxide synthase[J]. Biochem Pharm, 1995,50:132-133
- [2] Xie J, Roddy P, Rife TK, et al. Two closely linked but separable promoters for human neuronal nitric oxide synthase gene transcription[J]. Proc Nat Acad Sci, 1995,92:1242-1246
- [3] Xu W, Gorman P, Sheer D, et al. Regional localization of gene coding for human brain nitric oxide synthase to 12q24.2-24.31 by fluorescent in situ hybridization[J]. Cell Genet, 1993,64:62-63
- [4] Robinson LJ, Weremowicz S, Morton CC, et al. Isolation and chromosomal localization of the human endothelial nitric oxide synthase (NOS3) gene [J]. Genomics, 1994,19:350-357
- [5] Marsden PA, Heng HHQ, Duff CL, et al. Localization of the human gene for inducible nitric oxide synthase (NOS2) to chromosome 7q11.2-q12[J]. Genomics, 1994,19:183-185
- [6] Chartrain NA, Geller DA, Koty PP, et al. Molecular cloning, structure and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene[J]. Biochem, 1994,269:6765-6772
- [7] Kelly RA, Balligand JF, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function [J]. Circ Res, 1996,79:363
- [8] Lorens S, Nava E. Cardiovascular diseases and the nitric oxide pathway[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2003,1(3):335-346
- [9] Visigalli R, Bussolati, Sala R, et al. The stimulation of arginine transport by TNF alpha in human endothelial cells depends on NF-kappa B activation[J]. Biochim Biophys Acta, 2004,1664(1):45-52
- [10] Darcy Lidington, Fuyan Li. Deletion of neuronal NOS prevents impaired vasodilation in septic mouse skeletal muscle. Cardiovascular Research, 2007,(74):151-158
- [11] Kirksboen KA and Strant A. The role of nitric oxide in sepsis-An overview [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 1999, 43:275-288
- [12] Guy C, Brown, Vilmante Borutaite. Inhibition of mitochondrial respiratory complex I by nitric oxide, peroxynitrite and S-nitrosothiols[J]. Biochemistry et Biophysica Acta, 2004, 1658:44-49
- [13] 贾月霞. 败血症休克大鼠血管外膜 L-精氨酸 / 一氧化氮合酶 / 一氧化氮通路的变化[J]. 中国病理生理杂志, 2007,23(3):417-422
Jia Yue-xia, Pan Chong-shui, Yang Jing-hui, et al. Changes of L-arginine, NOS / NO pathway in adventitia of rats with sepsis. [J]. Chinese Journal of Pathophysiology, 2007, 23 (3): 417- 422
- [14] Annane D, Sanquer S, Sebilly V, et al. Compartmentalised inducible nitric oxide synthase activity in septic shock [J]. Lancet, 2000,355: 1143-1148
- [15] Sato S, Karniyama Y, Kitade H, et al. Nitric oxide production and hepatic dysfunction in patients with postoperative sepsis[J]. Clin Exp Pharmacol, 2000,27:197-201
- [16] Liu SF, Barnes PJ, Evans TW. Time course and cellular localization of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase messenger-ger mRNA expression in the rat in vivo [J]. Crit Care Med, 1997,25:512-518
- [17] Okamoto I, Abe M, Shibata K, et al. Evaluating the role of inducible nitric oxide synthase using a novel and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in septic injury produced by cecal ligation and puncture [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162:716-722
- [18] Bogdan C, Rollinghoff M and Diefenbach. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity [J]. Curr Opin Immunol, 2000, 12:61-76
- [19] Feihl F, Waeber B, Liaudet L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? [J]. Pharmacol Ther, 2001,91:179-213
- [20] Hattori, Kasaik, Gross SS, NO suppresses while peroxynitrite sustains NF-kappa B: a paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO[J]. Cardiovasc Res, 2004,63(1):31-40
- [21] Marletta MA, Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis[J]. Cell, 1994,78:927~9931
- [22] Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1990,30:535~560
- [23] Ignarro LJ. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. Circ Res, 1989,65:1~21
- [24] Szabo C, Mitchell JA, Thiemermann C, et al. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenalin precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock [J]. Br J Pharmacol, 1993,108:786-792
- [25] Wei Han Wang, Shuibang Wang, Liang Yan, et al. Superoxide production and reactive oxygen species signaling by endothelial nitric oxide-synthase [J]. J Biol Chem, 2000, 275(22):16899-16903
- [26] Tiefenbacher CP. Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001,280:H2484-2488
- [27] Yanashita T, Kawashima S, Ohashi Y, et al. Resistance to endotoxin shock in transgenic mice overexpressing endothelial nitric oxide synthase[J]. Circulation, 2000,101:931-937
- [28] Vallet B. Bench-to-bedside review: Endothelial cell dysfunction in severe sepsis, a role in organ dysfunction? [J]. Crit Care, 2003,7: 130-138
- [29] Okamoto I, Abe M, Shibata K, et al. Evaluating the role of inducible nitric oxide synthase using a novel and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in septic injury produced by cecal ligation and puncture [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162:716-722
- [30] Faik Yaylak, Hakan Canbaz. Liver tissue inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression and lipid peroxidation in experimental hepatic ischemia reperfusion injury stimulated with lipopolysaccharide: The role of aminoguanidine [J]. Journal of Surgical Research, 2008,148: 214-223
- [31] Germaine Escames, Francisco Ortiz, et al. Age-dependent lipopolysaccharide-induced iNOS expression and multiorgan failure in rats: Effects of melatonin treatment[J]. Experimental Gerontology[J]. 2006,41:1165-1173
- [32] Chin-Wei Chao, Shoen-Sheng Lee, et al. N-Allylsaccharibol as a novel agent prevents acute renal failure during endotoxemia [J]. European Journal of Pharmacology, 2006, 535:291-300
- [33] Wang B, Ma L, Tao X, et al. An Active Component of the Chinese Herbal Remedy Tripterygium Wilfordii Hook F, Inhibits production of nitric oxide by decreasing inducible nitric oxide synthase gene transcription[J]. Arthritis Rheumat, 2004, 50:2995-3003