

# 硝化应激与心血管疾病

徐文晶 韩 薇

**【摘要】** 硝化应激是导致心血管系统结构、功能异常的重要原因之一。硝化应激在动脉粥样硬化、心力衰竭、高血压、缺血-再灌注损伤、心房颤动等病理过程中起着关键作用。深入研究特定蛋白质硝化与心血管疾病的关系,对于揭示心血管疾病的发病机理、预防和治疗具有重要实际意义。

**【关键词】** 硝化应激;硝化修饰;一氧化氮

DOI:10.3969/j.issn.1673-6583.2012.03.008

内源性一氧化氮(NO)以及 NO 衍生物可以选择性地作用于蛋白质分子位点,使蛋白质得到或者失去相应的功能,从而对细胞生理活动进行调控。这种类似于磷酸化或者乙酰化的蛋白调控方式被称为蛋白质的硝化修饰<sup>[1]</sup>。

硝化修饰主要以两种形式出现,一种为半胱氨酸巯基的 S-亚硝基化,另一种为酪氨酸残基的硝基化。蛋白质的硝化修饰常常在应激条件下随着活性氧簇(ROS)及活性氮(RNS)的增加而产生,并对细胞产生多种毒性作用,引起细胞损伤或凋亡,产生硝化应激反应<sup>[2]</sup>。

硝化应激除了在胰岛素信号转导、线粒体能量代谢、信使核糖核酸(RNA)转录以及内质网功能等基本生命过程中发挥重要作用外,还与心血管系统疾病的发生、发展关系密切<sup>[3]</sup>。

## 1 硝化应激与动脉粥样硬化

在动脉粥样硬化组织中由硝化应激所产生的硝化产物含量是正常组织的 6 倍,而在动脉粥样硬化患者的细胞中过氧化亚硝酸盐(ONOO<sup>-</sup>)的含量是正常人细胞中的 90 倍<sup>[4]</sup>。在动脉粥样硬化病变的各个时期中,损伤部位都可以检测到诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的过表达以及酪氨酸残基的硝基化,此外在内膜斑块、复合增生细胞斑块及无细胞纤维斑块中也可检测到硝化酪氨酸的存在<sup>[5]</sup>。在人类动脉粥样硬化组织中,一方面硝化应激产生的 ONOO<sup>-</sup>能够引起脂质过氧化损伤动脉血管内皮细胞,刺激血管平滑肌细胞增殖,导致血管平滑肌细胞凋亡并引起血管重构;另一方面硝化应激能够使载脂蛋白 AI 或 AII 硝基化,从而降低巨噬细胞和内皮细胞携带胆固醇的能力,导致泡沫细胞生成,诱发动脉粥样硬化形成<sup>[6]</sup>。

在高胆固醇血症时,硝化应激将会引起促炎症因子的释放,黏附分子表达增加,白细胞转运增强,血管通透性增加,最终导致动脉粥样硬化形成<sup>[7]</sup>。醛固酮拮抗剂与血管紧张素转换酶抑制剂的联合应用,可降低血管内过氧化物的生成,从而起到内皮保护作用。同时还可以通过降低硝化应激水平,减小动脉粥样斑块的面积<sup>[8]</sup>。目前,单巨噬细胞内硝化应激的水平可能成为检测早期动脉粥样硬化的指标之一,具有重要的临床意义与应用价值<sup>[9]</sup>。

## 2 硝化应激与心力衰竭

在急性和慢性心力衰竭动物模型及患者心脏中都有 ROS(包括过氧化物、过氧化氢、羟自由基)生成的增加<sup>[10]</sup>。ROS 与超氧阴离子作用生成 ONOO<sup>-</sup>,可迅速使酪氨酸残基硝基化,形成比较稳定的终末代谢产物 3-硝基酪氨酸(3-NT),导致心肌细胞线粒体功能障碍,引发心力衰竭。此外,由硝化应激造成 ROS 与 RNS 之间的失衡也是诱发心力衰竭的重要原因之一<sup>[11]</sup>。硝化应激还能引起左室及血管系统功能障碍,诱发心力衰竭<sup>[12]</sup>。除了以上机制外,有研究表明在心力衰竭患者的肌浆内质网 Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶(SERCA)中发现了硝化蛋白的存在。SERCA2 $\alpha$ 的硝化修饰将使 SERCA 失活,引起细胞内钙紊乱从而导致心力衰竭<sup>[2]</sup>。虽然引起心力衰竭的特定蛋白硝化位点尚不明确,但使用抗硝化药物减少细胞内硝化应激水平将成为治疗心力衰竭的重要途径之一<sup>[13]</sup>。

## 3 硝化应激与高血压病

硝化应激在高血压病的病理生理过程中起着重要作用,但其发挥作用的具体机制并不明确<sup>[14]</sup>。在血管系统中血管紧张素 II 依赖的还原型辅酶 II(NADPH)氧化酶可产生大量的 ROS,尤其是过氧化氢,诱发的硝化应激可以通过维持 NADPH 氧化酶的活化、促进炎症基因的表达导致血管系统的损伤、细胞外基质的重组及血管平滑肌细胞的肥大和

增生,使血管系统功能障碍从而导致高血压的发生<sup>[15]</sup>。另外,硝化应激可降低 NO 的生物利用度,加重血管内皮的损伤,可诱发血管重构,使血管的反应性增加并升高血压。通过对临床病例的研究发现,高血压病患者血清中的硝化产物水平显著升高并与病情进展程度密切相关<sup>[16]</sup>。高血压患者血清中硝化产物水平有望成为衡量患者病情严重程度的指标之一。抗氧化-硝化药物的临床试验为药物治疗高血压病开拓了新的思路。

#### 4 硝化应激与缺血-再灌注损伤

在器官缺血-再灌注发生时将会引起 NO 的释放并且产生大量的 ROS 和 RNS,各种表型的 NOS 活化并协同氧化应激引起硝化应激<sup>[17]</sup>。一方面,RNS 作为自由基直接影响细胞膜结构,造成 DNA 损伤破坏细胞完整性,过量激活下游的二磷酸腺苷(ADP)聚核糖酶导致心肌细胞能量耗竭和细胞凋亡。另一方面,过量的 NO 还可与 ROS 形成过氧化亚硝酸盐直接造成心肌细胞的损伤<sup>[18]</sup>。增加 NO 的生物利用度可以对抗缺血-再灌注损伤及左室重构<sup>[17]</sup>。内皮型一氧化氮合成酶(eNOS)基因敲除的小鼠能够显著减少心肌梗死面积,改善心脏功能<sup>[19]</sup>。虽然 eNOS 参与心肌缺血-再灌注损伤的机制尚不明确,但由于 eNOS 是体内 RNS 的主要合成酶,推测这种损伤作用很可能与引起心肌细胞中蛋白质的硝化应激有关。缺血-再灌注损伤与硝化应激的具体机制还有待于进一步研究。

#### 5 硝化应激与心房颤动

在研究中发现,硝化应激在心房颤动的发生、发展及维持过程中起着重要作用,提示大量产生的 RNS 通过影响心房电重构从而导致心房颤动的触发及维持<sup>[20]</sup>。动物实验也证实,应用 ROS 清除剂可以抑制心肌电重构,从而减少心房颤动<sup>[21]</sup>。抗氧化药物可通过抑制心房重构而减少心房颤动发生。有研究证明 L 型钙通道、钠通道、瞬间外流的钾通道都对 RNS/ROS 失衡状态敏感<sup>[22]</sup>。抗氧化剂谷胱甘肽抑制剂能够减少心房组织中  $Ca^{2+}$  电流密度,提示离子通道功能在心房颤动发生维持过程中起着一定的作用,而硝化应激又可以通过影响离子通道的功能对心房颤动的发生维持起作用<sup>[23]</sup>。另外,在心房颤动患者的右心房中发现 eNOS/iNOS 的失调,引起 3-NT 的蓄积从而诱导心肌细胞凋亡,引起心房重构<sup>[24]</sup>。硝化应激与心房颤动之间的关系还存在较多空白,对此领域的进一步研究具有重要意义。

#### 6 硝化应激与衰老

衰老是所有的器官系统功能渐进性下降的过程,

是引起多种疾病的危险因素。衰老个体中发现的被硝化蛋白是线粒体锰-超氧化物歧化酶(Mn-SOD),目前 Mn-SOD 的硝化程度已作为衡量血管衰老程度的指标<sup>[25]</sup>。在所有的衰老理论中,最新的学说就是自由基学说。这意味着衰老与自由基和高水平的氧化活性分子的作用有关。不仅是 ROS,与此同时还产生过量的 RNS 即出现了硝化应激也与衰老相关<sup>[26]</sup>。此外硝化应激还可以通过硝化修饰减低  $Ca^{2+}$ -ATP 酶的活力。在衰老的费舍尔-344 型(Fischer-344)大鼠心脏中被硝化的  $Ca^{2+}$ -ATP 酶的数量较年轻大鼠显著增加,并且还发现了 3 个新的酪氨酸硝化位点<sup>[27]</sup>。氧化应激和硝化应激可通过激活下游核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)调控 ADP 核糖聚合酶(PARP)及细胞内还原状态和抗氧化应激相关的长寿基因和转录因子等引起衰老个体的心血管功能障碍<sup>[28]</sup>。衰老可以加速血管的硝化应激,其产生的 ROS 和 RNS 可以损伤血管及肾脏功能,又加速了组织和器官的衰老<sup>[29]</sup>。可见,硝化应激发挥单独作用或者联合其他因素发挥协同作用都与衰老有密不可分的关系。

#### 7 硝化生物学的研究展望

正是由于 RNS 或者 ROS 的高反应性和短半衰期,目前的研究手段还不能精确地测量或者鉴别究竟是由何种 RNS 诱发了硝化应激<sup>[2]</sup>。虽然电子顺磁共振(EPR)是自由基检测的金标准,但由于 EPR 对研究对象的特殊要求、容易与媒介发生反应,使结果产生较高的假阳性率、检测灵敏度低仅为  $10^{-6}$  mol/L 等缺陷使其在硝化生物学方面的应用受限。

此外,在硝化修饰的定位和定量方面也缺乏有效的方法学。虽然有少数抗体能够检测 3-NT,但是对于 S-亚硝化的检测一直没有很好的方法。由于 S-亚硝化修饰产物的不稳定性,因此细胞或组织内的 S-亚硝基化研究常常使用“生物素开关”化学反应法,即与半胱氨酸结合的 NO 可被更稳定的生物素标签所标志,随后这种标签能被后续的蛋白质印迹法或者质谱所检测。但这种方法的敏感性较低,检测蛋白的 S-亚硝基化又常常需要引入别的亚硝化物质导致研究结果的准确性受到影响而使其方法的开展受限。将来在测硝化生物学检测方法学上的突破,将促进本领域的研究发展并加深对硝化生物学的理解。

综上所述,硝化应激不仅可以介导蛋白质翻译后修饰发挥基本的生物学功能,而且还在疾病发生、发展的过程中扮演重要角色,并广泛存在于心肌炎、心源性休克等心血管系统疾病中。在疾病中硝化应激通过影响细胞中酶的活性和功能、细胞硝化位点、细胞线粒体能量代谢、离子通道功能等多

个方面来影响疾病的发生、发展。尽管对硝化生物学的认识有其局限性,但深入研究特定蛋白质硝化与疾病的关系可为揭示相关疾病的发病机理、预防和治疗心血管系统疾病提供新的途径和思路。

### 参 考 文 献

- [1] Hess DT, Matsumoto A, Kim SO, et al. Protein S-nitrosylation: purview and parameters [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6(2):150-166.
- [2] Habib S, Ali A. Biochemistry of nitric oxide[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2011, 26(1):3-17.
- [3] White PJ, Charbonneau A, Cooney GJ, et al. Nitrosative modifications of protein and lipid signaling molecules by reactive nitrogen species [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(6):E868-E878.
- [4] Hermo R, Mier C, Mazzotta M, et al. Circulating levels of nitrated apolipoprotein A-1 are increased in type 2 diabetic patients[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2005, 43(6):601-606.
- [5] Pennathur S, Bergt C, Shao B, et al. Human atherosclerotic intima and blood of patients with established coronary artery disease contain high density lipoprotein damaged by reactive nitrogen species [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(41):42977-42983.
- [6] Sucu N, Unlu A, Tamer L, et al. 3-Nitrotyrosine in atherosclerotic blood vessels [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2003, 41(1):23-25.
- [7] Deepa PR, Varalakshmi P. Favourable modulation of the inflammatory changes in hypercholesterolemic atherogenesis by a low-molecular-weight heparin derivative [J]. *Int J Cardiol*, 2006, 106(3):338-347.
- [8] Imanishi T, Ikejima H, Tsujioka H, et al. Addition of eplerenone to an angiotensin-converting enzyme inhibitor effectively improves nitric oxide bioavailability [J]. *Hypertension*, 2008, 51(3):734-741.
- [9] Deng T, Xu K, Zhang L, et al. Dynamic determination of Ox-LDL-induced oxidative/nitrosative stress in single macrophage by using fluorescent probes [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(11):1425-1432.
- [10] Tousoulis D, Papageorgiou N, Briasoulis A, et al. Conflicting effects of nitric oxide and oxidative stress in chronic heart failure: potential therapeutic strategies[J]. *Heart Fail Rev*, 2012, 17(1):65-79.
- [11] Hare JM, Beigi F, Tziomalos K. Nitric oxide and cardiobiology-methods for intact hearts and isolated myocytes[J]. *Methods Enzymol*, 2008, 441(1):369-392.
- [12] Parisis JT, Kourea K, Andreadou I, et al. Effects of Darbepoetin Alfa on plasma mediators of oxidative and nitrosative stress in anemic patients with chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. *Am J Cardiol*, 2009, 103(8):1134-1138.
- [13] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1):44-84.
- [14] Kavdia M. Mathematical and computational models of oxidative and nitrosative stress [J]. *Crit Rev Biomed Eng*, 2011, 39(5):461-472.
- [15] Escobales N, Crespo MJ. Oxidative-nitrosative stress in hypertension [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, 3(3):231-246.
- [16] Zhou L, Xiang W, Potts J, et al. Reduction in extracellular superoxide dismutase activity in African-American patients with hypertension [J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, 41(9):1384-1391.
- [17] Otani H. The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(8):1913-1928.
- [18] Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70(2):181-190.
- [19] Sun J, Murphy E. Protein S-nitrosylation and cardioprotection[J]. *Circ Res*, 2010, 106(2):285-296.
- [20] Neuman RB, Bloom HL, Shukrullah I, et al. Oxidative stress markers are associated with persistent atrial fibrillation [J]. *Clin Chem*, 2007, 53(9):1652-1657.
- [21] Shiroshita-Takeshita A, Schram G, Lavoie J, et al. Effect of simvastatin and antioxidant vitamins on atrial fibrillation promotion by atrial-tachycardia remodeling in dogs [J]. *Circulation*, 2004, 110(16):2313-2319.
- [22] Trebak M, Ginnan R, Singer HA, et al. Interplay between calcium and reactive oxygen/nitrogen species: an essential paradigm for vascular smooth muscle signaling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2010, 12(5):657-674.
- [23] Carnes CA, Janssen PM, Ruehr ML, et al. Atrial glutathione content, calcium current, and contractility [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(38):28063-28073.
- [24] Han W, Fu S, Wei N, et al. Nitric oxide overproduction derived from inducible nitric oxide synthase increases cardiomyocyte apoptosis in human atrial fibrillation [J]. *Int J Cardiol*, 2008, 130(2):165-173.
- [25] van der Loo B, Labugger R, Skepper JN, et al. Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(12):1731-1744.
- [26] Oliveira BF, Nogueira-Machado JA, Chaves MM. The role of oxidative stress in the aging process [J]. *Scientific World Journal*, 2010, 10:1121-1128.
- [27] Knyushko TV, Sharov VS, Williams TD, et al. 3-Nitrotyrosine modification of SERCA2a in the aging heart: a distinct signature of the cellular redox environment [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(39):13071-13081.
- [28] Csiszar A, Pacher P, Kaley G, et al. Role of oxidative and nitrosative stress, longevity genes and poly(ADP-ribose) polymerase in cardiovascular dysfunction associated with aging [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2005, 3(3):285-291.
- [29] Csiszar A, Toth J, Peti-Peterdi J, et al. The aging kidney: role of endothelial oxidative stress and inflammation [J]. *Acta Physiol Hung*, 2007, 94(1-2):107-115.

(收稿:2011-12-29 修回:2012-02-15)

(本文编辑:朱 映)