

文章编号: 1001-098X(2000)04-0170-04

一氧化氮与电离辐射

龚守良

(白求恩医科大学卫生部放射生物重点实验室,吉林长春 130021)

摘要: 一氧化氮(NO)的发现奠定了细胞信息传递的全新概念,即一个细胞产生的气体信号可穿透细胞膜调节另一个细胞的功能。NO具有独特的理化性质和生物学特性。体内NO是由L-精氨酸与O₂在NO合酶(NOS)的作用下合成的。NOS主要有3种亚型,即内皮型(eNOS)、神经元型(nNOS)和诱导型(iNOS),它们受Ca²⁺、钙调蛋白、磷酸化和NO的调节。NO生物学作用广泛,且具有双向性。NO在体外可引起细胞的辐射敏感性,但在体内主要具有辐射防护作用。

关键词: 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 电离辐射

中图分类号: R811.5 **文献标识码:** A

早在19世纪60~70年代,人们就发现外源性一氧化氮(nitric oxide, NO)供体有机硝酸酯治疗心肌缺血收到良好的效果。19世纪末,硝酸甘油已在心肌缺血发作的治疗中得到应用,但还不了解其作用机制。直到20世纪60年代,研究者发现机体在生理情况下可产生和排泄亚硝酸盐(NO₂⁻)与硝酸盐(NO₃⁻)。进入70年代,美国Murad F发现硝基酯类药物及外源性NO使环鸟苷酸(cGMP)增高,血管扩张和血小板抑制。到了80年代初,美国Furchgott RF在多年研究乙酰胆碱(Ach)舒张血管作用的基础上,提出血管内皮细胞分泌的内皮衍生舒张因子(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)是Ach诱发动脉平滑肌舒张的必需物质。1986年, Furchgott RF和美国Ignarr LJ几乎同时提出NO可能与EDRF为同一物质或其组份之一。1987年,英国Moncada S认定NO就是EDRF,从而,证实了NO在体内的存在及其重要意义。此后,NO领域的研究异常活跃,相继证实硝基酯类药物是外源性NO供体,L-精氨酸(L-Arg)是内源性NO前体。1991年,美国Bredt DS从大鼠小脑组织中克隆出NO合酶(NOS)。至此,全面揭示了生物体内L-Arg-NOS-NO系统。1998年, Furchgott RF, Ignarro LJ, Murad F三人由于发现NO作用获诺贝尔生理学或医学奖,因而奠定了细胞信息传递的全新概念,即一个细胞产生的气体信号可穿透细胞膜调节

另一个细胞的功能,与传统的细胞分子通过细胞膜或细胞内特异性受体结合而引起的信号传递途径迥然不同。

1 NO的生物学特性及其合成和代谢

NO具有独特的理化性质和生物学特性,无色,微溶于水,半寿期3~5s,是脂溶性较强的气体分子,能通过生物膜快速扩散,也就是从一个细胞产生的气体信号可穿透细胞膜调节另一个细胞的功能,起到自分泌和旁分泌的作用。因此,NO可被认为是一种第一和第二信使分子。

体内NO是由L-Arg与O₂在NOS的作用下合成的。首先,NOS接受还原型辅酶II(NADPH)提供的电子,使其辅基黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)/黄素单核苷酸(FMN)还原,还原型NOS在Ca²⁺/CaM(钙调蛋白)和O₂的共同作用下,L-Arg羟化为中间产物N^o-羟基-L-Arg,再进一步氧化为NO和瓜氨酸。生成的NO极不稳定,很快氧化成NO₂⁻和NO₃⁻。

NO能与含Fe²⁺血红素基团的蛋白质相结合,产生较稳定的亚硝酰基血红素蛋白复合物。当NO与含血红素的鸟苷酸环化酶(GC)结合,激活的GC使细胞产生大量cGMP而引发一系列的生物学效应。NO具有细胞毒作用^[1],可通过以下几种方式发生其作用:①NO与超氧阴离子(O₂⁻)结合,形成超氧亚硝酸根离子(ONOO⁻),一旦在低于生理pH条件下,立即分解。OH和NO₂^o两种自由基,具有很大的细胞毒性;②NO引起核酸的亚硝酰化,导致DNA链断裂;③NO与一些酶分子的铁-硫中心结

收稿日期: 2000-05-15

作者简介: 龚守良(1945-),男,吉林长春人,白求恩医科大学卫生部放射生物重点实验室教授,博士生导师,主要从事辐射生物效应的研究。

审校者: 白求恩医科大学卫生部放射生物重点实验室 刘树铮

合,发生一系列生化改变^④ NO还介导谷氨酸的细胞毒性,损伤组织细胞。

2 NOS的生物学特性及其调节

NOS是 NO合成的关键酶,现已从许多组织细胞中被纯化、克隆和表达。NOS主要有内皮型(endothelial NOS, eNOS)、神经元型(neuronal NOS, nNOS)和诱导型(inducible NOS, iNOS)3种亚型,前两种合称为结构型 NOS(constitutive NOS, cNOS),也称原生型 NOS。此3种亚型最初是分别在内皮细胞、小脑神经元和巨噬细胞发现的,现已发现存在于机体许多组织细胞^[2]。

NOS的3种亚型均是由2个相同亚基组成的二聚体,其羧基端与细胞色素P450还原酶相似,含有NADPH、FAD和FMN的结合序列;氨基端含有血红素、CaM、四氢生物蝶呤(BH₄)及L-Arg的结合序列,但其定位不明确。eNOS和nNOS与CaM结合依赖于细胞内Ca²⁺浓度的增高,而iNOS在静息时的细胞内Ca²⁺浓度即可与CaM结合^[3]。NOS还受其磷酸化的调节,磷酸化的NOS活性降低;蛋白激酶C(PKC)等物质促进NOS磷酸化,而Ca²⁺/CaM促进其去磷酸化。另外,NO介导NOS活性的抑制作用,NO与NOS相互作用生成稳定的血红素-NO复合体,使NOS活性下降,达到反馈调节NO合成的目的。

3 NO生物学作用的广泛性和双向性

NO的生物学作用广泛,对心血管、神经、呼吸、消化、泌尿及免疫系统等均发挥作用。然而,NO具有双向作用,其生成不足或过量,可引起这些系统的异常而发生疾病。

3.1 对心血管系统的作用

内皮细胞产生的NO主要由扩张血管物质如ACh、缓激肽等作用所致。产生的NO很快扩散至邻近的血管平滑肌细胞,激活GC,使cGMP升高而促进平滑肌松弛,调节局部组织的血流和血压;基础水平的NO能够调节脑、心、肺、胃肠道、肾等器官的血流。另外,内皮细胞产生的NO通过抑制血小板的粘附和聚集作用而调节血液凝固^[4]。

在机体发生炎症时,刺激白细胞(如巨噬细胞)产生NO,对细菌有毒性作用,这是有效的一面;但细菌感染导致败血症和有效循环血量不足时,释放大量NO,引起血管扩张,血压下降,甚至休克,这是

不利的一面^[5]。

3.2 对神经系统的作用

NO不仅在神经系统广泛存在,而且作为信使分子,对许多神经活动发生影响。NO可能作为NANC(非肾上腺非胆碱)能神经递质而对胃肠道平滑肌产生松弛作用,并引起大脑动脉舒张而达到调节血流的功能。NO参与学习和记忆功能,而且在神经发育方面起重要作用。另外,NO介导嗅觉、视觉及痛觉的传入,与吗啡耐受有关。NO还参与下丘脑和垂体神经肽的释放^[6]。

然而,大剂量NO则具有神经毒性^[1]。NO介导谷氨酸的神经毒性作用。当突触前释放过量的谷氨酸时,通过激活突触后NMDA(N-甲基-D-天冬氨酸)受体,细胞内Ca²⁺浓度增高,激活NOS神经元和胶质细胞,产生过多NO,使其神经元死亡。死亡的神经元属非NOS神经元,自身却能抵抗NMDA毒性,不受NO之侵害。

3.3 对免疫系统作用

已经发现,除巨噬细胞外其他许多免疫细胞受致炎因子或细胞因子刺激,诱导NOS活性,产生NO。巨噬细胞未受刺激时不表达iNOS,也无诱生型NO,但某些因子作用后,如干扰素 γ (IFN γ)、肿瘤坏死因子 γ (TNF γ)、脂多糖(LPS)和白细胞介素-1(IL-1)可诱导iNOS表达;另外一些介质,如糖皮质激素、转化生长因子 β (TGF β)、IL-4和IL-10等抑制iNOS的产生^[7,8]。辅助性T细胞(Th)1通过IFN β 刺激巨噬细胞产生大量的NO;Th2分泌的IL-4可下调巨噬细胞iNOS的表达,使NO的产生减少,并可抑制Th1分泌IFN γ ,因而NO参与了Th1/Th2间的平衡调节^[8]。另外,激活的Th1产生IFN γ ,使NO生成增加,反过来抑制细胞毒性T细胞增殖,NO与Th1间存在负反馈调节机制^[9]。

在病理情况下,诱导巨噬细胞等iNOS的表达,产生过量NO,使大量O₂⁻及ONOO⁻形成,它们具有直接的细胞毒性作用,并可诱导巨噬细胞和T细胞凋亡^[1]。

3.4 对肿瘤的作用

在不同肿瘤组织中,NOS的产生和活性不尽相同,与其生物学特性存在一定联系。大量的研究证实,NO是介导巨噬细胞杀伤肿瘤细胞的重要效应分子,而且介导内皮细胞的溶瘤作用^[10]。NO介导的抗肿瘤作用主要通过①与铁-硫基团或O₂⁻,干扰肿瘤细胞能量代谢;②对DNA产生直接和间接的毒

性,损伤 DNA 或抑制 DNA 合成、修复;③ 激活 p53 途径,诱导肿瘤细胞凋亡;④ 抑制蛋白质合成,阻碍细胞增殖^[11]。另外,NO 可激活 GC-cGMP 系统,抑制血小板聚集、粘附,抗肿瘤细胞转移^[4]。

有些肿瘤组织,如人头颈部鳞癌、前列腺癌、乳腺癌等, NOS 活性高于正常组织,且与病情进展正相关,提示 NO 具有促进肿瘤生成和发展的作用。NO 可损伤正常组织的 DNA 而致基因突变和癌变。另外,NO 参与血管内皮生长因子(VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)的促进血管生成和通过扩张血管增加血流量的作用,促进肿瘤生长、转移^[12]。NO 的这种双向作用具有浓度依赖性,适宜的低浓度促进肿瘤生长,高浓度(高于 10~100 倍)时则抑制肿瘤生长。

4 NO 与电离辐射

NO 在体外可引起细胞的辐射敏感性。NOS 抑制剂 L-硝基精氨酸(NNLA)对体外小鼠肿瘤模型具有辐射防护作用,可提高抗辐射能力 3~5 倍;而 NO 供体却引起相反的结果。另外,类似的结果证实,NO 释放物质能够诱导低氧仓鼠肺细胞的辐射敏感性^[13]。在体外增加 NO 而引起细胞辐射敏感性,受 IFN- γ 和 LPS 影响,可能通过 TNF- α 介导。单纯照射(0.5~50 Gy)巨噬细胞不诱导 NO,照后 24h 给予 TNF- γ 或 LPS 可增加 NO 产生,并呈剂量依赖关系(0.5~5 Gy),iNOS 也平行增加;照前应用 TNF- α 抗体,阻止 TNF- α 诱导 NO,说明 TNF- α 在 NO 促进巨噬细胞辐射敏感性方面起重要作用^[14]。

亚致死剂量 γ 射线照射小鼠,体内一些器官(肝、肠、肺、肾、脑、脾和心脏)NO 产生增加;低剂量 X 射线照射(4 cGy)小鼠,立即激起脑电图的改变,并且通过 NOS 抑制剂 NNLA 拮抗这一效应。然而,体内实验证实,NO 抑制剂和供体均具有辐射防护作用,这种作用依赖血流的改变,而不依赖 NO 水平的增高或降低。一般,1~10 Gy 体外照射巨噬细胞,NO 产生增加;但体内照射需更大的剂量,因为肿瘤浸润的巨噬细胞不活化,这也是体内实验引起辐射防护作用的可能原因^[15]。

已经发现,15 Gy 照射后 24h 电信号有意义地持续增高,硝酸盐也随之增加,用 iNOS 抑制剂(AMT)处理动物,这种电信号下降到平均基础水平。说明电信号的增加可能通过 iNOS 产生 NO 的

结果。Clarencon 等^[16]通过腹主动脉探测 NO 电信号实验发现, γ 射线 15 Gy 照后 12 min 增高 13%,照后 130 min 缓慢增高 18%;另外,经胸腔穿刺取血检测 NO 电信号,15 Gy 照后 90 min 增高 17%,照后 24 h 增高 25.6%,照后 3 d 明显降低。然而,值得注意的是,经胸腔穿刺取血检测的 NO 电信号在照后 5 min 未见增高,可能与直接通过腹主动脉探测 NO 电信号条件不同有关。根据上述实验结果, γ 射线照射所致血液 NO 的变化可分为 3 个连续步骤: NO 浓度的早期(5 min)增加,可能由于 eNOS 刺激产生;NO 浓度第 2 阶段(24 h)增加与 iNOS 表达有关;第 3 阶段,照后 3 d 的 NO 浓度进行性降低,即部分动物死亡前全身衰竭阶段。NO 作为辐射损伤反应早期介导因子,可能与其辐射防护作用有关。此外,经胸腔穿刺取血探测 NO 电信号发现,分别用 γ 射线 3.7 和 15 Gy 照射后 90 min 和 24 h,呈现剂量依赖性增加,提示血液 NO 浓度可能反映照射强度。

参考文献:

- [1] Wink DA, Mitchell JB. Chemical biology of NO: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of NO [J]. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25: 434-456.
- [2] Moncada S, Higgs A, Furchgott RF. X IV. International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research [J]. *Pharmacol Rev*, 1997, 49: 137-142.
- [3] Xia Y, Tsai AL, Berka V, et al. Superoxide generation from endothelial nitric-oxide synthase. A Ca²⁺/calmodulin-dependent and tetrahydrobiopterin regulatory process [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 25804-25808.
- [4] Chou TC, Li CY, Yen MH, et al. Antiplatelet effect of amlodipine: a possible mechanism through a nitric oxide-mediated process [J]. *Biochem Pharmacol*, 1999, 58: 1657-1663.
- [5] Nose M, Uzawa A, Nomura M, et al. Control of endotoxin shock by the dried preparation of low virulent streptococcus pyogenes OK-432 [J]. *Cell Immunol*, 1998, 188: 97-104.
- [6] Calza L, Giardino L, Pozza M, et al. Time-course changes of nerve growth factor, corticotropin-releasing hormone and nitric oxide synthase isoforms and their possible role in the development of inflammatory response in experimental allergic encephalomyelitis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 3368-3373.
- [7] Vodovotz Y, Chesler L, Chong H, et al. Regulation of transforming growth factor β by nitric oxide [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 2142-2149.
- [8] O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets [J]. *Immunity*, 1998, 8: 275-283.

- [9] Bingisser RM, Tibrook PA, Holt PG, et al. Macrophage-derived nitric oxide regulates T cell activation via reversible disruption of the Jak3/STAT5 signaling pathway[J]. *J Immunol*, 1998, 160: 5729.
- [10] Wink DA, Vodovotz Y, Laval J, et al. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 711-721.
- [11] Kim YM, Son K, Hong SJ, et al. Inhibition of protein synthesis by nitric oxide correlates with cytostatic activity: nitric oxide induces phosphorylation of initiation factor eIF-2 alpha[J]. *Mol Med*, 1998, 4: 179.
- [12] Ziche M, Morbidelli L, Chodhuri R, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99: 2625-2634.
- [13] Mitchell JB, DeGraff W, Kim S, et al. Redox generation of nitric oxide to radiosensitize hypoxic cells [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1998, 42: 795-798.
- [14] McKinney LC, Aquilla EM, Coffin D, et al. Ionizing radiation potentiates the IFN-gamma and/or LPS in murine macrophage cell lines: role of TNF-alpha [J]. *J Leukoc Biol*, 1998, 64: 459-466.
- [15] Vodovotz Y, Coffin D, DeLuca AM, et al. Induction of nitric oxide production in infiltration leukocytes following in vivo irradiation of tumor-bearing mice [J]. *Radiat Oncol Investig*, 1999, 7: 86-97.
- [16] Clarencon D, Lestaevell P, Laval JD, et al. Valtametric measurement of blood nitric oxide in irradiated rats [J]. *Int J Radiat Biol*, 1999, 75: 201-208.

Nitric oxide and ionizing radiation

GONG Shou-liang

(*MH Radiobiology Research Unite, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China*)

Abstract The discovery of nitric oxide (NO) established a complete new concept on the cell signal transduction, i. e. the gas signal produced from one cell can pass through the cell membrane to regulate the functions of another cell. NO has unique physical and chemical natures. NO in vivo is synthesized by L-arginine and oxygen under the action of NO synthase (NOS). NOS mainly includes 3 kinds of subsets: endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) and inducible NOS (iNOS). These NOSs are regulated by Ca^{2+} /calmodulin, phosphorylation and NO. The biological functions of NO are very wide and bidirect. NO might facilitate the radiosensitivity of cells in vitro, but display a radioprotective effect in vivo.

Key words nitric oxide; nitric oxide synthase; ionizing radiation

文章编号: 1001-098X(2000)04-0173-05

促血小板生成素与辐射损伤

张军权, 张浩

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要: TPO(促血小板生成素)是巨核系造血的主要刺激因子,近年的研究表明, TPO与造血干细胞之间存在密切联系。TPO可促进辐射损伤后的造血重建,有可能解决急性放射病中血小板恢复滞后的问题。TPO在造血干细胞移植、血小板采集与分离等领域也有广阔的应用前景。

关键词: 促血小板生成素; 辐射损伤; 造血干细胞

中图分类号: R818.4 文献标识码: A

1 TPO简介^[1]

20世纪50年代后期,有些学者提出,在生理条件下,血小板的生成受到一种体液因子的控制,并将这种因子命名为 thrombopoietin(TPO,促血小板生成素)。虽然在血小板减少症动物和病人的血清、血浆、尿液以及肾细胞的条件培养基中均可检测到

收稿日期: 2000-05-15

作者简介: ①张军权(1967-),男,天津蓟县人,北京放射医学研究所博士研究生,主要研究放射病的治疗。

②张浩(1968-),男,天津市人,北京放射医学研究所助理研究员,博士,主要研究方向:基因治疗。

审校者:北京放射医学研究所 毛秉智