

活性氮对细胞保护和损伤作用研究进展

陈素娟¹, 庞晨晨¹, 刘彬^{1*}, 皇甫超申^{2*}

(1. 河南大学护理与健康学院, 河南 开封 475004; 2. 河南大学环境医学研究所, 河南 开封 475004)

摘要: 活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 影响细胞内氧化还原平衡, 诱导蛋白质翻译后修饰 (post-translational modification, PTM), 在生理条件下作为信号分子参与细胞信号传导。但是过量的 RNS 会引起亚硝基化应激导致细胞的损伤, 并与肿瘤的发生和发展以及治疗效果等密切相关。本文阐述 RNS 在生理条件下的作用及在肿瘤发生和发展中的研究进展, 为新药的研发和疾病的治疗提供思路。

关键词: 活性氮; 亚硝基化蛋白修饰; 硝酸盐-亚硝酸盐-一氧化氮途径; 肿瘤生长; 肿瘤治疗

中图分类号: R965 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-4870(2020)12-2785-08

Research progress of reactive nitrogen species on cell protection and injury

CHEN Su-juan¹, PANG Chen-chen¹, LIU Bin^{1*}, HUANGFU Chao-shen^{2*}

(1. School of Nursing and Health, Henan University, Kaifeng 475004, China;

2. Institute of Environmental Medicine, Henan University, Kaifeng 475004, China)

Abstract: Reactive nitrogen species (RNS) affects intracellular redox balance and induces post-translational modification of proteins. Moreover, RNS, as the signal molecule, participates in the transduction of cellular signals under physiological conditions. However, excessive RNS can induce nitrosative stress and then damage cells, and thereby may play a role in the tumor initiation and progression. Thus, we discussed the role of RNS under physiological conditions and the tumor microenvironment, which may provide some novel ideas for the development of new drugs and the treatment of diseases.

Key words: reactive nitrogen species; nitrosative protein modification; NO_3^- - NO_2^- -NO pathway; tumor growth; tumor treatment

活性氮 (reactive nitrogen species, RNS) 是与氮原子相关的自由基, 包括氮的高级氧化物、S-亚硝基硫醇、硝酰阴离子、亚硝鎗阳离子和二亚硝基铁络合物等。RNS 可诱导蛋白质翻译后修饰 (post-translational modification, PTM) 以改变蛋白质的结构和功能, 调控细胞信号传导^[1]。在生理条件下, RNS 的产生和清除处于动态平衡以保证细胞氧化还原稳态, 在氧化还原

信号的传递中发挥作用, RNS 还作为信号分子参与心血管运动张力和心肌收缩力的调节, 抑制血小板活化、聚集和黏附以及调控细胞的增殖等^[2]。当细胞内 RNS 过量产生并远远超过细胞的清除能力时, 便会诱发亚硝基化应激, 导致细胞内脂质、DNA 和蛋白质的氧化损伤^[3], 即 RNS 过量产生并超过了细胞的防御能力时, 则对细胞产生毒性作用以损伤细胞。一般轻度的细胞损伤引起细胞水肿等可逆性改变时, 细胞可存活, 而重度损伤则导致细胞凋亡和坏死等不可逆损伤, 如 RNS 持续产生能降低神经元可塑性, 最终导致脑细胞死亡^[4]。但对于机体已经存在的肿瘤细胞, RNS 通过引起 DNA 损伤和蛋白质结构功能改变可以促进肿瘤细

收稿日期: 2020-03-30; 修回日期: 2020-05-22.

基金项目: 国家环保公益项目专项资助项目 (200809115); 省部共建河南大学科研项目 (SBGJ090702).

*通讯作者 Tel: 86-378-3880585,

E-mail: aozdlx1024@163.com; emdx1629@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0431

胞的侵袭能力、化疗抵抗、免疫逃避和调节肿瘤细胞代谢改变来保护肿瘤细胞,并最终导致肿瘤患者预后不良^[5]。然而重要的是,当增加的肿瘤细胞内RNS水平超过肿瘤细胞的防御能力时,过高的RNS也会对肿瘤细胞造成损伤,这为肿瘤的治疗提供了潜在靶点。本文主要就RNS在生理条件下和肿瘤微环境(the tumor microenvironment, TME)中的保护及损伤作用进行综述。

1 RNS的来源和清除

RNS的主要来源是一氧化氮合酶(nitric oxide synthases, NOS), *L*-精氨酸在NOS催化作用下产生一氧化氮自由基(nitric oxide radical, •NO),此过程需要四氢生物蝶呤(tetrahydrobiopterin, BH4)、黄素腺嘌呤二核苷酸、黄素单核苷酸、钙调素和铁原卟啉IX等多种辅助因子的参与。•NO主要由神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS或NOS-1)、诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS或NOS-2)和内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS或NOS-3)3种NOS同工酶产生,这3种NOS亚型均以单体形式合成,需要形成二聚体才能结合BH4和底物*L*-精氨酸催化•NO的生成。其中eNOS和nNOS分别在 endothelial 细胞和神经元细胞中表达,而iNOS的转录调控和诱导需要受炎症细胞因子、衰老、缺氧以及各种内毒素的影响^[6]。此外,当NOS系统受损时,通过NOS催化•NO的生成被抑制。•NO的产生还可通过硝酸盐-亚硝酸盐-一氧化氮(nitric oxide, NO)途径(NO₃⁻-NO₂⁻-NO,图1)。另外,近期发现亚硝酸盐并非曾经被认为是•NO代谢的惰性终产物,亚硝酸盐在血液和组织中作为•NO的内分泌储蓄池,参与多种生理学和生理病理学反应^[7]。

细胞内的•NO能与活性氧(reactive oxygen species, ROS)反应转化生成其他RNS。NOS催化*L*-精氨酸产

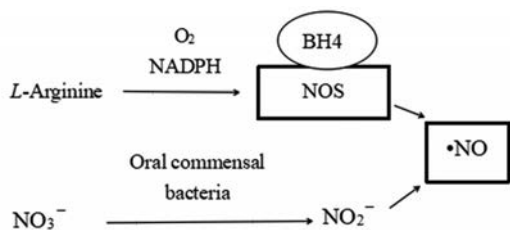


Figure 1 NO₃⁻-NO₂⁻-NO pathway and NOS catalyze the production of •NO. NOS enzymes catalyze the formation of •NO from *L*-arginine. Additionally, •NO is also produced through reduction of nitrate/nitrite. NADPH: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; BH4: Tetrahydrobiopterin; NOS: Nitric oxide synthases; •NO: Nitric oxide radical

生•NO的过程中伴随着超氧阴离子(O^{2•-})的生成,而•NO可与O^{2•-}快速反应生成其衍生物过氧亚硝酸根(ONOO⁻) (图2), ONOO⁻活性极强^[8], •NO与ONOO⁻反应产生NO₂。因此,•NO转化为NO₂的过程中,ONOO⁻可被认为是NO₂的供体或中间产物。NO₂和•NO可进一步反应生成N₂O₃等^[9]。

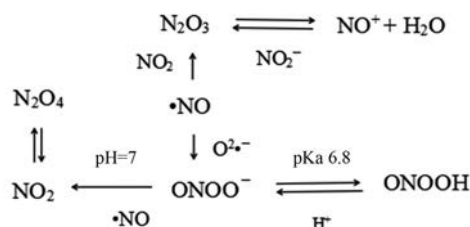


Figure 2 •NO main metabolic reactions produce ONOO⁻ and other RNS. •NO, a pivotal component of physiological RNS, can combine with O^{2•-} to generate ONOO⁻. O^{2•-}: Superoxide anion radical; ONOO⁻: Peroxynitrite; RNS: Reactive nitrogen species

另外,RNS的产生在细胞毒性阈值内可作为细胞信号分子发挥重要的生理功能,但是,过量RNS的产生会导致细胞损伤。这主要取决于RNS的产生和清除的相对速度。生理条件下,多余的RNS会在引起细胞功能障碍之前被迅速清除,确保细胞的正常生理活动。Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)-核因子E2相关因子2(nuclear factor ery-throid 2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)信号通路是细胞氧化应激反应的关键通路。研究发现Keap1暴露于•NO后,导致其半胱氨酸(cysteine, Cys)残基发生*S*-亚硝基化,抑制Nrf2的降解^[10],促使Nrf2向核内转移,调控下游抗氧化酶的表达,清除多余的RNS。

2 RNS诱导蛋白质PTM

RNS诱导大量蛋白质的PTM,对蛋白质的不同修饰改变了蛋白质的功能以及其与下游信号靶点的相互作用。RNS主要诱导蛋白质的3种PTM^[11]: ① *S*-亚硝基化; ② 谷胱甘肽化; ③ 酪氨酸硝基化。可逆的蛋白质Cys残基修饰可传导细胞信号,不可逆的蛋白质Cys修饰如Cys亚磺酸(Cys-SO₂H)和磺酸(Cys-SO₃H)会导致细胞内的调控机制紊乱^[12]。其中RNS诱导蛋白质的PTM如*S*-谷胱甘肽化和*S*-亚硝基化属于可逆的Cys修饰,且*S*-亚硝基化在细胞生理信号功能中起主要作用。

2.1 S-亚硝基化 *S*-亚硝基化是指•NO氧化还原修饰目标蛋白的Cys残基,形成*S*-亚硝基硫醇衍生物(*S*-nitrosothiol derivative, RSNO) (图3),提供以氧化还原

为基础的细胞信号机制^[13]。与磷酸化或泛素化等其他 PTM 不同, *S*-亚硝基化不依赖于酶。 *S*-亚硝基化反应由 *S*-亚硝基化和反硝基化反应调控, 使生物系统保持着动态平衡^[14]。蛋白激酶和磷酸酶、代谢酶、膜受体和通道、细胞骨架元素和转录因子均可作为 *S*-亚硝基化的潜在作用靶点, *S*-亚硝基化调节蛋白活性、稳定性和蛋白-蛋白之间的相互作用, 而异常的 *S*-亚硝基化则与多种病理生理机制相关^[15]。

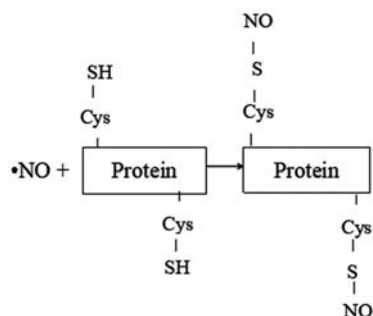


Figure 3 *S*-Nitrosylation of proteins. Coupling of $\bullet\text{NO}$ to a -SH of cysteine residues of proteins allows the formation of *S*-nitrosothiols. SH: Sulfhydryl group; Cys: Cysteine

$\bullet\text{NO}$ 通常针对蛋白质中的 1 个或多个 Cys 残基, 诱导蛋白质发生 *S*-亚硝基化以改变蛋白质的生理或病理学功能^[16], 蛋白质 *S*-亚硝基化能改变蛋白质的活性, 但同时也能保护蛋白质, 阻止其半胱氨酸巯基发生不可逆氧化。 *S*-亚硝基化已成为心血管功能的重要调节因子, 在心血管保护机制中占优势^[17]。 *S*-亚硝基化还与细胞的凋亡密切相关。低水平的 *S*-亚硝基化蛋白具有抗细胞凋亡作用, 而过高水平 $\bullet\text{NO}$ 诱导的蛋白质 *S*-亚硝基化可促进细胞的凋亡, 研究认为 *S*-亚硝基化通过影响线粒体伴侣 TRAP1 (TNF receptor-associated protein 1) 结构和三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶活性, 调节细胞对凋亡刺激的反应^[18]。

2.2 谷胱甘肽化 谷胱甘肽化是最重要的硫化反应, 是指在蛋白质的半胱氨酸巯基残基上添加谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 或 *S*-亚硝基硫醇 (*S*-nitrosothiol, GSNO) (图 4)。此反应是可逆的且不依赖于酶活性,

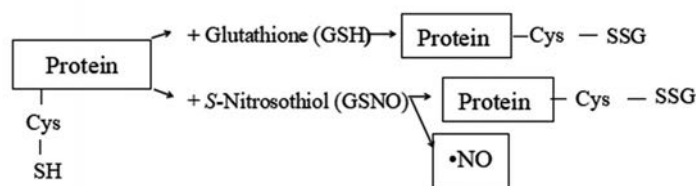


Figure 4 Mechanisms of glutathionylation. Reactions between cysteine residues and glutathione (GSH) or *S*-nitrosothiols (GSNO). And GSNO is able to release $\bullet\text{NO}$. SSG: Glutathione disulfide

同时 GSNO 缓慢分解还可产生 $\bullet\text{NO}$, GSNO 被认为是 $\bullet\text{NO}$ 效应的主要生理介质^[19]。

2.3 酪氨酸硝基化 蛋白质酪氨酸硝基化被认为是体内氧化应激的生物标志物, 作为多种疾病发生和发展的预测因子发生在心血管疾病、神经变性、炎症和肿瘤等多种疾病中^[20]。酪氨酸硝基化是两步法过程: ① 由 ONOO^- 氧化酪氨酸生成酪氨酸自由基; ② 酪氨酸自由基与 NO_2 反应生成 3-硝基酪氨酸 (3- NO_2 -Tyr) (图 5)。 ONOO^- 已被报道在多种细胞类型中与酪氨酸磷酸化的抑制或激活有关^[8]。酪氨酸硝基化是一个选择性的过程, 与酪氨酸残基对硝化剂的可获得性有关, 一般来说, 大多数被硝化的酪氨酸残基都在其附近产生硝化剂, 如 NO_2^- 和 H_2O_2 存在时有 ONOO^- 和过氧化物酶 2 种硝化剂^[21]。

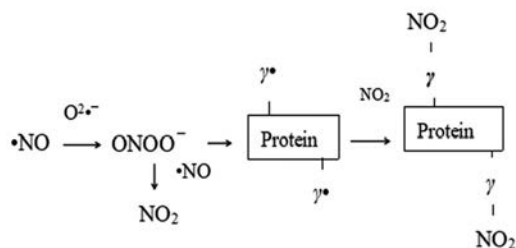


Figure 5 Tyrosine (γ) nitration of proteins. Tyrosine (γ) nitration is a two-step process: the generation of tyrosyl radical by oxidation of tyrosine by reactive species generated from ONOO^- , and then the reaction of tyrosyl radical with nitrogen dioxide (NO_2) to form 3-nitrotyrosine

3 RNS 在生理条件下的作用

nNOS 产生的 $\bullet\text{NO}$ 可调节乙酰胆碱、组胺和血清素等神经递质的释放, 参与神经元兴奋性和放电的调控, 可引起突触可塑性的长期增强或抑制。 $\bullet\text{NO}$ 还参与大脑皮质和海马的突触传递, 和学习记忆功能有关^[22]。近期研究发现存在于血管内皮中的 nNOS 产生的 $\bullet\text{NO}$ 在血液流动和氧气输送中起作用, 并调节心肌功能, 维持心血管系统的稳态^[23]。此外, 在生殖系统, nNOS 产生的 $\bullet\text{NO}$ 启动并维持阴茎勃起, 勃起功能障碍患者的 nNOS 表达明显降低^[24]。

iNOS在生理条件下的极少表达。而细胞内毒素、干扰素- γ 、白细胞介素- 1β 和氧化应激等因素可调控iNOS的表达^[25]。一般nNOS与eNOS在较短的时间内产生较少的•NO,而iNOS在短时间内可产生较高水平•NO,且可长时间持续产生^[6]。研究发现,在肥胖小鼠中,激活iNOS可促进•NO的过量产生,破坏了肥胖小鼠的肝溶酶体功能,导致了肥胖相关的肝脏自噬缺陷和胰岛素抵抗^[26]。

eNOS释放•NO可调节血管舒张并抑制血小板聚集和血管平滑肌细胞增殖等^[27]。eNOS的激活可通过钙依赖性或非依赖性途径。钙依赖性途径通过乙酰胆碱、缓激肽、组胺等受体激动剂作用于内皮细胞膜上的特定受体来增加细胞内钙的浓度,与钙调蛋白的结合可导致eNOS的钙调蛋白结合域被激活而产生•NO^[28]。钙非依赖性途径调节血流动力学的剪切应力和激素的反应。苏氨酸495(Thr495)可作为抑制位点,而丝氨酸635(Ser635)、丝氨酸1179(Ser1179)和丝氨酸1177(Ser1177)是激活位点。蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)和蛋白激酶B(Akt)通过磷酸化Ser1177来激活eNOS。 H_2O_2 和缓激肽增加Ser1177磷酸化和Thr495去磷酸化来激活eNOS产生•NO^[29]。其中,剪切应力依赖PKA作用于Ser1179和Ser635位点诱导eNOS磷酸化^[30],植物激素葛根素依赖Akt通过eNOS磷酸化调节血管张力^[31]。近期对生殖系统的研究发现,eNOS亚硝基化可能是阴茎勃起后消肿的结果,而非原因^[32]。

NOS催化产生的•NO还与鸟苷酸环化酶的活化和环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)的生成有关。NOS产生的•NO扩散到细胞膜,激活鸟苷酸环化酶将三磷酸鸟苷转化为cGMP,cGMP结合并激活蛋白激酶G(protein kinase G, PKG),降低 Ca^{2+} 水平,使平滑肌松弛^[33]。近期在耐缺氧果蝇实验研究中发现,在缺血应激过程中,耐缺氧果蝇细胞内NO/cGMP/PKG通路的被激活可能是一种适应性的细胞保护机制,调节这种级联信号可作为潜在治疗靶点,保护细胞免受缺氧或缺血引起的细胞损伤^[34]。

硝酸盐和亚硝酸盐通过 NO_3^- - NO_2^- -NO途径产生•NO,通过增加•NO的生物利用度和亚硝基的衍生物,进而发挥防止微血管炎症、动脉粥样硬化斑块的形成、血小板聚集和心肌缺血再灌注损伤等血管保护作用^[35]。通过在不同体重指数的女性中的研究发现,血清氮氧化物浓度有显著升高的趋势,因此血清硝酸盐和亚硝酸盐等氮氧化物也许可作为预测肥胖的新表型加以研究^[36]。

另外,由于•NO具有诱导肺血管扩张的能力,吸入NO可用于治疗一系列的心肺疾病。有研究报道,在

压缩气体输送系统吸入NO时,当NO在输送给患者之前被富含 O_2 的空气稀释,就会产生 NO_2 ,即会不可避免地同时输送 NO_2 给患者,而有毒的 NO_2 可对高危患者的气道造成损害^[37]。但在一项随机交叉研究中,25名受试者连续4周暴露于浓度为0、0.2、1和 $3\text{ mg}\cdot\text{m}^{-3}$ 的 NO_2 下3 h,结果显示在此研究的 NO_2 浓度范围内,受试者没有出现严重的急性不良反应^[38]。吸入NO可选择性地引起肺血管舒张而不降低全身动脉压力,而近期NO生成器的突破性研发和测试研究,通过应用脉冲放电从空气中产生NO,并通过清除和过滤系统进而有效清除多余的有毒气体和金属杂质,将可能有益于吸入NO以用于心肺疾病治疗^[39]。

4 RNS与肿瘤的发生发展

肿瘤发病机制复杂,涉及由不同免疫细胞等组成的TME。TME是由肿瘤细胞、免疫细胞、细胞外基质、可溶性因子和血管等共同形成的在细胞、基质、可溶性因子以及血管之间的相互作用下产生的复杂微环境^[40]。TME中的•NO可对肿瘤生长有利,也可对肿瘤生长不利^[5]。在实体肿瘤组织酸性缺氧的TME中,•NO与 $O_2^{\cdot-}$ 相互作用,可快速生成ONOO⁻。最新研究报道利用体内生物发光成像技术发现了肿瘤组织中•NO和ONOO⁻等含氮氧化物的产生增加^[41]。关于肿瘤的发生和发展方面,早期研究发现缺失iNOS的小鼠易发生肠道肿瘤,并证实了•NO在正常细胞的防御机制中发挥作用,抑制肿瘤的发生^[42]。而过量的•NO可导致正常细胞内稳态的改变,诱导氧化应激,通过改变与肿瘤相关基因的表达和引起基因突变,促进肿瘤的发生^[43]。另外,在机体已经存在的肿瘤细胞中,RNS修饰可溶因子和受体以诱导和维持肿瘤特异性免疫反应,形成“化学屏障”破坏TME中效应T细胞的浸润和功能,保证了肿瘤的恶性进展^[44]。所以在正常细胞中生理剂量内的RNS可作为信号分子发挥防御机制保护正常细胞,抑制肿瘤发生。而过量的RNS损害正常细胞并促进肿瘤的发生。同时,在机体已存在的肿瘤细胞中,RNS同样可保护肿瘤细胞并促进肿瘤细胞的恶性进展,但更重要的是,当TME中的RNS产生过量并超过肿瘤细胞的防御能力时,RNS又能抑制肿瘤细胞生长,甚至杀死肿瘤细胞(图6)。

一方面,RNS水平在肿瘤细胞毒性阈值内时可促进肿瘤细胞的恶性发展。在人口腔癌中,研究发现iNOS在mRNA水平和蛋白水平的表达增加,硝基酪氨酸与恶性细胞表型相关,且高硝基酪氨酸免疫标记可用于区分转移性和非转移性口腔鳞状细胞癌病例,并预测哪些患者有较高的死亡风险。另外,硝基酪氨酸可作为判断口腔鳞状细胞癌预后的重要指标^[45]。研究

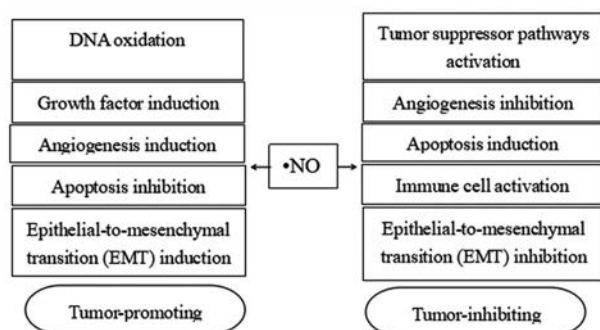


Figure 6 Role of $\bullet\text{NO}$ in tumor microenvironment. $\bullet\text{NO}$ can either enhance or inhibit tumor progression, depending on the biological context, the concentration of $\bullet\text{NO}$, and on the duration of $\bullet\text{NO}$ production. EMT: Epithelial-to-mesenchymal transition

表明抑制 $\bullet\text{NO}$ 产生的NOS抑制剂亚硝基左旋精氨酸(*L*-nitro-arginine methyl ester, *L*-NAME)可降低促转移基因及与干性相关的基因的表达并抑制球状体的形成能力,另外,亚硝酸盐作为 $\bullet\text{NO}$ 的内分泌储蓄池,亚硝酸盐的存在也间接证实 $\bullet\text{NO}$ 的产生,故此研究为了保证实验的严谨性,同时检测了亚硝酸盐的水平,研究结果提示抑制 $\bullet\text{NO}$ 的产生可抑制肿瘤的恶性发展,且NOS产生的 $\bullet\text{NO}$ 可通过依赖丝裂原细胞外信号调节激酶(mitogen extracellular signal-regulated kinase, MEK)-细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)通路促进人胰腺癌细胞的侵袭^[46]。人结肠癌供血动脉与正常结肠组织供血动脉相比,显示出更强的血管舒张。研究发现NOS的高表达和 $\bullet\text{NO}$ 产生的增多增强了人结肠癌供血动脉的血管舒张并减弱了血管收缩,即人结肠癌动脉中 $\bullet\text{NO}$ 介导的信号通路提高了肿瘤组织供血并有利于肿瘤发展^[47]。

另一方面,RNS生成被抑制或者被升高都能对肿瘤细胞造成损伤,以抑制肿瘤细胞的生长。通过抑制或者增加 $\bullet\text{NO}$ 的产生可用于肿瘤治疗,发挥抗肿瘤作用。通关藤作为中药成分用于肿瘤治疗,研究发现 $\bullet\text{NO}$ 作为肿瘤细胞与内皮细胞之间的信使可介导通关藤提取物的抗肿瘤作用^[48]。有研究发现,M1巨噬细胞通过依赖iNOS分泌过多的 $\bullet\text{NO}$ 扩散到邻近的肿瘤细胞,导致肿瘤细胞内蛋白质亚硝基化和DNA链断裂,对肿瘤细胞产生细胞毒性反应,并通过固有的凋亡途径导致肿瘤细胞凋亡^[49]。但同时,减少 $\bullet\text{NO}$ 产生也能用于治疗肿瘤,如研究发现抑制 $\bullet\text{NO}$ 产生的NOS抑制剂*L*-NMMA可有效降低肿瘤细胞的存活率,有效提高三阴性乳腺癌患者的生存率^[50]。近期关于肿瘤耐药方面的研究,利用纳米系统可编程释放 $\bullet\text{NO}$ 和多柔比星, $\bullet\text{NO}$ 可通过降低p-糖蛋白的表达而增加耐药肿瘤细胞

中的多柔比星的积累,以克服多药耐药障碍, $\bullet\text{NO}$ 在耐多药肿瘤治疗中具有巨大的潜力^[51]。此外,在肿瘤治疗过程中,肿瘤药物常对肿瘤患者产生严重的不良反应。通过研究设计的可激活纳米探针可在特定肿瘤相关生物标志物的刺激下对肿瘤细胞进行特定成像和破坏。在肿瘤内 $\bullet\text{NO}$ 和酸性双键的刺激下,此纳米探针可输出双信号,用于体内肿瘤的比率光声和光热成像,提高肿瘤治疗的准确性和特异性。这种 $\bullet\text{NO}$ 和酸性作用的双重激活,使纳米探针可以在肿瘤和正常组织之间产生更多的热疗差异,从而为肿瘤患者提供最小不良反应的光热疗法^[52]。

显然, $\bullet\text{NO}$ 在一定的浓度范围内有利于肿瘤的生长, $\bullet\text{NO}$ 的浓度过高或者过低均会抑制肿瘤的恶性进展。因此利用此特点通过靶向调控肿瘤局部的 $\bullet\text{NO}$ 浓度可用于肿瘤的治疗。其中提取自番茄枝科植物的黄连素、唇形科植物的水苏碱、蓝莓的紫檀芪和多种植物中的白花丹素等都是iNOS的天然抑制剂(表1),而吴茱萸中的吴茱萸碱、姜黄属植物中的 δ -榄香烯和多种植物中的槲皮素-3-*O*-木糖苷等都是iNOS的天然刺激物^[53]。另外值得注意的是,促进或抑制 $\bullet\text{NO}$ 的生成均需密切监控 $\bullet\text{NO}$ 浓度的变化,但由于一直缺乏具有深层组织相容性的灵敏分析工具,直观调控体内 $\bullet\text{NO}$ 浓度的变化仍存在困难。近期研究报道了一种优化探测 $\bullet\text{NO}$ 的可激活光声探头,通过空间弛豫对硼-氮二吡咯甲基染料平台可进行平面化,这种优化有效促进了小鼠乳腺癌模型中内部 $\bullet\text{NO}$ 浓度的检测^[54]。

Table 1 Natural product inhibitors and stimulators of inducible nitric oxide synthase (iNOS)

Natural product inhibitor of iNOS	Natural product stimulator of iNOS
Berberine (<i>Ipomoea</i>)	Evodiamine (<i>Evodia</i>)
Stachydrine (<i>Leonurus</i>)	δ -Elemene (<i>Curcuma</i>)
Pterostilbene (Blueberries)	Quercetin-3- <i>O</i> -xyloside (Various plants)
Plumbagin (Various plants)	Fulvic acid (Humus)
Dolastatin 15 (<i>Auricularia</i>)	Liriodenine (<i>Michelia</i>)
Ganoderic acid T (<i>Ganoderma</i>)	Physalin A (<i>Physalis</i>)

此外,越来越多证据表明 $\bullet\text{NO}$ 供体作为靶向药物可逆转各种化疗耐药和免疫耐受,发挥抗肿瘤作用^[55]。 $\bullet\text{NO}$ 供体产生高浓度的RNS抑制人结肠癌细胞的增殖^[56]。 $\bullet\text{NO}$ 供体选择性增加肿瘤局部 $\bullet\text{NO}$ 浓度,对血液循环影响小。新型药物RRx-001可特异性地将 $\bullet\text{NO}$ 传递到肿瘤组织中,产生轻微不良反应,这一方法被认为对今后发展更多选择性的放射增敏剂和提高放疗的治疗价值具有重要意义^[57]。 $\bullet\text{NO}$ 供体JS-K作为新型的卵巢癌治疗药物,可抑制卵巢癌细胞的增

殖,引起细胞核萎缩,诱导卵巢癌细胞的凋亡^[58]。 NO_3^- - NO_2^- - NO 途径可在疾病状态下提供 $\bullet\text{NO}$,硝酸盐和亚硝酸盐可作为 $\bullet\text{NO}$ 的有效外源性供体,且硝酸盐和亚硝酸盐价格实惠易获取。然而必须注意,虽然早期就有关于亚硝酸盐在心血管疾病用药的相关研究^[59,60],但是,必须严格考虑硝酸盐和亚硝酸盐给药的安全性,必须注意硝酸盐和亚硝酸盐被国际癌症协会列为可能致癌物,因此硝酸盐和亚硝酸盐被开发为药物作用于人体之前,必须探索清楚硝酸盐和亚硝酸盐致癌的具体机制,才能避免硝酸盐和亚硝酸盐对人体的毒性作用,进而利用硝酸盐和亚硝酸盐作为 $\bullet\text{NO}$ 的供体为肿瘤治疗提供积极有效的作用。

5 展望

RNS对细胞有积极和消极的双重影响,这取决于RNS产生的量、RNS暴露的时间和细胞的类型等。前期大量研究集中在预防和减轻细胞内诱发的硝化反应,但随着研究的深入,发现硝化反应并不像曾经一直被认为的对细胞功能造成永久性改变,而是处于动态调节,在细胞信号传导中发挥作用。在正常细胞中,RNS参与细胞防御机制以保护细胞和抗肿瘤的发生。在肿瘤细胞中,RNS可诱导并维持肿瘤特异性免疫反应而利于肿瘤细胞的恶性生长,但是,RNS又能氧化损害肿瘤细胞、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡和克服肿瘤耐药性。探究RNS在不同细胞中的毒性阈值并精确了解RNS在不同细胞内发挥保护作用或损伤作用所需的具体浓度范围,则可充分利用RNS的双重作用,为肿瘤或其他RNS相关疾病的治疗及其新药的研发提供新思路。

作者贡献:陈素娟负责论文撰写和图片设计;庞晨晨协助论文撰写和图片设计并负责核对参考文献;刘彬指导关键性理论并对论文的核心内容提出指导性意见;皇甫超申负责确定论文选题并设计论文框架。

利益冲突:本论文所有作者均不存在利益冲突。

References

- [1] Adams L, Franco MC, Estevez AG. Reactive nitrogen species in cellular signaling [J]. *Exp Biol Med*, 2015, 240: 711-717.
- [2] Ghimire K, Altmann HM, Straub AC, et al. Nitric oxide: what's new to NO? [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2017, 312: C254-C262.
- [3] Hunyadi A. The mechanism(s) of action of antioxidants: From scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39: 2505-2533.
- [4] Ramalingam M, Kim SJ. Reactive oxygen/nitrogen species and their functional correlations in neurodegenerative diseases [J]. *J Neural Transm*, 2012, 119: 891-910.
- [5] Kamm A, Przychodzen P, Kuban-Jankowska A, et al. Nitric oxide and its derivatives in the cancer battlefield [J]. *Nitric Oxide*, 2019, 93: 102-114.
- [6] Forstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function [J]. *Eur Heart J*, 2012, 33: 829-837.
- [7] Thomas DD, Corey C, Hickok J, et al. Differential mitochondrial dinitrosyliron complex formation by nitrite and nitric oxide [J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 277-283.
- [8] Speckmann B, Steinbrenner H, Grune T, et al. Peroxynitrite: from interception to signaling [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2016, 595: 153-160.
- [9] Basu S, Grubina R, Huang J, et al. Catalytic generation of N_2O_3 by the concerted nitrite reductase and anhydrase activity of hemoglobin [J]. *Nat Chem Biol*, 2007, 3: 785-794.
- [10] Um HC, Jang JH, Kim DH, et al. Nitric oxide activates Nrf2 through S-nitrosylation of Keap1 in PC12 cells [J]. *Nitric Oxide*, 2011, 25: 161-168.
- [11] Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Feldman NB, et al. ROS and RNS signaling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications [J]. *Free Radic Res*, 2018, 52: 507-543.
- [12] Paulech J, Liddy KA, Engholm-Keller K, et al. Global analysis of myocardial peptides containing cysteines with irreversible sulfinic and sulfonic acid post-translational modifications [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2015, 14: 609-620.
- [13] Xiong Y, Uys JD, Tew KD, et al. S-glutathionylation: from molecular mechanisms to health outcomes [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15: 233-270.
- [14] Seth D, Hess DT, Hausladen A, et al. A multiplex enzymatic machinery for cellular protein S-nitrosylation [J]. *Mol Cell*, 2018, 69: 451-464.e6.
- [15] Stomberski CT, Hess DT, Stamler J. Protein S-nitrosylation: determinants of specificity and enzymatic regulation of S-nitrosothiol-based signaling [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30: 1331-1351.
- [16] Kovacs I, Lindermayr C. Nitric oxide-based protein modification: formation and site-specificity of protein S-nitrosylation [J]. *Front Plant Sci*, 2013, 4: 137.
- [17] Zhang R, Hess DT, Reynolds JD, et al. Hemoglobin S-nitrosylation plays an essential role in cardioprotection [J]. *J Clin Invest*, 2016, 126: 4654-4658.
- [18] Faienza F, Lambrugh M, Rizza S, et al. S-nitrosylation affects TRAPI structure and ATPase activity and modulates cell response to apoptotic stimuli [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 176: 113869.
- [19] Wu W, Perrin-Sarrado C, Ming H, et al. Polymer nanocomposites enhance S-nitrosoglutathione intestinal absorption and promote the formation of releasable nitric oxide stores in rat aorta [J]. *Nanomedicine*, 2016, 12: 1795-1803.

- [20] Bartesaghi S, Radi R. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration [J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 618-625.
- [21] Li H, Yang Z, Gao Z. Protein tyrosine nitration: chemistry and role in diseases [J]. *Adv Mol Toxicol*, 2020, 13: 109-128.
- [22] Hopper RA, Garthwaite J. Tonic and phasic nitric oxide signals in hippocampal long-term potentiation [J]. *J Neurosci*, 2006, 26: 11513-11521.
- [23] Costa ED, Rezende BA, Cortes SF, et al. Neuronal nitric oxide synthase in vascular physiology and diseases [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 206.
- [24] Dashwood MR, Crump A, Shi-Wen X, et al. Identification of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in human penis: a potential role of reduced neuronally-derived nitric oxide in erectile dysfunction [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2011, 12: 1316-1321.
- [25] Lind M, Hayes A, Caprnda M, et al. Inducible nitric oxide synthase: good or bad? [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93: 370-375.
- [26] Qian Q, Zhang Z, Li M, et al. Hepatic lysosomal iNOS activity impairs autophagy in obesity [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 8: 95-110.
- [27] Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: beyond eNOS [J]. *J Pharmacol Sci*, 2015, 129: 83-94.
- [28] Kuchan MJ, Frangos JA. Role of calcium and calmodulin in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells [J]. *Am J Physiol*, 1994, 266: C628-C636.
- [29] Sessa WC. eNOS at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117: 2427-2429.
- [30] Boo YC, Hwang J, Sykes M, et al. Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser635 by a protein kinase A-dependent mechanism [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283: H1819-H1828.
- [31] Li S, Li Q, Lv X, et al. Aurantio-obtusin relaxes systemic arteries through endothelial PI3K/AKT/eNOS-dependent signaling pathway in rats [J]. *J Pharmacol Sci*, 2015, 128: 108-115.
- [32] Musicki B, Burnett AL. eNOS S-nitrosylation in erectile function [J]. *Int J Impot Res*, 2019, 31: 52-53.
- [33] Münzel T, Daiber A, Ullrich V, et al. Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25: 1551-1557.
- [34] Mahneva O, Caplan SL, Ivko P, et al. NO/cGMP/PKG activation protects *Drosophila* cells subjected to hypoxic stress [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2019, 223: 106-114.
- [35] Rocha BS, Laranjinha J. Nitrate from diet might fuel gut microbiota metabolism: minding the gap between redox signaling and inter-kingdom communication [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 149: 37-43.
- [36] Bahadoran Z, Mirmiran P, Jeddi S, et al. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway: findings from 20 years of the tehran lipid and glucose study [J]. *Int J Endocrinol Metab*, 2018, 16: e84775.
- [37] Petit PC, Fine DH, Gregory B, et al. The pathophysiology of nitrogen dioxide during inhaled nitric oxide therapy [J]. *ASAIO J*, 2017, 63: 7-13.
- [38] Gube M, Brand J, Chaker A, et al. Biological effects of inhaled nitrogen dioxide in healthy human subjects [J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2016, 89: 1017-1024.
- [39] Yu B, Ichinose F, Bloch DB, et al. Inhaled nitric oxide [J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176: 246-255.
- [40] Janina F, Adrian A, Markus H, et al. STIM-orai channels and reactive oxygen species in the tumor microenvironment [J]. *Cancers*, 2019, 11: 457.
- [41] Cheng G, Pan J, Podsiadly R, et al. Increased formation of reactive oxygen species during tumor growth: *ex vivo* low-temperature EPR and *in vivo* bioluminescence analyses [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 147: 167-174.
- [42] Scott DJ, Hull MA, Cartwright EJ, et al. Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc (Min/+) mouse [J]. *Gastroenterology*, 2001, 121: 889-899.
- [43] Kruk J, Aboul-Enein HY. Reactive oxygen and nitrogen species in carcinogenesis: implications of oxidative stress on the progression and development of several cancer types [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2017, 17: 904-919.
- [44] De Sanctis F, Sandri S, Ferrarini G, et al. The emerging immunological role of post-translational modifications by reactive nitrogen species in cancer microenvironment [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 69.
- [45] Servato JPS, Vieira CU, Faria PR, et al. The importance of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine as prognostic markers for oral squamous cell carcinoma [J]. *J Oral Pathol Med*, 2019, 48: 967-975.
- [46] Fujita M, Somasundaram V, Basudhar D, et al. Role of nitric oxide in pancreatic cancer cells exhibiting the invasive phenotype [J]. *Redox Biol*, 2019, 22: 101158.
- [47] Voss N, Kold-Petersen H, Bo edtkjer E. Enhanced nitric oxide signaling amplifies vasorelaxation of human colon cancer feed arteries [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316: H245-H254.
- [48] Li Z, Hao H, Tian W, et al. Nitric oxide, a communicator between tumor cells and endothelial cells, mediates the anti-tumor effects of *Marsdenia Tenacissima* extract (MTE) [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 250: 112524.
- [49] Bogen B, Fauskanger M, Haabeth OA, et al. CD4⁺ T cells indirectly kill tumor cells *via* induction of cytotoxic macrophages in mouse models [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2019, 68: 1865-1873.
- [50] Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative

- breast cancer [J]. Breast Cancer Res, 2015, 17: 25.
- [51] Wang L, Chang Y, Feng Y, et al. Nitric oxide stimulated programmable drug release of nanosystem for multidrug resistance cancer therapy [J]. Nano Lett, 2019, 19: 6800-6811.
- [52] Teng L, Song G, Liu Y, et al. Nitric oxide-activated "dual-key-one-lock" nanoprobe for *in vivo* molecular imaging and high-specificity cancer therapy [J]. J Am Chem Soc, 2019, 141: 13572-13581.
- [53] Özenver N, Efferth T. Small molecule inhibitors and stimulators of inducible nitric oxide synthase in cancer cells from natural origin (phytochemicals, marine compounds, antibiotics) [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 176: 113792.
- [54] Reinhardt C J, Xu R, Chan J. Nitric oxide imaging in cancer enabled by steric relaxation of a photoacoustic probe platform [J]. Chemical Sci, 2020, 11: 1587-1592.
- [55] Bonavida B. Sensitizing activities of nitric oxide donors for cancer resistance to anticancer therapeutic drugs [J]. Biochem Pharmacol, 2020, 176: 113913.
- [56] Oláh G, Módis K, Törö G, et al. Role of endogenous and exogenous nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide in HCT116 colon cancer cell proliferation [J]. Biochem Pharmacol, 2018, 149: 186-204.
- [57] Scicinski JJ, Oronsky B, Ning S, et al. NO to cancer: the complex and multifaceted role of nitric oxide and the epigenetic nitric oxide donor, RRx-001 [J]. Redox Biol, 2015, 6: 1-8.
- [58] Liu B, Huang X, Li Y, et al. JS-K, a nitric oxide donor, induces autophagy as a complementary mechanism inhibiting ovarian cancer [J]. BMC Cancer, 2019, 19: 645.
- [59] Dejam A, Hunter CJ, Tremonti C, et al. Nitrite infusion in humans and nonhuman primates: endocrine effects, pharmacokinetics, and tolerance formation [J]. Circulation, 2007, 116: 1821-1831.
- [60] Siddiqi N, Bruce M, Neil CJ, et al. Protocol: does sodium nitrite administration reduce ischaemia-reperfusion injury in patients presenting with acute ST segment elevation myocardial infarction? Nitrites in acute myocardial infarction (NIAMI) [J]. J Transl Med, 2013, 11: 116.