

线粒体一氧化氮合酶及其生物学作用

刘文武, 孙学军*, 徐伟刚

(第二军医大学海军医学系潜水医学教研室, 上海 200433)

[摘要] 近来,越来越多的证据表明存在线粒体一氧化氮合酶(mitochondrial nitric oxide synthase, mtNOS),它与线粒体内膜的基质面结合,通过钙敏感性途径产生一氧化氮(nitric oxide, NO)。生理状态下,mtNOS催化产生的NO通过与细胞色素C氧化酶可逆性竞争来调节线粒体的氧耗和跨膜电位。NO与线粒体呼吸链产生的超氧阴离子反应,生成过氧亚硝酸,后者不可逆性调节线粒体内的敏感靶点,诱导氧化和(或)硝化应激。此外,也发现NO参与了细胞的程序化死亡。本文主要综述了目前关于mtNOS在线粒体功能调节中作用的认识。

[关键词] 线粒体;一氧化氮合酶;一氧化氮

[中图分类号] Q 55 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)06-0656-04

Mitochondrial nitric oxide synthase: biological function

LIU Wen-wu, SUN Xue-jun*, XU Wei-gang (Department of Diving Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Increasing evidences have shown the existance of a mitochondrial nitric oxide synthase (mtNOS), which binds to the matrix face of the mitochondrial inner membrane and produces nitric oxide (NO) through a Ca^{2+} sensitive pathway. Under physiological condition, the NO catalyzed by mtNOS regulates mitochondrial oxygen consumption and transmembrane potential *via* reversible competition with cytochrome C oxidase. The reaction of NO with superoxide anion, which was produced by mitochondrial respiratory chain, yields peroxynitrite. Peroxynitrite irreversibly modifies susceptible targets in mitochondria and induces oxidative and/or nitrative stress. In addition, NO has also been implicated in the programmed cell death. This article reviews the current understanding of mtNOS's role in the regulation of mitochondrial functions.

[KEY WORDS] mitochondrion; nitric oxide synthase; nitric oxide

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 656-659]

自从一氧化氮(nitric oxide, NO)发现以来,其与一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)就成为医学研究领域的一大热点。大量研究证实,NO在心血管、神经、免疫等系统的调节中发挥了重要的作用。近几年的实验研究发现,线粒体内也存在NOS(mitochondrial NOS, mtNOS)。由于线粒体是细胞的能量工厂,在细胞的生命活动中具有不可替代的作用,因此关于mtNOS及其产生的NO对线粒体影响的研究备受重视。目前已发现NO对线粒体的作用方式与公认的通过激活鸟苷酸环化酶产生效应不同,而且它在调节细胞的氧化呼吸和线粒体能量代谢等方面发挥了重要作用。此外,线粒体也是细胞内自由基生成的主要场所,NO和自由基之间的反应又使NO对线粒体的作用更加复杂。有实验表明,mtNOS及其产生的NO在高血压及神经元变性等疾病中具有重要作用^[1,2]。本文就对mtNOS及其生物学作用作一综述。

1 mtNOS的鉴定及其特性

实验证实,机体内NOS存在三种不同的亚型。根据其对于钙离子的敏感性分为两大类:一类为钙依赖性NOS,即组成型NOS(constitutive NOS, eNOS),包括内皮型NOS(endothelial NOS, eNOS)和神经型NOS(neuronal NOS, nNOS),作用比较迅速;另一类为钙非依赖性NOS,主要是

诱导型NOS(inducible NOS, iNOS),合成不依赖钙的参与,一般在一些细胞因子或脂多糖(LPS)的刺激下易产生表达。因此,鉴定mtNOS,就是要确定mtNOS是否是已知三种亚型中的一种或为一种新型的NOS。

Loesch等^[3]在研究大鼠基底动脉周神经中的NADPH黄递酶活性时,首次描述了线粒体能产生NO,他们的染色发现,其主要局限于管壁神经末梢的线粒体内。Ghafourifar等^[4]运用分光光度法在肝细胞线粒体内也检测到了NO的存在,并基于底物和抑制剂方面的相似性,他们认为mtNOS可能与已知的NOS相似,同时也证实此酶活性与线粒体内膜有关。此外,还发现线粒体摄取钙后能活化此酶,即具有钙敏感性。Bates等^[5,6]运用eNOS单克隆抗体,在电子显微镜下发现大鼠肝、心、脑等部位的细胞线粒体内存在eNOS的免疫反应性,说明NO可能是线粒体呼吸的一个内在调节因子。Hotta等^[7]在豚鼠的心脏细胞线粒体研究中,通过免疫印迹分析,发现了类似的蛋白,它能与eNOS而不

[基金项目] 国家自然科学基金(30500579)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30500579)。

[作者简介] 刘文武, 硕士, 助教。

E-mail: liuwenwu1980@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: sunxjk@hotmail.com

是 nNOS 或 iNOS 抗体反应,并且发现标记部位局限于线粒体内膜。此后, Tatoyan 和 Giulivi^[8]的研究出现了难以解释的结果。他们基于大鼠肝脏纯化的 mtNOS 对 Ca^{2+} 敏感和组成型表达的特点,认为 mtNOS 可能是 cNOS,但它却不能与 eNOS 或 nNOS 抗体产生交叉反应。相反,这个酶与钙调蛋白结合紧密,在免疫反应性、相对分子质量(125 000~130 000)、酶动力学参数、辅助因子等方面与 iNOS 有较大的相似性。随着进一步研究, Rothe 等^[9]的研究出现了与上述不同的结果,认为 mtNOS 可能为 nNOS,因为他们在野生型小鼠神经元的线粒体内发现了 nNOS 免疫反应性。而 Haynes 等^[10]认为,与相应的 NOS 抗体产生交叉反应不能说明就是某型 NOS,因为 Western 印迹实验中,抗体只是与蛋白的某些表位结合,它们只是蛋白的一部分(约 1%~15%),不能说明与其余的蛋白也有 100% 的同源性。三种不同亚型 NOS 大概有 49%~56% 的同源性,同源氨基酸大约有 48%~55% 存在于 C 末端,而购买的抗体一般是和 NOS 的 C 末端反应,因此通过抗体交叉反应鉴定具有一定的局限性。随后, Elfering 等^[11]在实验中采用二维电泳分析,用胰蛋白酶或内蛋白酶 V₈ 胶内消化 mtNOS,然后用 MALDI-TOF(基质辅助的激光解吸/电离飞行时间)和 Q-TOF(四极-飞行时间质谱仪)分析洗脱片段,发现大部分消化的片段与大鼠的 nNOS 相匹配,所有片段与 nNOS 有 100% 的同源性,而与 iNOS 和 eNOS 分别只有 21% 和 78% 的同源性,并且纯化的 mtNOS 氨基酸分析后还发现其在等电点(pI)、相对分子质量及氨基酸组成上与 nNOS 有较大的相似性。由于全长 nNOS(nNOS α)有 4 个剪接变体,即 nNOS β 、nNOS γ 、nNOS μ 、nNOS-2,因此分离得到的蛋白是否为其中之一或为一个新的剪接变体? 随后 RT-PCR 实验结果表明,mtNOS 在序列和大小上与 nNOS α 相似,认为 mtNOS 是 nNOS 的 α 亚型^[11-12],与 nNOS 不同的是,mtNOS 有 2 个翻译后的修饰,即乙酰化和磷酸化。乙酰化促进它与膜的结合,而磷酸化则与此相反。然而另外一个研究小组结果显示,mtNOS 的相对分子质量为 130 000,虽然它与 nNOS 抗体能产生交叉反应,与钙调蛋白结合紧密,却能被经典的 iNOS 诱导剂 LPS 所诱导^[13]。基于上述实验研究,另外有学者认为,可能存在不只一种 mtNOS 变体,依不同的组织而不同。

不同 mtNOS 实验出现不同结果,可能与其分离和纯化有关。因为即使是最好的线粒体分离方法,仍然存在约 1% 的其他细胞碎片的污染。经典的测定呼吸链中的酶的研究没有必要 100% 的线粒体制品。但是,由于 NOS 在细胞内广泛表达,因此在 mtNOS 的实验中,普通的线粒体分离就不能满足要求了。此外,NOS 很难和其他 2 个精氨酸代谢的酶(精氨酸酶 II 和精氨酸脱羧酶)竞争底物,因为后者在线粒体内的含量较高,而且,精氨酸脱羧酶的产物精胺是线粒体基质中内源性 NOS 的抑制剂^[14-16]。这些都会影响到 mtNOS 的测定。

2 mtNOS 的定位

Reiner 等^[17]通过免疫电子显微镜观察到 eNOS 定位于线粒体外膜上。Gao 等^[18]的实验也观察到其定位于外膜的

胞质面。他们除了观察到上述结果外,将线粒体用蛋白酶 K 去除外膜结合蛋白后,Western 印迹未发现 eNOS 条带,而且去除 eNOS 自动抑制区的 5 个氨基酸残基,线粒体中也检测不到 eNOS。但我们可以认为这样的 NOS 只是结合在线粒体外膜上的蛋白,而不是真正意义上的 mtNOS。而其他实验则与上述结果不同。免疫组化研究发现,mtNOS 与琥珀酸脱氢酶共存,而琥珀酸脱氢酶是线粒体内膜的一个标记物,因而可以认为 mtNOS 与线粒体内膜结合。此外,mtNOS 的活性分析也支持 mtNOS 存在于内膜,因为亚线粒体颗粒和天然线粒体成分的 mtNOS 活性较线粒体匀浆液或通透处理的线粒体高。定位做得较好的要算 Ghafourifar 和 Richter^[4]的实验。他们采用氧化血红蛋白分析,发现完整线粒体和亚线粒体(去除外膜和膜间腔的线粒体)中不能检测到 NO,这样做排除了其他非线粒体 NOS 的污染和线粒体内膜胞质侧存在 NOS 的可能性。运用同样的方法,在翻转后的线粒体内膜,而不是基质中检测到 NO,而且它对常见的 NOS 抑制剂敏感,说明 mtNOS 存在于线粒体内膜的基质面。基于上述实验,基本可以将 mtNOS 定位于线粒体内膜。

3 mtNOS 及线粒体内 NO 的生物学作用

电子通过线粒体呼吸链的传递,在其末端最终传给氧生成水。伴随电子的传递,质子从线粒体的内膜基质被泵至膜间腔。这就是在 20 世纪 50 年代由 Mitchell 提出的化学渗透学说。这个学说认为,质子的移动,将在线粒体内膜建立起 2 个梯度,一个是电位梯度 $\Delta\psi$,一个是质子梯度 ΔpH 。第一个梯度使得内膜基质侧电位为负,第二个梯度维持基质碱性。抑制线粒体电子传递链,可减小 $\Delta\psi$ 和 ΔpH 。虽然细胞色素 C 氧化酶的 O_2 结合位点是特异性的,但 NO 和 O_2 在化学上的一些共性使得 NO 能与 O_2 竞争,结合到细胞色素 C 氧化酶上,从而抑制了电子传递。这种抑制作用是可逆性的,且呈剂量依赖性。因此,药理学上可以认为 NO 是 O_2 的拮抗剂。在生理浓度下的 NO 就能抑制 O_2 的消耗,降低 $\Delta\psi$ 和 ΔpH ,从而减少 ATP 的生成。

上述大部分实验研究都发现,mtNOS 为一钙敏感性蛋白。而线粒体内钙离子浓度受 $\Delta\psi$ 的调节,即 $\Delta\psi$ 减小则抑制钙摄取,反之则增加其摄取。 Ca^{2+} 的摄取增加,能激活 mtNOS。而 mtNOS 的主要生物学作用就是催化生成 NO,生成的 NO 通过和 O_2 竞争细胞色素 C 氧化酶而降低 $\Delta\psi$,从而又抑制了 Ca^{2+} 的摄取和线粒体 Ca^{2+} 的升高。因此,为了防止细胞器的 Ca^{2+} 超载,mtNOS 通过负反馈调节的形式维持着细胞内 Ca^{2+} 的稳定。

NO 除了与 O_2 竞争细胞色素 C 氧化酶外,另一重要作用就是与线粒体内的超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)发生反应。虽然 $O_2^{\cdot-}$ 的活性中等,但它能与 NO 以 $1.9 \times 10^4 s^{-1}$ 的速率常数发生反应,控制其扩散,从而生成过氧亚硝酸($ONOO^-$),而 $ONOO^-$ 是具有高氧化性的活性氮家族成员。事实上,线粒体内膜 NO 和 $O_2^{\cdot-}$ 反应生成 $ONOO^-$ 的速率常数为 $9.5 \times 10^{-14} s^{-1}$,超过了细胞色素 C 氧化酶对 NO 的利用能力($0.8 \times 10^{-14} s^{-1}$)^[19]。与 NO 反应的 $O_2^{\cdot-}$ 占整个内膜产生的

15%,其余85%的 O_2^- 生成 H_2O_2 。内膜释放 O_2^- 到基质,基质高pH值使NO和 O_2^- 的反应较为稳定,是生成 $ONOO^-$ 的有利环境^[20],而且在这些部位也发现了一些含有硝化的酪氨酸残基的蛋白,而酪氨酸的硝化是 $ONOO^-$ 的生化标志,这也支持上述观点。mtNOS产生的 $ONOO^-$ 能诱导氧化应激,促进细胞色素C从线粒体的释放^[21],这种现象能被抗凋亡蛋白Bcl-2抑制,表明 $ONOO^-$ 在凋亡中起到一定作用。此外,线粒体中的 $ONOO^-$ 能导导线粒体功能异常,导致大鼠、人骨骼肌收缩障碍^[22],降低心肌的氧化磷酸化能力^[23]。

蛋白巯基(SH)的亚硝基化是线粒体内NO参与的另一反应。由于NO的高脂溶性,低pH值和膜的亲脂性使得内膜和膜间腔是S-亚硝基化的有利场所。线粒体膜间隙蛋白、caspase-3、内膜镶嵌蛋白以及复合体I等的亚硝基化,在NO的信号调节中具有重要作用^[24]。

NO作为细胞色素C氧化酶的调节剂,不同于其他的细胞色素C氧化酶抑制剂(CN^- , N_3^- , $HCOOH$, S_2^- , CO),具有以下特点:(1)通过特殊的酶以一定的速率产生;(2)产生的部位与效应部位十分接近;(3)它对呼吸的抑制是可逆性的。有关线粒体NO最大的生理作用在于其对线粒体的呼吸并不象其他抑制剂一样是阻断作用,它是通过减缓呼吸链中的电子流来抑制呼吸的,这样避免了完全的呼吸抑制和低 $[NO]/[O_2]$ 比导致的活性氧(ROS)爆发,而ROS的爆发将对细胞产生极为不利的影响。此外,线粒体NO的产生,有利于 O_2 向周围组织的扩散。靠近血管的细胞能较周围细胞获得更多的L-精氨酸和 O_2 ,L-精氨酸和 O_2 的获取能活化mtNOS,使之产生更多的NO。产生的NO反过来与细胞色素C氧化酶结合,抑制了 O_2 的消耗,使更多的 O_2 扩散到邻近组织^[25]。同时,NO还具有扩张血管的作用,从另一个侧面也增加了组织的氧供。

虽然迄今为止尚未找到mtNOS的序列,但是综合近年的实验研究,我们可以初步确定它的几个特性:(1)它与线粒体内膜结合;(2)mtNOS催化生成NO受到 Ca^{2+} 的调节;(3)mtNOS通过催化生成NO对线粒体的呼吸等功能产生一定影响。mtNOS产生的NO通过竞争细胞色素C氧化酶氧的结合位点,调节线粒体呼吸、 $\Delta\psi$ 和 ΔpH ,从而调节线粒体的生物能学。此外mtNOS生成的NO能产生 $ONOO^-$,诱导氧化和/或硝化应激,同时还能使线粒体内的一些酶失活,引起细胞色素C的释放等。它的这些作用说明其与细胞凋亡有关。但是,它也能使caspase-3产生S-亚硝基化,也就是说使凋亡蛋白失活,又说明它具有抗凋亡作用,保护了不必要的凋亡和细胞器免遭caspase的水解。因此,有必要更好的来了解线粒体mtNOS。

[参考文献]

- Calderon-Cortes E, Clemente-Guerrero M, Sierra-Campos E, et al. Functional characterization of brain mitochondrial nitric oxide synthase during hypertension and aging [J]. *Amino Acids*, 2006, 30: 73-80.
- Marks JD, Boriboun C, Wang J. Mitochondrial nitric oxide mediates decreased vulnerability of hippocampal neurons from immature animals to NMDA [J]. *J Neurosci*, 2005, 25: 6561-6575.
- Loesch A, Belai A, Burnstock G. An ultrastructural study of NADPH-diaphorase and nitric oxide synthase in the perivascular nerves and vascular endothelium of the rat basilar artery [J]. *J Neurocytol*, 1994, 23: 49-59.
- Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria [J]. *FEBS Lett*, 1997, 418: 291-296.
- Bates TE, Loesch A, Burnstock G, et al. Mitochondrial nitric oxide synthase: a ubiquitous regulator of oxidative phosphorylation [J]? *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 218: 40-44.
- Bates TE, Loesch A, Burnstock G, et al. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 213: 896-900.
- Hotta Y, Otsuka-Murakami H, Fujita M, et al. Protective role of nitric oxide synthase against ischemia-reperfusion injury in guinea pig myocardial mitochondria [J]. *Eur J Pharmacol*, 1999, 380: 37-48.
- Tatoyan A, Giulivi C. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273: 11044-11048.
- Rothe F, Huang PL, Wolf G. Ultrastructural localization of neuronal nitric oxide synthase in the laterodorsal tegmental nucleus of wild-type and knockout mice [J]. *Neuroscience*, 1999, 94: 193-201.
- Haynes V, Elfering S, Traaseth N, et al. Mitochondrial nitric oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation [J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2004, 36: 341-346.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 38079-38086.
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, et al. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 14126-14131.
- Escames G, Leon J, Macias M, et al. Melatonin counteracts lipopolysaccharide-induced expression and activity of mitochondrial nitric oxide synthase in rats [J]. *FASEB J*, 2003, 17: 932-934.
- Li G, Regunathan S, Reis DJ. Arginine is synthesized by a mitochondrial arginine decarboxylase in rat brain [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1995, 763: 325-329.
- Wu G, Morris SM Jr. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond [J]. *Biochem J*, 1998, 336(Pt 1): 1-17.
- Galea E, Regunathan S, Eliopoulos V, et al. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine [J]. *Biochem J*, 1996, 316(Pt 1): 247-249.
- Reiner M, Bloch W, Addicks K. Functional interaction of caveolin-1 and eNOS in myocardial capillary endothelium revealed by immunoelectron microscopy [J]. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49: 1605-1610.
- Gao S, Chen J, Brodsky SV, et al. Docking of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) to the mitochondrial outer membrane: a pentabasic amino acid sequence in the autoinhibitory domain of eNOS targets a proteinase K-cleavable peptide on the cytoplasmic face of mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 15968-15974.

- [19] Poderoso JJ, Lisdero C, Schopfer F, et al. The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 37709-37716.
- [20] Valdez LB, Alvarez S, Arnaiz SL, et al. Reactions of peroxynitrite in the mitochondrial matrix[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 29: 349-356.
- [21] Ghafourifar P, Schenk U, Klein SD, et al. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome C release from isolated mitochondria. Evidence for intramitochondrial peroxynitrite formation[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 31185-31188.
- [22] Boveris A, Alvarez S, Navarro A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock[J]. *Free Radic Biol Med*, 2002, 33: 1186-1193.
- [23] Kanai A, Epperly M, Pearce L, et al. Differing roles of mitochondrial nitric oxide synthase in cardiomyocytes and urothelial cells[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 286: H13-H21.
- [24] Clementi E, Brown GC, Feelisch M, et al. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 7631-7636.
- [25] Solien J, Haynes V, Giulivi C. Differential requirements of calcium for oxoglutarate dehydrogenase and mitochondrial nitric-oxide synthase under hypoxia: impact on the regulation of mitochondrial oxygen consumption [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2005, 142: 111-117.

[收稿日期] 2005-12-20

[修回日期] 2006-03-08

[本文编辑] 尹 茶