

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01356

• 综述 •

一氧化氮对微生物生长影响作用的两面性

李德东, 王彦*, 李莹, 姜远英*

第二军医大学药学院新药研究中心, 上海 200433

[摘要] 近年来,随着研究的深入,一氧化氮(NO)越来越多的生物学功能逐渐被发现。以往国内外很多报道都证实 NO 在抗微生物感染方面起到重要作用,然而近年来的一些发现表明,NO 对微生物的生长还起到保护作用,这种保护作用体现在 NO 能促进细菌的耐药及在氧化应激和压力应激时对微生物的保护等方面。本文综述了 NO 对微生物生长影响作用的两面性及其机制的研究进展。

[关键词] 一氧化氮;微生物;两面性

[中图分类号] R 37 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)12-1356-03

Influence of nitric oxide on growth of microorganisms: a double-edged sword

LI De-dong, WANG Yan, LI Ying*, JIANG Yuan-ying*

New Drug R & D Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] Recently increasing functions of nitric oxide (NO) has been discovered. Researchers around the world have reported that NO plays an important role in the anti-microbial infection; however, more recent studies have found that NO also protect the growth of microorganisms, for example, it can facilitate drug resistance of bacteria and it can protect microorganisms from oxidative stress and pressure. This paper reviews both positive and negative roles of NO on microbial growth and the related mechanisms.

[Key words] nitric oxide; microorganism; two-side

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(12): 1356-1358]

随着一氧化氮(nitric oxide, NO)在促进血管舒张方面的作用被发现, NO 的生理和病理作用逐渐受到人们的重视,并成为当前的一个研究热点。近年来对其在感染损伤方面作用的研究亦取得了很大的进展。传统观点认为 NO 是抗感染损伤的一个重要分子,在细菌、真菌、病毒等感染中,活化的巨噬细胞通过产生大量 NO 来杀伤微生物。然而最近的一些研究表明, NO 对于微生物的生长是有保护作用的,这种作用体现在 NO 在不良环境下对微生物的保护。本文将从杀伤和保护两方面对 NO 影响微生物的生长进行阐述。

1 NO 对微生物的杀伤作用

作为活化巨噬细胞产生的一种细胞毒效应分子, NO 能介导巨噬细胞抑制和杀伤细菌、真菌等微生物,是机体抗感染防御体系中的重要因子之一。促使微生物自身体内产生 NO 也是药物发挥氧化应激作用杀伤微生物的重要机制^[1]。

1.1 NO 对细菌的杀伤作用 Nameda 等^[2]用 β -葡聚糖和吡啶美辛诱导小鼠腹腔感染细菌,导致感染性休克,在应用

NOS 抑制剂后, NO 代谢产物产量下降,小鼠的死亡率升高。用 NOS 抑制剂 2 周后,小鼠各器官细菌的数量明显上升,腹膜细胞中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的浓度上升。Webert 等^[3]在小鼠气管内滴入铜绿假单胞菌诱导肺炎的产生,然后将小鼠暴露在含有一定浓度 NO 的空气中。结果显示,与对照组相比,暴露在 NO 条件下的小鼠内诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性下降,但氮氧化物的水平明显上升,细菌数量明显减少,白细胞浸润程度降低,而机体的气体转换没有受到影响。Canthaboo 等^[4]用百日咳杆菌感染野生型小鼠和 iNOS 缺失型小鼠,结果显示 iNOS 缺失型小鼠对百日咳杆菌更为敏感。Engelsman 等^[5]在外科手术器具材料上添加 NO 释放涂层,在体外实验中能有效抑制金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌等的感染,但是在体内实验中这种效果却不明显。

1.2 NO 对真菌的杀伤作用 NO 对真菌的杀伤作用与细菌相似。Kim 等^[6]用血小板激活因子(PAF)预处理白假丝酵母菌感染的小鼠,导致 iNOS mRNA 和蛋白质的高表达。当加入 NF- κ B 抑制剂后,这种效果被显著地抑制。PAF 预

[收稿日期] 2010-04-07 **[接受日期]** 2010-04-27

[基金项目] 国家自然科学基金(81072678, 30825041, 30630071, 30672626), 上海市教育发展基金会晨光计划(2007CG51), Supported by National Natural Science Foundation of China(81072678, 30825041, 30630071, 30672626) and Chenguang Plan of Shanghai Education Development Foundation(2007CG51).

[作者简介] 李德东, 硕士生, E-mail: lidedong2005@163.com

* 通讯作者(Corresponding authors). Tel: 021-81871280, E-mail: wangyansmmu@126.com; Tel: 021-81871357, E-mail: jiangyy@smmu.edu.cn

处理小鼠避免了因白假丝酵母菌感染而引起的死亡,肾脏中真菌的增长也变缓。然而加入 iNOS 抑制剂后及在 iNOS 缺失小鼠中,PAF 的这种保护作用消失。数据显示 NO 在 PAF 诱导的保护机体抵抗白假丝酵母菌感染中发挥了重要作用。

在 NO 对微生物杀伤作用的研究中,大量的研究集中于机体通过巨噬细胞产生 NO 来杀伤侵袭的微生物。然而也有一些研究指出,促使微生物自身产生 NO 是药物发挥氧化应激作用来杀伤微生物的重要机制。Osório 等^[7] 研究指出 NO 在甲萘醌等诱导的酵母细胞凋亡中发挥重要作用:液泡膜蛋白 Btn1p 在酵母空泡运输精氨酸过程中发挥重要作用,BTN1 基因缺失型菌株对于甲萘醌、二酰胺、过氧化氢等引起的氧化应激产生耐受。实验发现,基因缺失菌相比野生型菌株,药物作用后活性氧生成减少。他们认为 BTN1 基因缺失型菌株不能有效转运精氨酸来合成 NO,从而减少了氧化损伤,而外源加入精氨酸则能够逆转这种氧化耐受。Almeida 等^[8] 也认为 NO 在酵母细胞凋亡过程中发挥重要作用:他们用过氧化氢诱导酵母细胞发生凋亡,从中检测到 NOS 的活性升高,NO 的生成增加。这种 NO 的生成依赖于左旋精氨酸,在加入 NOS 抑制剂后,细胞 NO 生成量下降,同时对过氧化氢产生耐受。

1.3 NO 对微生物杀伤作用机制 NO 是一种带有不配对电子的气体自由基,可与原核细胞和真核细胞内许多生物小分子发生化学及生化反应,包括氧化还原、离子移位和集团修饰等^[9]。生物体许多细胞如巨噬细胞、中性粒细胞都具有 iNOS,在细胞因子的作用下这些细胞能够产生效应分子 NO,杀伤微生物。

在病理条件下,NO 可以直接抑制微生物的有氧呼吸能量代谢;在高浓度时,NO 还可以与体内产生的氧自由基等反应生成活性氮氧化物(RNOS),再由活性氮氧化物发挥抗微生物感染作用。例如 NO 与超氧阴离子(O_2^-)反应,生成过氧亚硝基阴离子($ONOO^-$)或三氧化二氮(N_2O_3)等一系列物质,介导氧化损伤或亚硝基化损伤^[10]。 $ONOO^-$ 可有效地氧化蛋白质巯基、Fe/S 中心、锌指结构、硝基化蛋白质的酪氨酸残基等,使许多重要的蛋白质或酶失活,影响细胞代谢,并抑制呼吸链酶,破坏线粒体结构,使 DNA 链断裂,对微生物造成杀伤^[11]。另外,NO 是活化巨噬细胞抑制和杀伤胞内病菌的重要效应分子,它可以通过诱导巨噬细胞释放肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)等炎症介质介导免疫毒性反应,杀死病菌。

2 NO 对微生物的保护作用

以往关于 NO 对微生物生长影响的研究多着眼于 NO 对微生物的杀伤方面,然而最近的一些研究表明: NO,尤其是微生物自身产生的 NO,对其抵抗外界恶劣环境、促进微生物感染宿主,甚至促进微生物耐药等方面发挥重要作用。

2.1 NO 对细菌的保护作用 Johnson 等^[12] 的研究发现,在植物生长组织内会有纤维二糖(植物细胞壁的一种成分)的生成,而一些植物致病性链霉菌属容易感染生长旺盛的植物组织。这些链霉菌会产生 NO 等活性氮类物质用于一种叫做 thaxtomin 的生物合成,thaxtomin 能够抑制植物纤维二糖

的合成,从而破坏了细胞壁的完整性,促进细菌感染植物组织。然而在此过程中 NO 的作用尚未研究清楚。

Gusarov 等^[13-15] 关于 NO,尤其是细菌内源性 NO 对细菌的影响做了长期细致的研究,他们用 NO 预处理枯草杆菌,然后加以 H_2O_2 刺激,结果显示用 NO 预处理细菌几秒后再加以 H_2O_2 刺激能够大幅提高细菌的氧化应激适应能力。此外他们还认为内源性 NO 是维持细菌毒力和细菌在巨噬细胞内存活的关键因素:他们比较了 NOS 缺失型和野生型炭疽芽孢杆菌在小鼠体内的毒力以及巨噬细胞对其 DNA 的损伤程度,结果显示 NOS 缺失型细菌感染小鼠所需的半数致死量明显增加,巨噬细胞作用后 DNA 损伤也更加显著。另外,他们关于内源性 NO 促进细菌产生耐药性的报道更是引起了人们的关注,他们的研究发现: NOS 基因缺失型枯草杆菌对于各种药物的敏感性明显上升,而外源性加入 NO 后细菌对药物的敏感性降低,他们认为这种 NO 促进细菌耐药作用具有广谱性。Husain 等^[16] 的研究结果与上述结果相似,他们研究了沙门菌属在氧化应激环境下存活的条件,发现用 NO 预处理细菌,阻断有氧呼吸电子传递链,增加细菌内 NADH 的含量,能够使细菌耐受 H_2O_2 导致的氧化应激。

2.2 NO 对真菌的保护作用 相对于 NO 对细菌的保护作用,关于 NO 对真菌的保护作用的研究报道较为少见。Chiang 等^[17] 的研究表明微量的 NO 能够降低金属离子对酿酒酵母的杀伤:他们用不同浓度的铜离子刺激酿酒酵母,然后加以不同浓度的 NO,结果显示低浓度的 NO 能够降低金属离子的毒性,对菌体起到保护作用。Domitrovic 等^[18] 也研究了 NO 对酿酒酵母的保护作用,他们将酿酒酵母置于不同的温度环境及流体静力压下,观察其对于热刺激及压力刺激的耐受能力。结果显示:预先用 NO 供体短时间处理酵母细胞能够增强其耐高温和耐压力刺激的能力。

2.3 NO 对微生物保护作用机制 NO 对微生物的保护作用是最近几年研究较为深入的一个方向。然而其作用机制目前尚未有统一的看法。Gusarov 等^[13-15] 认为 NO 促进细菌耐受氧化应激的关键在于 NO 可以抑制芬顿效应。芬顿效应是一种在亚铁离子(Fe^{2+})催化下 O_2^- 和 H_2O_2 相互作用生成羟自由基($OH\cdot$)的反应,NO 抑制了芬顿效应,从而减少了对细菌具有很强杀伤作用的 $OH\cdot$ 的产生。此外 NO 还可以增强过氧化氢酶的活性,两方面共同导致了细菌对过氧化氢的耐受。而 Husain 等^[16] 并不认同此观点,他们认为 NO 阻断了细菌有氧呼吸电子传递链,增加了细菌内的 NADH 的含量,从而促进了氧化剂的还原,阻止了氧化剂对细菌的杀伤。Chiang 等^[17] 研究发现微量 NO 可以降低铜离子对酿酒酵母菌的毒性,认为 NO 抑制了铜离子介导的转录因子 Mac1 的活性,导致了对铜离子有高度亲和性的转运蛋白 Ctr1 的表达,从而阻止了高浓度铜离子进入细胞。Domitrovic 等^[18] 认为 NO 增强酵母耐高温和耐压力刺激的机制并不相同,但共同的可能是 NO 在信号转导过程中发挥了重要作用。

3 NO 作用的双重性

NO 广泛产生于各种生物细胞中,在哺乳动物、细菌、真菌体内均有产生。并在各种生物信号转导过程中发挥重要

作用^[19-20]。在关于 NO 与微生物生长之间关系的研究中,人们发现在不同的浓度、不同的环境下,NO 会对微生物的生长造成截然不同的影响。例如 Chiang 等^[17]的研究表明微量的 NO 能够激活铜离子敏感性转录因子(Ace1),加速金属离子的代谢,从而降低金属离子的毒性,对细菌起到保护作用;而高浓度的 NO 反而抑制 Ace1,减缓金属离子的代谢,增加了金属离子的毒性。目前 NO 对微生物生长所造成的双重影响尚待研究。另外,一些 NO 在微生物生长过程中起到了特殊的作用,例如 Barraud 等^[21]研究发现铜绿假单胞菌内源性产生的 NO 能够促使细菌由菌丝态向游离态转换,合理利用 NO 的这种性质,将 NO 供体与杀菌药合用可以增强药物对菌丝态细菌的杀菌效果。此外,不同的微生物,NO 所表现出的作用可能也完全不同,例如文献^[7,13-15]关于 NO 对于真菌和细菌耐药性的研究报道截然相反,Osório 等^[7]认为促使微生物自身产生 NO 是药物发挥氧化应激作用来杀伤微生物的重要机制;而 Gusarov 等^[13-15]认为微生物自身能够产生 NO 是增强细菌感染宿主,甚至产生耐药性的重要机制。这似乎是两种矛盾的观点。但仔细推敲,我们认为是可以解释的:外界刺激杀伤微生物时,早期微生物自身免疫机制发挥作用,产生 NO,这时的 NO 对于微生物是有保护作用的^[14],而药物大量长时间刺激诱使微生物产生大量 NO,这时的 NO 又是有杀伤作用的。所以我们认为 NO 产生的时间、环境、浓度不同是它表现为双刃剑作用的重要原因。但这只是我们的猜测,其中的机制需要进一步的研究。目前关于微生物内源性 NO 的研究报道并不多见,内源性 NO 在微生物的生长过程中发挥着怎样的作用尚不得而知。但我们相信,就像在哺乳动物体内的作用一样,NO 在微生物信号转导等方面也发挥着独特的作用,而且这种作用深受浓度、环境、菌种等的影响。

对微生物来说,NO 是一把双刃剑,在适宜的环境中 NO 对微生物起到保护作用,而条件不适则有可能对其造成杀伤。更加深入地研究 NO 对微生物生长造成的影响及其机制,必将有利于我们寻找新的抗感染药物作用靶点和新的抗感染治疗手段。

[参考文献]

- [1] Yang C S, Yuk J M, Jo E K. The role of nitric oxide in mycobacterial infections[J]. *Immune Netw*, 2009, 9: 46-52.
- [2] Nameda S, Saito M, Miura N N, Adachi Y, Ohno N. Effect of nitric oxide on beta-glucan/indomethacin-induced septic shock[J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28: 1254-1258.
- [3] Webert K E, Vanderzwan J, Duggan M, Scott J A, McCormack D G, Lewis J F, et al. Effects of inhaled nitric oxide in a rat model of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia[J]. *Crit Care Med*, 2000, 28: 2397-2405.
- [4] Canthaboo C, Xing D, Wei X Q, Corbel M J. Investigation of role of nitric oxide in protection from *Bordetella pertussis* respiratory challenge[J]. *Infect Immun*, 2002, 70: 679-684.
- [5] Engelsman A F, Krom B P, Busscher H J, van Dam G M, Ploeg R J, van der Mei H C. Antimicrobial effects of an NO-releasing poly(ethylene vinylacetate) coating on soft-tissue implants *in vitro* and in a murine model[J]. *Acta Biomater*, 2009, 5: 1905-1910.
- [6] Kim H A, Kim S H, Ko H M, Choi J H, Kim K J, Oh S H, et al. Nitric oxide plays a key role in the platelet-activating factor-induced enhancement of resistance against systemic candidiasis[J]. *Immunology*, 2007, 124: 428-435.
- [7] Osório N S, Carvalho A, Almeida A J, Padilla-Lopez S, Leão C, Laranjinha J, et al. Nitric oxide signaling is disrupted in the yeast model for Batten disease[J]. *Mol Biol Cell*, 2007, 18: 2755-2767.
- [8] Almeida B, Buttner S, Ohlmeier S, Silva A, Mesquita A, Sampaio-Marques B, et al. NO-mediated apoptosis in yeast[J]. *J Cell Sci*, 2007, 120: 3279-3288.
- [9] Spiropoulou C F, Morzunov S, Feldmann H, Sanchez A, Peters C J, Nichol S T. Genome structure and variability of a virus causing Hantavirus pulmonary syndrome[J]. *Virology*, 1994, 200: 715-723.
- [10] Chan J, Tanaka K, Carroll D, Flynn J, Bloom B R. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Infect Immun*, 1995, 63: 736-740.
- [11] Demiryürek A T, Cakici I, Kanzik I. Peroxynitrite: a putative cytotoxin[J]. *Pharmacol Toxicol*, 1998, 82: 113-117.
- [12] Johnson E G, Sparks J P, Dzikovski B, Crane B R, Gibson D M, Loria R. Plant-pathogenic *Streptomyces* species produce nitric oxide synthase-derived nitric oxide in response to host signals[J]. *Chem Biol*, 2008, 15: 43-50.
- [13] Gusarov I, Shatalin K, Starodubtseva M, Nudler E. Endogenous nitric oxide protects bacteria against a wide spectrum of antibiotics[J]. *Science*, 2009, 325: 1380-1384.
- [14] Shatalin K, Gusarov I, Avetissova E, Shatalina Y, McQuade L E, Lippard S J, et al. Bacillus anthracis-derived nitric oxide is essential for pathogen virulence and survival in macrophages[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 1009-1013.
- [15] Gusarov I, Nudler E. NO-mediated cytoprotection: Instant adaptation to oxidative stress in bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102: 13855-13860.
- [16] Husain M, Bourret T J, McCollister B D, Jones-Carson J, Laughlin J, Vazquez-Torres A. Nitric oxide evokes an adaptive response to oxidative stress by arresting respiration[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 7682-7689.
- [17] Chiang K T, Shinyashiki M, Switzer C H, Valentine J S, Gralla E B, Thiele D J, et al. Effects of nitric oxide on the copper-responsive transcription factor Ace1 in *Saccharomyces cerevisiae*: cytotoxic and cytoprotective actions of nitric oxide[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 377: 296-303.
- [18] Domitrovic T, Palhano F L, Barja-Fidalgo C, DeFreitas M, Orlando M T, Fernandes P M. Role of nitric oxide in the response of *Saccharomyces cerevisiae* cells to heat shock and high hydrostatic pressure[J]. *FEMS Yeast Res*, 2003, 3: 341-346.
- [19] Gusarov I, Starodubtseva M, Wang Z Q, McQuade L, Lippard S J, Stuehr D J, et al. Bacterial nitric-oxide synthases operate without a dedicated redox partner[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 13140-13147.
- [20] Nioche P, Berka V, Vipond J, Minton N, Tsai A L, Raman C S. Femtomolar sensitivity of a NO sensor from *Clostridium botulinum*[J]. *Science*, 2004, 306: 1550-1553.
- [21] Barraud N, Hassett D J, Hwang S H, Rice S A, Kjelleberg S, Webb J S. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *J Bacteriol*, 2006, 188: 7344-7353.