

# 蛋白质酪氨酸硝化的研究<sup>\*</sup>

池 泉 黄开勋<sup>\*\*</sup>

(华中科技大学化学系 武汉 430074)

**摘 要** 蛋白质酪氨酸硝基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰,与多种病症相关。经由过氧亚硝酸根( $\text{ONOO}^-$ )和  $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ /血红素过氧化物酶体系是促使蛋白质硝化最主要的两种途径,其反应为自由基机理。本文对体内蛋白质硝基化的途径、机制及其生物学意义作了综述,指出蛋白质的硝化具有选择性,特定酪氨酸残基发生硝化能够改变蛋白质的结构和功能,影响其免疫应答和可能涉及的信号转导过程,从而具有重要的生物学意义。

**关键词** 酪氨酸硝化 3-硝基酪氨酸 活性氮 过氧亚硝酸根

中图分类号: Q51; R362 文献标识码: A 文章编号: 1005-281X(2006)07/8-1019-07

## Protein Tyrosine Nitration

Chi Quan Huang Kaixun<sup>\*\*</sup>

(Department of Chemistry, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

**Abstract** Protein tyrosine nitration is an important posttranslational modification involving a variety of diseases. It's occurred via peroxynitrite or nitrite/hydrogen peroxide/hemeperoxydase system, and nitrotyrosine is formed by free radical reaction. The *in vivo* protein nitration pathways, the mechanism and the biological significance are discussed. It points out that protein nitration has selectivity, and nitration of special tyrosine residue(s) can lead to the alteration of the structure and functions of the protein, and affect the immunological response or signal transduction involved.

**Key words** tyrosine nitration; 3-nitrotyrosine; reactive nitrogen species; peroxynitrite

## 1 引言

NO 是生物体内的一种重要信使分子,参与血管调节、神经传递、炎症和免疫反应等多种过程<sup>[1]</sup>。但炎症条件下诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的过量表达会使 NO 水平升高,产生细胞毒性,造成病理损伤。活性氧(ROS)存在下,NO 衍生得到的活性氮(RNS),如过氧亚硝酸根离子( $\text{ONOO}^-$ )等,是 NO 介导病理损伤作用的重要环节。 $\text{ONOO}^-$ 可使酪氨酸(Tyr)或蛋白质酪氨酸残基发生硝化反应,生成 3-硝基酪氨酸(NT)。目前,酪氨酸残基硝化已被确认为是一种重要的蛋白质翻译后修饰,并且与炎症、心血管病和神经退行性疾病等多种病症相关,而 NT

的形成则被认为是体内 RNS 形成的生物标志(biomarker)<sup>[2]</sup>。

## 2 蛋白质硝化与疾病

早在 1990 年 Oshima 等<sup>[3]</sup>就报道了在人尿液中检测到 NT、3-硝基苯乙酸和 3-硝基苯乳酸等代谢物,并提出 NT 可作为内源性蛋白质硝化的标志。1992 年 Beckman 小组<sup>[4,5]</sup>证实  $\text{ONOO}^-$ 可在体外促使蛋白质如超氧化物歧化酶 Cu, ZnSOD 等发生硝化,并提出内源性硝化剂可导致体内蛋白质的硝化。之后 Beckman<sup>[6]</sup>又提出用抗体的方法来识别硝化蛋白,并且用免疫组化的方法证实了人动脉粥样硬化病变组织和急性呼吸窘迫综合症肺部组织中硝化蛋

收稿: 2005 年 8 月, 收修改稿: 2005 年 11 月

\*国家自然科学基金项目资助(No: 20371018)

\*\*通讯联系人 e-mail: hxxzxf@mail.hust.edu.cn

白的存在;同时 Halliwell 实验室<sup>[7]</sup>用高效液相色谱分离、紫外检测的方法测定了类风湿性关节炎病人血清和滑液中游离 NT 的含量,此后有关蛋白质硝化的报道迅速增多。

随着分析检测技术的发展,人们已经在 50 多种人类疾病和多种动物或细胞模型中检测到游离或蛋白质结合形态的 NT。通常疾病状态下 NT 的水平明显高于正常水平<sup>[12]</sup>,根据疾病和组织的不同,蛋白质结合的 NT 残基含量相对正常值要高出 2—10 倍,而游离的 NT 含量则高出 1.5—2 倍。目前已分析鉴定了多种人类疾病以及动物和细胞模型中的硝化蛋白,如人肾移植排斥和神经退行性疾病中的 MnSOD<sup>[8,9]</sup>、人帕金森综合症和动物模型中的一突触蛋白<sup>[10—12]</sup>、人胰腺癌中的 c-Src 酪氨酸激酶<sup>[13]</sup>、人心脏衰竭和老年鼠模型中的肌浆网钙 ATP 酶<sup>[14,15]</sup>、人急性呼吸窘迫综合症中的几种血浆蛋白<sup>[16]</sup>、帕金森综合症鼠模型中的酪氨酸羟化酶<sup>[17]</sup>、肌萎缩性侧索硬化症鼠模型中的烯醇化酶、ATP 酶、热休克蛋白和肌动蛋白等<sup>[18]</sup>、牛动脉粥样硬化损伤处前列腺环素合酶<sup>[19]</sup>、糖尿病鼠模型中和由内毒素诱发硝化的琥珀酰辅酶 A 3-氧酸辅酶 A 转移酶<sup>[20,21]</sup>、鼠肝和肺组织中由内毒素诱发硝化的线粒体蛋白<sup>[22]</sup>、镰状细胞病鼠肾和肝组织中的肌动蛋白<sup>[23]</sup>等,而在细胞模型中检测到的硝化蛋白则更多<sup>[2]</sup>,如与早老性痴呆症相关的 tau 蛋白<sup>[24—26]</sup>等。这些例子说明蛋白质硝化与疾病密切相关,并且可能介导疾病的发生和发展。

### 3 RNS 与蛋白质硝化

RNS 指的是 NO 和由 NO 与 ROS 衍生的自由基或非自由基活性产物,如 NO<sub>2</sub>、HNO<sub>2</sub>、ONOO<sup>-</sup>、NO<sub>2</sub>Cl 等。RNS 的形成离不开 ROS,氧化应激状态下 RNS/ROS 水平的升高将导致蛋白质的硝化。多种途径可导致蛋白质酪氨酸残基的硝化<sup>[27]</sup>,其中经由 ONOO<sup>-</sup> 和 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/血红素过氧化物酶促使蛋白质硝化被认为是最主要的两种途径。由于生物体系的复杂性,哪种硝化途径占主导作用应根据具体的模型来定。

ONOO<sup>-</sup> 在体内主要由 NO 与超氧阴离子(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)快速结合生成,是一个扩散控制的反应,其速率常数 (~10<sup>10</sup> L·mol<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>)比 SOD 清除 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的速率常数 ((1—2) × 10<sup>9</sup> L·mol<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>)大<sup>[28]</sup>。NO 的半衰期为几秒且容易穿过细胞膜,O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的半衰期仅为几毫秒

并只能经离子通道穿过细胞膜,而 NO 和 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 必须同时产生才能生成 ONOO<sup>-</sup>,因此 ONOO<sup>-</sup> 将主要在产生 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 的位点附近形成。另一个产生 ONOO<sup>-</sup> 的途径是亚硝酸根阴离子(NO<sup>-</sup>)与分子氧直接反应<sup>[29]</sup>,其速率常数为 5.7 × 10<sup>7</sup> L·mol<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>。

ONOO<sup>-</sup> 是一个强氧化剂和硝化剂,其主要的反应途径如图 1 所示<sup>[30]</sup>。这些反应大致可分为直接氧化还原反应、与 CO<sub>2</sub> 的反应和质子化后均裂 3 大类。体内 ONOO<sup>-</sup> 与其共轭酸 ONOOH(p K<sub>a</sub> = 6.8)共存,可直接氧化过渡金属中心(单电子氧化)或巯基(双电子氧化),生成 NO<sub>2</sub> 或 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,过渡金属中心则形成氧合金属配合物。CO<sub>2</sub> 在体内浓度很高,血浆中达 1.3 mmol L<sup>-1</sup>,与 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> (25 mmol L<sup>-1</sup>) 维持平衡。ONOO<sup>-</sup> 可与 CO<sub>2</sub> 反应(速率常数 5.8 × 10<sup>4</sup> L·mol<sup>-1</sup>·s<sup>-1</sup>),生成中间体 ONOOCO<sub>2</sub><sup>-</sup>,然后均裂产生 CO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和 NO<sub>2</sub>。CO<sub>3</sub><sup>-</sup> 是一个强单电子氧化剂,CO<sub>2</sub> 的存在增强了 ONOO<sup>-</sup> 的氧化能力,而 NO<sub>2</sub> 较温和,同时是一个硝化剂。ONOOH 均裂产生 OH 和 NO<sub>2</sub>,OH 氧化能力很强,但选择性较低。在没有靶分子存在时,ONOO<sup>-</sup> 大部分通过分子内重排分解转化为 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>。CO<sub>3</sub><sup>-</sup> 和氧合金属配合物等可将 Tyr 氧化生成酪氨酸自由基(Tyr·),Tyr·与 NO<sub>2</sub> 结合生成 NT。

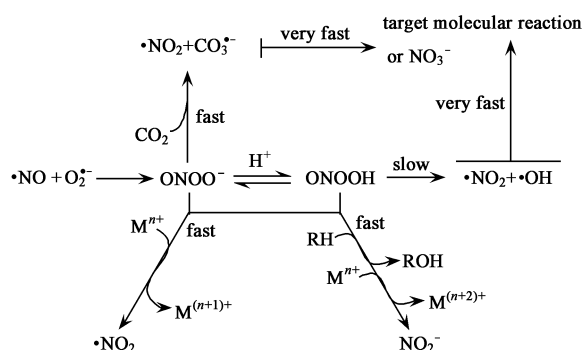
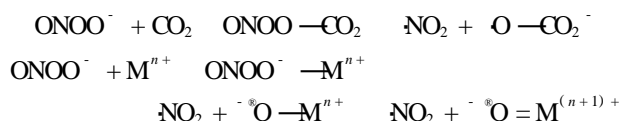


图 1 ONOO<sup>-</sup> 反应途径<sup>[30]</sup>

Fig. 1 Peroxynitrite reaction pathways<sup>[30]</sup>

ONOO<sup>-</sup> 与过渡金属离子反应很快<sup>[30]</sup>,小分子金属配合物,如 Fe( )-EDTA、金属卟啉以及血红素蛋白、SOD 等都可加速蛋白质的硝化。H<sup>+</sup>、CO<sub>2</sub> 以及过渡金属离子均可看作是 Lewis 酸,而 ONOO<sup>-</sup> 是 Lewis 碱,反应形成 Lewis 酸碱加合物后发生均裂,产生 NO<sub>2</sub> 和氧自由基。金属氧自由基经氧化金属离子重排形成氧合金属配合物。





经由  $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ /血红素过氧化物酶体系使蛋白质硝化同样涉及到自由基的形成<sup>[31,32]</sup> (图 2)。髓过氧化物酶 (MPO)、嗜酸性粒细胞过氧化物酶 (EPO) 或辣根过氧化物酶 (HRP) 等与  $\text{H}_2\text{O}_2$  反应生成化合物 (铁( ) 阳离子自由基配合物), 化合物可氧化  $\text{NO}_2^-$  生成  $\text{NO}_2$  (速率常数  $2 \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ), 同时得到化合物, 化合物可继续氧化  $\text{NO}_2^-$  生成  $\text{NO}_2$  (速率常数  $5.5 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ )。化合物也可氧化 Tyr 生成 Tyr·, Tyr· 与  $\text{NO}_2$  结合生成 NT。其它的血红素蛋白 (血红蛋白、肌红蛋白、细胞色素 c 等)、游离血红素也可发生类似的反应产生  $\text{NO}_2$ , 另外  $\text{NO}_2^-$  还可被由 Fenton 反应生成的 OH 氧化而生成  $\text{NO}_2$ , 从而促使蛋白质硝化<sup>[33,34]</sup>。

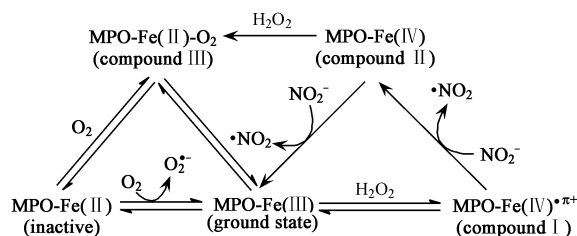


图 2  $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ /血红素过氧化物酶体系<sup>[34]</sup>

Fig. 2  $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ /hemeperoxydase system<sup>[34]</sup>

另外一个途径是  $\text{NO}_2^-$  的酸化形成  $\text{HNO}_2$ ,  $\text{HNO}_2$  可缓慢地硝化蛋白质。在一些模型中, 在没有明显需要  $\text{O}_2^{\bullet-}$  和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的情况下, 可观察到 NT 的缓慢积累<sup>[35]</sup>。除酸化外,  $\text{NO}_2^-$  还可被由 MPO 生成的化合物氧化  $\text{Cl}^-$  形成的次氯酸 (HOCl) 所氧化, 生成硝酰氯 ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ) 而使蛋白质硝化, 但  $\text{NO}_2\text{Cl}$  作为内源性硝化剂似乎不可能<sup>[36]</sup>。此外,  $\text{H}_2\text{O}_2$  还可氧化  $\text{NO}_2^-$ , 经由  $\text{ONOOH}$  的路径硝化蛋白质, 但需要较高的  $\text{H}_2\text{O}_2$  浓度, 生理条件下不可能产生。

上述两种主要硝化途径的自由基反应机理已获公认<sup>[27]</sup>。系统内存在的  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  和氧合金属配合物以及 OH 等可将 Tyr 氧化生成 Tyr·, Tyr· 与产生的  $\text{NO}_2$  以扩散控制的速率结合生成 NT (图 3)。Tyr· 二聚形成 3,3'-二酪氨酸可与 Tyr· 和  $\text{NO}_2$  生成 NT 的反应竞争。然而, 在蛋白质中由于扩散和空间位阻的影响, 分子内或分子间发生二聚反应受到限制。

无论在水溶液中, 还是在疏水环境中, Tyr 更倾向于同  $\text{NO}_2$  反应生成 NT。另一竞争途径是 OH 和氧合金属配合物的介导形成 3-羟基酪氨酸<sup>[31]</sup>。Tyr 也能同 NO 结合形成 3-亚硝基酪氨酸 (3-nitrosotyrosine), 再经过连续的两电子氧化反应最终生成 NT, 这主要发生在含过渡金属的蛋白质中<sup>[37]</sup>。Beckman<sup>[3,4]</sup> 最初还提出了一种亲电芳环硝化机理,  $\text{ONOO}^-$  与过渡金属离子结合形成极化分子, 异裂后产生  $\text{NO}_2^+$ , 极化分子或  $\text{NO}_2^+$  亲电进攻芳环而使 Tyr 硝化。不过目前的实验证据还不能证实亲电芳环硝化可在生物体内发生。

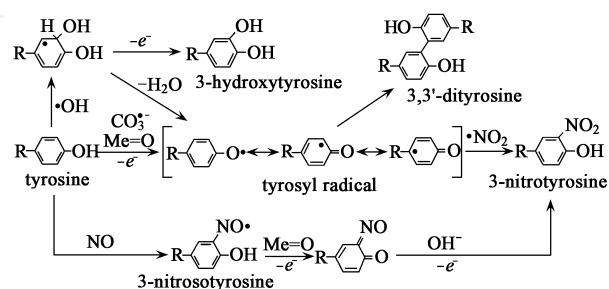


图 3 酪氨酸硝化的自由基机理<sup>[27]</sup>

Fig. 3 The free radical mechanism of tyrosine nitration<sup>[27]</sup>

硝化是一个选择性修饰特定蛋白质的过程。在一系列疾病和实验模型中<sup>[2,38]</sup>, 只在疾病损伤部位和特定的细胞中检测到了硝化蛋白, 这说明靠近硝化试剂的产生位点决定了硝化修饰的目标蛋白。由于蛋白质含量的差异, 不同类型细胞中将会有不同的蛋白质被硝化。然而, 蛋白质免疫印迹 (抗 NT) 观察到的硝化蛋白与考马斯亮蓝染色凝胶上的主要条带并不总是吻合<sup>[39]</sup>, 这说明蛋白质的硝化不仅仅是由蛋白质的大小和含量所决定。

蛋白质结构上的差异决定了硝化是一个选择性修饰特定 Tyr 残基的过程。谷氨酰胺合酶的硝化位点分析表明多数被硝化的 Tyr 是表面暴露的, 但并不是所有表面暴露的 Tyr 残基都易于被硝化<sup>[40]</sup>, 类似的还有 Tyr 羟化酶, Tyr423 是主要的硝化位点, 但它并不是表面暴露程度最高的<sup>[41]</sup>。

硝化非表面暴露的特定 Tyr 残基, 可能的机制是被蛋白质金属活性中心所催化<sup>[43]</sup>, 如 MnSOD<sup>[43]</sup>、前列腺环素合酶<sup>[44]</sup> 和细胞色素<sup>[45,46]</sup> 等。 $\text{ONOO}^-$  可与过渡金属离子迅速反应, 产生硝化中间体, 从而使邻近的没有暴露在表面的 Tyr 残基发生硝化。 $\text{ONOO}^-$  与 MnSOD 作用, 靠近金属活性中心的 Tyr34 是其主要的硝化位点<sup>[43]</sup>, 而前列腺环素合酶中的

Tyr430 邻近血红素辅基,与  $\text{ONOO}^-$  作用时被优先硝化<sup>[43]</sup>。细胞色素 c 有 4 个保守的 Tyr 残基,用连续低浓度引入  $\text{ONOO}^-$  的方式与细胞色素 c 反应,开始 Tyr97 或(和) Tyr74 被硝化,这两个 Tyr 残基暴露在蛋白质的表面;然后 Tyr67 被硝化,生成二硝化和三硝化产物,而 Tyr67 包埋在蛋白质的内部,但靠近血红素辅基,在有过量未反应的细胞色素 c 存在下, Tyr67 的硝化证明了金属活性中心催化的机制;最后 Tyr48 被硝化<sup>[46]</sup>。另外疏水性、不同的硝化试剂也可能影响蛋白质的硝化位点<sup>[47]</sup>。

不含金属离子的蛋白质其硝化位点可能与其序列、Tyr 残基的位置及周围环境有关。对硝化蛋白的分析表明,硝化与磷酸化不同,它没有特定的序列要求<sup>[39]</sup>,但已知的 Tyr 硝化位点表明它靠近酸性残基,通常含有转动诱导氨基酸(turn inducing residues)。Tyr 残基能以氢键与邻近的负电荷基团发生作用,通常是 Gu 残基。细胞色素 P450 中 Tyr190 周围的负电荷和可能与 Gu149 形成的氢键不仅影响 Tyr 硝化的选择性,而且可解释硝化后蛋白质功能的明显改变<sup>[48]</sup>。

总的来说,蛋白质含量、Tyr 的多少以及 Tyr 自由基的存在似乎对 Tyr 残基的选择性硝化不产生影响。Tyr 残基的表面暴露、不存在立体位阻以及其所处的静电微环境则构成了决定蛋白质主要硝化位点的结构要素<sup>[39]</sup>。

#### 4 硝化对蛋白质结构、功能的影响

酪氨酸芳环硝化增加了一个较大体积的取代基,酚羟基  $\text{p}K_a$  值由 10 降到 7.5,蛋白质增加了负电荷。特定 Tyr 残基发生硝化能够改变蛋白质的结构和功能,影响其免疫应答和可能涉及的信号转导过程<sup>[39]</sup>。

一些蛋白在硝化后获得了某些功能,如细胞色素 c<sup>[46]</sup>,硝化破坏了 Met80 与卟啉铁的配位,使得可以结合  $\text{H}_2\text{O}_2$  而增强了其过氧化物酶活性。一些蛋白在硝化后其功能未受到影响,如急性呼吸窘迫综合征血浆中的转铁蛋白、 $\alpha_1$ -抗凝乳蛋白酶等<sup>[16]</sup>。然而更多的蛋白在硝化后其功能受到抑制,如高糖刺激后鼠冠状动脉微血管上电压门控的  $\text{K}^+$  离子通道<sup>[49]</sup>,鼠巨噬细胞中的铁调蛋白-1 (IRP-1)<sup>[50]</sup>。 $\text{ONOO}^-$  可以使多种酶失活<sup>[30]</sup>,如细胞色素 P450、前列腺环素合酶、谷氨酰胺合酶、酪氨酸羟化酶、钙 ATP 酶和蛋白激酶 C 等,除 Tyr 残基硝化外,也可能是氧化性修饰其它关键性残基(如 Cys)或辅基的结

果。MnSOD 与  $\text{ONOO}^-$  作用, Tyr34 被硝化,阻碍了底物靠近活性中心而致使酶的失活。有趣的是,用  $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ /血红素过氧化物酶体系, MnSOD 硝化后其活性并未受到影响<sup>[51]</sup>。这说明硝化并没有发生在靠近金属活性中心的 Tyr34,而是一些表面暴露的 Tyr 残基。这个例子可以用金属离子与  $\text{ONOO}^-$  作用生成活性自由基中间体而促使邻近的 Tyr 残基发生硝化来解释,同时对线粒体中  $\text{ONOO}^-$  的产生及反应是一个有力的支持。胰岛素有 4 个 Tyr 残基,也可能在氧化应激状态下成为  $\text{ONOO}^-$  作用的靶点。为了探索  $\text{ONOO}^-$  与糖尿病之间的关系,我们研究了  $\text{ONOO}^-$  与胰岛素的相互作用<sup>[52]</sup>,发现  $\text{ONOO}^-$  可硝化猪胰岛素生成单硝化和多硝化产物,并且反应具有选择性。分离出的单硝化胰岛素其受体结合能力为正常胰岛素的 69%,降血糖活性有一定程度的降低。硝化胰岛素的二级结构也发生了变化,螺旋的含量明显降低。

蛋白质硝化可影响细胞的信号转导, Tyr 残基硝化后改变了蛋白(亚基)间的相互作用,从而抑制自身以及底物的磷酸化<sup>[53,54]</sup>; $\text{ONOO}^-$  可以氧化酪氨酸磷酸酶的关键 Cys 残基,抑制其活性,间接地增强了酪氨酸激酶活性,从而促进酪氨酸磷酸化<sup>[55]</sup>。促进还是抑制酪氨酸磷酸化与  $\text{ONOO}^-$  的浓度相关:例如在人血红细胞中,低浓度的  $\text{ONOO}^-$  抑制磷酸酶的活性,增强了条带 3(erythrocyte band 3)酪氨酸磷酸化;而高浓度的  $\text{ONOO}^-$  使蛋白质本身发生硝化,酪氨酸磷酸化减弱<sup>[56]</sup>。 $\text{ONOO}^-$  激活受体酪氨酸激酶和非受体酪氨酸激酶已有较多研究<sup>[57,58]</sup>,其机制涉及与 Cys 残基相关的氧化激活激酶和(或)磷酸酶的抑制。非常有趣的是,一些含 NT 的多肽可与 SH2 结构域结合,取代磷酸化的 Tyr527,从而激活 Src 激酶 Lyn<sup>[59]</sup>。由于硝化和磷酸化在结构修饰上的相似性,有人提出硝化在某种程度上可以模拟磷酸化<sup>[14]</sup>,而在生理条件下,酪氨酸硝化和磷酸化的水平处在同一数量级(0.01—0.1 mol %),提示蛋白质硝化可能参与调节细胞信号转导,而且可能与酪氨酸磷酸化协同发生作用<sup>[60]</sup>。

细胞线粒体被认为是 RNS 的一个产生源<sup>[61]</sup>,虽然 NO 主要在线粒体外产生,但容易扩散进入线粒体,与线粒体中产生的  $\text{O}_2^{\cdot-}$  结合形成  $\text{ONOO}^-$ ,干扰线粒体中代谢过程,硝化线粒体蛋白<sup>[62,63]</sup>。而且细胞色素 c 可替代过氧化物酶,以  $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ /细胞色素 c 途径硝化蛋白质<sup>[51]</sup>。已对多种线粒体蛋白的硝化进行了研究<sup>[61,64]</sup>,包括 MnSOD、乌头酸酶、细胞

色素 c、电压依赖的阴离子通道、ATP 酶和琥珀酰辅酶 A:3-氧酸辅酶 A 转移酶等。MnSOD 的硝化和失活可导致 ROS 的积累,促进  $\text{ONOO}^-$  的形成,细胞色素 c 硝化后其过氧化活力增强,这些将进一步造成氧化损伤,引起细胞凋亡或坏死。

但应注意到,对蛋白质硝化的研究,体外试验和体内情况不一致<sup>[65]</sup>,需要进一步确证在体内是硝化而不是其它氧化性修饰改变了蛋白质功能,以及硝化到什么程度才能显著改变蛋白质的功能。

## 5 硝化蛋白的降解、修复及抗硝化

修饰蛋白的代谢对蛋白质更新以恢复正常水平和抵御疾病是一个重要过程。体内硝化蛋白可被蛋白酶体所降解和消除<sup>[66]</sup>,但其分子机制还不甚清楚。Tyr 残基的硝化可加速蛋白水解酶体降解某些蛋白,且降解速率与其硝化程度相关<sup>[67]</sup>。与硫酸化的 Tyr 残基相比,硝化蛋白可被糜蛋白酶降解,但速率较未硝化的蛋白慢<sup>[68]</sup>。蛋白质硝化还可能存在一种修复机制<sup>[69]</sup>,在这个过程中硝化蛋白没有明显的降解,而硝化可能是一个可逆过程,并存在“Tyr 去硝化酶”活性物质。这种活性物质对热和胰蛋白酶敏感,只以蛋白 Tyr 残基为底物,且对不同的硝化蛋白呈现不同的反应动力学,行使去除硝化、修复硝化蛋白的作用<sup>[70,71]</sup>。蛋白质硝化的可逆研究给硝化参与调节细胞信号转导提供了证据。细菌和哺乳动物硝基还原酶都不能还原游离或蛋白质结合形态的 NT<sup>[72]</sup>。对游离的 Tyr,其代谢机制仍不清楚。检测尿液中 NT 的代谢产物,结果表明 NT 发生了脱氨基和脱羧作用<sup>[5]</sup>。

除了硝化蛋白自身的代谢机制外,体内还存在多种可以阻止蛋白质发生硝化的因素<sup>[73]</sup>,包括阻止硝化剂的形成以及直接清除 RNS 等两个方面。抑制 NO 和 ROS 的生成,可阻止 RNS 的形成。在体内血红蛋白可有效清除 NO,而 SOD 及其类似物可以清除  $\text{O}_2^{\bullet-}$ 。ROS 的清除剂同样适用于 RNS。小分子还原剂,如 GSH、抗坏血酸等以及 ebselen (2-苯基-1,2-苯并异噻唑-3-(2H) 酮) 等有机硒化合物可用于清除  $\text{ONOO}^-$ ,谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH Px) 等硒蛋白、血红蛋白以及白蛋白等也可作为  $\text{ONOO}^-$  的清除剂。Ebselen 是一个人工合成的具有 GSH Px 活性的有机硒化合物,ebselen 和 GSH Px 能与  $\text{ONOO}^-$  迅速反应(反应速率常数分别为 2 和  $8 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ),生成硒氧化物和  $\text{NO}_2^-$ ,而硒氧化物又可被 GSH 还原。基于这种机理,Sies<sup>[74]</sup>提出

GSH Px 也是  $\text{ONOO}^-$  的还原酶。我们实验室发现单独的 GSH 和 ebselen 对  $\text{ONOO}^-$  引发的胰岛素硝化均有明显的抑制,但作为 GSH Px 的还原性底物 GSH 与 GSH Px 的模型化合物 ebselen 之间却存在相互拮抗作用。经过对其产物分析,确定其机理是 GSH 和 ebselen 能够反应生成一种加合物,从而抑制了 GSH 和 ebselen 各自的抗硝化能力<sup>[75]</sup>。红细胞中血红蛋白浓度达  $\text{mmol L}^{-1}$  水平, $\text{ONOO}^-$  可与氧合血红蛋白 (oxyHb) 迅速反应异构化为  $\text{NO}_3^-$ <sup>[76]</sup>,而 oxyHb 也可氧化 NO 和  $\text{NO}_2^-$  成为  $\text{NO}_3^-$ ,因此进入到红细胞中的 RNS 可被清除<sup>[27]</sup>。血清中高浓度的白蛋白(含 1 个 Cys 残基和多个 Tyr 残基)也可清除  $\text{ONOO}^-$ 。另外金属卟啉类化合物虽可以促进蛋白质的硝化,但同时也具备 SOD 和  $\text{ONOO}^-$  还原酶的活性,并且可与  $\text{CO}_3^{\bullet-}$  迅速反应<sup>[77]</sup>。它们已成功用在抑制炎症条件下细胞和动物模型中  $\cdot\text{NO}$  所介导的损伤和硝化<sup>[78,79]</sup>。

## 6 结语

综上所述,可以归纳出如下结论:(1)多种途径可导致体内蛋白质酪氨酸的硝化,除  $\text{ONOO}^-$  路径外,还包括  $\text{NO}_2^-/\text{H}_2\text{O}_2$ /血红素过氧化物酶以及过渡金属介导的硝化路径;(2)自由基反应是 NT 形成的主要机理, $\text{CO}_3^{\bullet-}$  和氧合金属配合物氧化 Tyr 生成 Tyr $\cdot$ ,Tyr $\cdot$  与  $\text{NO}_2$  以扩散控制的速率结合生成 NT;(3)NT 已作为  $\cdot\text{NO}$  介导的氧化应激的相关生物标志;(4)特定蛋白质中特定 Tyr 残基的硝化将导致其功能的改变并产生相应的生物效应。

蛋白质硝化是一种选择性翻译后修饰,具有重要的生物学功能。进一步鉴别体内的硝化蛋白,分析它们的构-效关系,研究特定蛋白质硝化与疾病发生、发展关系将有助于揭示相关疾病的发病机理。疾病中硝化蛋白的积累不仅仅是 RNS 增加的表现,也是硝化蛋白分解和(或)修复过程受损的结果。硝化蛋白的修复机制是这些研究中的一个重要方面,它将有助于人们理解蛋白质硝化在免疫应答、信号转导、新陈代谢方面所起的作用。深入开展蛋白质硝化和硝化蛋白的修复这两个方面的研究有可能发现药物作用的新靶点,为人类相关疾病的预防和治疗提供新的途径而具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Bredt D S. Free Radic. Res., 1999, 31: 577—596

- [2] Greenacre S A B, Ischiropoulos H. *Free Radic. Res.*, 2001, 34: 541—581
- [3] Ohshima H, Friesen M, Brouet I, et al. *Food Chem. Toxicol.*, 1990, 28: 647—652
- [4] Smith C D, Carson M, Beckman J S, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 299: 350—355
- [5] Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman J S, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1992, 298: 431—437
- [6] Ye Y Z, Strong M, Beckman J S, et al. *Methods Enzymol.*, 1996, 269: 201—209
- [7] Kaur H, Halliwell B. *FEBS Lett.*, 1994, 350: 9—12
- [8] Aoyama K, Matsubara K, Kobayashi S, et al. *Ann. Neurol.*, 2000, 47: 524—527
- [9] MacMillan-Crow L A, Crow J P, Thompson J A, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 11853—11858
- [10] Gasson B I, Duda J E, Lee V M, et al. *Science*, 2000, 290: 985—989
- [11] Przedborski S, Chen Q, Vila M, et al. *J. Neurochem.*, 2001, 76: 637—640
- [12] Ischiropoulos H. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003, 991: 93—100
- [13] MacMillan-Crow L A, Greendorfer J S, Thompson J A, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 377: 350—356
- [14] Lokuta A J, Maertz N A, Haworth R A, et al. *Circulation*, 2005, 111: 988—995
- [15] Knyushko T V, Sharov V S, Bigelow D J, et al. *Biochemistry*, 2005, 44: 13071—13081
- [16] Gile M D, Souza J M, Ischiropoulos H, et al. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.*, 2000, 278: L961—L967
- [17] Ara J, Przedborski S, Ischiropoulos H, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 7659—7663
- [18] Casoni F, Basso M, Bonetto V, et al. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 16295—16304
- [19] Zou M H, Leist M, Ullrich V. *Am. J. Pathol.*, 1999, 154: 1359—1365
- [20] Turko I V, Marcondes S, Murad F. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2001, 281: H2289—H2294
- [21] Marcondes S, Turko I V, Murad F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 7146—7151
- [22] Aulak K S, Miyagi M, Yan L, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98: 12056—12061
- [23] Aslan M, Ryan T M, Freeman B A, et al. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 4194—4204
- [24] Horiguchi T, Uryu K, Trojanowski J Q, et al. *Am. J. Pathol.*, 2003, 163: 1021—1031
- [25] Reynolds M R, Berry R W, Binder L I. *Biochemistry*, 2005, 44: 1690—1700
- [26] Zhang Y J, Xu Y F, Wang J Z, et al. *FEBS Lett.*, 2005, 579: 2421—2427
- [27] Radi R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101: 4003—4008
- [28] Radi R, Peluffo G, Alvarez M N, et al. *Free Radic. Biol. Med.*, 2001, 30: 463—488
- [29] Hogg N, Singh R J, Kalyanaram B. *FEBS Lett.*, 1996, 382: 223—228
- [30] Alvarez B, Radi R. *Amino Acids*, 2003, 25: 295—311
- [31] Brennan M L, Wu W, Hazen S L, et al. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277: 17415—17427
- [32] Monzani E, Roncone R, Casella L, et al. *Eur. J. Biochem.*, 2004, 271: 895—906
- [33] Thomas D D, Espey M G, Wink D A, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99: 12691—12696
- [34] Bian K, Gao Z, Murad F, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100: 5712—5717
- [35] Pfeiffer S, Lass A, Mayer B, et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 34051—34058
- [36] Whiteman M, Siau J L, Halliwell B. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 8380—8384
- [37] Gunther M R, Hsi L C, Curtis J F, et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 17086—17090
- [38] Turko I V, Murad F. *Pharmacol. Rev.*, 2002, 54: 619—634
- [39] Ischiropoulos H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, 305: 776—783
- [40] Berlett B S, Friguet B, Stadtman E R, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, 93: 1776—1780
- [41] Blanchard-Fillion B, Souza J M, Ischiropoulos H, et al. *J. Biol. Chem.*, 2001, 276: 46017—46023
- [42] Daiber A, Bachschmid M, Beckman J S, et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2004, 317: 873—881
- [43] Yamakura F, Taka H, Fujimura T, et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 14085—14089
- [44] Zou M H, Leist M, Ullrich V. *Am. J. Pathol.*, 1999, 154: 1359—1365
- [45] Quaroni L G, Seward H E, Monro A W, et al. *Biochemistry*, 2004, 43: 16416—16431
- [46] Baththany C, Souza J M, Radi R, et al. *Biochemistry*, 2005, 44: 8038—8046
- [47] Zhang H, Bhargava K, Kalyanaram B, et al. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 8969—8978
- [48] Lin H L, Zhang H, Hollenberg P F, et al. *Chem. Res. Toxicol.*, 2005, 18: 1203—1210
- [49] Li H, Gutterman D D, Liu Y, et al. *Diabetes*, 2004, 53: 2436—2442
- [50] Gonzalez D, Drapier J C, Bouton C. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 43345—43351
- [51] Castro L, Eiserich J P, Sweeney S, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2004, 421: 99—107
- [52] Chi Q, Wang T, Huang K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2005, 330: 791—796
- [53] El-Remessy A B, Bartoli M, Platt D H, et al. *J. Cell Sci.*, 2005, 118: 243—252
- [54] Reinehr R, Gorg B, Haussinger D, et al. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 10364—10373
- [55] Takakura K, Beckman J S, Crow J P, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1999, 369: 197—207
- [56] Mallozzi C, Di Stasi A M, Minetti M. *FASEB J.*, 1997, 11: 1281—1290

- [57] Klotz L O, Schroeder P, Sies H. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33: 737—743
- [58] Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi A M M. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33: 744—754
- [59] Mallozzi C, Di Stasi A M M, Minetti M. *FEBS Lett.*, 2001, 503: 189—195
- [60] Monteiro H P. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33: 765—773
- [61] Radi R, Cassina A, Hodara R, et al. *Free Radic. Biol. Med.*, 2002, 33: 1451—1464
- [62] Elfering S L, Haynes V L, Giulivi C, et al. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2004, 286: H22—H29
- [63] Koeck T, Fu X, Aulak K S, et al. *J. Biol. Chem.*, 2004, 279: 27257—27262
- [64] Turko I V, Li L, Murad F, et al. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 33972—33977
- [65] Kanski J, Hong S J, Schoneich C. *J. Biol. Chem.*, 2005, 280: 24261—24266
- [66] Grune T, Reinheckel T, Davies K J A. *FASEB J.*, 1997, 11: 526—534
- [67] Grune T, Blasig I E, Davies K J, et al. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273: 10857—10862
- [68] Souza J M, Choi I, Ischiropoulos H, et al. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2000, 380: 360—366
- [69] Kamisaki Y, Wada K, Murad F, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95: 11584—11589
- [70] Kuo W N, Kanadia R N, Shabhad V P, et al. *Mol. Cell Biochem.*, 1999, 201: 11—16
- [71] Irie Y, Saeki M, Murad F, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100: 5634—5639
- [72] Lightfoot R T, Shuman D, Ischiropoulos H. *Free Radic. Biol. Med.*, 2000, 28: 1132—1136
- [73] Arteel G E, Briviba K, Sies H. *FEBS Lett.*, 1999, 445: 226—230
- [74] Sies H, Sharov V S, Klotz L O, et al. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272: 27812—27817
- [75] 汪铁林(Wang T L), 池泉(Chi Q), 黄开勋(Huang K X). *无机化学学报(Chinese J. Inorg. Chem.)*, 2005, 21(4): 500—504
- [76] Romero N, Radi R, Linares E, et al. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 44049—44057
- [77] Ferrer-Sueta G, Vitturi D, Radi R, et al. *J. Biol. Chem.*, 2003, 278: 27432—27438
- [78] Muscoli C, Cuzzocrea S, Salvemini D, et al. *Br. J. Pharmacol.*, 2003, 140: 445—460
- [79] Pacher P, Liaudet L, Szabo C, et al. *Circulation*, 2003, 107: 896—904