

活性氮在缺血性脑中风中的作用研究进展*

张盼¹⁾ 闫伟杰²⁾ 肇玉明^{2)**}

(¹⁾首都医科大学 13 级长学制临床医学系, 北京 100069; (²⁾首都医科大学基础医学院药理学系, 北京 100069)

摘要 以自由基为代表的小分子活性物质对于维持生物体正常的生理功能起着不可或缺的作用, 但在包括中风的多种病理状态下, 过量的小分子活性物质由于其高活性、强氧化性可对人体内的组织器官造成严重损伤。活性氧和活性氮是两种重要的小分子活性物质, 并且活性氮在中风的发病机制中的作用备受关注, 是近年研究的热点之一。本文就近年来活性氮在中风中的生理性与病理性的作用进行综述及展望。

关键词 活性氮, 活性氧, 脑中风, 脑缺血再灌注损伤

学科分类号 R338, R741

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0309

脑中风是严重危害中老年健康的重大疾病之一, 是造成全球病死率第二的杀手^[1-2]。脑中风是由于颅内血管阻塞或破裂而造成的急性脑功能损伤, 根据病因的不同, 可分为缺血性脑中风和出血性脑中风, 而缺血性脑中风发病率约占 85%^[2]。中风发病后可引起一系列的神经级联反应, 包括小分子活性物质的大量产生与释放, 引起细胞损伤。活性氧和活性氮是两种重要的小分子活性物质。以往的研究较为关注活性氧, 发现活性氧会通过一系列氧化反应造成组织细胞的损伤, 如使细胞膜的通透性增强; 其可通过对基因的作用导致染色体畸变、DNA 链断裂或者碱基改变破坏 DNA 等, 使蛋白质的结构改变等, 从而影响组织功能^[3-5]。对于活性氮的研究是近年才兴起的热点课题, 关于与中风相关的活性氮的生理学及病理学作用的系统性报道却偏少。因此本文从活性氮的分子结构特性、其在中枢神经系统的生理学功能及在缺血性脑中风发病中的作用等方面进行综述与展望, 为中风的病因学及治疗提供理论依据。

1 活性氮的分子结构及生理功能

活性氮(reactive nitrogen species, RNS)是一类在分子组成上含有氮的活性化学物质的总称, 包括一氧化氮(NO)、二氧化氮(NO₂)、过氧亚硝基

(ONOO⁻)等。其中, 以 NO 与 ONOO⁻为典型代表, 在生物体的生理与病理条件下均发挥重要作用; 并且 NO₂ 与 ONOO⁻等活性氮物质是以 NO 为底物, 经过氧化反应生成的。

1.1 一氧化氮(NO)

NO 是由氧与氮双原子分子构成的气态分子。NO 有 11 个价电子, O 原子和 N 原子形成共价键后, 在分子轨道上含有 1 个未成对的电子, 所以具有顺磁性。NO 结构简单, 有一个处于 2p- π 反键轨道的单电子(图 1)^[6], 决定了它的不稳定和高活性, 它的生物半衰期仅 3~5 s, 反应性极强, 且有明显的亲脂性, 是极易通过细胞膜扩散的气体自由基。

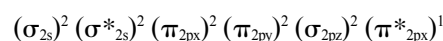


Fig. 1 Molecular orbital electron configuration of the NO
图 1 NO 的分子轨道电子排布式

* 国家自然科学基金(31570856, 21375133), 北京市自然科学基金(5152005), 2016 年北京市教育委员会科技计划一般项目基金(KM201610025003)和首都医科大学本科学子科研训练项目(7NZDS2015)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 010-83911678, E-mail: yumingzhao@ccmu.edu.cn

收稿日期: 2017-03-11, 接受日期: 2017-04-24

鉴于 NO 作为信号分子的重要性, 1998 年的诺贝尔生理学或医学奖授予了 R.F.Furhgoth、J.I.Lgnarro 和 F.Murad 三位学者, 以褒奖他们在 NO 相关研究中取得的成绩. 在哺乳动物体内有多种细胞均可产生 NO, 其合成途径是在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化作用下由左旋-精氨酸(L-arginine)通过还原型尼克酰胺腺苷二核苷酸磷酸(NADPH)还原而生成的, 其反应过程如图 2^[7]. 根据编码基因的不同, 可将 NOS 分为三个亚型: 内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)^[8]. 研究发现, 不同类型的 NOS 分布呈现组织选择性, 并且编码产生的 NO 参与不同的生理过程^[9]. eNOS 主要分布在血管内皮细胞, 产生的 NO 经由 GC(guanylate cyclase)-cGMP(cyclic guanosine monophosphate)信号途径调节组织局部血流及舒张血管平滑肌^[10-12]. iNOS 则主要存在于内皮细胞、单核巨噬细胞和胶质细胞, 参与机体的免疫调节功能. nNOS 主要在周围和中枢神经系统的神经元中高表达, 其产生的 NO 对于调节突触传递及可塑性功能有重要作用^[13]. 就哺乳动物而言, 神经细胞、巨噬细胞、肝细胞、血管内皮细胞、中性粒细胞等多种体细胞均可产生

一氧化氮, 但生理条件下血管内皮细胞是产生一氧化氮的最主要细胞, 其产生的一氧化氮在生理、病理情况下均有保持血管内皮细胞完整性的作用^[10-12], 并可通过细胞膜迅速传递至血管平滑肌细胞, 使平滑肌松弛、动脉血管扩张, 从而调节血压和血流分布. 实验证明, 一氧化氮作为强有力的脑血管扩张剂, 可参与脑血管基本张力的调节^[14], 脑血管内皮细胞释放的一氧化氮能提高血管平滑肌细胞中的鸟苷酸环化酶的活性, 使环一磷酸鸟苷水平提高, 导致血管松弛; 相反, 若实验动物应用 NOS 抑制剂, 则发现环一磷酸鸟苷含量下降, 脑动脉收缩. 一氧化氮还通过白细胞聚集和抑制血小板以保护脑的血管内皮. 基础含量的一氧化氮也能阻止脑动脉对 5-羟色胺和去甲肾上腺素等物质所致的收缩反应^[15]. 多种实验表明, NO 也是神经递质, 是存在于大脑血管、神经元和神经胶质细胞信息通路的重要信使分子, 参与神经传递、炎症和免疫反应, 在心脑血管系统中调节众多的生理和病理生理环节^[16]. 如实验证明, NO 可使半胱氨酸巯基发生 S-亚硝基化反应(S-nitrosylation), 这一反应广泛存在于蛋白质翻译后的修饰过程及信号通路的调控机制中^[17-18], NO 与谷胱甘肽形成的代谢产物 S-亚硝基谷胱甘肽(S-nitrosoglutathione)可通过 HIF1 α /VEGF 通路参与血管新生与神经损伤修复^[19].

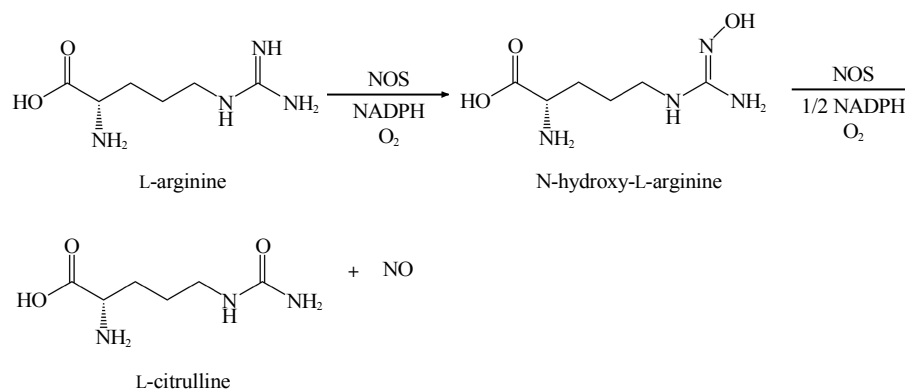


Fig. 2 Synthesis process of the NO in the organism

图 2 NO 的体内合成过程

1.2 一氧化氮与超氧阴离子生成的活性氮产物

NO 具有较高的化学活性, 它易于与氧气在常温下发生反应生成红棕色的 NO₂. NO 与超氧阴离子(O₂⁻)可生成过氧亚硝基(ONOO⁻)^[20], ONOO⁻极不稳定, 在酸性介质下(此时分子结构为 ONOOH)易

进一步分解为羟自由基·OH 及二氧化氮自由基·NO₂(代谢过程见图 3); NO 与 2 分子·NO₂可生成三氧化二氮(N₂O₃); ONOO⁻还可与 CO₂ 反应生成 ONOOCO₂⁻, 在众多 NOS 代谢产物中, ONOO⁻的半衰期极短, 且活性远强于 NO 及其他产物, 它的

性质极具有代表性, 在细胞信号转导途径中发挥重要的调控作用^[21]. ONOO⁻作为中间产物, 可生成上述多种活性自由基; 在体外培养的血管内皮细胞中 ONOO⁻可通过激活转录因子而增加血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达, 刺激血管新生^[22]; 小剂量 ONOO⁻可刺激神经干细胞增殖^[23]; 作为氧化剂可直接氧化氨基酸残基, 可使蛋白质中的酪氨酸残基快速硝化成 3-硝基酪氨酸(3-nitrotyrosine, 3-NT), 使机体呈现硝化应激状态^[24-25], 参与多种生理病理过程.

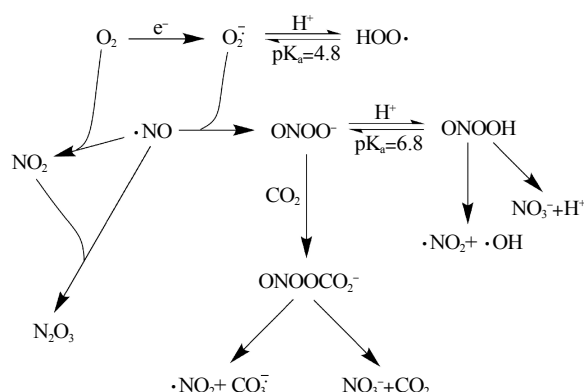


Fig. 3 Biosynthesis and metabolites of the ONOO⁻

图3 ONOO⁻的生物合成及代谢产物

2 活性氮在中风病理过程中的作用

脑缺血再灌注损伤是脑卒中造成的严重损伤之一, 脑组织内存在丰富的易被氧化的不饱和脂肪酸, 易于发生氧化还原反应. 同时, 脑组织内抗氧化能力及清除自由基的能力相较于其他组织明显偏低, 决定了缺血的病理生理过程与自由基的产生密切相关^[26-27]. 而脑组织在发生缺血、缺氧后, 自由基不断增多, 会引起级联放大效应, 导致脑损伤进一步加重. 脑中风导致的细胞损伤的研究早些年主要锁定在神经元, 近年来的研究显示脑缺血后血脑屏障(blood-brain-barrier, BBB)的破坏更应引起重视. 尤其对于一氧化氮而言, 脑血管内皮细胞是它的主要产地之一, 同时又是重要的靶细胞, 它对血脑屏障的作用在中风的病理过程中格外重要. 缺血及再灌注后也会产生过量的活性氮(包括一氧化氮), 这些过度聚集的活性分子往往具有自由基的高活性, 会引发炎症级联反应和早期微血管的氧化, 并增加血脑屏障的通透性, 诱发脑水肿、出血

及细胞死亡, 也成为了近年的研究热点.

机体的内部屏障之一是血脑屏障, 它是由介于血循环与脑实质间的软脑膜、包于壁外的星形胶质足突形成的胶质膜和脉络丛的脑毛细血管壁所组成, 是重要的中枢神经系统的解剖结构基础^[28]. 构成血脑屏障的关键组织细胞位点是血管内皮细胞, 血管内皮细胞间存在结构复杂的紧密连接, 且相对缺乏胞饮囊泡及窗孔, 生理状态下, 其大多数内外源性物质可被阻止透过血脑屏障. 但是, 在中风的病理过程中, 重点受损区域及活性氮的主要来源地却是脑血管内皮细胞. NO 是小分子气溶性分子, 能自由通过内皮细胞, 并在中风的发病过程中发挥重要作用. 由内皮型一氧化氮合酶(eNOS)产生的低浓度的 NO 有生理功能, 可以参与神经调节. 而由诱导型一氧化氮合酶(iNOS)和神经元型一氧化氮合酶(nNOS)产生的高浓度的 NO 会影响脑缺血、诱发炎症、细胞死亡、血脑屏障通透性和梗死扩大^[29]. 在中风模型 - 大脑中动脉阻塞实验性模型中, 具有保护作用的 eNOS 表达变化不明显, 但缺血 1 h 及再灌注过程中可引起 nNOS 的显著增高, 并且 iNOS 的表达在再灌注的过程中急剧升高, 导致 NO 含量在缺血与再灌注过程中显著性升高^[30-32]. 有学者进一步解释了不同分型 NOS 在损伤下变化的不均一性及其在损伤中的作用, 认为 eNOS 在急性脑损伤时发生了解耦联, 因而其活性被抑制; 而免疫细胞及胶质细胞被激活后造成的 iNOS 被激活可产生大量的 NO, 进而会与 O₂·生成活性更强的 ONOO⁻从而产生细胞毒性^[33]. 剖析活性氮诱导损伤的机制, 发现水解脑血管和神经元周围细胞外基质的基质金属蛋白酶(matrix metallo proteinases, MMPs)可被 NO 及 ONOO⁻激活, 进而造成神经元外基质、紧密连接蛋白以及血脑屏障机械结构降解^[34-35]. 活性氮的重要靶分子之一是位于细胞膜的整合蛋白小窝蛋白 1(caveolin-1), caveolin-1 可以抑制紧密连接蛋白的降解、MMPs 的活性和 RNS 的生产来保护血脑屏障的完整性^[36], 其表达下调将引起血脑屏障被破坏. Caveolin 作为一种结构和支架蛋白, 能够负向调控多种细胞型的信号通路. Caveolin-1 可以结合并抑制包含 CAV 结合位点的多种蛋白, 含有 CAV 结合位点的 MMPs 被认为是潜在的结合目标^[37], 生理状态下, caveolin-1 可通过抑制 MMPs 的激活, 从而保护血脑屏障的完整性. 同时, 有研究表明, NOS 也含有 CAV 结合位点, caveolin-1 与 NOS 相结合^[38], 可抑制其活性. 在中风的状态下,

caveolin-1 与活性氮的互相作用, 可以形成反馈回路, 在 caveolin-1 和 NO 之间存在相互调控的关系, 一方面, caveolin-1 抑制所有三种 NOS 亚型的活性^[39], caveolin-1 的下调可引起 NOS 的增加, 进而促进生成更多的 NO, 而 NO 能通过激活 MMPs, 从而造成血脑屏障不断被破坏^[40]. 另一方面 NO 本身可以改变 caveolin-1 在小窝结构的分布与丰度. NO 供体精胺氮氧化加合物(spermine-NONOate)降低 Cav-1 的表达并改变了其在内皮细胞的分布^[29]. 脑缺血所产生的 NO 调节 caveolin-1 在 mRNA 和蛋白质水平的表达^[41], 抑制其产生. 因此, caveolin-1 和 NO 的相互调控可能是在脑缺血再灌注损伤期间调节血脑屏障通透性的重要信号通路^[42]. ONOO⁻通过分解催化剂 FeTPPS 可抑制 MMP-9 活性、转录因子 NF- κ B 表达及相应的血脑屏障损伤, 证实 ONOO⁻过量可造成血脑屏障损伤^[35]. NO 除对内皮细胞的直接作用外, 还可进一步通过血脑屏障, 引起其他细胞产生炎症反应及死亡, 扩大梗死面积^[43].

除了通过金属基质蛋白酶诱导内皮细胞及血脑屏障损伤外, 活性氮可通过硝化应激反应使细胞内蛋白质中的酪氨酸硝化成 3-NT, 引起蛋白质结构和功能改变, 导致细胞坏死或凋亡^[44]. 参与硝化应激的标志活性氮包括 NO 及由 NO 与 ROS 衍生的自由基或非自由基活性产物(如 NO₂、HNO₂、ONOO⁻等). 尤其是 ONOO⁻除了通过硝化应激反应修饰多种生物分子, 导致血管内皮细胞等结构破坏、功能丧失外, 其与 NO 相似, 很容易穿过各种生物膜, 可直接氧化蛋白质分子的巯基或间接通过生成氧化和硝基化作用更强的 ONOOH, 使蛋白质酪氨酸残基发生硝基化生成硝基酪氨酸, 而可触发对蛋白质、脂类及 DNA 的各种氧化损伤, 包括灭活细胞的各种代谢酶、离子泵、破坏蛋白质结构、损伤细胞膜及使核酸断裂等, 最终导致多种细胞凋亡^[45]. 研究证实, ONOO⁻介导的细胞损伤可通过 P38 MAPK 与 P53 激酶信号通路发挥^[31-35, 43-47].

此外, 活性氮物质可通过激活自噬通路参与脑缺血的病理过程; 并且研究发现, 被激活的自噬与线粒体凋亡信号通路之间存在着内在的交叉性^[48-49]. 如 ONOO⁻既可以触发凋亡效应, 还可触发缺氧低糖造成的损伤病理过程中内皮细胞的自噬-溶酶体信号途径, 其表现为自噬-溶酶体途径分子标志物溶酶体相关膜蛋白 2(lysosome-associated membrane protein2, LAMP2)和微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule associated protein 1 light chain3, LC3)

以及 Cathepsin B 的高表达^[50], 并造成紧密连接蛋白的降解等一系列的对血管内皮细胞的损伤, 说明 ONOO⁻除通过诱导坏死、凋亡外, 还可通过调节自噬过程来参与中风的发病. 而抗氧化剂或自由基清除剂可通过抑制 NO 及 ONOO⁻诱导的神经损伤^[51-56], 提示小分子活性氮类物质选择性抑制剂可能成为治疗中风损伤的新策略. 然而, 活性氮一方面可引起损伤作用外, 另一方面作为机体对损伤刺激的应激反应, 这类物质也很可能通过信号因子的调节, 启动机体的保护与修复机制. 在急性损伤阶段, NO 作为扩血管因子之一, 通过使脑血管舒张, 缺血区局部脑血流(regional cerebral blood flow, rCBF)增多, 局部神经元的供氧得到改善. 动物研究证实, 肾上腺皮质激素与雌激素均可通过调节 NO 的生成继而增加中风区域的脑血流^[57-58]. NO 还可通过抑制血小板黏聚, 减少缺血区血栓形成, 改善局部微循环^[59]. 同时, 研究证实, 在损伤早期, 经过药物干预, NO 可通过调节脑内一氧化碳(CO)含量, 降低脑水肿及血脑屏障的通透性^[60]. 研究还证实, 与雄性动物相比, 在雌性动物可通过 nNO/PARP-1 信号通路对中风后脑梗死产生差异性保护作用^[61]. 此外, 如前所述, 活性氮类物质可通过调控神经再生进行再生性修复. 如 caveolin-1 作为负调控因子, 可抑制神经干细胞向神经元的分化及其增殖; 由于中风状态下 caveolin-1 的表达下降, 继而 caveolin-1 对神经再生的负调控作用减弱, 最终内源性神经再生上调, 这对于损伤后的机体修复是有利的^[62]. 由此推论, 在脑缺血再灌注中活性氮可能起到双重作用: 既可能是细胞损伤分子, 又可能通过调控修复过程促进组织修复. 活性氮在中风损伤修复中的积极意义近年逐步受到重视, 如能够全方面解析其保护作用及相关机制, 阐明活性氮对损伤修复的作用靶点, 在中风的过程中给予有效的药物干预, 发挥其积极作用; 同时抑制损伤相关通路, 从抗损伤、促修复的双重角度治疗中风, 这将是中风治疗的一个很有希望的治疗策略.

3 研究中所遇难题

活性氮类物质在中风病理过程中复杂的两重性, 为研究带来了极大的困难, 明晰其在损伤与修复中的作用, 寻找相关的药物作用靶点, 是研究的难点与重点问题. 同时, 活性氮类物质选择性抑制剂的相对缺乏, 也对研究带来了一定困难, 设计与合成高选择性的抑制剂, 为研究提供工具, 是非常

必要的。

一氧化氮等活性氮分子的半衰期很短, 并且它们的稳态浓度比较低, 因此真正能用来在生物体内对它们进行实时检测的方法很少, 尤其是缺乏适用于活体原位检测的新技术。目前为止, 常见的检测方法大多是通过间接及离体的方法测定活性氮, 如荧光探针法、化学发光法、电子自旋共振法、电化学方法、电子顺磁共振法等。其中, 荧光探针检测法由于操作简单, 利用激光共聚焦显微成像技术即可观察被检测物质在细胞内含量的变化, 容易实施、选择性好而在近年发展较快。出现较早的有二氢罗丹明和 2, 7-二氯二氢荧光素, 是常用于检测 ONOO^- 的探针, 但因其易被其他 ROS、RNS 氧化, 选择性较差, 而被逐渐替代。为此, 中国学者在这个领域进行了大量的深入研究。利用酮的氧化还原反应合成了新型的荧光探针, 如 HKGreen-1 荧光探针以荧光素的衍生物为主体, 排除了其他自由基的干扰, 成功对 ONOO^- 进行了检测和成像。随后出现的 HKGreen-2、HKGreen-3 又进行了新的改良, 对 ONOO^- 有了更高的敏感性及细胞安全性^[63]。又如近年的新型近红外有机小分子荧光探针 BzSe-Cy, 利用硒能够与 ONOO^- 发生特异性且可逆的氧化还原反应, 实现对细胞内氧化还原状态的监测^[64], 并实现了对细胞内 ONOO^- 和抗坏血酸的可逆荧光应答^[65]。相对而言, 其他检测方法如动态原位观察器官、组织和生物体内自由基的分析方法, 由于需要的检测仪器的灵敏度及活性氮半衰期

等因素的限制, 使得对活性氮的相关研究受到制约。因此, 发展实时、动态、高灵敏性的检查方法亦是本领域的当务之急, 如若这一问题得以解决, 对活性氮的研究将有极大的帮助。

4 结语与展望

本文以 NO 和 ONOO^- 为代表, 总结了近年来活性氮类小分子物质的结构、生理功能及在缺血性脑中中风病理过程中的作用(图 4)。活性氮类物质因其活泼的化学性质, 可参与人体内一系列生理反应, 担当着重要的角色, 是人体内一种不可或缺的物质。但在病理状态下, 其损伤与保护的双刃剑作用, 尚未得到透彻阐述, 尤其是其对损伤修复过程中的保护作用, 还有待了解和研究。对活性氮进行充分的研究, 进一步了解其在人体内的机理功能, 探索其产生和发展过程, 熟悉其表达到消亡过程中参与反应的中间产物及激活剂、抑制剂, 能够使人增强对疾病的预防和治疗能力。为患者及潜在患病人群的健康加强保障。如果研究得以突破, 通过干预相应的靶点, 使损伤的促进因素受到抑制; 修复的相应作用得到促进, 将是对中风非常好的治疗手段。如研究发现, NMDA 受体通过 NR2B 受体亚基与突触后致密蛋白 95(PSD95)及 nNOS 搬组成 NR2B-PSD95-nNOS 信号复合物。这一结构可以使 nNOS 充分激活, 产生大量 NO, 引起神经损伤。因此, 有学者试图促使 nNOS 与 PSD95 解耦联, 在不影响 NMDA 受体和 nNOS 活性的情况下, 减

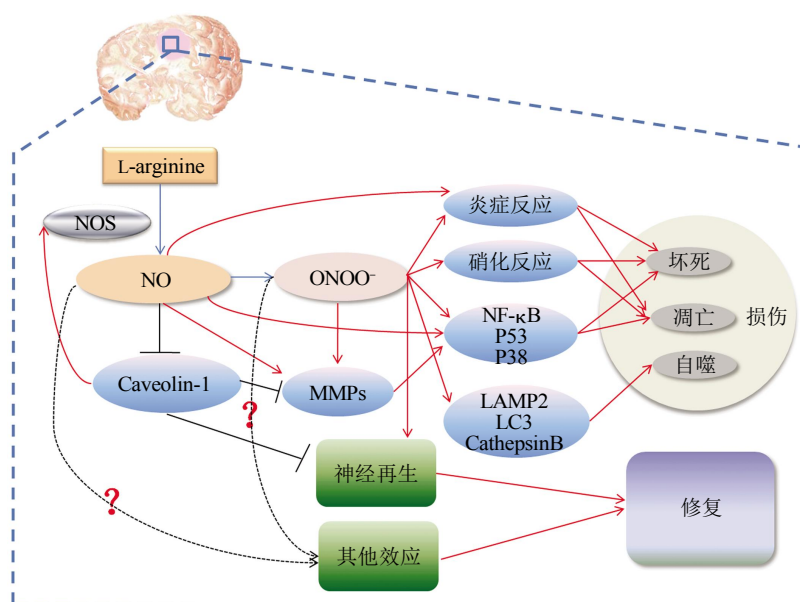


Fig. 4 Roles of reactive nitrogen species in ischemic stroke

图 4 活性氮在缺血性脑中中风中的作用

少 NO 释放, 发挥神经保护作用, 从而减轻神经元的凋亡和损伤, 如果相应的药物解偶联剂能够通过临床实验, 可能为中风患者带来福音^[66]。

目前, 虽然活性氮的检测及分析研究手段制约了研究的深入, 对 RNS 的检测手段的特异性与灵敏性的提高, 有助于监测疾病的病理变化。随着精准医学与大数据分析技术的发展, 相信经过不断地努力和科学技术的日益发展, 不久的将来对活性氮物质的研究会有所突破, 可以更好地控制其对人体造成的危害, 发挥其积极意义, 为治疗包括中风在内的疾病提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Mozaffarian D. Executive summary: heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*, 2016, **133**(4): 447-454
- [2] Liu L P, Wang D, Wong K S L, *et al.* Stroke and stroke care in china huge burden, significant workload, and a national priority. *Stroke*, 2011, **42**(12): 3651-3654
- [3] 申慧彬. 依达拉奉治疗脑出血患者疗效的 Meta 分析. *山西医药杂志*, 2015, **44**(15): 1783-1786
Shen H B. *Shanxi Medical Journal*, 2015, **44**(15): 1783-1786
- [4] 徐建兴. 呼吸链电子漏在细胞凋亡中的作用. *生物化学与生物物理进展*, 2003, **30**(4): 29-35
Xu J X. *Prog Biochem Biophys*, 2003, **30**(4): 29-35
- [5] 郁军超, 薛连璧. 机体 ROS 的产生及对生物大分子的毒性作用. *山东医药*, 2012, **52**(8): 95-96
Yu J C, Xu L B. *Shandong Medical Journal*, 2012, **52**(8): 95-96
- [6] 朱万强, 罗宿星, 李华刚, 等. 对一氧化氮分子结构的教学讨论. *大学化学*, 2013, **28**(1): 23-26
Zhu W Q, Luo X X, Li Y G, *et al.* *University Chemistry*, 2013, **28**(1): 23-26
- [7] 张鹏飞. 活性氮氧化物(RNOS)分子探针的研究[D]. 天津: 南开大学药物化学系, 2011
Zhang P F. *Reactive nitrogen oxides (RNOS) molecular probes* [D]. Tianjin: Department of Drug Chemistry, Nankai University, 2011
- [8] Paakkari I, Lindsberg P. Nitric oxide in the central nervous system. *Ann. Med*, 1995, **27**(3): 369-377
- [9] Garry P S, Ezra M, Rowland M J, *et al.* The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment: From bench to bedside. *Exp Neurol*, 2015, **263**: 235-243
- [10] Hayashi T, Juliet P A, Miyazaki A, *et al.* Beta antagonist and beta agonist, celiprolol, restores the impaired endothelial dependent and in dependent responses and decreased TNF alpha in rat with type II diabetes. *Life Sci*, 2007, **80**(6): 592-599
- [11] Cottone S, Mule G, Nardi E, *et al.* Microalbuminuria and early endothelial activation in essential hypertension. *J Hum Hypertens*, 2007, **21**(2): 167-172
- [12] Arbel Y, Dvir D, Feinberg M S, *et al.* The association between right coronary artery morphology and endothelial function. *Int J Cardiol*, 2007, **115**(1): 19-23
- [13] 倪远宁, 季 晖, 王琳娜, 等. 一氧化氮与神经血管单元的关联性及相关药物研究进展. *药学进展*, 2015, **39**(1): 5-12
Ni Y N, Ji H, Wang L N, *et al.* *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2015, **39**(1): 5-12
- [14] Freedman J E, Loscalzo J, Barnard M R, *et al.* Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest*, 1997, **100**(2): 350-356
- [15] Kasuya N, Kishi Y, Sakita S Y. Acute vigorous exercise primes enhanced NO release In human platelets. *Atherosclerosis*, 2002, **161**(1): 225-232
- [16] Pesse B, Levrard S, Feihl F, *et al.* Peroxynitrite activates ERK *via* Raf-1 and MEK, independently from EGF receptor and p21Ras in H9C2 cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, **38**(5): 765-775
- [17] Hess D T, Stamler J S. Regulation by S-nitrosylation of protein post-translational modification. *J Biol Chem*, 2012, **287**(7): 4411-4418
- [18] Yin R, Fang L, Li Y, *et al.* Pro-inflammatory macrophages suppress PPAR- γ activity in adipocytes *via* S-nitrosylation. *Free Radical Bio Med*, 2015, **89**: 895-905
- [19] Khan M, Dhammu T S, Matsuda F, *et al.* Promoting endothelial function by S-nitrosoglutathione through the HIF-1 α /VEGF pathway stimulates neurorepair and functional recovery following experimental stroke in rats. *Drug Des Devel Ther*, 2015, **9**: 2233-2247
- [20] Möller Matías N, R Jack, Jr Lancaster, *et al.* The interaction of reactive oxygen and nitrogen species with membranes. *Curr Top Membr*, 2008, **61**(8): 23-42
- [21] Reinehr R, Becker S, Hongen A, *et al.* The Src family kinase Yes triggers hyperosmotic activation of the epidermal growth factor receptor and CD95. *J Biol Chem*, 2004, **279**(23): 23977-23987
- [22] Platt D H, Bartoli M, El-Remessy A B, *et al.* Peroxynitrite increases VEGF expression in vascular endothelial cells *via* STAT3. *Free Radic Biol Med*, 2005, **39**(10): 1353-1361
- [23] Yoneyama M, Kawada K, Gotoh Y, *et al.* Endogenous reactive oxygen species are essential for proliferation of neural stem progenitor cells. *Neurochem Int*, 2009, **56**(6-7): 740-746
- [24] Muijsers R B, Folkerts G, Henricks P K, *et al.* Peroxynitrite: a two-faced metabolite of nitric oxide. *Life Sci*, 1997, **60** (21): 1833-1845
- [25] Tao R R, Wang H, Hong L J, *et al.* Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult *via* E6AP activation in endothelial cells both *in vitro* and *in vivo*. *Antioxid Redox Signal*, 2014, **21**(1): 1-16
- [26] Granger D N, Rutili G, McCord J M. Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. *Gastroenterology*, 1981, **81**(5): 22-23
- [27] Lee C T, Yu L E, Wang J Y, *et al.* Nitroxide antioxidant as a potential strategy to attenuate the oxidative/nitrosative stress

- induced by hydrogen peroxide plus nitric oxide in cultured neurons. Nitric Oxide, 2016, **54**(1): 38–50
- [28] Keaney J, Campbell M. The dynamic blood-brain barrier. FEBS J, 2015, **282**(21): 4067–4079
- [29] Shen J G. Reactive nitrogen species: dual roles for blood brain barrier disruption and brain repairs in cerebral ischemia and reperfusion injury. Acta Biophysica Sinica, 2012, **28**(4): 295–306
- [30] Shen J G, Ma S, Chan P H, *et al.* Nitric oxide down-regulates caveolin-1 expression in rat brains during focal cerebral ischemia and reperfusion injury. J Neurochem, 2006, **96**(4): 1078–1089
- [31] Brenman Jay E, Chao Daniel S, Gee Stephen H, *et al.* Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. Cell, 1996, **84**(5): 757–767
- [32] Bredt D S, Hwang P M, Glatt C E, *et al.* Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. Nature, 1991, **351**(6329): 714–718
- [33] Fitch R H, Threlkeld S W, McClure M M, *et al.* Use of a modified prepulse inhibition paradigm to assess complex auditory discrimination in rodents. Brain Res Bull, 2008, **76**(1–2): 1–7
- [34] Gu Y, Zheng G, Xu M, *et al.* Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. J Neurochem, 2012, **120**(1): 147–156
- [35] Ding R, Feng L, He L, *et al.* Peroxynitrite decomposition catalyst prevents matrix metalloproteinase-9 activation and neurovascular injury after hemoglobin injection into the caudate nucleus of rats. Neuroscience, 2015, **297**: 182–193
- [36] Shaheen E L, Annette K, Deborah T, *et al.* Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. FRONT Neurol, 2013, **4**(32): 1–15
- [37] Chow A K, Cena J, El-Yazbi A F, *et al.* Caveolin-1 inhibits matrix metalloproteinase-2 activity in the heart. J Mol Cell Cardiol, 2007, **42**(4): 896–901
- [38] Choi K H, Kim H S, Park M S, *et al.* Regulation of caveolin-1 expression determines early brain edema after experimental focal cerebral ischemia. Stroke, 2016, **47**(5): 1336–1343
- [39] Garcia-Cardena G, Martasek P, Masters B S, *et al.* Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain *in vivo*. J Biol Chem, 1997, **272**(41): 25437–25440
- [40] Gu Y, Dee C M, Shen J G. Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. Front Biosci, 2011, **3**(4): 1216–1231
- [41] Shen J, Ma S, Chan P, *et al.* Nitric oxide down-regulates caveolin-1 expression in rat brains during focal cerebral ischemia and reperfusion injury. J Neurochem, 2006, **96**(4): 1078–1089
- [42] Fu S P, Gu Y, Jiang J Q, *et al.* Calycosin-7-O- β -D-glucoside regulates nitric oxide/caveolin-1/matrix metalloproteinases pathway and protects blood-brain barrier integrity in experimental cerebral ischemia-reperfusion injury. J Ethnopharmacol, 2014, **155**(1): 692–701
- [43] Matsui T, Nagafuji T, Kumanishi T, *et al.* Role of nitric oxide in pathogenesis underlying ischemic cerebral damage. Cell Mol, 1999, **19**(1): 177–189
- [44] Liu D H, Yuan F G, Hu S Q, *et al.* Endogenous nitric oxide induces activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 *via* S-nitrosylation in rat hippocampus during cerebral ischemia-reperfusion. Neuroscience, 2013, **229**: 36–48
- [45] Ascenzi P, di Masi A, Sciorati C, *et al.* Peroxynitrite An ugly biofactor. Biofactors, 2010, **36**(4): 264–273
- [46] Oh-Hashi K, Maruyama W, Isobe K. Peroxynitrite induces GADD34, 45, and 153 *via* p38 MAPK in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Free Radic Biol Med, 2001, **30**(2): 213–221
- [47] Kaji T, Kaieda I, Hisatsune T, *et al.* 3-Morpholininosydnonimine hydrochloride induces p53-dependent apoptosis in murine primary neural cells: a critical role for p21(ras)-MAPK-p19(ARF) pathway. Nitric Oxide, 2002, **6**(2): 125–134
- [48] Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, *et al.* Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. Am J Pathol, 2008, **172**(2): 454–469
- [49] Han F, Shirasaki Y, Fukunaga K, *et al.* Microsphere embolism induced endothelial nitric oxide synthase expression mediates disruption of the blood-brain barrier in rat brain. J Neurochem, 2006, **99**(1): 97–106
- [50] Han F, Chen Y X, Lu Y M, *et al.* Regulation of the ischemia-induced autophagy-lysosome processes by nitrosative stress in endothelial cells. J Pineal Res, 2011, **51**(1): 124–135
- [51] 黄小平, 邓常青, 邱咏园, 等. 黄芪甲苷和三七的三种有效成分配伍对小鼠脑缺血 / 再灌注后氧化应激和 Nrf2/HO-1 途径的影响. 中国药理学通报, 2013, **29**(11): 1596–1601
- Huang X P, Deng C Q, Qiu Y Y, *et al.* Chin Pharmacol Bull, 2013, **29**(11): 1596–1601
- [52] 梁金花. 自由基清除剂与亚低温结合治疗急性脑梗死的临床研究. 中国现代药物应用, 2016, **10**(6): 171–172
- Lang J H. Chin J Mod Drug Appl, 2016, **10**(6): 171–172
- [53] Kim G W, Lewén A, Copin J, *et al.* The cytosolic antioxidant, copper/zinc superoxide dismutase, attenuates blood-brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cordal ischemia in mice. Neuroscience, 2001, **105**(4): 1007–1018
- [54] 徐兵, 陈伟, 刘磊. 丹红联合依达拉奉治疗老年脑梗死的疗效及对 Hs-CRP、D-二聚体影响. 心脑血管病防治, 2015, **15**(3): 235–236
- Xu B, Chen W, Liu L. Prevention and Treatment of Cardio-Cerebral-Vascular Disease, 2015, **15**(3): 235–236
- [55] 胡世辉, 朱志杰, 章志奇, 等. 依达拉奉联合丹红注射液治疗急性脑梗死的疗效观察. 蚌埠医学院学报, 2013, **38**(9): 1170–1172
- Hu S H, Zhu Z J, Zhang Z Q, *et al.* J Bengbu Med Coll, 2013, **38**(9): 1170–1172
- [56] Koayashi T, Kuroda S, Tada M, *et al.* Calcium-induced

- mitochondrial swelling and cytochrome *c* release in the brain: its biochemical characteristics and implication in ischemic neuronal injury. *Brain Res*, 2003, **960**(1-2): 62-70
- [57] Limbourg F P, Huang Z H, Plumier J C, *et al.* Rapid nontranscriptional activation of endothelial nitric oxide synthase mediates increased cerebral blood flow and stroke protection by corticosteroids. *J CLIN INVEST*, 2002, **110**(11): 1729-1738
- [58] Yang S H, Shi J, Day A L, *et al.* Estradiol exerts neuroprotective effects when administered after ischemic insult. *STROKE*, 2000, **31**(3): 745-749
- [59] Dawson D A. Nitric oxide and focal cerebral ischemia: multiplicity of action and diverse outcome. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*, 1994, **6**(4): 299-324
- [60] 符 荣, 赵甲山, 赵洪洋, 等. 一氧化碳及一氧化氮对局灶性缺血脑组织的影响. *中风与神经疾病杂志*, 2004, **21**(1): 36-38
- Fu R, Zhao J S, Zhao H Y, *et al.* *Journal of Apoplexy and Nervous Diseases*, 2004, **21**(1): 36-38
- [61] McCullough L D, Zeng Z Y, Blizzard K K, *et al.* Ischemic nitric oxide and poly (ADP-ribose) polymerase-1 in cerebral ischemia: male toxicity, female protection. *J Cerebr Blood F Met*, 2005, **25**(4): 502-512
- [62] Li Y, Luo J M, Lau W M, *et al.* Caveolin-1 plays a crucial role in inhibiting neuronal differentiation of neural stem progenitor cells *via* VEGF signaling-dependent pathway. *PLOS ONE*, 2011, **6**(8): e22901
- [63] 王正芳. 检测细胞中一氧化氮和过氧亚硝基阴离子的荧光探针. *科技信息*, 2012, **6**: 146-147
- Wang Z F. *Science*, 2012, **6**: 146-147
- [64] Miller E W, Bian S X, Chang C J. A fluorescent sensor for imaging reversible redox cycles in living cells. *J Am Chem Soc*, 2007, **129**(12): 3458-3459
- [65] Xu K H, Chen H C, Tian J W, *et al.* A near-infrared reversible fluorescent probe for peroxynitrite and imaging of redox cycles in living cells. *Chem Commun*, 2011, **47**(33): 9468-9470
- [66] Zhou L, Li F, Xu H B, *et al.* Treatment of cerebral ischemia by disrupting ischemia-induced interaction of nNOS with PSD-95. *Nat Med*, 2010, **16**(12): 1439-1443

Roles of Reactive Nitrogen Species in Ischemic Stroke*

ZHANG Pan¹⁾, YAN Wei-Jie²⁾, ZHAO Yu-Ming^{2)**}

¹⁾ Department of Clinical Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

²⁾ Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract Small molecules of free radicals play essential roles in maintaining normal physiological function in organisms. However, in a variety of pathological conditions, excessive accumulation of these substances might cause serious damage to tissues and organs due to their highly active, strong oxidization properties. For instance, reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS), two major small molecules active substances, are proved to participate in the pathogenesis of stroke. In particular, the role of reactive nitrogen in stroke onset is one of the hot spot in current stroke etiology study. In this publication, recent progress of the physical and pathological functions of RNS in stroke study are reviewed and prospected.

Key words reactive nitrogen species, reactive oxygen species, stroke, cerebral ischemia-reperfusion injury

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0309

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (31570856, 21375133), Beijing Natural Science Foundation (5152005), 2016 Scientific Research Project of Beijing Educational Committee (KM201610025003) and Capital Medical University Undergraduate Research Program(7NZDS2015).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-83911678, E-mail: yumingzhao@ccmu.edu.cn

Received: March 11, 2017 Accepted: April 24, 2017