

• 综 述 •

## NO 检测方法的新进展及其在高原医学中的应用\*

李新建<sup>1,2</sup>, 朱俊宇<sup>1,2</sup> 综述, 高钰琪<sup>2,3</sup>, 罗勇军<sup>2,3△</sup> 审校

(1. 第三军医大学学员旅 9 队, 重庆 400038; 2. 第三军医大学高原军事医学系高原疾病学教研室, 重庆 400038; 3. 高原医学教育部重点实验室, 重庆 400038)

关键词: 高原习服; 高原适应; 一氧化氮

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.02.020

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)02-0171-03

一氧化氮(NO)是由内皮细胞分泌的一种脂溶性气体,由一氧化氮合成酶(NOS)在氧气、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)、黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)、黄素单核苷酸(FMN)和四氢蝶呤的参与下,催化 L-精氨酸生成。NO 具有舒张血管、抗血小板凝集、抑制血管平滑肌生长等多种生物活性<sup>[1]</sup>。NOS 包括神经元性(nNOS)、诱导性(iNOS)和内皮性(eNOS)三种形式<sup>[2]</sup>。nNOS 和 eNOS 一般在大脑和血管内皮细胞表达,而 iNOS 主要在呼吸道上皮细胞表达<sup>[3]</sup>。在缺氧条件下缺氧诱导转录因子(HIF1 和 HIF2)激活 NOS 基因的表达,使 iNOS 和 eNOS 表达增加,从而使组织产生 NO 增加<sup>[4-5]</sup>, NO 气体通过自由扩散进入平滑肌细胞,激活可溶性鸟苷酸环化酶产生 3',5'-环鸟苷酸(cGMP),从而导致血管舒张。NO 的代谢也可导致在组织蛋白和血液中的酪氨酸硝化,血红蛋白的变构状态也可以调节氮氧化物结构<sup>[6-10]</sup>,因而可以通过检测血液、唾液和尿液中具有生物活性的氮氧化物,来反映 NO 的含量。本综述总结了 NO 的测定方法,NO 的计量单位以及 NO 在高原习服、高原适应、高原病的发病中的作用。

## 1 在高原地区对呼出气体中 NO 含量的测量方法

目前在高原地区的 NO 含量主要采用化学发光传感器和一次性电化学传感器两种技术测量。化学发光传感器分析器是基于对气相的化学发光光电倍增管,来检测电子激发态的二氧化氮光子排放量,二氧化氮是通过 NO 与臭氧反应产生的,因此相应的 NO 含量也可以换算出来。在使用这种仪器时虽然光电倍增管系统和反应室的设计可以代偿任何外部气压的变化,但是大气压的变化仍可以影响通过节流传感器的流率并且导致 NO 信号的水平降低,因而必须用含有标准 NO 气体的大气压进行校准,使样本流率的变化不影响在高原 NO 的收集和测量,可以测定小于十亿分之一(ppb)的气相 NO、1 pmol 液相 NO 分子<sup>[11]</sup>。一次性电化学传感器是电化学性的测量方法,电极是位于一种用于测量 NO 的溶液中,可以与扩散到容器中的气相分子发生反应。由于电化学传感器技术取决于促使气体进入反应室的扩散速度,而大气压又影响着气体的扩散速度,因此大气压的变化可以影响 NO 的检测。高原上低气压环境导致了进入到反应室的气体量减少,这就降低了测量的精确度,同时由于这种实验仪器的性能因受大气压影响,而使它的操作范围海拔低于 3 100 m 的地区。

## 2 NO 分析的样本采集及结果计量单位

NO 广泛存在于人类呼出的气体中<sup>[12]</sup>。在 20 世纪 90 年

代初,通过 NO 的化学发光分析仪可以检测呼出气体中的 NO,并且用于临床实验<sup>[13-15]</sup>。在临床肺功能实验中常通过标准化法测量呼出 NO,它可以测量呼气早期的气道 NO(在气体流入 NO 分析仪的速度为 50 mL/s 时前 10 s 的呼气),因而反映了前 500~750 mL 呼出气体中 NO 的含量<sup>[16]</sup>。相比之下,在不透性麦拉气球收集的呼出气体中,用 offline 方法可以测定来源于肺泡腔和血管内的 NO,这种方法被推荐用于高原地区 NO 水平的评价,而且屏气可以增加检测总量 NO 的灵敏度<sup>[4,17-18]</sup>。以上两种方法的区别是很重要的,因为这两个方法测量的是不同位置的 NO,根据这两种收集方法的实验研究可能会得出相反的结论。

NO 分析仪器报告的结果为 NO 占呼出气体的 ppb,可以将它换算成呼出 NO 占呼出气体的部分压力(NO 分压),可以比较不同海拔 NO 含量。计量单位的不同可以影响 NO 对比的结果,如果是气压,那么就把 ppb 转换成纳米汞柱(nmHg)。nmHg 单位的 NO 分压的计算如下:ppb 单位的 NO 乘以 nmHg 单位时的周围环境气压然后再除以 1 000。因此在高原地区由于低气压的影响而使 NO 分子数较少,所以从上述可知,高原地区的研究报道也应考虑大气压影响<sup>[19]</sup>。

## 3 体内合成之外的 NO

口腔细菌可以生产 NO<sup>3-</sup>,而且食品和饮料也可能会增加循环中有生物活性的 NO<sup>2-</sup> 和 NO<sup>3-</sup> 水平,这些都会影响 NO 的测定结果<sup>[20]</sup>。因而建议在收集呼出 NO 时,受试者应禁食水 1 h<sup>[15]</sup>,充分考虑到上述可能增加呼出气 NO 测量结果的因素<sup>[21-22]</sup>。值得庆幸的是,研究表明平均日常消费的 NO<sup>3-</sup> 还没有达到明显改变 NO<sup>3-</sup> 或 NO<sup>2-</sup> 含量的水平。例如有学者通过收集西藏农牧区的膳食信息,评价世居 4 200 m 藏族人饮食中的 NO<sup>[23-25]</sup>,在这个研究中 5 名男子和 5 名女子提供了他们的呼气和尿液,并提供了过去 24 h 的饮食摄入量并等份的食品和家庭供水。在他们的饮料(水、茶和青稞酒)中检测到了 0~15 μmol 的 NO<sup>2-</sup> 和 0~70 μmol 的 NO<sup>3-</sup>,食物中不包括绿色蔬菜或其他来源(如腊肉)的 NO<sup>3-</sup>;典型膳食中包括低含量的 NO<sup>2-</sup> (<0.4 mg/kg)和 NO<sup>3-</sup> (<125 mg/kg)<sup>[26]</sup>。

## 4 NO 在高原习服适应中的作用

平原人进入高原后,机体在神经-体液调节下发生一系列的代偿适应性变化,以适应高原环境,这个过程称为习服。高原适应是指高原上的人群或动物种系发生了一种可以遗传的,并具有遗传基础的解剖上和生化上的特征,因而能很好地生活

\* 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(2012CB518200);国家自然科学基金资助项目(30900715)。 作者简介:李新建,男,高原医学在读本科。 △ 通讯作者,E-mail:wazyhgy1976@yahoo.cn。

在高原环境的过程<sup>[27-28]</sup>。在高原医学领域,有许多关于 NO 的研究,例如 NO 含量、影响 NO 生成的相关基因多态性与急性高原反应、高原肺水肿、高原适应或慢性高原病易感性,肺动脉压力,机体运动能力等的关系<sup>[29]</sup>。李红等<sup>[30]</sup>报道快速进入高原者进入高原后的 NO 由平原的(82.55±33.47)μmol/L 降至(54.23±26.19)μmol/L,高原缺氧引起的血清 NO 合成分泌降低与快速进入高原者进入高原后的肺动脉高压及急性高原反应的发生密切相关。马勇等也研究发现初入海拔 5 380 m 居住 10 d,血浆 NO 含量的急骤下降则可能是舒缩血管因子低氧性平衡失调、肺动脉血管收缩、肺动脉压力改变所致,导致急性高原病易感<sup>[31]</sup>。

有学者报道低氧可降低兔离体肺组织中 NO,并引起肺血管收缩的现象,提示高原地区 NO 含量降低可能是高原地区缺氧性肺血管收缩反应发生的原因<sup>[32-33]</sup>。高原肺动脉高压是一种血管性反应并且与保持肺血管舒张的 NO 水平密切相关<sup>[34]</sup>。高原肺水肿发病的根本原因是缺氧导致肺血管收缩增强,肺动脉压急剧升高。1 个在平原地区的健康人在 4 559 m 停留 20 h 时,肺动脉收缩压增加了 13 mmHg;高原肺水肿患者则增加了 2 倍多(27 mmHg)<sup>[35]</sup>。因此,NO 可以通过血管扩张,抵消缺氧性肺血管收缩,当高原肺水肿患者吸入混有 15~40 ppm NO 的气体 15~40 min 时,都能降低肺动脉压<sup>[35]</sup>,因而吸入 NO 可以应用于高原肺水肿的治疗过程中<sup>[12]</sup>。此后还有大量研究表明体内不同形式和不同部位的 NO,在氧气从肺运输到心血管、血液和线粒体的各级梯度中发挥着重要的作用<sup>[36-39]</sup>。对于高原肺水肿患者的 NO 含量降低,是否与 NOS3 基因(该基因编码 eNOS)多态性相关还存在争议,有的学者研究报道 NOS3 基因 G894T(Glu298Asp)多态性与高原肺水肿的易感性相关,然而另有学者报道该位点的多态性与 HAPE 的易感性不相关<sup>[40-44]</sup>。

急性高原反应的发生也与 NO 含量密切相关,Macinnis 等<sup>[45]</sup>报道在急性高原反应患者中呼出气 NO 的浓度低于健康对照组。Wang 等<sup>[46]</sup>通过研究 NOS3 基因 G894T 多态性与急性高原反应的易感性,发现基因型 NOS3 894T 在急性高原反应中发病率显著高于对照组,是急性高原反应的危险因素之一。

研究表明在暴露于高原的前 20 h 血管内血浆 NO<sup>2-</sup>、RS-NO、动脉和静脉血液中红细胞 NO 的水平都发生了明显的改变,而且在高原地区红细胞中氮氧化物约占动脉总 NO 的 22%,而在平原地区只占了 11%<sup>[34]</sup>。因而红细胞相关 NO 可以导致血管扩张、增加血流量和提高氧运输,提示 NO 在高原适应时的重要作用。有报道在印度 3 400 m 和在秘鲁 4 350 m 的高原居民和土著人的循环氮氧化物水平有一个小到大的增加,并且发现了在 4 200 m 藏族人的红细胞相关氮氧化物比低海拔地区平原人高了 200 倍,而且他们的硝酸盐与美国平原人群相比有 10 倍的增加<sup>[23]</sup>。通过测定藏族人尿中氮氧化物定量,发现他们全身 NO 含量是高于平原人群的,这与肺中总量 NO 和氮氧化物的测量结果是一致的,即肺中总量 NO 和氮氧化物在藏族人中也同样是高于平原人的,这表明了机体内有更多的 NO 合成<sup>[47]</sup>。这些变化可能是由于遗传变异,Wang 等<sup>[48]</sup>研究 NOS3 基因的 G894T 多态性与高原适应的相关性,发现安第斯高原世居人口中等位基因 G 的频率显著高原居住在平原的印第安人人群,提示 NOS3 894G 基因型可以提高

NO 的含量,促进高原习服和适应。

## 5 结论与展望

大量研究已明确,高水平 NO 与在高原地区机体的功能改善和预防疾病是相关的。然而许多关键问题仍然需要得到解决,例如:成功高原习服的平原人的 NO 是否仍然升高,这种升高是否是短暂的,NO 是否只是对高原环境的一种早期反应而不能维持。同样,还需要了解当藏族人在平原地区无缺氧条件时,他们在高原上的高水平 NO 是否继续保持。

## 参考文献

- [1] 王岩飞. 一氧化氮治疗急性高原肺水肿的近况与展望[J]. 高原医学杂志, 2006, 16(1): 63-64.
- [2] Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1411(2/3): 217-230.
- [3] Guo FH, De Raeve HR, Rice TW, et al. Continuous nitric oxide synthesis by inducible nitric oxide synthase in normal human airway epithelium in vivo[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92(17): 7809-7813.
- [4] Dweik RA, Laskowski D, Abu-Soud HM, et al. Nitric oxide synthesis in the lung: regulation by oxygen through a kinetic mechanism[J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(3): 660-666.
- [5] 吴文明, 张方信, 张盼, 等. 高原缺氧条件对大鼠肠黏膜组织及缺氧诱导因子-1 $\alpha$ 、诱导型一氧化氮合酶表达的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35(5): 592-594.
- [6] Angelo M, Singel DJ, Stamler JS. An S-nitrosothiol(SNO) synthase function of hemoglobin that utilizes nitrite as a substrate[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(22): 8366-8371.
- [7] Nagababu E, Ramasamy S, Abernethy DR, et al. Active nitric oxide produced in the red cell under hypoxic conditions by deoxy-hemoglobin-mediated nitrite reduction[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(47): 46349-46356.
- [8] Gladwin MT, Grubina R, Doyle MP. The new chemical biology of nitrite reactions with hemoglobin: R-state catalysis, oxidative denitrosylation, and nitrite reductase/anhydrase[J]. *Acc Chem Res*, 2009, 42(1): 157-167.
- [9] Cosby K, Partovi KS, Crawford JH, et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation[J]. *Nat Med*, 2003, 9(12): 1498-1505.
- [10] Ghosh S, Janocha AJ, Aronica MA, et al. Nitrotyrosine proteome survey in asthma identifies oxidative mechanism of catalase inactivation[J]. *J Immunol*, 2006, 176(9): 5587-5597.
- [11] Gelb AF, Taylor CF, Shinar CM, et al. Effect of fluticasone 250 μg/salmeterol 50 μg and montelukast on exhaled nitric oxide in asthmatic patients[J]. *Can Respir J*, 2008, 15(4): 193-198.
- [12] Scherrer U, Vollenweider L, Delabays A, et al. Inhaled nitric oxide for highaltitude pulmonary edema[J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(10): 624-629.
- [13] Dweik RA, Boggs PB, Erzurum SC, et al. An official ATS clinical practice guideline: interpretation of exhaled nitric oxide levels (FENO) for clinical applications[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 184(5): 602-615.
- [14] American Thoracic Society and the European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 171(8): 912-930.

- [15] American Thoracic Society. Recommendations for standardized procedures for the on-line and off-line measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide in adults and children[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999, 160(6): 2104-2117.
- [16] Macintyre N, Crapo RO, Viegi G, et al. Standardisation of the single-breath determination of carbon monoxide uptake in the lung[J]. *Eur Respir J*, 2005, 26(4): 720-735.
- [17] Borland CD, Higenbottam TW. A simultaneous single breath measurement of pulmonary diffusing capacity with nitric oxide and carbon monoxide[J]. *Eur Respir J*, 1989, 2(1): 56-63.
- [18] Tsoukias NM, Shin HW, Wilson AF, et al. A single-breath technique with variable flow rate to characterize nitric oxide exchange dynamics in the lungs[J]. *J Appl Physiol*, 2001, 91(1): 477-487.
- [19] Dill DB, Evans DS. Report barometric pressure[J]. *J Appl Physiol*, 1970, 29(6): 914-916.
- [20] Larsen FJ, Weitzberg E, Lundberg JO, et al. Dietary nitrate reduces maximal oxygen consumption while maintaining work performance in maximal exercise[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(2): 342-347.
- [21] Lundberg JO, Weitzberg E, Cole JA, et al. Nitrate, bacteria and human health[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2(7): 593-602.
- [22] Zetterquist W, Pedroletti C, Lundberg JO, et al. Salivary contribution to exhaled nitric oxide[J]. *Eur Respir J*, 1999, 13(2): 327-333.
- [23] Erzurum SC, Ghosh S, Janocha AJ, et al. Higher blood flow and circulating NO products offset high-altitude hypoxia among Tibetans[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(45): 17593-17598.
- [24] Beall CM, Laskowski D, Strohl KP, et al. Pulmonary nitric oxide in mountain dwellers[J]. *Nature*, 2001, 414(6862): 411-412.
- [25] Hoit BD, Dalton ND, Erzurum SC, et al. Nitric oxide and cardiopulmonary hemodynamics in Tibetan highlanders[J]. *J Appl Physiol*, 2005, 99(5): 1796-1801.
- [26] Pannala AS, Mani AR, Spencer JP, et al. The effect of dietary nitrate on salivary, plasma, and urinary nitrate metabolism in humans[J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(5): 576-584.
- [27] 高钰琪. 高原病理生理学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [28] 黄庆愿, 高钰琪, 史景泉, 等. 低氧习服过程中大鼠心脏的适应性改变[J]. *中国病理生理杂志*, 2001, 17(7): 606-609.
- [29] 汪涛, 张珍祥, 刘声远, 等. 前列腺素、一氧化氮和钾通道在鼠兔缺氧肺血管反应钝化中的作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(5): 711-714.
- [30] 李红, 郑必海, 江承剑, 等. 快速进入高原者血清一氧化氮及血浆内皮素的变化及其意义[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2005, 8(2): 179.
- [31] 马勇, 张西洲, 何富文, 等. 高原移居人群肺功能与血浆一氧化氮测定结果分析[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2000, 23(2): 111.
- [32] Persson MG. Endogenous nitric oxide as a probable modulator of pulmonary circulation and hypoxic pressor response in vivo[J]. *Acta Physiol Scand*, 1990, 140(4): 449-457.
- [33] Gustafsson LE, Leone AM, Persson MG, et al. Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991, 181(2): 852-857.
- [34] Pepke-Zaba J, Higenbottam TW, Dinh-Xuan AT, et al. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension[J]. *Lancet*, 1991, 338(8776): 1173-1174.
- [35] Bailey DM, Dehnert C, Luks AM, et al. High-altitude pulmonary hypertension is associated with a free radical-mediated reduction in pulmonary nitric oxide bioavailability[J]. *J Physiol*, 2010, 588(23): 4837-4847.
- [36] Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology[J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 147 Suppl 1: S193-201.
- [37] Erusalimsky JD, Moncada S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(12): 2524-2531.
- [38] Knott AB, Bossy-Wetzel E. Impact of nitric oxide on metabolism in health and age-related disease[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2010, 12(Suppl 2): 126-133.
- [39] Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J, et al. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control[J]. *Nature*, 1996, 380(6571): 221-226.
- [40] Ahsan A, Charu R, Pasha MA, et al. eNOS allelic variants at the same locus associate with HAPE and adaptation [J]. *Thorax*, 2004, 59(11): 1000-1002.
- [41] Ahsan A, Mohd G, Norboo T, et al. Heterozygotes of NOS3 polymorphisms contribute to reduced nitrogen oxides in high-altitude pulmonary edema[J]. *Chest*, 2006, 130(5): 1511-1519.
- [42] Weiss J, Haefeli WE, Gasse C, et al. Lack of evidence for association of high altitude pulmonary edema and polymorphisms of the NO pathway[J]. *High Alt Med Biol*, 2003, 4(3): 355-366.
- [43] Droma Y, Hanaoka M, Ota M, et al. Positive association of the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms with high-altitude pulmonary edema[J]. *Circulation*, 2002, 106(7): 826-830.
- [44] Yujing S, Mingwu F, Wenquan N, et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms associated with susceptibility to high altitude pulmonary edema in Chinese railway construction workers at Qinghai-Tibet over 4 500 meters above sea level[J]. *Chin Med Sci J*, 2010, 25(4): 215-221.
- [45] Macinnis MJ, Carter EA, Koehle MS, et al. Exhaled nitric oxide is associated with acute mountain sickness susceptibility during exposure to normobaric hypoxia[J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2012, 180(1): 40-44.
- [46] Wang P, Koehle MS, Rupert JL. Genotype at the missense G894T polymorphism(Glu298Asp) in the NOS3 gene is associated with susceptibility to acute mountain sickness[J]. *High Alt Med Biol*, 2009, 10(3): 261-267.
- [47] Castillo L, DeRojas-Walker T, Yu YM, et al. Whole body arginine metabolism and nitric oxide synthesis in newborns with persistent pulmonary hypertension[J]. *Pediatr Res*, 1995, 38(1): 17-24.
- [48] Wang P, Ha AY, Kidd KK, et al. A variant of the endothelial nitric oxide synthase gene(NOS3) associated with AMS susceptibility is less common in the Quechua, a high altitude Native population[J]. *High Alt Med Biol*, 2010, 11(1): 27-30.