

多形核白细胞产生的 $\text{NO}^\cdot$ 和 O_2^- 自由基 主要形成 ONOO^- *

赵保路 王建朝 侯京武 忻文娟

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 用 ESR 自旋捕集技术研究了人多形核白细胞 (PMN) 受促癌剂佛波醇 (PMA) 刺激产生 O_2^- 和 $\text{NO}^\cdot$ 自由基的相互作用. 发现加 L-精氨酸使在 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉到的 O_2^- 明显减少, 加 N^G -甲基精氨酸 (NGMA) 使在 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉的 O_2^- 明显增加. 用黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶和光照核黄素体系证明, 加 L-精氨酸使 PMA 刺激 PMN 产生 $\text{NO}^\cdot$ 自由基与 O_2^- 结合生成 ONOO^- 是加入 L-精氨酸使 PMA 刺激 PMN 体系捕捉的 O_2^- 减少的主要原因, 并且推算了加入不同浓度 L-精氨酸 PMN 产生 $\text{NO}^\cdot$ 自由基的量. 用羟基自由基清除剂和 ONOO^- 氧化 DMPO 和 DMSO 及其对 pH 的依赖关系, 证明了 ONOO^- 分解并没有直接生成羟基自由基. 用依赖鲁米诺的化学发光法研究了人多形核白细胞受促癌剂 PMA 刺激产生 $\text{NO}^\cdot$ 自由基动力学过程. 另外, 用化学合成的 $\text{NO}^\cdot$ 自由基和过氧亚硝基在模型体系研究了它们的 ESR 和化学发光特征. 说明 PMA 刺激 PMN 生成的 $\text{NO}^\cdot$ 和 O_2^- 自由基反应形成的 ONOO^- 是引起化学发光的主要形式.

关键词 $\text{NO}^\cdot$ 自由基 O_2^- 过氧亚硝基 多形核白细胞 ESR 化学发光

多形核白细胞 (PMN) 在保护身体免受外来入侵微生物损伤和杀伤癌细胞方面起着重要作用. 很多研究表明, 当 PMN 在执行这一功能时, 它被刺激活化, 产生呼吸爆发, 消耗大量氧同时释放大活性氧自由基^[1, 2]. 最近用热能分析仪研究发现, 培养的鸡巨噬细胞在受脂多糖和干扰素刺激活化时释放 NO 气体, 并且证明 NO 气体的产生是依赖 L-精氨酸的^[3]. 但是, 巨噬细胞在受到脂多糖刺激时也会产生活性氧自由基. 那么巨噬细胞同时产生这两种自由基会发生什么结果以及在有活性氧存在条件下 $\text{NO}^\cdot$ 自由基产生的动力学过程和途径又是怎样的呢? 这些都是需要深入研究的. 另外, $\text{NO}^\cdot$ 自由基具有重要生理调节功能, 是内皮细胞松弛因子 (EDRF), 它能使血管平滑肌松弛, 抑制血小板凝聚, 并与神经传导、学习和记忆有着密切关系^[4, 5]. 也有文献报道 $\text{NO}^\cdot$ 自由基还参与免疫杀伤和细胞毒性作用^[6]. 但是多形核白细胞受刺激释放的 $\text{NO}^\cdot$ 自由基是如何执行这一功能的, 特别是在有活性氧存在条件下它又是通过什

么途径来实现这一功能的. 都是没有解决的问题. 因此, 我们首先用 ESR 自旋捕集技术研究了人多形核白细胞受促癌剂 PMA 刺激产生 $\text{NO}^\cdot$ 和 O_2^- 自由基的相互作用的特征. 然后用人工合成的 ONOO^- 和羟基自由基清除剂研究了 ONOO^- 的氧化作用的途径. 同时用依赖鲁米诺的化学发光法研究了 PMA 刺激 PMN 体系产生 $\text{NO}^\cdot$ 自由基的动力学过程及化学合成的 $\text{NO}^\cdot$ 和过氧亚硝基在模型体系中化学发光特点.

1. 材料和方法

1.1 试剂

鲁米诺(luminol), PMA (phorbol myristate acetate), tNB (nitroso-tert-butane), 黄嘌呤, 超氧化物歧化酶(SOD), DMPO (5, 5-dimethyl-1-pyrroline-1-oxide) 和过氧化氢酶购自 Sigma 公司. NGMA 购自 ICNBIOMEDICALS INC. 过氧化氢和其它试剂均为国产 AR 级试剂. DMPO 用前用活性碳提纯.

1.2 $\text{NO}^\cdot$ 的制备

取 250 mL 圆底烧瓶, 加入 20 g 铜和 100 mL 1:1 的硝酸, 反应放出气泡, 将所生成气体先通入一盛蒸馏水的锥形瓶, 然后通入盛 2 mol/L 氢氧化钾溶液的锥形瓶中. 洗涤后的气体(NO)可直接用于实验.

1.3 多形核白细胞的分离纯化

正常人新鲜抗凝血购自北京市红十字血液中心. 用 6% 葡聚糖分离白细胞, 用冰水低速法除去残留的红细胞, 再用 Ficoll 淋巴细胞分离液梯度离心得 PMN. 将 PMN 悬浮于 Hank's 液中待用.

1.4 过氧亚硝基阴离子(ONOO^-)的合成

ONOO^- 的合成是通过 1 个淬灭流动反应器. 0.6 mol/L NaNO_2 水溶液和 0.6 mol/L HCl /0.7 mol/L H_2O_2 混合溶液, 各以 26 mL/min 的速度通入 T 形管上端的 2 个叉口, 两种溶液混合于内径 3 mm 的玻璃管中, 反应生成过氧亚硝酸. 在 T 形管的中部叉口以同样速度通入 1.5 mol/L NaOH 溶液, 使反应液迅速变为碱性. 所得的混合溶液通过 1 个二氧化锰柱子, 以除去多余的 H_2O_2 . 溶液在 -20°C 下冷冻. 过氧亚硝酸盐趋于冰的表面形成黄色的薄层. 刮下此薄层, 作为过氧亚硝基阴离子研究用. 其浓度用 302 nm 的紫外吸收峰测定 ($\xi = 1.670 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

1.5 PMA 刺激 PMN 产生 O_2^- 的测定

PMN (10^7 个细胞/mL), DETAPAC (diethyltri-amine-pentacetic acid) (10 mmol/L) 和 PMA (100 nmol/L), 混合, 在 37°C 温育 2 min, 加入 0.1 mol/L DMPO, 立即测试 ESR 波谱. 加不同浓度的 L-精氨酸或 NGMA 以检测它们对 PMN 产生自由基的影响.

1.6 L-精氨酸对黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶产生 O_2^- 清除的测定

0.32 mmol/L 黄嘌呤, 0.1 mmol/L DETAPAC, 0.1 mol/L DMPO 和 0.54 U/mL 黄嘌呤氧化酶混合均匀, 立即记录 ESR 波谱. 测 L-精氨酸和 NGMA 对该体系产生 O_2^- 的影响时, 分别加入不同浓度的 L-精氨酸或 NGMA.

1.7 $\text{NO}^\cdot$ 对光照核黄素产生 O_2^- 清除的测量

1.2 mmol/L 核黄素, 20 mmol/L EDTA 和 0.1 mol/L DMPO 混合均匀, 用 1 kW 汞灯光照

射 20 s (光距 60 cm). 立即记录 ESR 波谱. 测 $\text{NO}^\cdot$ 与该体系产生的 O_2^- 作用时, 加入不同浓度的 $\text{NO}^\cdot$.

利用在光照核黄素中 NO 对 O_2^- 的抑制曲线, 以在 NGMA 存在对 NO 产生达到饱和抑制时作为无 NO 产生为标准, 测量和计算出在不同浓度 L-精氨酸存在时 PMN 产生的 NO 的量.

1.8 ONOO^- 氧化 DMSO (dimethylsulfoxide) 产生甲基自由基的检测

4.8 mmol/L ONOO^- , 80 mmol/L tNB 和 1.4 mol/L DMSO 充分混合后吸入石英毛细管, 在 ESR 波谱仪上记录 ESR 波谱.

1.9 ESR 测试条件

所有 ESR 波谱都在 Varian E-109 ESR 波谱仪上测定. X-波段, 100 kHz 高频调制, 调制幅度 1×10^{-4} T, 中心磁场 $3\,250 \times 10^{-4}$ T, 扫宽 200×10^{-4} T, 时间常数 0.128 s.

1.10 化学发光的测定

为了检测 PMA 刺激 PMN 产生 $\text{NO}^\cdot$ 的发光, 首先将 PMN (1×10^6 个细胞/mL), PMA (100 nmol/L) 和鲁米诺 (0.06 mmol/L) 在 5 mL 发光管中混合均匀, 在不同时间加入 L-精氨酸或 NGMA, 并测定不同时间的发光峰值. 测量 $\text{NO}^\cdot$ 自由基化学发光对 O_2^- 的依赖时, 将黄嘌呤 (0.32 mmol/L), 鲁米诺 (0.06 mmol/L) 和黄嘌呤氧化酶 (0.095 U/mL) 共 1 mL 在 5 mL 发光管中混合均匀, 放入 WDD-1 型发光仪测定不同时间的发光峰值. 在不同时间再加入不同浓度 $\text{NO}^\cdot$, 并测试其发光峰值. 测量 ONOO^- 的化学发光时, 将 (0.03 mmol/L) ONOO^- 与鲁米诺混合后, 立即测化学发光峰值.

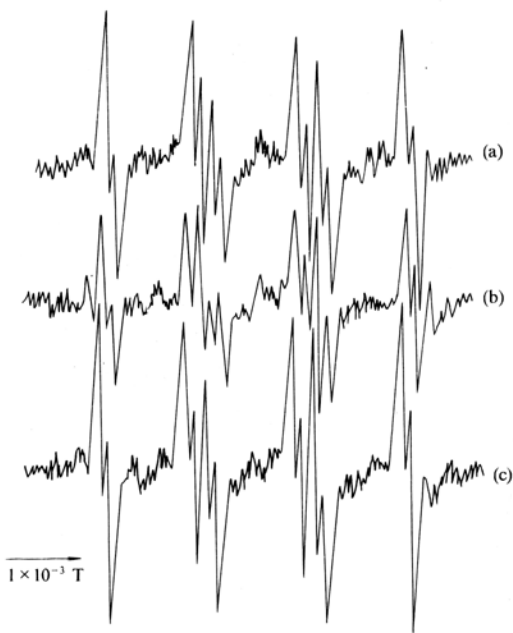


图 1 用 DMPO (0.1 mol/L) 自旋捕获的 PMA (200 ng/mL) 刺激 PMN (10^7 个细胞/mL) 产生的超氧阴离子自由基的 ESR 波谱 (a); 加入 1.0 mmol/L, L-精氨酸 (b) 和 1.0 mmol/L N^G -甲基-精氨酸 (c) 对 (a) 中捕获到的 ESR 波谱的影响

ESR 测试条件详见材料和方法

2 结果

2.1 PMA 刺激 PMN 产生 NO 自由基的测定

用 DMPO 捕获的 PMA 刺激 PMN 产生的 O_2^- 的 ESR 波谱及 L-精氨酸 (1 mmol/L) 和 NGMA (1 mmol/L) 对 PMA 刺激 PMN 产生 O_2^- 的影响如图 1(a), (b), (c) 所示. 图 1(a) 是 1 个由 O_2^- 与 DMPO 的加合物 (DMPO-OOH , $g=2.005\,5$, $a_N=14.3 \times 10^{-4}$ T, $a_H^\beta=11.3 \times 10^{-4}$ T, $a_H^\alpha=1.26 \times 10^{-4}$ T) 和羟基与 DMPO 的加合物 (DMPO-OH , $g=2.005\,3$, $a_N=a_H=14.9 \times 10^{-4}$ T) 组成的复合谱. 由图可以看出, L-精氨酸可以明显减少在 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉到的 O_2^- , 而 NGMA 则可以明显增加在 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉到的 O_2^- . 而且对精氨酸的浓度有一定的依赖关系 (表 1). 加入 L-精氨酸只是略微增加 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉到的羟基自由基,

表 1 L-精氨酸对 PMA 刺激 PMN (10^7 个细胞/mL) 产生 O_2^- 的影响和产生的 $\text{NO}^\cdot$ 自由基的量

L-精氨酸浓度/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.8	1.0	0.1	0
对 O_2^- 的抑制/%	65.7 ± 5.34	51.5 ± 2.68	28.9 ± 3.42	14.7 ± 3.12
产生的 $\text{NO}^\cdot/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	10.2 ± 0.05	4.2 ± 0.02	1.1 ± 0.03	0.1 ± 0.02

而 NGMA 对 PMA 刺激 PMN 体系中捕捉的羟基自由基的影响不十分明显。

为了检验 L-精氨酸和 NGMA 对 O_2^- 有没有影响,在黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系中检测了 L-精氨酸对 O_2^- 的清除作用。在所用浓度范围内,未检测到有任何清除作用。在该体系中,在所用浓度范围内,NGMA 对 O_2^- 也没有增强作用。

为了测量在上述实验中有多少 $\text{NO}^\cdot$ 自由基生成并与 O_2^- 结合形成了 ONOO^- 。用光照核黄素产生的 O_2^- 作为模型,用化学合成的 $\text{NO}^\cdot$ 与之反应。发现随着 $\text{NO}^\cdot$ 浓度的增加,检测到的 O_2^- 线性下降,且呈现量效关系(图 2)。由此图可以推算出在以上 PMA 刺激 PMN 实验中,加不同浓度 L-精氨酸产生 $\text{NO}^\cdot$ 自由基的量(表 1)。由表中的数据可以看出,在未加 L-精氨酸时,PMN 就可以产生 NO 自由基,只是分离的细胞中 $\text{NO}^\cdot$ 合成酶的底物 L-精氨酸的浓度有限,所以产率比较低。当加入 L-精氨酸之后, $\text{NO}^\cdot$ 产率急剧增加。在体内有大量 L-精氨酸供应,类似本实验外加 L-精氨酸的情况。产生的 $\text{NO}^\cdot$ 和 ONOO^- 的免疫功能和毒性也就表现出来。

2.2 PMA 刺激 PMN 产生的 $\text{NO}^\cdot$ 和 O_2^- 主要形成 ONOO^-

为了研究 PMN 产生的 $\text{NO}^\cdot$ 和 O_2^- 反应形成的 ONOO^- 是否分解生成了 $\cdot\text{OH}$ 自由基。我们用 DMPO 在不同 pH 与化学合成的 ONOO^- 反应,在很宽的 pH 范围内($\text{pH}=4 \sim 7.8$)都可以得到一个与羟基自由基和 DMPO 自旋加合物一样的四线谱(图 3)。但用羟基自由基的特异清除剂乙醇或甘露醇都不能使四线谱减小,也没有出现羟基进攻乙醇产生乙醇自由基与 DMPO 加合物的 ESR 信号^[7]。这就说明四线谱不是由 ONOO^- 直接分解产生的 $\cdot\text{OH}$ 与 DMPO 形成的自旋加合物,而是 DMPO 被 ONOO^- 直接氧化形成的自由基^[8]。

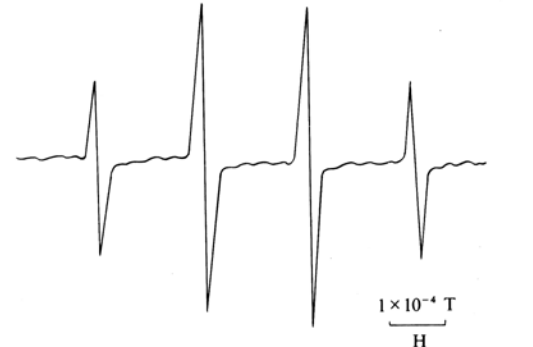


图 3 用 DMPO (0.1 mol/L) 与 ONOO^- (0.3 mmol/L) 反应产生的自由基的 ESR 波谱
ESR 测试条件详见材料和方法

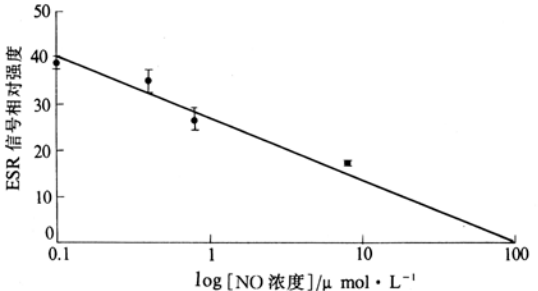


图 2 加入 $\text{NO}^\cdot$ 对用 DMPO (0.1 mol/L) 捕集光照核黄素/EDTA 体系产生的 O_2^- 自由基 ESR 波谱信号的清除作用
条件同图 1

图 4 给出了图 3 四线谱强度对 pH 的依赖关系。在磷酸缓冲溶液中,降低 pH,四线谱强度有所增强,升高 pH,四线谱强度降低,而在碳酸缓冲溶液中,即使升高 pH,仍能给出很强的四线谱,证明 ONOO^- 氧化 DMPO 不一定是

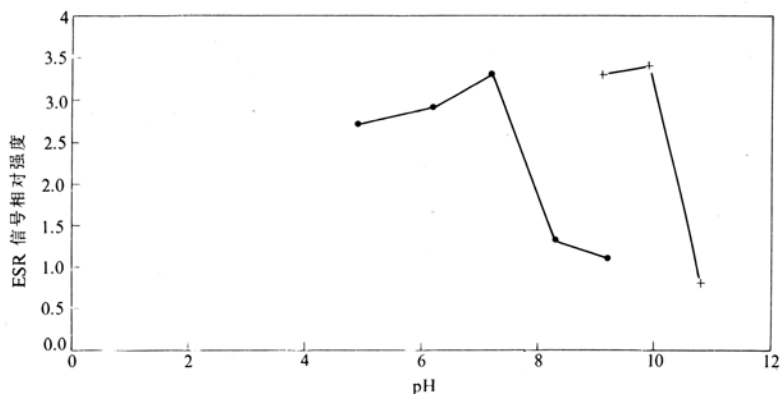


图 4 用 DMPO (0.1 mol/L) 与 ONOO^- (0.3 mmol/L) 反应产生的自由基的 ESR 波谱对 pH 的依赖关系
ESR 测试条件详见材料和方法

直接通过 $\cdot\text{OH}$ 自由基途径。

用 tNB 捕集到了 ONOO^- 氧化 DMSO 产生的甲基自由基。用羟自由基清除剂甘露醇或乙醇都不能清除此信号,说明 ONOO^- 氧化 DMSO 不是直接通过 $\cdot\text{OH}$ 自由基的机理。在 pH 等于 10 时该信号达到最大值, pH 小于 9 或大于 11, 该信号都迅速变小。进一步证明了 ONOO^- 氧化 DMSO 不是直接通过 ONOO^- 在低 pH 分解产生 $\cdot\text{OH}$ 的途径实现的。

2.3 PMN 受 PMA 刺激呼吸爆发产生 NO^+ 发光的动力学过程

用 PMA 刺激 PMN 在鲁米诺中即给出较强的发光强度,当加入 L-精氨酸 (5 mmol/L) 后,使其发光强度剧烈增加达上百倍,到一峰值后,再逐渐减少。在开始到 10 min 之间加 L-精氨酸,其发光的峰值基本相同,只是后加 L-精氨酸的发光强度的半衰期(发光强度衰减到峰值一半的时间)有所增加。10 min 之后,再加 L-精氨酸,发光强度的峰值就逐步降低,半衰期延长(图 5)。加入 NGMA 抑制这一体系的发光增强。

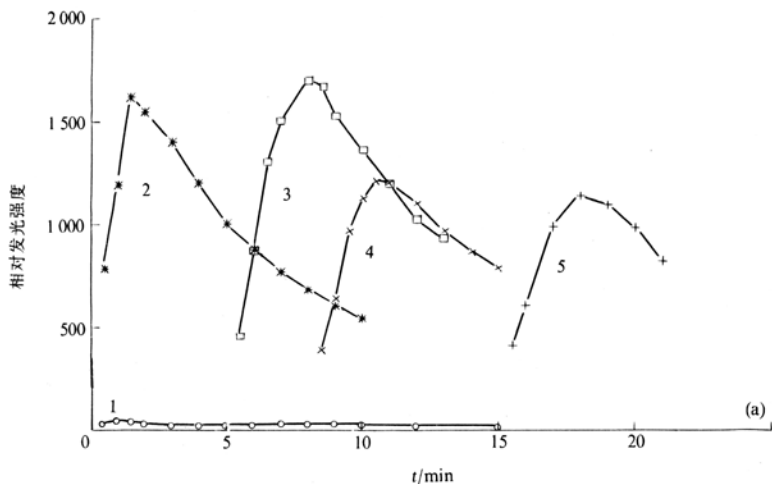


图 5 PMA 刺激 PMN 对化学发光的影响

1 为产生的化学发光, 2 为反应开始化学发光, 3 为 5 min 化学发光, 4 为 8 min 化学发光, 5 为 15 min 加入 L-精氨酸 (0.1 mmol/L) 化学发光

为了探讨 PMA 刺激 PMN 产生 $\text{NO}^\cdot$ 自由基的发光机理, 用黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应模型体系进行了测量. 结果发现, 将新制备的 $\text{NO}^\cdot$ 水溶液和鲁米诺混合, 几乎检测不出任何发光强度. 而黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应体系与鲁米诺混合可以给出较强的发光. 若将 $\text{NO}^\cdot$ 水溶液与黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应体系混合后则给出非常强的发光强度(图 6). 在黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应后不同时间加入 $\text{NO}^\cdot$, 产生发光强度的动力学基本相似. 实验还发现, 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应体系的发光强度随溶液 pH 增加而加大, 但在 $\text{NO}^\cdot$ 与黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶反应体系中的发光强度则有最佳 pH 范围(9.5 ~ 10.3)(图 7).

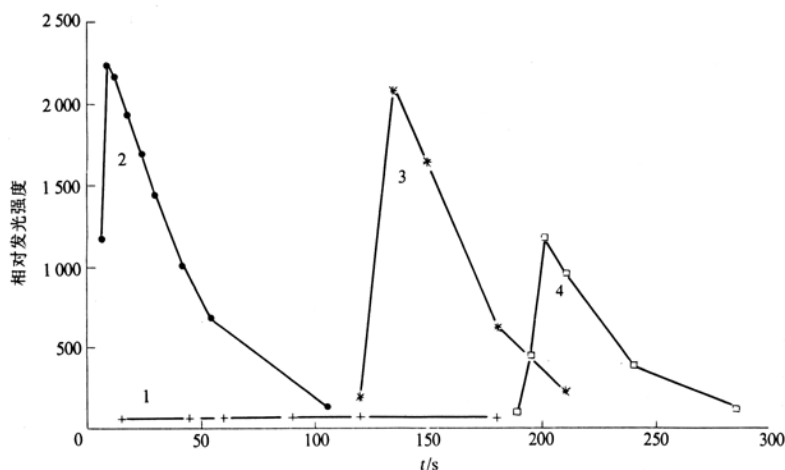


图 6 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系对发光的影响

1 为鲁米诺中的化学发光, 2 为在反应开始化学发光, 3 为 125 s, 4 为 175 s 时加入 $\text{NO}^\cdot$ (0.03 mmol/L) 化学发光

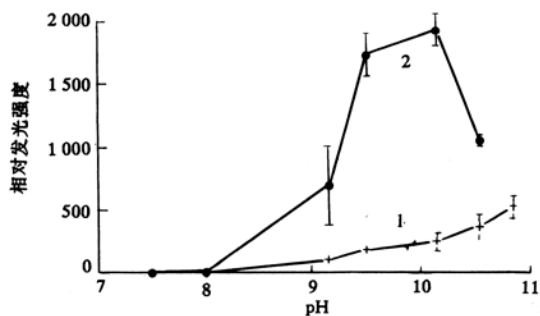


图 7 黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系化学发光对 pH 的依赖关系

1 为在鲁米诺中化学发光, 2 为加入 $\text{NO}^\cdot$ (0.03 mmol/L) 后的化学发光

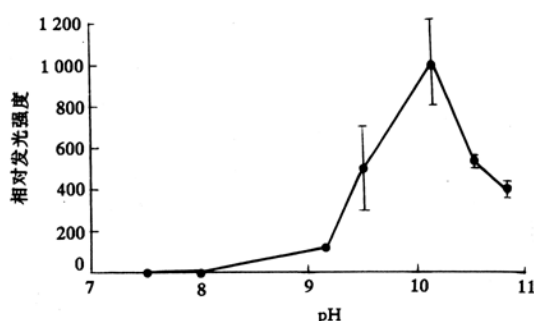


图 8 ONOO^- (0.03 mmol/L) 在鲁米诺中的化学发光对 pH 的依赖关系

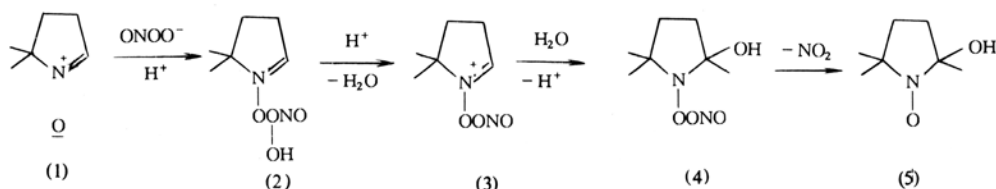
为了验证 PMA 刺激 PMN 产生的 O_2^- 和 $NO^\cdot$ 自由基是否也反应形成了 $ONOO^-$ ，我们研究了化学合成的 $ONOO^-$ 的化学发光特性。发现它的发光动力学，对 pH 的依赖关系 (图 8) 均与 $NO^\cdot$ 加入黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶及 PMA 刺激 PMN 加 L-精氨酸的类似。在鲁米诺体系中加入合成的 $ONOO^-$ ($0 \sim 35 \mu\text{mol/L}$) 产生的化学发光强度与 $ONOO^-$ 浓度基本上是线性关系。PMA 刺激 PMN 产生的 $NO^\cdot$ 和 O_2^- 自由基形成的 $ONOO^-$ 的化学发光也在此范围内，发光的结果和 ESR 的结果是一致的。

3 讨论

在 PMA 刺激 PMN 体系中加入 L-精氨酸，不仅不能使 DMPO 捕集的超氧阴离子自由基信号增加，反而随加入的 L-精氨酸浓度增加而减少。出现此现象可能有两个原因：(1) L-精氨酸对 O_2^- 的清除作用。我们用黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系产生 O_2^- 实验否定了这一可能性。在所用浓度范围内，L-精氨酸对超氧阴离子自由基没有清除作用；(2) 加入 L-精氨酸生成的 $NO^\cdot$ 自由基与超氧阴离子自由基结合生成 $ONOO^-$ 。我们用光照核黄素产生 O_2^- 和合成的 $NO^\cdot$ 自由基实验证明了。PMA 刺激 PMN 体系，NO 加入黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶体系和 $ONOO^-$ 化学发光的一致性也说明了 PMA 刺激 PMN 产生的 $NO^\cdot$ 和 O_2^- 反应形成了 $ONOO^-$ 。

在 PMA 刺激 PMN 体系中加入 L-精氨酸虽然在捕集的 ESR 波谱中羟基信号有所增加，但远没有像发光那样成百倍增加。过去文献中曾提出 $ONOO^-$ 的氧化性可能是通过羟基和 $NO^\cdot$ 自由基的机理^[9, 10]。即在周围的 pH 略低于生理 pH 时，它可以很快分解生成氧化性很强的 $\cdot OH$ 和 $NO^\cdot$ 自由基。

我们的 PMA 刺激 PMN 产生自由基的 ESR 结果不支持这一反应机理。用 DMPO 捕捉化学合成的 $ONOO^-$ 分解产物，虽然在一定 pH 可以检测到一个四线谱信号，但用羟基自由基清除剂不能使信号减小，也表明此信号不是直接来自羟基自由基。另外， $ONOO^-$ 是一个有效的电子氧化剂 ($E_a[ONOO^-/NO^\cdot] = 1.4V$)^[11]。因此， $ONOO^-$ 可能是按照下式直接氧化 DMPO 的^[9]。



最近 Beckman 等人^[12]提出过氧亚硝基的类羟基氧化性来自 trans-过氧亚硝酸的振动激发态的概念。过氧亚硝基有 trans 和 cis 两种构象，从能量的角度考虑，在高 pH，cis-过氧亚硝基较稳定，质子化以后，减少了电荷的排斥，促使它异构化生成 trans-过氧亚硝酸，然后再离子化生成 trans-过氧亚硝基。量子力学计算表明，trans-过氧亚硝基和 trans-过氧亚硝酸都很容易转变成振动激发态，其中包括 N—O—O 键的弯曲和 O—O 键的拉长。激发态的 trans-过氧亚硝酸或者氧化一个靶分子同时释放一个 $NO^\cdot$ ，或者分子重排生成硝酸。

最近一些实验表明，PMN 受 PMA 刺激和在吞噬过程中，产生呼吸爆发同时释放 O_2^- 和 $NO^\cdot$ 自由基^[13~15]。 $NO^\cdot$ 和 O_2^- 又可以反应形成 $ONOO^-$ 。这在免疫学和预防及杀伤外来入侵

微生物和癌细胞方面具有重要的生理意义。 ONOO^- 在 pH7.4 的半寿命大约为 1 s 左右, 这就使得它在生理条件下足够的稳定和从它生成的位置扩散到反应的靶分子, 如膜脂和蛋白质的巯基。一旦酸化, 立即转化成氧化性很强振动激发态的过氧亚硝酸并产生 NO_2 和类 $\cdot\text{OH}$ 物质。这是建立在氧自由基的基础之上的但又比氧自由基杀伤力更强的机体的一个防护途径和机理。如果我们能找到一种方法增加 $\text{NO}\cdot$ 和 $\text{O}_2\cdot^-$ 的产率, 这将为肿瘤的治疗展示一个新途径。但是, 它也会对正常细胞和组织造成严重的损害, 因而也给我们提出了寻找清除它和保护机体方法的新任务。

参 考 文 献

- 1 Zhao B L, Li X J, He R G *et al.* ESR studies on oxygen consumption during the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Biol Intern Reports*, 1989, 13: 317 ~ 323
- 2 Zhao B L, Li X J, Xin W J. ESR studies on active oxygen radicals produced in the respiratory burst of human polymorphonuclear leukocytes. *Cell Biol Intern Reports*, 1989, 13: 529 ~ 536
- 3 Sung Y J, Hotchkiss J H, Austic R E *et al.* Direct measurement of nitric oxide in headspace gas produced by a chicken macrophage cell line in a closed culture system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1992, 184, 3 642
- 4 Palmer R M J, Ferrige A G, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987, 327: 524 ~ 526
- 5 Palmer R M J, Ashton D S, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988, 333: 664 ~ 666
- 6 Knowles R G, Palacios M, Palmer R M J *et al.* Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 5 159 ~ 5 162
- 7 Bernofsky C, Bandara B M R, Hinojosa O. ESR studies of the reaction of hypochlorite with 5, 5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide. *Free Rad Biol Med*, 1990, 8: 231 ~ 239
- 8 Zhao B L, Huang N N, Zhang J Z *et al.* Studies on the exposure of hydroxyl radical from hemotoporphyrin derivative solution to light by spin trapping method. *KEXUE TONGBAO*, 1986, 31: 1 139 ~ 1 143
- 9 Markert M, Andrews P C, Babior B M. Measurement of $\text{O}_2\cdot^-$ production by human neutrophils. The preparation and assay of NADPH oxidase-containing particles from human neutrophils. In: Packer L ed. *Methods in Enzymology* V105. Orlando: Academic Press, 1984, 358 ~ 365
- 10 Reed J W, Ho H H, Jolly W L. Chemical synthesis with a quenched flow reactor. Hydroxytrihydrate and peroxynitrite. *J Am Chem Soc*, 1974, 96: 453 ~ 454
- 11 Crow J P, Spruell C, Chen J. *et al.* On the pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxynitrite. *Free Rad Biol Med*, 1994, 16: 331 ~ 338
- 12 Koppenol W H, Moreno J J, Pryor W A *et al.* Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem Res Toxicol*, 1992, 5: 834 ~ 842
- 13 Marletta M A, Yoon P S, Iyenga R *et al.* Macrophage oxidation of L-Arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 1988, 27: 8 706 ~ 8 711
- 14 Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman J S. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*, 1992, 298: 446 ~ 451
- 15 Carreras M C, Pargament G A, Catz S C *et al.* Kinetics of nitric oxide and hydrogen peroxide production and formation of peroxynitrite during the respiratory burst of human neutrophils. *FEBS Letters*, 1994, 341: 65 ~ 68