

气体信号分子的血红素蛋白靶点研究进展

李骏, 宋怡菲, 仪杨, 马晨, 张黄子怡, 杜琳琳, 李峻宇, 谢飞*, 马雪梅*

北京工业大学环境与生命学部, 北京 100124

摘要: 气体信号分子包括一氧化氮、一氧化碳和硫化氢等,在调节血管扩张、神经传递、血小板凝集、免疫、细胞增殖和线粒体呼吸等生理过程中起着至关重要的作用。已有研究表明细胞中的血红素蛋白是气体信号分子的主要受体之一,它们都有共同的辅因子——血红素。血红素由4个吡咯类亚基组成的环状结构,中心螯合了1个亚铁离子的基团,是血红蛋白、肌红蛋白、过氧化物酶、细胞色素等蛋白质的辅基,中间的亚铁离子可以和气体信号分子配位结合,广泛地参与生物体内各项生理活动。对气体信号分子作用的血红素蛋白种类以及下游通路进行了综述,以期为深入研究其作用机制提供参考。

关键词: 血红素蛋白;一氧化氮;一氧化碳;硫化氢;氢气

DOI: 10.19586/j.2095-2341.2023.0044

中图分类号:Q51

文献标志码:A

Research Progress on Heme Protein Targets of Gas Signaling Molecules

LI Jun, SONG Yifei, YI Yang, MA Chen, ZHANG-HUANG Ziyi, DU Linlin, LI Junyu, XIE Fei*, MA Xuemei*

Faculty of Environment and Life, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China

Abstract: Gas signaling molecules, including nitric oxide, carbon monoxide, and hydrogen sulfide, play crucial roles in regulating physiological processes such as vasodilation, neurotransmission, platelet aggregation, immunity, cell proliferation, and mitochondrial respiration. Studies have shown that heme protein in cells is one of the main receptors of gas signal molecules, and they all have the same cofactor—heme. Heme is a ring composed of four pyrrole subunits, with a center chelating a ferrous ion group. It is a co-group of proteins such as hemoglobin, myoglobin, peroxidase and cytochrome. The intermediate ferrous ion can coordinate and bind with gas signaling molecules, widely participating in various physiological activities of organisms. In this paper, the types of heme proteins and downstream pathways involved in the action of gas signaling molecules were reviewed, with a view to providing reference for further study of their mechanisms.

Key words: heme sensors; nitric oxide; carbon monoxide; hydrogen sulfide; hydrogen

气体信号分子是由生物体细胞内产生的、具有生物学效应的气态分子^[1]。目前,生物学领域确定的气体信号分子有一氧化氮(nitric oxide, NO)、一氧化碳(carbon monoxide, CO)和硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)^[2]。最早人们发现NO由乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)刺激内皮细胞释放,可

引起大鼠主动脉舒张^[3]。后来人们发现CO也可以像NO一样调节环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)发挥神经递质的作用^[4]。在20世纪90年代,研究人员发现鼠、牛及人大脑中均存在相对高浓度的H₂S,在哺乳动物的疼痛机制中发挥作用^[5-7]。此后,气体信号分子广泛的生

收稿日期:2023-03-31; 接受日期:2023-05-04

基金项目:军委后勤保障部开放研究重点项目(BHJ17L018)。

联系方式:李骏 E-mail: Lijun199907@163.com

*通信作者 谢飞 E-mail: qinluntan2018@163.com; 马雪梅 E-mail: xmmea@bjut.edu.cn

理功能研究成为热点,例如, H_2S 可以调节植物对硫酸盐的代谢^[8],CO能够抑制动物丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)发挥抗炎作用^[9],CO氧化可促进细菌的甲烷、乙酸、氢气生成及硫酸盐还原等反应^[10]。

气体信号分子本身不直接参与生理反应,而是负责与相应的受体结合进而引发相应的生理功能。信号分子细胞内的受体种类有很多,包括激酶类、血红素蛋白和转录因子等。血红素蛋白是广泛存在于各种生物体内的一类含有血红素辅基的蛋白质^[11-12]。在结构方面,血红素蛋白由不同结构域组成,其中至少包含一个含有血红素辅因子的输入结构域和参与生物反应的输出结构域。目前发现的所有能够稳定结合血红素的结构域都被证明能够参与信号转导,例如可溶性鸟苷酸环化酶(soluble guanylate cyclase, sGC)^[13]、血红素与

NO结合(heme NO binding, HNOB)^[14]、CO氧化激活剂(CO oxidation activator, CoxA)^[15]、血红蛋白(hemoglobin, Hb)、肌红蛋白(myoglobin, Mb)^[14]、过氧化物酶(peroxidase, POD)、细胞色素(cytochrome)^[16]等。在功能方面,血红素蛋白参与调节生物体的血压、生物节律、气体信号分子代谢、休眠、共生、生物膜形成或扩散等(表1)。血红素蛋白结合的血红素辅基是自身的活性中心,中间整合的 Fe^{2+} 负责与气体信号分子结合,并对多种气体信号分子作出响应而产生构型变化,进而参与后续的信号转导(表2)^[17]。本文将对气体信号分子作用的血红素蛋白种类以及血红素蛋白如何调控气体信号分子的下游通路进行综述,同时展望了氢分子(hydrogen, H_2)作为第4个气体信号分子的可能性,以期深入气体信号分子机理的相关研究提供参考。

表1 血红素蛋白参与的相关生理过程

Table 1 The involvement of heme proteins in related physiological processes

蛋白名称	参与的生理学过程	蛋白分布情况	发挥作用的方式
CLOCK/BMAL1 异源二聚体	调节生物体节律	哺乳动物	通过蛋白质之间相互作用
组氨酸激酶	调节细菌休眠	细菌	通过磷酸化的传递
鸟苷酸环化酶	调控血管内壁压力	哺乳动物	通过胞内信使传导信号
血红蛋白、肌红蛋白	负责在体内运输氧气	动物	通过血红素中的铁离子可逆结合
细胞色素类蛋白	负责传递电子,参与生物氧化	动物、植物	通过血红素中铁离子的还原态和氧化态之间的可逆变化

表2 气体信号分子对血红素蛋白的识别

Table 2 Recognition of heme protein by gas signal molecules

气体信号分子	结合的血红素蛋白	结合位点	如何诱导构象变化	产生的生理功能
NO	鸟苷酸环化酶(sGC)	血红素中的 Fe^{2+}	2个亚基的催化结构域之间发生了扭转,底物结合口袋打开,并催化GTP形成cGMP	激活sGC活性,调节生物体血压
	血红素一氧化氮/氧结合蛋白(H-NOX)	血红素中的 Fe^{2+}	引起蛋白质N端半部分的移位,导致H-NOX整体的构象发生变化	调控细菌生物膜形成
	NO敏感蛋白(NosP)	血红素中的 Fe^{2+}	未知	调控细菌生物膜扩散
CO	sGC	血红素中的 Fe^{2+}	2个亚基的催化结构域之间发生了扭转,底物结合口袋打开,并催化GTP形成cGMP	激活sGC活性
	CO氧化激活剂(CooA)	血红素中的 Fe^{2+}	N末端经过大的重新定位	激活负责CO氧化的酶转录
	RcoM	血红素中的 Fe^{2+}	未知	参与细菌内CO氧化功能
	胱硫醚 β -合酶(CBS)	血红素中的 Fe^{2+}	未知	抑制CBS活性
H_2S	未发现	未知	未知	动物:舒张血管、降低血压;植物:调节气孔运动、促进根的发育、种子萌发、光合作用等

1 响应NO的血红素蛋白

NO 血红素蛋白是细胞中能够响应 NO 信号的靶点,包括可溶性鸟苷酸环化酶 sGC、血色素一氧化氮/氧结合蛋白以及 NO 敏感蛋白(NO-sensing protein, NosP)。

1.1 可溶性鸟苷酸环化酶

1.1.1 sGC 的结构组成 可溶性鸟苷酸环化酶是存在于动物体内的一种基于血液的血红素类蛋白质,在多组织中均可以表达。sGC 由 2 个亚基 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 组成,质量约为 80 kD,是一种异二聚体酶,每个酶结合一个血色素分子^[18]。虽然 2 个亚基的表达具有组织特异性,但是也存在一些序列同源性^[19-20]。从 N 端开始,2 个亚基各自分别为 H-NOX (heme nitric oxide oxygen binding) 结构域、Per/Arnt/Sim(PAS) 结构域、螺旋线圈(CC) 结构域和 C-末端催化结构域,其中 PAS 和 CC 2 个结构域介导 $\alpha 1$ 和 $\beta 1$ 相互作用^[21]。 $\beta 1$ 亚基的 His105 和血色素分子中心的铁离子紧密结合,使 $\beta 1$ 亚基的 H-NOX 处于失活构象,而 $\alpha 1$ 亚基 H-NOX 的血色素结合口袋被 N 端螺旋所占据,因此不能结合血色素。通过紫外/可见光谱扫描小鼠的 sGC,发现血色素分子结合在 $\beta 1$ 亚基的前 194 个氨基酸上,其中 His105 是血红素的配体^[22],可以响应 NO 气体信号分子。

1.1.2 NO 影响 sGC 的构象并激活下游通路 NO 通过结合 sGC 中的血色素分子发挥自身的生理功能。sGC 不与 NO 结合时,血色素中心的 Fe 处于二价还原状态;当 sGC 与血液中的 NO 结合时形成 5 配位的 Fe^{2+} -NO 复合物,此时 sGC 处于激活状态。

在 sGC 中间靠近 N 端部分有一个近似 90° 的弯曲,这种弯曲构象通过 $\beta 1$ 亚基的 H-NOX 与 PAS 及 CC 结构域复杂的相互作用来保持稳定。在无活力状态下,位于 C 端的催化模块的底物结合口袋处于关闭状态,底物无法结合。在 NO 的激活下, $\beta 1$ 亚基的 His105 与血色素中 Fe 离子的结合被 NO 打破,导致 $\beta 1$ 亚基中 H-NOX 结构域发生了构象变化,其中 sGC 构成传导模块的 CC 结构域从直角弯曲螺旋的无活力状态变成了 2 根完整的伸展螺旋。CC 结构域 2 个螺旋之间还发生了 70° 的相对转动,导致与 CC 结构域直接相连的催化模块构象变化,即 2 个亚基的催化结构域之间发生了扭转,底物结合口袋打开,并催化 GTP 形成 cGMP^[23]。

激活状态下的 sGC 可以将 GTP 环化为 cGMP,而 cGMP 作为胞内信使激活信号通路下游的生理变化,包括扩张血管、聚集血小板等^[18, 24]。血色素与 NO 的结合十分灵敏,血液当中含有皮摩级的 NO 就能引起相应的生理过程^[25]。

1.2 血色素-氧化氮/氧结合蛋白

1.2.1 H-NOX 结构域的发现 研究大鼠的 sGC 一级结构发现,其与细菌中一个血色素蛋白家族的一级序列具有 15%~40% 的相似性^[26],该家族包括真核生物 sGC 以及来自细菌基因组的数百个预测开放阅读框(open reading frame, ORF)。已有研究证明,无毒浓度的 NO 可以调节细菌的生理生化过程进而引发细菌相关的行为发生改变,因此早期将他们命名为 HNOB。随着研究的深入,研究者发现这些细菌血色素结构域的长度约为 190 个氨基酸,并且有几个绝对保守的氨基酸。因此,人们推测在细菌当中也会存在着和动物体内相似的血红素蛋白。此后,H-NOX 作为广泛存在的基于血红素的细菌 NO 受体家族^[27],逐渐走进人们的视野。

1.2.2 H-NOX 结构域的组成 最早被结晶且得到原子水平结构的 H-NOX 结构域来自嗜热厌氧杆菌,分辨率为 $1.7 \text{ \AA}$ ^[28]。嗜热厌氧杆菌的 H-NOX 家族是由 7 个 α -螺旋和 1 个四股反平行 β 片组成的蛋白质。蛋白的 N-末端区域由 5 个螺旋组成(αA - αD 和 αG),位于血红素的远端;C-末端区域位于血红素的近端,由 β 片、 αF 螺旋和单圈的螺旋 αE 组成^[29]。H-NOX 结构域除了与血色素结合的 His 外,还有 Tyr135、Ser137、Arg139 组成的 YxS/TxR 基序以及距离 C 末端约 10 个氨基酸的 Pro,它们均是保守的。其中,YxS/TxR 基序和 Pro 残基目前被认为对维持家族中独特的血色素结构很重要。另外,与真核生物不同的是,由于 Pro 的挤压作用,导致其中的血色素发生了扭曲^[30-31]。

1.2.3 H-NOX 结构域对 NO 的响应 H-NOX 结构域在响应气体信号分子时,血色素中的 Fe^{2+} 与 His 结合形成 Fe-His 键。NO 可以与 His 竞争结合 Fe^{2+} ,在 NO 与 Fe^{2+} 结合时,Fe-His 发生断裂,导致血色素产生畸变,其中 Fe 从组氨酸端移向血红素的远端,血色素中吡咯环在平面上方向血色素口袋的远端移动,连同其连接的丙酸基团一起,通过吡咯环与 αA 的相互作用,引起蛋白质 N 端部分的移位,进而导致 H-NOX 整体的构象发生变化,最终催化下游的相关信号蛋白。

不同的细菌体内下游信号也不完全相同,有部分兼性需氧细菌编码的 H-NOX 结构域与环状 di-GMP 合成酶和磷酸二酯酶位于同一操纵子中。这些酶被称为 H-NOX 依赖的环状 di-GMP 加工酶 (H-NOX-associated cyclic-di-GMP processing enzyme, HaCE), 其中环状 di-GMP 是细菌中调节生物膜形成的第二信使分子。另一部分细菌中的二鸟苷酸环化酶 (diguanylate cyclase, DGC)、磷酸二酯酶 (phosphodiesterase, PDE) 则是分开表达的。细菌通过这些酶来调节环状 di-GMP 的产生, 最终影响细菌生物膜的形成^[26] (图 1)。

1.3 NO敏感蛋白(No-sensing protein, NosP)

1.3.1 NosP 结构域的发现 在大部分细菌中都存在 H-NOX 结构域, 但也有部分不编码 H-NOX 结构域的细菌仍然能对低浓度的 NO 作出群体感

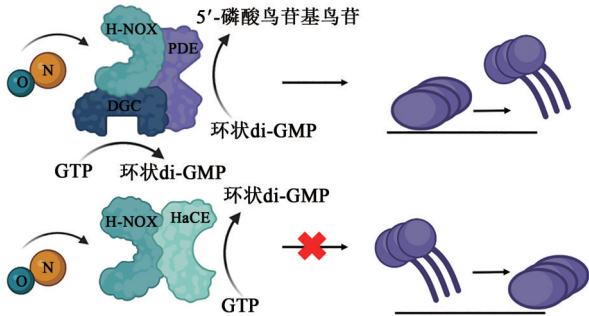


图 1 细菌生物膜形成的调控途径^[26]

Fig. 1 Regulatory pathways for bacterial biofilm formation^[26]

应和生物膜形成等生理反应, 例如铜绿假单胞菌, 这说明存在其他的 NO 感受机制^[32]。随着研究深入, 这种新的 NO 结合蛋白被鉴定出来, 将其命名为 NO 敏感蛋白 (NosP)。目前已经鉴定出含有 NosP 的细菌如表 3。

表 3 目前已知含有 NosP 的细菌种类

Table 3 Currently known bacterial species containing NosP

细菌名称	拉丁文名	NosP 种类	氨基酸数目	结合血红素数目	是否含有 H-NOX
铜绿假单胞菌	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1	387	1	否
霍乱弧菌	<i>Vibrio cholerae</i>	2	405/395	1/1	否
希瓦氏菌	<i>Shewanella oneidensis</i>	1	395	1	否
嗜肺军团菌	<i>Legionella pneumophila</i>	1	388	1	是

目前, NosP 结构域属于一个未表征的蛋白质家族, 以最早发现的铜绿假单胞菌 NosP 为例, 其大小为 42 kD。可见光内的吸收峰在 413 nm, 而真核生物中的血红素蛋白通常在 403 nm 处有吸收峰, 例如辣根过氧化物酶。与 sGC 不同的是, 在 NosP 中检测到的血红素却是扭曲的。目前已知的所有 NosP 在 N 末端与一个血红素结合, 并检测到和它配位的组氨酸^[33], 遗憾的是并没有解析 NosP 的三级结构。在一级结构水平上, NosP 由 N 端和 C 端的 FIST (F-box 和细胞内信号转导) 2 个结构域组成。

1.3.2 NosP 对 NO 的响应 NosP 定位在细胞溶胶中。NO 通过自由扩散方式跨膜进入细胞, 与 NosP 的铁离子配位, 导致 NosP 构象变化, 使 NosP 依赖的组氨酸激酶 (histidine kinases, NahK) 自磷酸化增加, NahK 将磷酸盐转移下游的环状 di-GMP 代谢反应调节因子 (cyclic-di-GMP metabolizing response regulator, NarR)。磷酸化的 NarR 表现出 DGC 降低和 PDE 增加的活性, DGC 催化 GTP 形成环状 di-GMP 过程被抑制; PDE 催化环状 di-GMP

形成 5'-磷酸鸟苷基-(3', 5')-鸟苷 [5'-phosphoguanlyl-(3', 5')-guanosine, pGpG], 最终导致环状 di-GMP 的降低, 使细菌中生物膜扩散 (图 2)^[32]。

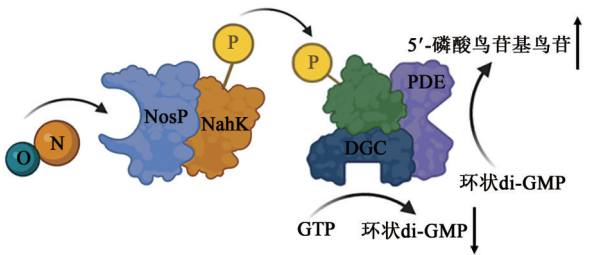


图 2 嗜肺军团菌、霍乱弧菌体内 NosP 对 NO 的信号转导通路^[32]

Fig. 2 Signal transduction pathway of NosP to NO in *Legionella pneumophila* and *Vibrio cholerae*^[32]

2 响应 CO 的血红素蛋白

2.1 sGC

本节主要讨论 sGC 对 CO 的响应以及与 NO 响应的区别。

2.1.1 CO影响sGC的构象并激活下游通路 sGC不但能够对NO作出响应,也是CO的靶点。CO在生物体内主要通过激活sGC升高cGMP来介导效应。在哺乳动物体内,CO也通过激活sGC来发挥和NO类似的生理功能,例如降血压、聚集血小板等。CO未与亚铁血红素 Fe^{2+} 结合前, Fe^{2+} 突出于卟啉环外以高自旋形式存在;当CO与 Fe^{2+} 结合时, Fe^{2+} 以低自旋结构进入卟啉环面内,构型变化与NO是一致的^[34],sGC的主体结构改变被激活,从而促进cGMP水平升高。

2.1.2 CO和NO对sGC构象的区别 CO与NO对sGC构象影响仅有小部分是不同的。通过对比NO和CO 2种气体对sGC H-NOX结构域的影响,发现NO通过形成5配位Fe-NO键状态,然后血红素中Fe-His键发生断裂,形成激活的sGC,而CO与 Fe^{2+} 形成6配位化学键,NO血红素铁位移为0.2~0.3 Å,CO结合时铁位移为0.8~0.9 Å,推测可能是由于碳原子的半径相比氮原子更大,这也解释了为什么CO对血红素辅基的亲合力要低于NO。

此外,在与CO结合的同时,sGC的血红素发生枢转,将丙酸基团保持在吡咯环上。与CO不同的是,NO通常以一定角度与血红素结合,而CO更倾向于垂直于血红素平面结合。这说明CO由于碳原子半径更大的缘故,比NO对sGC构象的影响更大,通常变化有以下几点:① α 残基的His105及其相邻残基会移位;②由于肽链与血红素的丙酸盐相互作用,H-NOX结构域的肽链会与血红素有相对滑动。此外,Glu41附近的侧翼肽链也有约0.5 Å的位移。最后,由于血红素的转移,Phe112附近的区域变成了无序状态,最终打开底物结合域。

2.2 CO氧化激活剂(CO oxidation activator, CooA)

CooA蛋白家族是一类含血红素的原核CO感应转录因子,它负责激活一系列有关CO氧化的酶,其 K_m 值约为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[35]。人们最早在深红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)时发现并确定了它的结构。

2.2.1 CooA结构域的组成 CooA蛋白家族是含有2个血红素的同源二聚体蛋白,由A、B 2条单链构成。每个单体具有N端血红素结合域和C端DNA结合域,该结构域包含经典的螺旋-转-螺旋DNA结合基序^[36]。在无CO结合状态下,单体A链的N末端Pro2与单体B链的血红素配位,反之

相同。同之前提到的血红素受体蛋白一样,CooA的血红素也会与自身亚基的His77配位结合。

2.2.2 CooA对CO的响应 CO与CooA中血红素结合,通过改变DNA结合结构域使其重新定向导致被激活,进而识别特异性的DNA。CooA对CO具有微摩尔亲和力,仅当其血红素中存在 Fe^{2+} 时才能够与CO结合,而氧化的CooA对CO没有作用^[37]。CooA处于关闭状态时,单体A链的N末端与单体B链的血红素铁配位;在打开状态下,由于空间的排斥作用,N末端与血红素结合的Pro配体发生分离,并移动了约20 Å,从而使CO能够结合^[38]。释放的N末端经过重新定位^[15],在血红素结合结构域和DNA结合结构域之间形成了一个桥梁,可以成功将DNA结合结构域稳定在与特定DNA结合所需的方向上,并通过CooA和RNA聚合酶之间的接触激活一系列负责CO氧化的酶发生转录^[39]。此外,血红素也收紧了与CO结合的口袋,保证了CO的稳定结合。

2.3 CO代谢调节因子

通过基因组分析推测存在不同于CooA的CO感应细菌转录调节因子。随后在能够氧化CO的异养需氧细菌伯克霍尔德菌中发现了第二类基于血红素的CO代谢调节因子(regulator of CO metabolism, RcoM)^[40]。遗憾的是目前还没有关于RcoM空间构型的报道,所以我们在这里只讨论RcoM已经确定的结构情况以及如何对CO作出响应。

RcoM是在细菌中发现的第二类基于血红素的CO反应转录调节因子,且与CooA没有同源性。在伯克霍尔德菌(*Burkholderia xenovorans*)中首先鉴定到RcoM,该蛋白是由2种高度同源的血红素蛋白RcoM-1和RcoM-2组成的同源二聚体^[35]。每个单体都含有一个血红素结合PAS结构域和一个DNA结合的LytTR结构域,这2个结构域非常保守^[41]。通过研究该蛋白的突变体,发现PAS结构域残基His74和Met104充当血红素 Fe^{2+} 的配体,Met104在与气态效应物结合时发生位移^[42]。RcoM-1对CO有着非常高的亲和力,但是对DNA的亲合力不强,RcoM-2则与之相反^[43]。据此推测,对于RcoM-1蛋白而言,高CO亲和力与低DNA亲和力共同构成了一个转录“积累开关”,可以感知较低但持久的CO水平。2种RcoM在体内作为CO的受体蛋白,参与细菌内的CO氧化功能。目前,已经在不同的细菌体内鉴定出了13种RcoM(表4),

它们均参与细菌体内CO的有氧或无氧代谢。

表4 目前已经报道的RcoM
Table 4 Currently reported RcoM

名称	拉丁文名	呼吸类型	含有RcoM的种类	生理功能
艾氏碱菌	<i>Alcinella ehrlichei</i>	需氧	1	参与CO氧化功能
异种伯克霍尔德菌	<i>Burkholderia xenovorans</i>	需氧	2	参与CO氧化功能
皮氏地杆菌	<i>Geobacter</i> sp. strain FRC-32	厌氧	1	参与CO氧化功能
硫还原土杆菌	<i>Geobacterium sulfurreducens</i>	厌氧	1	参与CO氧化功能
还原铀地杆菌	<i>G. uraniumreducens</i>	厌氧	1	参与CO氧化功能
甲醇假单胞菌	<i>Pseudomonas carbinolicus</i>	厌氧	1	参与CO氧化功能
茎瘤固氮根瘤菌	<i>Azorhizobium caulinodans</i>	需氧	1	功能未知
自养黄杆菌	<i>Xanthobacter autotrophicus</i>	需氧	1	功能未知
磁性磁螺菌	<i>Magnetospirillum magneticum</i>	兼性厌氧	1	功能未知
格瑞菲斯瓦尔德磁螺菌	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	兼性厌氧	1	功能未知
磁螺菌	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	兼性厌氧	1	功能未知
深红红螺菌	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	厌氧	1	功能未知

2.4 胱硫醚 β -合酶(cystathione β synthase,CBS)

2.4.1 CBS的结构 CBS主要在大脑细胞中表达,定位于细胞溶胶,质量约为63 kD,由551个氨基酸组成,是一种同源四聚体^[44]。CBS也是一个血红素蛋白,属于磷酸吡哆醛(pyridoxal phosphate, PLP)依赖酶的 β 蛋白家族。目前,已经被鉴定出的CBS多达20万种,每个亚基包括一个血红素结合域、一个催化结构域和一个调节结构域(AdoMet)^[45]。每个亚基分别与一个血红素和一个PLP相结合,是一种广泛存在于动物和微生物体内参与硫代谢调节的酶^[46]。

辅因子血红素结合在血红素结合域,位于N端约前70个氨基酸,其中Cys52和His65负责结合血红素;催化结构域是高度保守的,位于第40~413个氨基酸,结构域中Lys119与PLP相结合,负责结合丝氨酸与同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)作为底物合成胱硫醚、水和H₂S^[47]; AdoMet位于C端末尾的140个氨基酸,对形成四聚体蛋白以及酶的活化有重要的作用,同时也是CBS的变构激活剂。

2.4.2 CO影响CBS的活性 有证据显示,CBS的血红素并不参与催化反应过程,但是血红素中Fe离子的价态可以影响酶活性。在CO作用下与亚铁血红素结合对酶活性产生负调节作用。当外源CO与Fe²⁺配位结合,亚基中Cys52与血红素分离,形成了亚铁CBS的特定6配位结构,并抑制其酶

活性^[48-49]。

2.5 其他CO感受器

在生物体内对于CO的识别也不仅仅只有这几种蛋白。以动物为例,血红素类蛋白有很多类别:第一类是部分含有血红素的结构蛋白,例如血红蛋白、肌红蛋白,它们可以利用血红素转运、储存氧气^[50];第二类是以血红素为辅基的酶,负责转移电子,或者催化氧化、分解、脱水、异构等各种化学反应,如血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、过氧化物酶、细胞色素C(cytochrome C)、细胞色素P450(cytochrome P450)等^[16, 51-53]。它们参与生物体内各种各样的生理反应,尤其涉及电子转移类的氧化还原反应。CO作为可以和血红素Fe²⁺配位的气体信号分子,可以与相关的蛋白结合进而影响生物体的生理功能^[54]。表5列出了CO对相关血红素类蛋白的结构及功能的影响。

3 响应硫化氢(H₂S)的血红素蛋白

传统上被称为有毒气体的H₂S是继NO、CO发现的第3个气体信号分子^[55]。它在哺乳动物、鱼类和无脊椎动物体内,都可以生成内源性H₂S气体,并且可以通过作用于靶蛋白来调节生物过程,发挥类似神经递质的中枢调节作用^[5]。

表5 CO对相关血红素类蛋白功能的影响

Table 5 Effects of CO on the function of related heme proteins

蛋白名称	结构组成	结合血红素数	生理功能	CO作用
血红蛋白	2个 α 亚基和2个 β 亚基组成异二聚体	4	运输生物体内氧气和二氧化碳	与氧气竞争血红素的结合位点,使血红蛋白失去运输氧气的能力
肌红蛋白	球形/单条肽链	1	细胞内储存和分配氧气	与氧气竞争影响肌细胞内供氧
血红素加氧酶-1	单条肽链	1	负责生物体内血红素分解的诱导酶,并产生CO	未知
一氧化氮合酶	二聚体	1	在体内催化L-精氨酸生成NO	通过钙和磷脂酰肌醇3-激酶/Akt机制激活一氧化氮合酶
细胞色素C	球形/单条肽链	1	在线粒体嵴上与其他氧化酶排列成呼吸链,传递电子	抑制细胞色素C功能,直接抑制细胞内呼吸
细胞色素P450	单条肽链	1	参与生物合成和许多生理有效物质的代谢	抑制细胞色素P450活性

到目前为止,尚未发现 H_2S 具有生物效应的单一蛋白靶点,但存在较多 H_2S 间接调控血红素蛋白的证据(表6)。例如, H_2S 与细胞色素C氧化酶的相互作用与激活ATP钾敏感通道、调节肌肉松弛有关^[56]。 H_2S 对细胞色素C氧化酶的抑制也

与诱导类似冬眠的状态有关。尽管 H_2S 可能通过与血红素蛋白相互作用来诱导各种反应,但由于目前缺少结构研究导致这些相互作用的基础机制尚不清楚。

表6 H_2S 对相关血红素类蛋白功能的影响Table 6 Effects of H_2S on the function of related heme proteins

蛋白名称	结构组成	结合血红素数	生理功能	H_2S 作用
血红蛋白	2个 α 亚基和2个 β 亚基组成异二聚体	4	运输生物体内氧气和二氧化碳	产生硫血红蛋白复合物,与降解 H_2S 有关
肌红蛋白	球形/单条肽链	1	细胞内储存和分配氧气	产生硫肌红蛋白复合物,与降解 H_2S 有关
细胞色素C	球形/单条肽链	2	在线粒体嵴上与其他氧化酶排列成呼吸链,传递电子	低浓度(<1 mol)可以刺激氧气消耗,高浓度抑制细胞色素C功能
血红蛋白I (来自蛤蜊 <i>Lucina pectinata</i>)	二聚体	2	与 H_2S 结合并将其运输到硫化物氧化自养细菌上,以维持共生关系并保护软体动物免受 H_2S 毒性	可以作为与蛤蜊体内共生细菌的能量来源

值得注意的是,硫醌氧化还原酶(sulfide-quinone oxidoreductase, SQR)能够不可逆地氧化 H_2S 。已有研究发现,SQR介导了 H_2S 氧化驱动线粒体复合物I处的反向电子传输(reverse electron transport, RET),这个过程将电子进行反向运输,由线粒体基质运输至膜间空间,促进线粒体产生超氧化物。此外,RET也可以诱导超氧化物依赖性线粒体解偶联和下游腺苷激活蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)的激活,因此推测SQR是 H_2S 的一个直接作用靶点^[57],但遗憾的是SQR并不是血红素类蛋白。

生理浓度的 H_2S 可直接或与NO协同舒张血

管、降低血压^[58],对心脏具有负性肌力作用^[59]。在植物中, H_2S 可以调节气孔运动,促进根的发育、种子萌发、光合作用等^[60-62]。此外,细菌体内也对 H_2S 有相应的反应,例如用作光合作用和呼吸的电子供体,细菌体内的醌氧化还原酶、过硫酸盐双加氧酶等也是 H_2S 的同化和解毒途径^[63]。

4 展望

不同的生物体自身受体蛋白并不相同,虽然感知气体最直接的结构是血红素中的 Fe^{2+} ,但血红素包括很多蛋白质,特别是酶类的辅基,因此不

同的蛋白构象产生的变化也不同,这也解释了气体信号分子生理作用的多样性。

有研究表明,氢分子也可以和血红素中的 Fe^{2+} 结合生成氢化血红素^[64],而氢分子也具有广泛的生理功能,例如抗炎^[65]、降低血压、减轻再灌注损伤等^[66-68],因此有人推测氢分子可能是第4个人们发现的气体信号分子。但是目前人们还没有在哺乳动物的体内检测到产生氢气的氢化酶,已发现的内源性氢气都是由体内肠道当中的微生物产生的^[69],所以氢分子是否作为一种气体信号分子还有待进一步研究。

目前为止,绝大部分的信号分子受体都是在动物或原核生物内发现的,对于植物而言,大部分关于气体信号分子的研究都停留在生理的宏观水平,鉴定到植物内的靶点对于植物的生理研究有重要的意义。气体分子具有独特的理化性质和特殊的信号转导方式,例如分子体积小、可以自由扩散、不依赖对应的膜受体等,这为调节生理活动及代谢提供了新的思路。目前来说,气体信号分子大部分的生理功能都已经研究清楚,但作为气体信号分子的部分受体——血红素蛋白的结构研究较少,尤其是结合气体分子后的构象如何变化方面。期望随着研究的深入,可以彻底在原子水平上揭示气体信号分子的作用机制。

参 考 文 献

- [1] WAREHAM L K, SOUTHAM H M, POOLE R K. Do nitric oxide, carbon monoxide and hydrogen sulfide really qualify as 'gasotransmitters' in bacteria?[J]. *Biochem. Soc. Trans.*, 2018, 46(5): 1107-1118.
- [2] CUI Q, YANG Y, JI N, *et al.* Gaseous signaling molecules and their application in resistant cancer treatment: from invisible to visible[J]. *Future Med. Chem.*, 2019, 11(4): 323-336.
- [3] DE PAULA T D, SILVA B R, GRANDO M D, *et al.* Relaxation induced by the nitric oxide donor and cyclooxygenase inhibitor NCX2121 in renal hypertensive rat aortas[J]. *Eur. J. Pharm. Sci. Off. J. Eur. Fed. Pharm. Sci.*, 2017, 107: 45-53.
- [4] KASHFI K. Carbon monoxide in cell signaling and potential therapeutics[J/OL]. *Biochem. Pharmacol.*, 2022, 204: 115231 [2022-08-19]. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2022.115231>.
- [5] SHAN H, QIU J, CHANG P, *et al.* Exogenous hydrogen sulfide offers neuroprotection on intracerebral hemorrhage injury through modulating endogenous H_2S metabolism in mice[J/OL]. *Front. Cell. Neurosci.*, 2019, 13: 349 [2019-08-07]. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00349>.
- [6] YANG S Q, JIANG L, LAN F, *et al.* Inhibited endogenous H_2S generation and excessive autophagy in hippocampus contribute to sleep deprivation-induced cognitive impairment[J/OL]. *Front. Psychol.*, 2019, 10: 53 [2019-01-24]. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2019.00053>.
- [7] KULKARNI-CHITNIS M, MITCHELL-BUSH L, BELFORD R, *et al.* Interaction between hydrogen sulfide, nitric oxide, and carbon monoxide pathways in the bovine isolated retina[J]. *AIMS Neurosci.*, 2019, 6(3): 104-115.
- [8] AUSMA T, DE KOK L J. Atmospheric H_2S : impact on plant functioning[J/OL]. *Front. Plant Sci.*, 2019, 10: 743 [2019-06-11]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00743>.
- [9] LIN C C, YANG C C, HSIAO L D, *et al.* Heme oxygenase-1 induction by carbon monoxide releasing molecule-3 suppresses interleukin-1 β -mediated neuroinflammation[J/OL]. *Front. Mol. Neurosci.*, 2017, 10: 387 [2017-11-20]. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00387>.
- [10] MENDES S S, MIRANDA V, SARAIVA L M. Hydrogen sulfide and carbon monoxide tolerance in bacteria[J/OL]. *Antioxidants*, 2021, 10(5): 729 [2021-05-05]. <https://doi.org/10.3390/antiox10050729>.
- [11] SOUSA E H, LOPES L G, GONZALEZ G, *et al.* Drug discovery targeting heme-based sensors and their coupled activities[J]. *J. Inorg. Biochem.*, 2017, 167: 12-20.
- [12] KRÜGER A, KEPPEL M, SHARMA V, *et al.* The diversity of heme sensor systems-heme-responsive transcriptional regulation mediated by transient heme protein interactions[J/OL]. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2022, 46(3): fuac002 [2022-05-06]. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac002>.
- [13] CORREIA S S, IYENGAR R R, GERMANO P, *et al.* The CNS-penetrant soluble guanylate cyclase *Stimulator* CY6463 reveals its therapeutic potential in neurodegenerative diseases[J/OL]. *Front. Pharmacol.*, 2021, 12: 656561 [2021-05-24]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.656561>.
- [14] SUMI M P, TUPTA B, GHOSH A. Nitric oxide trickle drives heme into hemoglobin and muscle myoglobin[J/OL]. *Cells*, 2022, 11(18): 2838 [2022-09-12]. <https://doi.org/10.3390/cells11182838>.
- [15] ROBERTS G P, THORSTEINSSON M V, KERBY R L, *et al.* CooA: a heme-containing regulatory protein that serves as a specific sensor of both carbon monoxide and redox state[J]. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.*, 2001, 67: 35-63.
- [16] MOHRMANN H, DRAGELJ J, BASERGA F, *et al.* The reductive phase of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c oxidase disentangled by CO ligation[J/OL]. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2017, 19: 32143 [2014-11-16]. <https://doi.org/10.1039/c7cp06480b>.
- [17] NISHINAGA M, SUGIMOTO H, NISHITANI Y, *et al.* Heme controls the structural rearrangement of its sensor protein mediating the hemolytic bacterial survival[J/OL]. *Commun. Biol.*, 2021, 4(1): 467 [2021-04-13]. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01987-5>.
- [18] CHILDERS K C, YAO X Q, GIANNAKOULIAS S, *et al.* Synergistic mutations in soluble guanylyl cyclase (sGC) reveal a key role for interfacial regions in the sGC activation mechanism[J]. *J. Biol. Chem.*, 2019, 294(48): 18451-18464.
- [19] KOESLING D, MERGIA E, RUSSWURM M. Physiological functions of NO-sensitive guanylyl cyclase isoforms[J]. *Curr. Med. Chem.*, 2016, 23(24): 2653-2665.

- [20] DERBYSHIRE E R, MARLETTA M A. Structure and regulation of soluble guanylate cyclase[J]. *Annu. Rev. Biochem.*, 2012, 81: 533-559.
- [21] MONTFORT W R, WALES J A, WEICHSEL A. Structure and activation of soluble guanylyl cyclase, the nitric oxide sensor[J]. *Antioxid. Redox Signal.*, 2017, 26(3): 107-121.
- [22] RÜHLE A, ELGERT C, HAHN M G, *et al.* Tyrosine 135 of the β_1 subunit as binding site of BAY-543: importance of the Y-x-S-x-R motif for binding and activation by sGC activator drugs[J/OL]. *Eur. J. Pharmacol.*, 2020, 881: 173203[2020-05-13]. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173203>.
- [23] KANG Y, LIU R, WU J X, *et al.* Structural insights into the mechanism of human soluble guanylate cyclase[J]. *Nature*, 2019, 574(7777): 206-210.
- [24] LIU T, SCHROEDER H, POWER G G, *et al.* A physiologically relevant role for NO stored in vascular smooth muscle cells: a novel theory of vascular NO signaling[J/OL]. *Redox Biol.*, 2022, 53: 102327[2022-05-09]. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102327>.
- [25] SÖMMER A, BEHREND S. Methods to investigate structure and activation dynamics of GC-1/GC-2[J]. *Nitric Oxide*, 2018, 78: 127-139.
- [26] BACON B, NISBETT L M, BOON E. Bacterial haemoprotein sensors of NO: H-NOX and NosP[J]. *Adv. Microb. Physiol.*, 2017, 70: 1-36.
- [27] L-MNISBETT, BOON E M. Nitric oxide regulation of H-NOX signaling pathways in bacteria[J]. *Biochemistry*, 2016, 55(35): 4873-4884.
- [28] PELLICENA P, KAROW D S, BOON E M, *et al.* Crystal structure of an oxygen-binding heme domain related to soluble guanylate cyclases[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101(35): 12854-12859.
- [29] KHALID R R, SIDDIQI A R, MYLONAS E, *et al.* Dynamic characterization of the human heme nitric oxide/oxygen (HNOX) domain under the influence of diatomic gaseous ligands[J/OL]. *Int. J. Mol. Sci.*, 2019, 20(3): 698[2019-02-06]. <https://doi.org/10.3390/ijms20030698>.
- [30] CHEN C Y, LEE W, RENHOWE P A, *et al.* Solution structures of the *Shewanella woodyi* H-NOX protein in the presence and absence of soluble guanylyl cyclase stimulator IWP-051[J]. *Protein Sci.*, 2021, 30(2): 448-463.
- [31] KAROW D S, PAN D, TRAN R, *et al.* Spectroscopic characterization of the soluble guanylate cyclase-like heme domains from *Vibrio cholerae* and *Thermoanaerobacter tengcongensis*[J]. *Biochemistry*, 2004, 43(31): 10203-10211.
- [32] HOSSAIN S, BOON E M. Discovery of a novel nitric oxide binding protein and nitric-oxide-responsive signaling pathway in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *ACS Infect. Dis.*, 2017, 3(6): 454-461.
- [33] BACON B A, LIU Y, KINCAID J R, *et al.* Spectral characterization of a novel NO sensing protein in bacteria: NosP[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(43): 6187-6200.
- [34] MA X, SAYED N, BEUVE A, *et al.* NO and CO differentially activate soluble guanylyl cyclase via a heme pivot-bend mechanism[J]. *EMBO J.*, 2007, 26(2): 578-588.
- [35] VOS M H, SALMAN M, LIEBL U. Early processes in heme-based CO-sensing proteins[J/OL]. *Front. Mol. Biosci.*, 2022, 9: 1046412[2022-11-03]. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.1046412>.
- [36] BORJIGIN M, LI H, LANZ N D, *et al.* Structure-based hypothesis on the activation of the CO-sensing transcription factor CooA[J]. *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 2007, 63(3): 282-287.
- [37] HINES J P, DENT M R, STEVENS D J, *et al.* Site-directed spin label electron paramagnetic resonance spectroscopy as a probe of conformational dynamics in the Fe(III) "locked-off" state of the CO-sensing transcription factor CooA[J]. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, 2018, 27(9): 1670-1679.
- [38] ROBERTS G P, KERBY R L, YOUN H, *et al.* CooA, a paradigm for gas sensing regulatory proteins[J]. *J. Inorg. Biochem.*, 2005, 99(1): 280-292.
- [39] TRIPATHI S, POULOS T L. Testing the N-terminal velcro model of CooA carbon monoxide activation[J]. *Biochemistry*, 2018, 57(21): 3059-3064.
- [40] KERBY R L, ROBERTS G P. *Burkholderia xenovorans* RcoM (Bx)-1, a transcriptional regulator system for sensing low and persistent levels of carbon monoxide[J]. *J. Bacteriol.*, 2012, 194(21): 5803-5816.
- [41] KERBY R L, YOUN H, ROBERTS G P. RcoM: a new single-component transcriptional regulator of CO metabolism in bacteria[J]. *J. Bacteriol.*, 2008, 190(9): 3336-3343.
- [42] BOWMAN H E, DENT M R, BURSTYN J N. Met(104) is the CO-replaceable ligand at Fe(II) heme in the CO-sensing transcription factor BxRcoM-1[J]. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2016, 21(4): 559-569.
- [43] SALMAN M, VILLAMIL F C, RAMODIHARILAFY R, *et al.* Interaction of the full-length heme-based CO sensor protein RcoM-2 with ligands[J]. *Biochemistry*, 2019, 58(39): 4028-4034.
- [44] GIMÉNEZ-MASCARELL P, MAJTAN T, OYENARTE I, *et al.* Crystal structure of cystathionine β -synthase from honeybee *Apis mellifera*[J]. *J. Struct. Biol.*, 2018, 202(1): 82-93.
- [45] PEY A L, MARTÍNEZ-CRUZ L A, KRAUS J P, *et al.* Oligomeric status of human cystathionine beta-synthase modulates AdoMet binding[J]. *FEBS Lett.*, 2016, 590(24): 4461-4471.
- [46] ANASHKIN V A, BAYKOV A A, LAHTI R. Enzymes regulated via cystathionine β -synthase domains[J]. *Biochem. Biokhimiia*, 2017, 82(10): 1079-1087.
- [47] BHATT A, MUKHOPADHYAYA A, ALI M E. α -Helix in cystathionine β -synthase enzyme acts as an electron reservoir[J]. *J. Phys. Chem. B*, 2022, 126(26): 4754-4760.
- [48] SUEMATSU M, NAKAMURA T, TOKUMOTO Y, *et al.* CO-CBS-H2 S axis: from vascular mediator to cancer regulator[J]. *Microcirculation*, 2016, 23(3): 183-190.
- [49] KABE Y, YAMAMOTO T, KAJIMURA M, *et al.* Cystathionine β -synthase and PGRMC1 as CO sensors[J]. *Free. Radic. Biol. Med.*, 2016, 99: 333-344.
- [50] TUPTA B, STUEHR E, SUMI M P, *et al.* GAPDH is involved in the heme-maturation of myoglobin and hemoglobin[J/OL]. *FASEB J.*, 2022, 36(2): e22099[2022-12-31]. <https://doi.org/10.1096/fj.202101237RR>.
- [51] KAWAHARA B, FAULL K F, JANZEN C, *et al.* Carbon mon-

- oxide inhibits cytochrome P450 enzymes CYP3A4/2C8 in human breast cancer cells, increasing sensitivity to paclitaxel[J]. *J. Med. Chem.*, 2021, 64(12): 8437-8446.
- [52] YANG P M, HUANG Y T, ZHANG Y Q, *et al.*. Carbon monoxide releasing molecule induces endothelial nitric oxide synthase activation through a calcium and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt mechanism[J]. *Vasc. Pharmacol.*, 2016, 87: 209-218.
- [53] WANG J, LI X, CHANG J W, *et al.*. Enzymological and structural characterization of *Arabidopsis thaliana* heme oxygenase-1[J]. *FEBS Open Bio.*, 2022, 12(9): 1677-1687.
- [54] LIU S, XIA S, YUE D, *et al.*. The bonding nature of Fe-CO complexes in heme proteins[J]. *Inorg. Chem.*, 2022, 61(44): 17494-17504.
- [55] FARIS P, NEGRI S, FARIS D, *et al.*. Hydrogen sulfide (H_2S): as a potent modulator and therapeutic prodrug in cancer[J]. *Curr. Med. Chem.*, 2023, 30(40): 4506-45032.
- [56] ZOU S, SHIMIZU T, YAMAMOTO M, *et al.*. Hydrogen sulfide-induced relaxation of the bladder is attenuated in spontaneously hypertensive rats[J]. *Int. Urol. Nephrol.*, 2019, 51(9): 1507-1515.
- [57] JIA J, WANG Z, ZHANG M, *et al.*. SQR mediates therapeutic effects of H_2S by targeting mitochondrial electron transport to induce mitochondrial uncoupling[J/OL]. *Sci. Adv.*, 2020, 6(35): eaaz5752[2020-08-26]. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz5752>.
- [58] GHEIBI S, JEDDI S, KASHFI K, *et al.*. Regulation of vascular tone homeostasis by NO and H_2S : implications in hypertension[J]. *Biochem. Pharmacol.*, 2018, 149: 42-59.
- [59] BARROW K, WANG Y, YU R, *et al.*. H_2S protects from oxidative stress-driven ACE2 expression and cardiac aging[J]. *Mol. Cell. Biochem.*, 2022, 477(5): 1393-1403.
- [60] JIANG J L, TIAN Y, LI L, *et al.*. H_2S alleviates salinity stress in cucumber by maintaining the Na^+/K^+ balance and regulating H_2S metabolism and oxidative stress response[J/OL]. *Front. Plant Sci.*, 2019, 10: 678[2019-05-28]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00678>.
- [61] CORPAS F J, PALMA J M. H_2S signaling in plants and applications in agriculture[J]. *J. Adv. Res.*, 2020, 24: 131-137.
- [62] LIU F, ZHANG X, CAI B, *et al.*. Physiological response and transcription profiling analysis reveal the role of glutathione in H_2S -induced chilling stress tolerance of cucumber seedlings[J/OL]. *Plant Sci. Int. J. Exp. Plant Biol.*, 2020, 291: 110363[2019-11-29]. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110363>.
- [63] SHIMIZU T, MASUDA S. Persulphide-responsive transcriptional regulation and metabolism in bacteria[J]. *J. Biochem.*, 2020, 167(2): 125-132.
- [64] JIN Z, ZHAO P, GONG W, *et al.*. Fe-porphyrin: a redox-related biosensor of hydrogen molecule[J]. *Nano Res.*, 2023, 16(2): 2020-2025.
- [65] YOU Y, ZHU Y X, JIANG J, *et al.*. Water-enabled H_2 generation from hydrogenated silicon nanosheets for efficient anti-inflammation[J]. *J. Am. Chem. Soc.*, 2022, 144(31): 14195-14206.
- [66] TONG J, ZHANG Y, YU P, *et al.*. Protective effect of hydrogen gas on mouse hind limb ischemia-reperfusion injury[J]. *J. Surg. Res.*, 2021, 266: 148-159.
- [67] 王濛, 仪杨, 孙梦婷, 等. 富氢水和富氢生理盐水生物医学研究进展——动物实验[J]. *生物技术进展*, 2022, 12(3): 332-343.
- [68] 马雪梅, 张鑫, 谢飞, 等. 氢气生物学作用的生物酶基础[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(1): 15-22.
- [69] ZHANG Y, XU J, YANG H. Hydrogen: an endogenous regulator of liver homeostasis[J/OL]. *Front. Pharmacol.*, 2020, 11: 877[2020-06-11]. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00877>.