中国科学: 化学 2025 年 第 55 卷 第 7 期: 2051 ~ 2065
SCIENTIA SINICA Chimica chemcn.scichina.com
《中国科学》杂志社 SCIENCE CHINA PRESS

评 述

次硝酸来源及其检测与医学应用研究

刘思敏, 龚轩, 朱腾高, 闫书祥, 秦嫚嫚, 陈绪文, 陈焕文*

江西中医药大学恶性肿瘤中医药诊疗与康复江西省重点实验室, 南昌 330004
*通讯作者, E-mail: chw8868@gmail.com

收稿日期: 2024-12-29; 接受日期: 2025-02-14; 网络版发表日期: 2025-03-26
国家自然科学基金(22376084)、高灵敏数字化生物气溶胶直接分析仪离子源的研制与应用(2023ZDPY003)和江西中医药大学校级科技创新团队发展计划(CXTD22005)资助项目

摘要 次硝酸(HNO)是一种具有独特化学性质和生理功能的氮氢氧化物. 由于其具有弱酸性(pK_a = 11.4), HNO在生理条件下能够大量存在; 而又由于其独特的化学性质, 能与体内多种生命功能分子结合, 从而发挥生理作用. 例如, HNO的氧化性能使蛋白质中的硫醇氧化从而使蛋白质结构发生改变, 这也是HNO用于治疗心衰的作用机制之一. 另一方面, HNO的还原性使其能与体内氧化态金属蛋白发生反应, 从而迅速实现舒张血管的效果. 因此, HNO独特的分子结构和化学性质赋予了其特殊的生理功能. 随着对HNO生理作用关注的日益增加, 越来越多的研究致力于HNO的合成、检测及其在生物医学方面的应用. 本文结合课题组水氮歧化生成HNO的研究, 对HNO的来源、检测及医学应用进行综述, 旨在为研究人员提供关于内源性HNO的产生、外源性HNO的合成、体内及体外HNO的定性定量检测以及HNO的生理作用等方面的有益参考.

关键词 次硝酸, HNO合成, 水氮歧化反应, HNO检测, HNO医学应用

1 引言

次硝酸(分子式为HNO, 分子量为31.01, pK_a = 11.4, 英文系统名为nitroxylic acid, 常用名为azanone)是一种具有独特化学性质的小分子化合物, 早在1896年就被报道, 但其生理活性通过解酒药氰胺(NH_2CN)的出现才引起关注. 研究发现, NH_2CN本身不具备解酒作用[1], 但其代谢产物HNO能与乙醛脱氢酶(ALDH)中半胱氨酸硫醇形成二硫键[2], 从而抑制ALDH活性表现出解酒作用. 随着研究深入, 发现HNO具有舒张血管的作用[3]. 此后, HNO的生理活性和潜在应用, 特别是作为治疗心脑血管系统、癌症等疾病的潜在药物, 受到越来越广泛的关注和研究[4~6].

HNO在生理条件下能够大量存在, 可与生物体内多种物质结合发挥其生理作用. 因此, 近年来, 关于HNO潜在应用的研究受到越来越多的重视, 而其来源(包括体内来源和体外合成)及品质(包括定性定量检测)也日益受到关注. 本文将系统总结HNO的合成方法、检测技术及应用领域, 分析当前研究的进展与挑战, 旨在为研究人员对相关问题如内源性HNO的产生、外源性HNO合成、体内及体外HNO的定性定量检测、HNO生理作用等提供有益的参考.

引用格式: Liu S, Gong X, Zhu T, Yan S, Qin M, Chen X, Chen H. Research on the source of nitric acid and its detection and medical application. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 2051–2065, doi: 10.1360/SSC-2024-0293

© 2025 《中国科学》杂志社

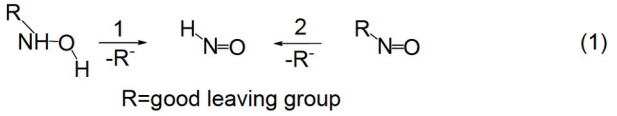
2 HNO的来源与获取途径

2.1 化学合成HNO

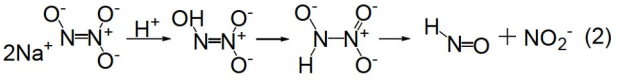
近年来, HNO在预防与治疗心衰[7~9]等疾病方面的表现促使人们开发出更多能够在生理条件下释放HNO的化学供体[10~12], 甚至还出现了在体外直接产生高纯度HNO的新方法[13].

2.1.1 通过化学供体释放HNO

目前, 通过供体释放HNO主要有两种策略(原理见反应式(1))[14].

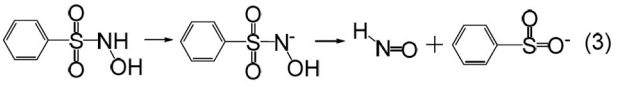


一种策略是通过歧化反应, 将羟胺衍生物中的−1价氮原子氧化为HNO中+1价氮原子. 按照这种策略合成的HNO供体主要有安吉里盐(Angeli's salt)以及皮洛特酸(Piloty's acid). Angeli's salt能够在生理条件下释放HNO (原理见反应式(2)), 是目前使用最广泛的HNO供体.



值得注意的是, Angeli's salt本身价格昂贵, 其分解速率易受pH和温度影响: 当pH低于4时, 不产生HNO, 只生成HNO单电子氧化物NO; 当pH高于8时, Angeli's salt的分解速率下降, 据此可制备短期储存的Angeli's salt母液[15]. 根据反应式(2)可知, Angeli's salt在释放HNO的同时会产生有一定毒性和生物学活性的副产物亚硝酸盐(NO_2^-). 因此, 在使用Angeli's salt研究HNO的生物学特性时, 需要考虑到副产物NO_2^-的影响.

Piloty's acid只能在无氧条件下产生HNO (原理见反应式(3)), 在pH中性和有氧条件下, Piloty's acid只能释放NO. 因生物体内一般都是有氧环境, 这一特性大大限制了Piloty's acid作为HNO供体在生理和药理研究中的应用[16].



另一种策略, 如反应式(1)所示, 是通过含+1价氮原子和良好离去基团的亚硝基化合物(如酰基/酰氧基亚硝基类化合物)直接分解产生HNO[17]. 这种策略释放HNO的速率快, 难以控制. 最近, Nourian等[18]改良了离去基团后, 实现了在生理条件下HNO的稳定释放(速率在0.6~25 min之间). 类似地, 对HNO供体的结构进行分子设计和修改后, 可改善和优化HNO的释放时间和条件[19~21]. 目前, 基于Piloty's acid的结构改性已经衍生出了多种用于临床治疗心力衰竭的HNO前药, 如CXL-1020、Cimlanod等[4,22], 与广泛应用的Angeli's salt相比, 这些前药具有更好的治疗效果, 为HNO治疗人类心血管疾病的应用研究建立了基础.

2.1.2 采用水与氮气直接合成HNO

与前人报道的在液相中采用HNO供体释放HNO的方法不同, 本课题组[13]提出了一种利用水自由基阳离子与氮气直接反应, 产生高纯HNO的方法. 一般而言, 即使采用昂贵的化学催化剂, 水与氮气也难以在常温常压条件下发生反应. 为了在常温常压条件下, 采用空气获得高纯度HNO, 研究人员巧妙地将空气中水分子转化为水自由基阳离子($H_2O^{+\bullet}$, m/z 18), 并使其立即与另外一个中性水分子配位, 形成相对稳定的具有"两中心三电子(2C3E)"结构的水自由基阳离子簇合物($(H_2O)_2^{+\bullet}$, m/z 36), 该离子簇合物具有优良的反应活性和相对较好的稳定性, 能在常温常压无催化剂条件下与空气中的氮气分子发生反应[13], 高效生成带电的羟氨自由基正离子和中性的HNO分子, 其反应原理如图1a所示. 由于羟氨为带电粒子, 利用电场可方便地与HNO分离, 从而获得纯度非常高的HNO产物. 从报道的数据看, 课题组已经在实验室实现了毫克级高纯HNO的合成. 按照成年人正常使用的剂量需求[23], 实验室合成的高纯HNO虽然量不大, 但是可满足一个成年患者一天的需要量.

文献[23]报道的方法利用了2个水分子在丢失一个电子之后所形成的"两中心三电子(2C3E)"结构[13], 以及利用了该中间体的特殊结构和反应活性, 实现了常温常压无催化剂条件下水与氮气的歧化反应. 方法采用的原料, 如氮气和水, 在空气中广泛存在, 且廉价易得. 基于该原理进行HNO制备的装置也相对简单(图1b), 利用现代加工技术可实现其小型化和微型化, 甚至研制出集人体HNO水平检测、制备与释放于一体的可穿戴式装置, 为HNO廉价化应用提供了新思路.

目前, 有多种生成HNO的化学方法. 在利用供体

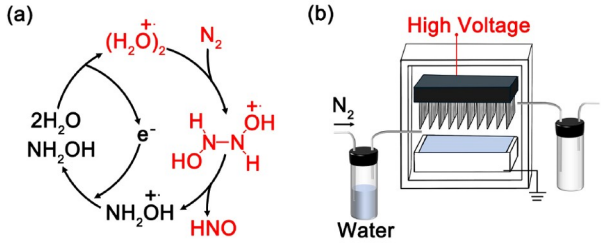


图 1　(网络版彩图)水与氮气直接合成HNO. (a) 水与氮气直接合成HNO机制图. (b) 水与氮气直接合成HNO装置图

Figure 1　(Color online) Direct synthesis of HNO from water and nitrogen. (a) Mechanism diagram of direct synthesis of HNO from water and nitrogen. (b) Device diagram of direct synthesis of HNO from water and nitrogen.

合成HNO的化学方法中，HNO通常在液相中产生，当供体与荧光基团结合时，可以直接用于观测HNO的实时释放及细胞成像. 但供体释放HNO的过程中通常会受到pH以及温度的影响，并伴有其他副产物的存在. 因此，在研究利用供体产生HNO的生物活性时需要考虑到该供体是否能在生物条件下产生HNO以及副产物是否具有生物活性以及毒理性. 利用水与氮气在气相中直接合成HNO则不需要考虑pH以及副产物等问题, 该方法所产生的另一产物带有正电, 会被反应装置中的负极板吸附与HNO分离. 但该方法的产率较供体相比较低. 因此, 在实际应用中, 需要综合考虑pH、副产物以及产率等因素.

2.2　生物合成内源性HNO

目前，除了化学合成外，HNO还可以通过两种生物途径合成内源性HNO: 一种是酶促反应，即内源性物质在一氧化氮合酶(NOS)等作用下产生HNO; 另一种是非酶促反应，也称单电子还原反应，即生物还原剂(如游离的氢原子H等)在生理条件下将NO还原成HNO[24].

2.2.1　酶促反应生成HNO

在体内合成NO过程中，如果一氧化氮合酶(NOS)体系中缺少四氢生物蝶呤(THB)，体内左旋精氨酸(L(+)-Arginine)通过六电子还原产生HNO以及瓜氨酸[25]. 这是一个常见的HNO来源途径. 此外, 在此条件下生成的NO还可被NADPH还原，生成HNO[26]. 在金属蛋白锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD)作用下, 甚至可观察到大量HNO的产生[27]. 最近研究表明，通过二磷酸腺苷(ADP)和一种合成肽激动剂的催化，还可在人血小板中生成HNO[24].

2.2.2　非酶促反应生成HNO

近年来，利用H等生物还原剂直接还原NO合成HNO的方法得到了广泛关注[28~30]. 研究表明，通过使用NO供体以及硫化氢(H_2S)供体进行实验，发现当两者共同作用时，观察到心肌细胞收缩和血管舒张效率显著提高，这在单独使用其中一种供体时未曾出现. 推测这种现象是由于H_2S还原NO产生了HNO的结果, 并使用HNO供体观测到了相类似的效果[31]. Arasimowicz-Jelonek等[32]发现, 在NO缺失的拟南芥中, 一般只有较低含量的HNO，而当正常植物处于缺氧状态时, HNO的产量在前24 h内增加了25%，这表明HNO的形成主要依赖于NO以及植物的氧化还原状态.

酶促反应生成HNO的过程中对酶具有浓度依赖性, 并且表现出酶的特异性催化作用. 非酶促合成主要依赖生理条件下的化学环境及反应底物，该类反应特异性较低易受环境影响. 酶促反应和非酶促反应都是生物体产生内源性HNO的方式，共同发挥作用使机体内HNO维持在生理范围内. 与化学合成HNO需要的特定反应条件不同，生物合成内源性HNO是在生物体内的生理条件下，并且生物合成HNO的研究主要集中于探究作为生物体内信号分子HNO的形成机制以及维持机体自身正常功能的调节物质，而不是HNO的生物活性. 此外，通过非酶促反应合成的内源性HNO可以为化学合成外源性HNO提供新思路.

3　HNO的检测方法

HNO的高反应活性和小分子特性增加了对其检测的难度，使研究人员在早期实验中难以直接检测到其产生. 这一困难在一定程度上限制了HNO的发现、合成及开发应用. 目前对于HNO的检测方法较为丰富, 主要包括质谱法、色谱法、电子顺磁共振波谱法、电化学法以及光谱法. 这些检测方法具有不同的适用范围及优点, 为不同基质下HNO的检测提供了有力工具.

3.1　质谱法检测HNO

质谱法是一种通过测量物质质量-电荷比进行分析的高灵敏方法. 目前，检测HNO的质谱法主要包括

膜进样质谱法、高压四极杆质谱法以及通过HNO捕获剂进行检测的质谱法. 其中膜进样质谱法是一种通过质谱检测溶解在液相中的气体的方法, 装置如图2a所示, 膜进样过程主要分为需要检测的气体从溶液中转移到膜表面、随后渗透通过膜、最后解析到真空中并进入质谱的三个阶段. 膜进样质谱法用于检测HNO的应用较早, 是基于检测NO发展起来的方法. 该方法在加入HNO供体后通过检测到NO^- (*m*/*z* 30)和二聚化产物N_2O (*m*/*z* 44)的信号以确定HNO的存在(图2b). 尽管*m*/*z* 30信号归属较为复杂, 可能是源于NO、HNO以及N_2O的碎片离子, 但对于NO和HNO的区分可以利用与化学试剂不同的性质进行区分, 例如, HNO在无氧条件下可以与硫醇反应产生N_2O, 而无氧条件下NO几乎不与硫醇反应[33]; 或者利用液氮对沸点相对较高的HNO和N_2O进行捕获以确定信号的归属问题[33]. 因此, 膜进样质谱法用于检测溶液中的HNO仍然是一种高灵敏度、高选择性和接近实时的方法, 其检测出HNO的浓度低至25 nM[33]. 该方法通过检测溶液中的HNO, 为探究生理条件下HNO的潜在作用机制提供了基础. Carrone等[34]提出了一种利用高压(1~1000 mbar)四极杆质谱直接检测气相中产生HNO的方法(装置如图2c所示). 该方法利用高压使两个HNO相遇的概率降低, 减少了HNO的二聚反应, 从而能够观察到更强烈的HNO^+信号. 实验利用HNO固体供体与气态NH_3在固相中反应产生HNO, 并将气体产物通过毛细管连接到高压(1~1000 mbar)四极杆质谱口进行检测, 在NH_3与供体接触前发现主要信号为NH_3^+ (*m*/*z* 17)而在反应发生15 s后可以明显观察到HNO^+ (*m*/*z* 31)的分子离子峰以及较低的N_2O^+ (*m*/*z* 44)信号(图2d), 证实了HNO的产生. 该方法使HNO成为质谱的主要峰信号, 具有良好的特异性和快速的响应能力, 实现了温和条件下对气态碱和固态HNO供体产生的HNO的检测, 但检测限较

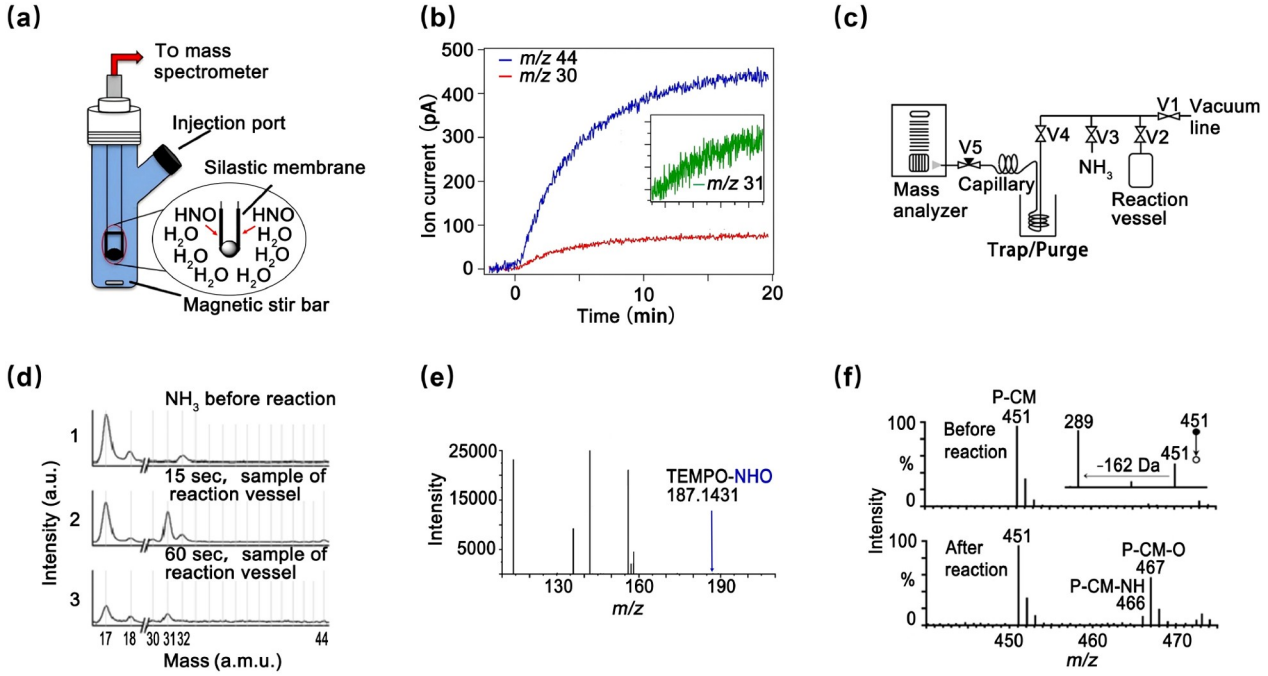


图 2 (网络版彩图)质谱法检测HNO. (a) 膜进样质谱法检测HNO装置图[33]. (b) 膜进样质谱法检测HNO总离子流图[33]. (c) 高压(1~1000 mbar)四极杆质谱法检测HNO装置图[34]. (d) 高压(1~1000 mbar)四极杆质谱法检测HNO质谱图[34]. (e) TEMPO捕获HNO高分辨质谱图[35]. (f) P-CM与HNO反应前后质谱图[13]

Figure 2 (Color online) Detection of HNO by mass spectrometry. (a) Detection of HNO device diagram by membrane injection mass spectrometry [33]. (b) Detection of HNO mass spectrum by membrane injection mass spectrometry. Reproduced with permission from Ref. [33]. Copyright 2011, Elsevier. (c) Detection of HNO device diagram by high-pressure (1–1000 mbar) quadrupole mass spectrometry. (d) Detection of HNO mass spectrum by high-pressure (1–1000 mbar) quadrupole mass spectrometry. (c, d) Reproduced with permission from Ref. [34]. Copyright 2021, Elsevier. (e) High resolution mass spectra of HNO captured by TEMPO. Reproduced withpermission from Ref. [35]. Copyright 2024, American Chemical Society. (f) Mass spectra of P-CM before and after reaction with HNO. Reproduced with permission from Ref. [13]. Copyright 2024, Springer Nature.

高, 为10 mM[34].

质谱法还可以与一系列试剂结合使用, 以提高HNO检测的灵敏度和准确度. Song等[35]将电喷雾装置与高分辨质谱联用, 在线监测自旋捕获剂2,2,6,6-四甲基哌啶-氮-氧化物(TEMPO)对一系列活性氧和活性氮的捕获及表征, 其中TEMPO对HNO的捕获可以归结为HNO氮原子上的自由电子与TEMPO氧原子上的自由电子配对形成共价键生成配合物TEMPO-NHO, 并在高分辨质谱中可以观察到TEMPO-NHO(*m*/*z* 187.1431)的特征峰(图2e), 该方法具有高度特异性, 可以快速从多种活性氮、活性氧物种中检测到HNO. Zhang等[13]利用一种基于香豆素的芳基膦荧光探针P-CM对HNO进行检测, P-CM中的芳基膦会与HNO反应生成特异性产物P-CM氮杂叶立德(P-CM-NH)和P-CM氧化物(P-CM-O). 经质谱进样分析可以发现未与HNO反应时谱图上主要离子峰为P-CM的准分子离子峰(*m*/*z* 451), 而与HNO反应后质谱图上*m*/*z* 466 (P-CM-NH)和467 (P-CM-O)处的离子峰明显升高(图2f). 通过串联质谱分析提高了对HNO检测的准确度、特异性物质的产生说明了该方法良好的特异性, 并且P-CM对HNO的检测限为20 nM, 并且P-CM不受生物体系中各种生物还原剂的影响, 实现了高准确度、高灵敏度、高特异性的复杂生物样品中HNO的检测.

3.2 色谱法检测HNO

高效液相色谱(HPLC)法是目前用于检测HNO最广泛的色谱技术, 以液体为流动相, 利用溶液中物质不同的极性等物理化学性质将各组分分离, 随后进入检测器进行检测, 但对HNO的检测一般需要通过衍生化处理, 对产生的特异性产物进行检测. 例如, HNO与还原型谷胱甘肽(GSH)反应, 生成氧化型谷胱甘肽(GSSG)和可以作为内源性产生HNO的特异性物质亚磺酰胺($GS(O)NH_2$), 后利用HPLC进行检测[36]. 该方法具有良好的特异性和灵敏度, 在GSH与NO等其他氮氧化物反应时未观察到$GS(O)NH_2$的产生, 而与HNO反应时可以观察到微摩尔(μM)浓度的$GS(O)NH_2$, 并且可以作为探究生物途径所产生的HNO的检测方法.

HNO对膦亲核试剂显示出较强的亲电性, 例如, HNO与三芳基膦化合物可以产生独特的氮杂叶立德和HNO衍生的羟胺(图3a). 据此原理建立了高选择性检测HNO的HPLC分析方法[37], 适用于探究HNO生物效应.

除了HPLC外, 还可以通过气相色谱-质谱(GC-MS)对HNO的二聚产物N_2O进行检测(图3b). Saha等[38]通过检测反应容器顶空气体中的N_2O来表明HNO的存在, 以证实基于钴亚硝酰配合物所合成的物质是有效的HNO供体, 该方法检测的N_2O可能不是通过HNO二聚所产生, 因此该方法的特异性不佳.

3.3 电子顺磁共振波谱法检测HNO

电子顺磁共振(EPR)是一种通过施加微波辐射使待测物质中未成对电子在不同的能级跃迁, 从而形成可供检测的共振信号. 通常用于检测自由基、固体中的晶格缺陷以及三重态分子. 而NO中含有未成对电子, 因此EPR可用于区分NO等单电子分子物质.

在检测HNO中最早采用EPR的目的是将NO与其他氧化态氮化合物进行区分, 但EPR无法直接对还原产物NO^-进行检测. 因此对于HNO的检测通常需要使用到顺磁捕获剂进行间接检测.

Bobko等[39]提出了一种利用EPR技术对硝酰氮氧化物(NNs)与HNO或NO的反应产物差异来区分HNO与NO的方法, 其产物分别为亚氨基氮氧化物的羟胺(hIN)和亚氨基氮氧化物(IN) (图4a). 该方法利用脂质体包裹NNs, 避免NNs在生物体系中被还原, 可以用于检测生物系统中的HNO. 同时膜屏障可以允许HNO与NO的渗透, 并且检测限约为1 nM. 因此该方法根据产物差异解决了HNO和NO难以区分的问题, 并具有在生物体系中检测HNO的良好特异性和灵敏度.

Liu等[40]利用四硫三芳基甲基(TAM)自由基解决了EPR缺少稳定的、对HNO敏感、窄的自旋探针问题, 并将TAM与Cu^{II}配位得到一种基于“开关响应”原理检测HNO的EPR探针(Cu^{II}[TD1]). 该探针检测HNO的传感机制是HNO的还原性能快速将Cu^{II}还原为Cu^{I}, 导致分子内的自旋消失, 恢复EPR信号(图4b). 将Cu^{II}[TD1]与不同浓度的HNO孵育, 发现随着反应时间增加EPR信号也在逐渐增加, 并且在20 min时到达平台, 较空白相比EPR信号增强了16.1倍, 检测限达到了1.95 μM. 在生物体系中与其他的活性氧、活性氮物种有较弱的响应, 在NO存在的情况下, EPR信号增强2.1倍, 可以根据响应强度来区分NO和HNO, 因此相较于其他活性氧、活性氮物种, Cu^{II}[TD1]对HNO具有更高的选择性. 但由于Cu^{II}[TD1]对HNO的响应主要是依赖

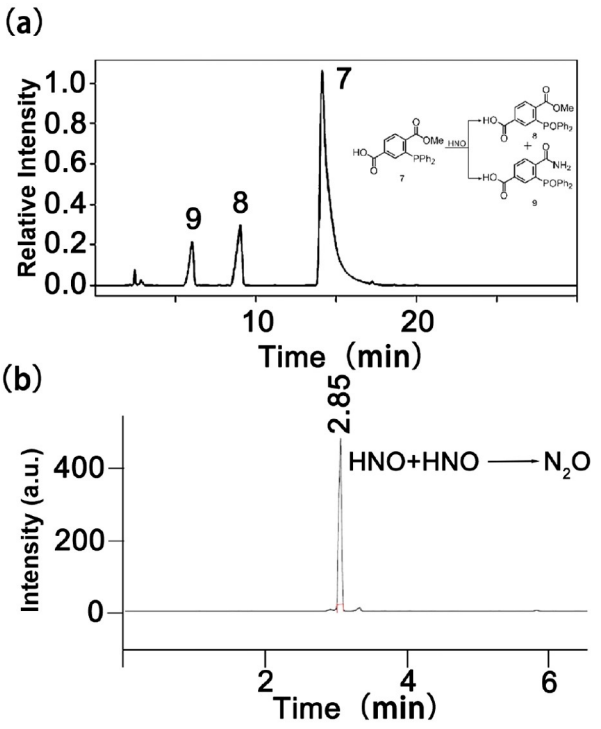


图 3 色谱法检测HNO. (a) HPLC检测HNO的色谱图[37] (插图为HNO与三芳基膦化物反应式). (b) 顶空气相检测N_2O的色谱图[38] (插图为HNO二聚生成N_2O的反应式)

Figure 3 Detection of HNO by chromatogram. (a) Detection of HNO chromatogram by HPLC (The inset shows the reaction of HNO and triaryl phosphides). Reproduced with permission from Ref. [37]. Copyright 2011, American Chemical Society. (b) Detection of N_2O chromatogram by headspace gas phase [38] (The inset shows the reaction for the formation of N_2O by HNO dimerization). Reproduced with permission from Ref. [38]. Copyright 2023, American Chemical Society.

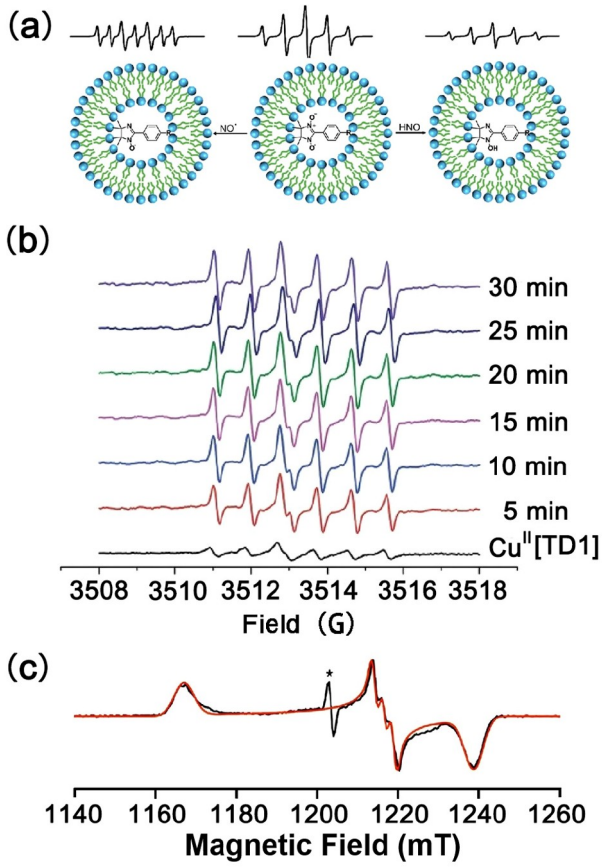


图 4 (网络版彩图) 电子顺磁共振波谱法检测HNO. (a) 脂质体包裹NNs检测HNO的EPR谱图[39]. (b) Cu^{II}[TD1]捕获HNO的EPR谱图[40]. (c) 亚硝酸还原酶C–H胺化反应的催化循环途径中检测HNO的EPR谱图[41]

Figure 4 (Color online) Detection of HNO by EPR. (a) EPR spectra of HNO detected by liposome-encapsulated NNs. Reproduced with permission from Ref. [39]. Copyright 2012, Taylor & Francis. (b) EPR spectrum of HNO captured by CuII [TD1]. Reproduced with permission from Ref. [40]. Copyright 2022, Royal Society of Chemistry. (c) EPR spectra of HNO detected in the catalytic cycle pathway of nitrite reductase C–H amination reaction. Reproduced with permission from Ref. [41]. Copyright 2024, American Chemical Society.

于Cu^{II}的还原, 因此, 生物体系中存在的抗坏血酸等还原剂会诱导EPR信号的产生, 局限了其在生物体系中的应用. 通过对该探针TAM的结构改性可以为非侵入性检测生物系统中的HNO提供有力的工具. Das等[41]在工程化血红素蛋白中发现了一种基于亚硝酸还原酶C–H胺化反应的催化循环途径, 在研究机理的过程中发现了HNO的参与, 随后利用EPR技术对HNO进行捕获验证(图4c), 该发现为研究生物系统中的HNO提供了新的视角.

3.4 电化学法检测HNO

电化学检测HNO的原理是利用HNO的氧化还原特性, 在HNO与电解池中其他物质发生氧化或还原反应时观察到相应的氧化还原电流, 从而实现HNO的检测. 例如, HNO和NO与铁卟啉配合物反应[42], 可据此进行HNO和NO的检测. 但是, 该方法难以区分HNO和NO, 因为它们与铁卟啉都会发生亚硝化反应并产生FeNO络合物[42]. 为了提高检测方法的选择性, 随后出现了钴、锰、铜等金属卟啉配合物与HNO的研究, 其中钴卟啉方法的选择性最好, 原理及实验装置见图5a[43]. 钴卟啉法可以在1~1000 nM范围内实现对HNO的定量检测(图5b), 将钴卟啉引入到培养皿中可以检测到活细胞所释放出的HNO, 且不会对细胞产生破坏和污染. Alvarez等[44]利用钴卟啉电极的电化学方法检

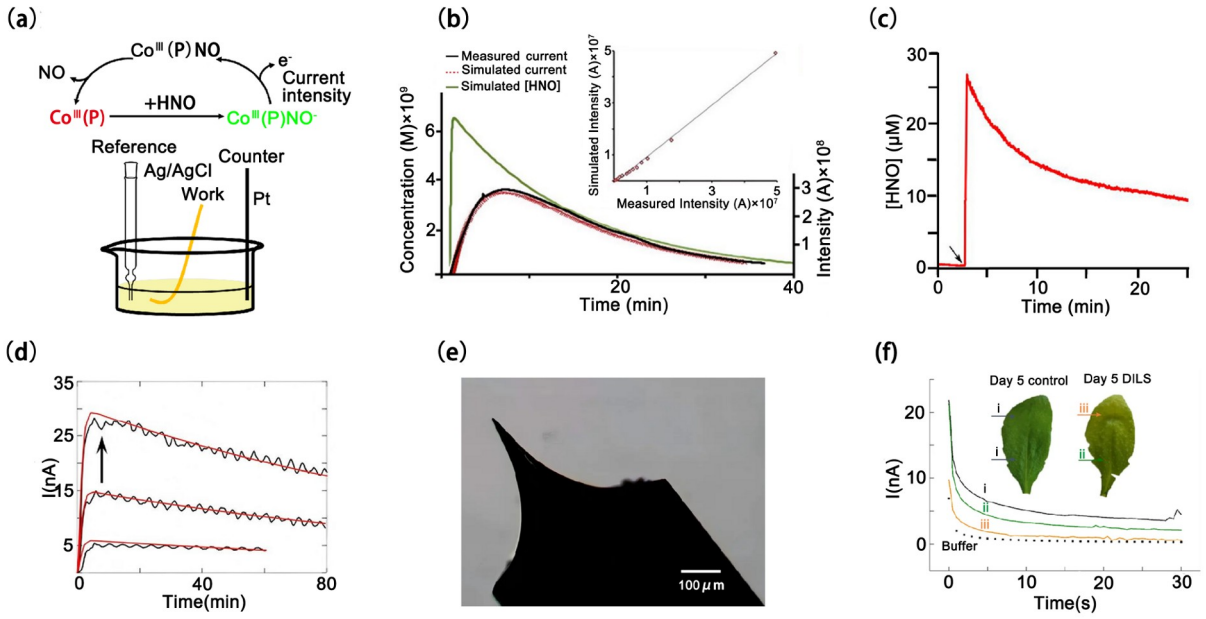


图 5　(网络版彩图) 电化学法检测HNO. (a) 钴卟啉电极检测HNO原理及装置图[43]. (b) 钴卟啉电极检测HNO[43]. (c) 电化学法检测肌红蛋白介导羟胺产生的HNO[44]. (d) 电化学法检测不同浓度抗坏血酸(0.4、0.6和1 μM)与NO反应产生的HNO[28]. (e) 针型钴卟啉电极[32]. (f) 电化学法检测活体中的HNO (字母i、ii、iii表示具有不同叶绿素含量的叶区)[32]

Figure 5　(Color online) Detection of HNO by electrochemistry. (a) Principle and device diagram of cobalt porphyrin electrode for detection of HNO. (b) Detection of HNO by cobalt porphyrin electrode. (a, b) Reproduced with permission from Ref. [43]. Copyright 2013, American Chemical Society. (c) Electrochemical method was used to detect HNO produced by myoglobin-mediated hydroxylamine production. Reproduced with permission from Ref. [44]. Copyright 2020, American Chemical Society. (d) The HNO produced by the reaction of different concentrations of ascorbic acid (0.4, 0.6, and 1 μM) with NO was detected by electrochemical method. Reproduced with permission from Ref. [28]. Copyright 2021, American Chemical Society. (e) Needle-type cobalt porphyrin electrode. (f) HNO *in vivo* was detected by electrochemical method. Letters i, ii, and iii indicate leaf regions with different chlorophyll contents. (e, f) Reproduced with permission from Ref. [32]. Copyright 2023, Springer Nature.

测肌红蛋白介导羟胺产生HNO，为保证实验不受Cu(II)和其他二价阳离子干扰，均在含有乙二胺四乙酸的磷酸盐缓冲溶液中进行，发现向含有肌红蛋白/过氧化氢的电解池中加入羟胺的厌氧溶液时，可以明显观察到电流信号的增加(图5c)，并且在生物相容浓度下也可以快速观察到HNO的产生，证实了肌红蛋白可以通过羟胺的过氧化作用产生HNO.

Neuman等[28]利用电化学方法报道了NO与还原剂反应产生HNO的直接反应速率常数并利用电化学方法可观测HNO浓度随时间的变化(图5d)，该体系中虽然有其他活性氮、活性氧的存在，但钴卟啉的工作电极对HNO具有特异性，因此没有干扰，为探究HNO是否能在生物条件下由NO单电子还原产生、研究NO与多种还原剂生成HNO的反应速率提供了科学工具. Arasimowicz-Jelonek等[32]利用电化学方法在黑暗诱导野生型拟南芥衰老的模型中观察到HNO的信号显著降低, 恢复光照以延缓衰老并增加叶绿素的含量后, 发现HNO的信号逐渐增强. 并且为研究植物活体中HNO的含量, 开发了一种针型电极(图5e), 发现叶绿素含量下降的叶片区域, HNO的信号也较弱(图5f)[32], 该实验在活细胞中证实了内源性HNO的产生，证明了细胞内氧化还原平衡的改变会导致内源性HNO的波动[32]，为研究活体中HNO提供了有力支架.

3.5　光谱法检测HNO

上述所提到的质谱、色谱、电子顺磁共振波谱和电化学等方法对于实时检测生物样本中的HNO具有仪器成本高、检测时间长等方面的问题. 因此, 近年来操作简便、可快速检测HNO的荧光光谱法[45~47]应用较为广泛. 荧光光谱法检测HNO是通过含有荧光基团的探针与HNO反应后物质的外层电子吸收光子，由基态跃迁到激发态, 再回到较低能级或者基态时, 检测到发射出的辐射.

常见的荧光探针有Cu(II)、氮氧自由基、2-巯基-

2-甲基丙酸以及芳基膦四类[48]. Cu(II)探针检测HNO的原理是Cu(II)上的未配对电子在分子间利用光诱导电子转移(PET)淬灭了荧光基团的荧光, 所以在未与HNO结合时Cu(II)探针通常不显示荧光或者表现出弱荧光. HNO的还原性, 可将Cu(II)还原为Cu(I), 使与Cu(II)连接的荧光基团由淬灭转变为发光状态(图6a), 从而实现高灵敏地检测HNO[49]. 2019年, Islam等[50]基于吩嗪制成的荧光基团2-[2-(吡啶-2-甲氧基)-苯基]-1H-咪唑[4,5-*b*]吩嗪(PIP)与Cu(II)形成的荧光探针[(PIP)Cu^{II}(Cl)] (图6e), 解决了大多数Cu(II)探针会受到H_2S以及生物体系中如半胱氨酸、抗坏血酸等还原剂的干扰问题. 并且荧光探针[(PIP)Cu^{II}(Cl)]具有细胞渗透性和可忽略的毒性, 使其可以用于细胞产生内源性HNO的成像检测, 并可以检测到μM级别的HNO, 具有用于流式细胞仪的潜力. 但该探针在检测HNO的同时可能会受到NO所带来的假阳性信号的影响[50]. 同年Maiti等[49]基于丹磺酰基-喹啉制备的荧光配体(DQ_{468})与Cu(II)结合形成的荧光探针[Cu^{II}(DQ_{468})Cl] (图6f)解决了Cu(II)类荧光探针选择性差的问题, [Cu^{II}(DQ_{468})Cl]在饱和的NO溶液中没有产生明显的荧光, 对HNO具有高度的特异性和灵敏度, 检测限可达0.091 μM. 目前多数研究通过使用不同的荧光团与铜基连接以形成“off-on”响应的Cu(II)荧光探针. 为探究不同荧光团对HNO检测结果的影响, 刘文波等[51]通过9-蒽甲酸、氟硼二吡咯以及香豆素三种荧光染料合成了三种不同的HNO探针(Cu^{II}[AD1]、Cu^{II}[BD1]、Cu^{II}[CD1]) (图6g, h, i). 在与HNO孵育5 min后发现Cu^{II}[CD1]具有最低的检测限(0.15 μM)和最高的响应强度(329.04倍), 该结果表明不同的荧光基团会影响荧光探针对HNO的检测限、响应强度以及特异性. Cu(II)探针的优点在于荧光增强是由HNO与探针的一步反应直接得到, 灵敏度较高, 可以用于活细胞的体外传感检测.

第二类是适用于简单化学体系中对HNO进行检测的氮氧自由基荧光探针, 该类探针利用氮氧自由基是单线激发态HNO猝灭剂的独特性能, 可在氮氧自由基荧光探针上的NO被还原为羟胺时观察到荧光“打开”现象(图6b). 但该类探针容易被各种还原剂还原为羟胺, 因此最好在没有还原剂存在的条件下对HNO进行检测. 第一个成功用于检测HNO的氮氧自由基探针4-((9-吖啶羰基)氨基))-2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧(TEMPO-9-AC) (图6j)[52], 可以区分水溶液中的NO和HNO,

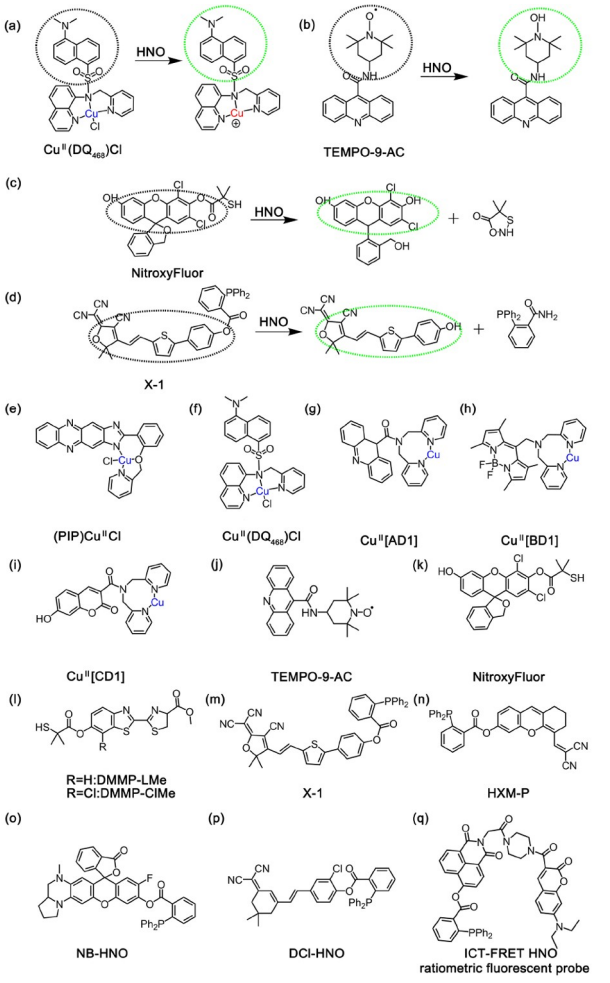


图 6 (网络版彩图) 四类的荧光探针检测HNO的机理及结构式. (a) 铜(II)类探针; (b) 氮氧化物类探针; (c) 2-巯基-2-甲基丙酸类探针; (d) 苯基膦类探针; (e) (PIP)Cu^{II}Cl探针; (f) Cu^{II}(DQ_{468})Cl探针; (g) Cu^{II}[AD1] 探针; (h) Cu^{II}[BD1]探针; (i) Cu^{II}[CD1]探针; (j) TEMO-9-AC探针; (k) Nitrox Flour探针; (l) DMMP-LMe和DMMP-CiLMe探针; (m) X-1探针; (n) HXM-P探针; (o) NB-HNO探针; (p) DCI-HNO探针; (q) ICT-FRET比率探针

Figure 6 (Color online) The mechanism and structural formula of four types of fluorescent probes for detecting HNO. (a) Copper (II) probe; (b) nitrogen oxide probes; (c) 2-mercapto-2-methylpropionic acid probe; (d) phenyl phosphine probes; (e) (PIP)Cu^{II}Cl probe; (f) Cu^{II}(DQ_{468})Cl probe; (g) Cu^{II}[AD1] probe; (h) Cu^{II}[BD1] probe; (i) Cu^{II}[CD1] probe; (j) TEMO-9-AC probe; (k) Nitrox Flour probe; (l) DMMP-LMe和DMMP-CiLMe probe; (m) X-1 probe; (n) HXM-P probe; (o) NB-HNO probe; (p) DCI-HNO probe; (q) ICT-FRET ratio probe.

并检测到μM级别的HNO, 但TEMPO-9-AC存在分子间荧光淬灭的现象以及副产物NO对HNO的竞争捕获使该探针的使用变得复杂. 并由于氮氧自由基自身的高反应活性, 副反应和干扰产物与其他三类荧光探针相

比较多.

第三类2-巯基-2-甲基丙酸荧光探针, 利用2-巯基-2-甲基丙酸酯与HNO进行分子内环化反应, 形成独特的中间体*N*-羟基亚磺酰而发出荧光(图6c)[53]. 2-巯基-2-甲基丙酸类探针虽然对HNO具有特异性, 但会受到生物样本中还原剂的影响[54], Pino等[54]为避免酯部分水解出现的假阳性结果, 在2-巯基乙酸的识别位点上先后引入α二甲基和邻氯取代基合成了荧光探针Nitroxy-Fluor (图6k), 使酯部分更加稳定, 但检测限较高. 最近, Szala等[55]基于两种萤火虫荧光素合成了两种不同的2-巯基-2-甲基丙酸荧光探针(DMMP-LMe (图6l)、DMMP-ClLMe (图6l)), 这两种荧光探针对HNO的响应在10 min内到达平台期, 并大大提高了灵敏度, 其检测限分别为32和22 nM.

第四类芳基膦类荧光探针是目前使用最为广泛的非金属类荧光探针, 芳基膦部分可以抑制荧光团的分子内电荷转移(ICT), 在与HNO作用时, HNO的氧化性使三苯基膦氧化为相应的膦氧化物并产生氮杂叶立德随后水解生成酰胺, 诱导ICT过程发生, 致使荧光染料释放发光(图6d)[56]. Li等[57]基于三氰基呋喃(TCF)衍生物合成了一种近红外荧光探针(X-1) (图6m), X-1利用近红外荧光探针的强穿透性, 成功用于活细胞中外源性和内源性HNO的成像, 并且X-1对HNO的灵敏度高、检测限为2.44 μM. 在施加生理环境下常见的活性氧、活性氮、活性硫等物质后发现X-1对这些活性物质几乎没有响应, 对HNO具有高度特异性. Zhou等[58]为更好地追踪生物体系中的HNO, 基于荧光团2-((6-羟基-2,3-二氢-1*H*-氧杂蒽-4-基)亚甲基)丙二腈开发出的荧光探针(HXM-P, 图6n)能够在15 s内对HNO进行响应, 在5 min内达到平台, 并具有高灵敏度, 检测限为10.7 nM. 近红外探针X-1以及HXM-P仅用于细胞中外源性和内源性HNO的检测, 而Xie等[59]为了探究动物体内HNO的水平波动, 基于对甲氨基酚的荧光团合成了荧光探针(NB-HNO, 图6o), 为了评估NB-HNO具有对动物体内HNO水平的检测能力, 使用了外源性和内源性HNO对小鼠进行荧光成像. 结果发现, 在只注射NB-HNO的小鼠体内在0~50 min内荧光变化最小, 而利用外源性HNO预处理的小鼠体内荧光强度逐渐增加, 该结果表明正常小鼠体内HNO含量较少并证明了NB-HNO在检测小鼠体内外源性HNO含量的有效性. 利用脂多糖(LPS)诱导小鼠产生过氧化氢酶的对照组以及同时用LPS和需要受到过氧化氢酶催化氰胺(CA)以产生内源性HNO的实验组, 结果表明对照组仅有微弱荧光, 实验组显示出明显的红色荧光, 并在50 min达到峰值. 强调了NB-HNO对小鼠内源性HNO的检测能力.

HNO不仅在动物中具有生理作用, 在植物也具有调控作用. Luo等[60]为阐明HNO在植物体内的潜在作用机制, 开发了一种基于二氰基异佛尔酮荧光团的荧光探针(DCI-HNO, 图6p). 该探针具有高灵敏度, 检测限为97 nM, 并可以在8 min时对HNO做出响应. Luo等[60]在烟草幼苗中加入不同浓度的HNO (0、5、10、20、50、100、200 μM), 发现随着HNO浓度的增加, 其荧光强度也逐渐增加, 并且根的荧光强度随着时间增加而增强. 因此, DCI-HNO可用于烟草幼苗中外源性HNO的成像. 在研究蔗糖引起的烟草衰老中, 利用不同蔗糖浓度(0、15、30、60、90、120 mM)以及DCI-HNO孵育后, 发现随着蔗糖浓度增加, 红色荧光信号逐渐增强, 结果表明蔗糖诱导烟草衰老时HNO的含量有所增加, 为植物体内探究HNO的生理作用提供了一种有力的检测工具. 目前大部分的荧光探针主要依赖于单个荧光团的淬灭和激活构建的, 容易受到探针浓度以及检测体系的影响, Ma等[61]基于香豆素和萘酰亚胺开发了一种新型的比率型荧光探针(图6q), 该探针利用ICT的荧光量子效率和荧光共振能量转移(FRET)的大斯托克斯位移, 有效地避免了荧光探针的自吸收和自淬灭现象, 在谷胱甘肽和抗坏血酸的存在下对HNO依然具有良好的选择性[61], 并且4 min的响应时间和14 nM的检测限使其成为检测生物体系中HNO的有力工具. 除了荧光外, 还可设计显色剂将HNO直接进行比色检测. 例如, Liu等[62]开发了一种比色法的显色剂, 该显色剂与HNO反应生成HNO-TCF配合物, 溶液由黄色变为蓝色[60], 具有很高的HNO选择性, 检测限低至10 nM. 此外, HNO-TCF探针还可以用于活细胞中HNO的荧光成像.

铜类荧光探针、氮氧自由基类荧光探针以及2-巯基-2-甲基丙酸类荧光探针多数为自发荧光干扰、强组织吸收的紫外可见荧光探针, 而芳基膦类荧光探针已有多种强穿透、低倍镜干扰、高安全性的近红外荧光探针, 并且可以对HNO快速做出响应, 对HNO的选择性也优于其他多种生物氧化剂, 并且不受生物体内多种还原剂的影响, 是探究生物系统中内源性HNO的

有力工具.

综上所述，质谱法对于检测HNO具有灵敏度高、响应时间短等优点, 但仪器成本较高, 适用于检测基质简单液体中的HNO. 色谱法通过衍生化处理具有良好的特异性和准确性，但响应时间长，可以用于液相中HNO的定性检测. 电子顺磁共振波谱法在HNO与自旋探针结合后具有组织穿透力强、特异性高的特点，但在组织中易受到背景信号的干扰，适用于生物体系中HNO的定性及半定量分析. 电化学法目前已经成功用于检测植物体内内源性HNO的产生，在检测生物样本中HNO时具有原位、不破坏组织等方面的优势，检测时需要注意电解质对结果的影响. 与电化学法同样具有快速定性优势的荧光光谱法，在检测生物体系中HNO时可以通过荧光成像来观测生物体产生HNO的部位及强度, 该方法的检测结果直观易得, 但实际应用时需要考虑到不同荧光探针的特性与局限性. 发展趋势在于开发出能够在生物体系中进行准确定量并不受生物体系中还原剂影响的检测方法，以确定HNO在生物体内发挥有益作用的精确范围以及提高内源性HNO检测的准确度.

4 HNO在医学方面的应用

与NO等其他氮氧化物类似，HNO也具有奇特的化学和生物学活性[6,63]. HNO能够与金属离子[64]以及蛋白质中半胱氨酸残基上的巯基反应[65]，影响生物体内的多种生理过程.

4.1 HNO在心血管细胞中的作用

HNO与NO的相关性引起了研究人员对HNO在心血管系统中作用的关注(图7). Favaloro等[66]在对大鼠心脏的离体灌流实验中证实了HNO通过鸟苷酸环化酶sGC依赖机制在心血管系统中产生的作用，研究使用0.1 nM~10 μM HNO供体Angeli's salt作用于钾离子通道, 有效地引起浓度依赖性的血管扩张, 并且该研究通过K_v通道抑制剂减弱了sGC激动剂所引起的血管舒张现象，表明了HNO对血管的舒张作用是通过环磷酸鸟苷cGMP所依赖的K_v通道激活所介导. 该机制是通过HNO与sGC上的二价铁离子结合，激活sGC使cGMP水平升高，活化蛋白激酶G，从而影响K_v通道的活性，发挥出舒张血管的生理作用. HNO在心肌细胞中产生正性肌力作用的另一机制完全独立于β肾上腺素[67]，其作用机制是通过与硫醇相互作用，增强肌质网(SR)中兰尼碱受体(RyR2)钙离子(Ca^{2+})释放、激活了Ca^{2+} ATP酶(由*serca2a*基因编码)，加速Ca^{2+}从细胞质中清除，并增加了肌丝Ca^{2+}敏感性[68]. 这一效应与NO不同，NO会减弱β受体激动剂以及肌丝Ca^{2+}的敏感性. 因此，相比于NO，HNO在治疗心脏负荷增加和功能降低时的心力衰竭方面更具优势.

HNO对缺血后再灌注的保护作用需要在缺血前进行供给，否则会加重再灌注损伤[70]. 与相同具有缺血后再灌注保护作用的NO相比，HNO的保护程度更大. 总的来说，HNO对心血管细胞具有多种生物学作用[71~73]，包括舒张血管、心肌收缩以及对缺血再灌注

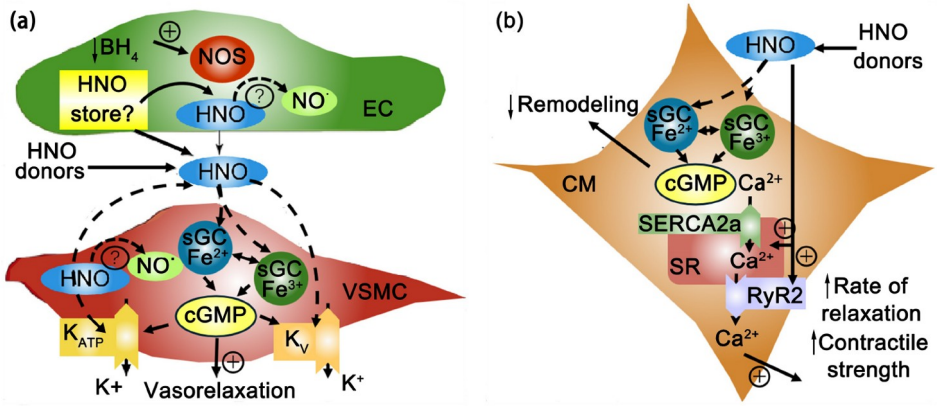


图 7 (网络版彩图) HNO在心血管细胞中的作用[69]. (a) HNO在血管平滑肌细胞(VSMC)中的作用及机制. (b) HNO在心肌细胞(CM)中的作用及机制

Figure 7 (Color online) Role of HNO in cardiovascular cells. (a) Role and mechanism of HNO in vascular smooth muscle cells (VSMC). (b) Role and mechanism of HNO in cardiomyocytes. Reproduced with permission from Ref. [69]. Copyright 2008, Elsevier.

的保护作用. 并且HNO在心血管系统中的独特作用机制为心血管疾病的治疗提供了一种新策略.

4.2　HNO在肿瘤细胞中的应用

HNO被证实可以通过多种机制产生抗癌作用, 如抑制乳腺癌和神经母细胞瘤的增殖、诱导非小细胞肺癌以及结肠癌细胞的凋亡、延缓肿瘤血管生成(图8). Norris等[74]发现1~4 mM HNO能在乳腺癌细胞中通过与甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上的巯基结合从而抑制其活性, 减少糖酵解的发生, 使缺氧诱导因子(HIF-1α)减少, 导致血管内皮生长因子(VEGF)减少, 最终产生抗肿瘤血管生成作用. GAPDH的高表达可以为肿瘤细胞提供能量, 促进肿瘤细胞的增殖, 而HNO通过与GAPDH上的硫醇结合抑制GAPDH的活性, 减少肿瘤细胞的糖酵解代谢和能量. 在缺氧条件下HIF-1α是关键的转录因子, 并且可以上调VEGF的表达, 促进肿瘤血管生成, 而HNO通过抑制HIF-1α的活性使VEGF减少, 抑制肿瘤的生长. Sidorkina等[75]还发现0.2~1.0 mM HNO可以在人乳腺癌细胞中通过抑制聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)的活性产生抑癌作用, 并在炎症条件下更加显著. PARP可以修复损伤的DNA, 而HNO通过直接抑制PARP的活性使肿瘤细胞内的DNA损伤累积, 从而诱导肿瘤细胞凋亡. 随后, 人们发现NO-NSAIDs不仅可以减少胃、肾以及心血管的损伤, 还具有抗肿瘤活性. 因此, Basudhar等[76]提出了一种可以释放HNO的阿司匹林复合物的方法, 不仅对胃溃疡展现出了良好的保护与抗炎作用, 还可以通过抑制GAPDH产生细胞毒性以抑制肿瘤的生长, 对非小细胞肺癌具有明显的细胞毒性.

4.3　HNO在神经细胞中的作用

HNO供体可作为一种无心血管及溃疡等副作用的抗炎药物[77], 使研究人员对HNO的抗炎作用充满期待. Huang等[78]发现, 在体内HNO通过抑制COX-2的活性, 表现出介于阿司匹林和布洛芬之间的抗炎活性, 该研究表明六种*N*-羟基磺酰胺类HNO供体对COX-2的半数抑制浓度(IC_{50})范围在44.3~101 μM, 且发现结构中$MeSO_2$或者SO_2NHOH部分不适合插入COX-2的结合位点, 为COX-2抑制剂的研究提供基础. Zhou等[79]通过100 μM Angeli's salt所释放的HNO发现, HNO通过抑制脂多糖(LPS)诱导的活性氧(ROS)和促炎因子TNF、IL1产生抗炎活性, 这些抗炎活性与NO_2^-无关, 但与HNO的浓度呈现良好的正相关性.

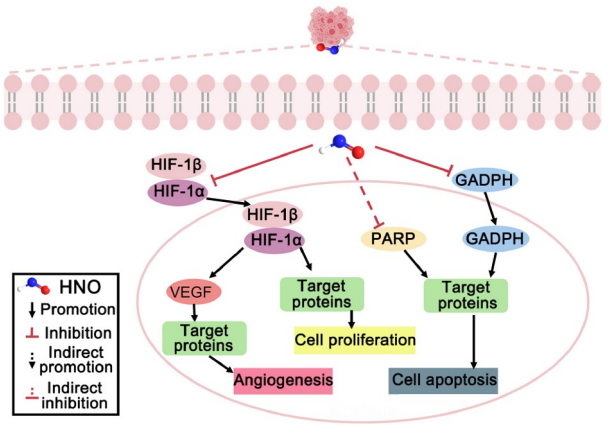


图 8　(网络版彩图) HNO在肿瘤细胞发挥抗肿瘤作用的三种通路[72]

Figure 8　(Color online) Three pathways of anti-tumor effect of HNO in tumor cells. Reproduced with permission from Ref. [72]. Copyright 2020, Mary Ann Liebert.

HNO作为神经保护剂的潜力在于其抗炎活性(图9). 2009年, 有研究表明HNO可以通过影响NMDA上的巯基去抑制钙离子内流以及兴奋性毒性[80], 但Choe等[81]的研究表明, 在小鼠脑缺血再灌注模型中, 与心脏保护作用相同剂量μM浓度的HNO会对神经系统造成伤害, 并且在血流灌注减少时神经毒性是加重的, 甚至通过激活TPRA1导致偏头痛[82]. 而Zhou等[79]利用100 μM Angeli's salt所释放的HNO作用于小胶质细胞中, 发现HNO与含有硫醇的IKKβ中的Cys-179相互作用, 确定了Cys-179是HNO抗炎活性的关键靶点之一, 并且表明HNO抑制了LPS所诱导的IkBα的磷酸化和降解, 从而抑制了p50、p65的活化以及核转移. LPS同时还可以激活p38-MAPK通路以发生炎症反应, 100 μM Angeli's salt所释放的HNO可以通过抑制p38-MAPK所介导的通路抑制炎症反应, 并且p38-MAPK抑制剂可以抑制p65的表达, 这表明p38-MAPK可以作为p65通路的上游激活剂. 小胶质细胞的活化是一系列神经炎症和神经退行性疾病的主要特征之一.

虽然HNO对神经系统的具体作用机制未能统一, 但通过治疗神经炎症从而治疗及延缓神经退行性疾病, HNO仍然展现出重要的治疗潜力.

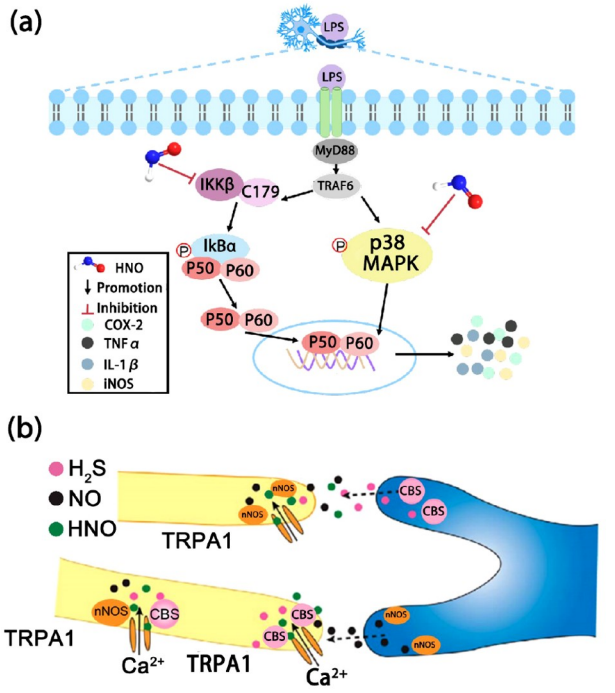


图 9 (网络版彩图) HNO在神经细胞中的作用. (a) HNO在小胶质细胞中抑制LPS引起的炎症. (b) HNO在神经元中激活TPRA1[82]

Figure 9 (Color online) Role of HNO in nerve cells. (a) HNO inhibits LPS-induced inflammation in microglia. (b) HNO activates TPRA1 in neurons. Reproduced with permission from Ref. [82]. Copyright 2014, Springer Nature.

5 总结与展望

HNO的化学来源主要还是通过Angeli's salt、Piloty's acid等供体的释放. Angeli's salt价格昂贵, 并且在研究HNO的生物效应时, 还需要排除供体释放的副产物对实验结果的影响. 新近报道的一种利用水自由基阳离子与N_2直接生成HNO的方法, 该方法更为温和、绿色、节能, 为产生高纯度HNO提供了新思路.

HNO的检测方法发展较快. 早期有气相顶空、气相色谱等方法, 主要通过检测HNO的二聚化脱水产物N_2O来判断HNO是否产生. 随后发展了高效液相色谱、电化学等方法, 对HNO及其与硫醇、金属蛋白等反应产生的特定产物或反应中产生的电流进行检测, 避免了非HNO二聚产生N_2O的影响, 提高了检测方法的抗干扰性能和结果的准确度. 但这些方法对于内源性产生HNO的检测灵敏度及检测限较为有限. 最近, 荧光探针技术被引入用于检测和成像细胞内的HNO, 这为研究其内源性产生机制提供了一种有力的检测途径, 尤其是荧光探针与质谱或EPR技术联用, 具有极高的灵敏度和选择性, 以及良好的发展前景.

HNO不仅能够舒张血管、收缩心肌, 还具有抑制血小板聚集的作用. HNO供体CXL-1020已经进入临床试验, 用于治疗心力衰竭. 因此, HNO的生物效应研究主要集中在心血管和肿瘤领域, 也涉及神经生物学领域, 并表现出较好的超过非甾体抗炎类药物本身的抗炎作用. 可见, 随着研究的深入, HNO的应用正展示出良好前景.

本文对HNO的来源、检测方法及应用进行了综述, 展现了近年来HNO的研究进展, 但在以下方面还存在一些挑战, 仍需要进一步研究.

(1) HNO的高效化学合成. 目前, 多数供体都是在液相中产生HNO, 同时需要考虑到反应环境的pH、氧气含量等条件因素, 以及副产物的毒副作用. 在气相中产生的HNO便于与其他产物进行分离, 但产率不佳, 限制了其在疾病治疗等领域的广泛应用. 因此, 未来研究应集中开发易分离产物且高产率产生HNO的合成方法, 如探索新的反应体系或在反应中加入易降解的催化剂, 以提高HNO的产量, 推动HNO在不同疾病治疗中的应用.

(2) HNO的原位检测及定量分析. HNO的高反应活性及短寿命的特性使离线检测以及定量分析的准确度有所降低. 因此, 未来研究应引入响应速度快、灵敏度高的原位检测方法, 或者将检测方法与成像技术相结合, 使HNO在生物体内的分布和动态变化更直观, 使内源性产生HNO的研究更加深入, 并精确量化HNO在药物治疗中的治疗指数.

(3) HNO在神经系统中的应用. 虽然HNO在治疗心力衰竭、癌症等方面具有广泛应用, 但在神经系统中的作用未能统一. 未来研究应明确HNO在神经系统中的生物活性, 以实现HNO的多靶标治疗, 或通过探究HNO与神经细胞膜以及特异性信号通路的相互作用去揭示HNO在神经系统中的生理作用.

参考文献

1 Svanas GW, Weiner H. *Biochem Pharmacol*, 1985, 34: 1197–1204

2 Wong PSY, Hyun J, Fukuto JM, Shirota FN, DeMaster EG, Shoeman DW, Nagasawa HT. *Biochemistry*, 1998, 37: 5362–5371
3 Fukuto JM, Gulati P, Nagasawa HT. *Biochem Pharmacol*, 1994, 47: 922–924
4 Kamynina A, Guttzeit S, Eaton P, Cuello F. *Hypertension*, 2022, 79: 946–956
5 Muniz Carvalho E, Silva Sousa EH, Bernardes-Génisson V, Gonzaga de França Lopes L. *Eur J Inorg Chem*, 2021, 2021: 4314
6 Sun HJ, Lee WT, Leng B, Wu ZY, Yang Y, Bian JS. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 32: 331–349
7 Felker GM, Borentain M, Cleland JG, DeSouza MM, Kessler PD, O′Connor CM, Seiffert D, Teerlink JR, Voors AA, McMurray JJV. *Eur J Heart Fail*, 2019, 21: 1022–1031
8 Felker GM, McMurray JJV, Cleland JG, O'Connor CM, Teerlink JR, Voors AA, Belohlavek J, Böhm M, Borentain M, Bueno H, Cole RT, DeSouza MM, Ezekowitz JA, Filippatos G, Lang NN, Kessler PD, Martinez FA, Mebazaa A, Metra M, Mosterd A, Pang PS, Ponikowski P, Sato N, Seiffert D, Ye J. *JACC Heart Fail*, 2021, 9: 146–157
9 Kemp-Harper B. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2021, 78: S13–S18
10 Bharadwaj V, Rahman MS, Sampson P, Seed AJ, Brasch NE. *J Org Chem*, 2021, 86: 16448–16463
11 Guo Q, Qian X, Chen J, Wu Y, Fu K, Sun Z, Zheng Z, Liu Y, Zhou Y. *Nitric Oxide*, 2023, 136-137: 24–32
12 Rahman MS. Synthesis and Photochemical Studies of New Photoactivatable Nitroxyl (HNO)-Releasing Compounds. 2019
13 Zhang X, Su R, Li J, Huang L, Yang W, Chingin K, Balabin R, Wang J, Zhang X, Zhu W, Huang K, Feng S, Chen H. *Nat Commun*, 2024, 15: 1535
14 DuMond JF, King SB. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14: 1637–1648
15 Stoyanovsky DA, Clancy R, Cederbaum AI. *J Am Chem Soc*, 1999, 121: 5093–5094
16 Zamora R, Grzesiok A, Weber H, Feelisch M. *Biochem J*, 1995, 312: 333–339
17 Miranda K, Nagasawa H, Toscano J. *CTMC*, 2005, 5: 649–664
18 Nourian S, Lesko RP, Guthrie DA, Toscano JP. *Tetrahedron*, 2016, 72: 6037–6042
19 Long Y, Xia Z, Rice AM, King SB. *Molecules*, 2022, 27: 5305
20 Rahman MS, Bharadwaj V, Lautaha AKHS, Sampson P, Brasch NE, Seed AJ. *Molecules*, 2024, 29: 3918
21 Smulik-Izydorczyk R, Rostkowski M, Gerbich A, Jarmoc D, Adamus J, Leszczyńska A, Michalski R, Marcinek A, Kramkowski K, Sikora A. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 661: 132–144
22 Pellicori P, Cleland JGF, Borentain M, Taubel J, Graham FJ, Khan J, Bruzzese D, Kessler P, McMurray JJV, Voors AA, O′Connor CM, Teerlink JR, Felker GM. *Eur J Heart Fail*, 2024, 26: 142–151
23 Teerlink JR, Diaz R, Felker GM, McMurray JJV, Metra M, Solomon SD, Adams KF, Anand I, Arias-Mendoza A, Biering-Sørensen T, Böhm M, Bonderman D, Cleland JGF, Corbalan R, Crespo-Leiro MG, Dahlström U, Echeverria LE, Fang JC, Filippatos G, Fonseca C, Goncalvesova E, Goudev AR, Howlett JG, Lanfear DE, Li J, Lund M, Macdonald P, Mareev V, Momomura S, O'Meara E, Parkhomenko A, Ponikowski P, Ramires FJA, Serpytis P, Sliwa K, Spinar J, Suter TM, Tomcsanyi J, Vandekerckhove H, Vinereanu D, Voors AA, Yilmaz MB, Zannad F, Sharpsten L, Legg JC, Varin C, Honarpour N, Abbasi SA, Malik FI, Kurtz CE. *N Engl J Med*, 2021, 384: 105–116
24 Vargas P, Doctorovich FA , Suarez SA. *Eur J Inorg Chem*, 2024, 27: e202482101
25 Adak S, Wang Q, Stuehr DJ. *J Biol Chem*, 2000, 275: 33554–33561
26 Schmidt HHHW, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 14492–14497
27 Ivanović-Burmazović I. 5-HNO generation from NO, nitrite, inorganic or organic nitrosyls, and crosstalk with H_2S. In: Doctorovich F, Farmer PJ, Marti MA, Eds. *The Chemistry and Biology of Nitroxyl (HNO)*. Boston: Elsevier, 2017. 67–104
28 Neuman NI, Venâncio MF, Rocha WR, Bikiel DE, Suárez SA, Doctorovich F. *Inorg Chem*, 2021, 60: 15997–16007
29 Peng S, Li Z, Zhang Y, Cao W, Liu J, Zhu W, Ye Y. *Sens Actuat B-Chem*, 2020, 317: 128211
30 Suarez SA, Vargas P, Doctorovich FA. *J Inorg Biochem*, 2021, 216: 111333
31 Yong QC, Hu LF, Wang S, Huang D, Bian JS. *Cardiovasc Res*, 2010, 88: 482–491
32 Arasimowicz-Jelonek M, Floryszak-Wieczorek J, Suarez S, Doctorovich F, Sobieszczuk-Nowicka E, Bruce King S, Milczarek G, Rębiś T, Gajewska J, Jagodzik P, Żywicki M. *Nat Plants*, 2023, 9: 36–44
33 Cline MR, Tu C, Silverman DN, Toscano JP. *Free Radical Biol Med*, 2011, 50: 1274–1279
34 Carrone G, Mazzeo A, Marceca E, Pellegrino J, Suárez S, Zarenkiewicz J, Toscano JP, Doctorovich F. *J Inorg Biochem*, 2021, 223: 111535
35 Song X, Basheer C, Xia Y, Zare RN. *Environ Sci Technol*, 2024, 58: 16196–16203

36 Donzelli S, Espey MG, Thomas DD, Mancardi D, Tocchetti CG, Ridnour LA, Paolocci N, King SB, Miranda KM, Lazzarino G, Fukuto JM, Wink DA. *Free Radical Biol Med*, 2006, 40: 1056–1066

37 Reisz JA, Zink CN, King SB. *J Am Chem Soc*, 2011, 133: 11675–11685

38 Saha S, Maity S, Mazumdar R, Samanta B, Ghosh R, Guha AK, Mondal B. *Inorg Chem*, 2023, 62: 17074–17082

39 Bobko AA, Ivanov A, Khramtsov VV. *Free Radical Res*, 2013, 47: 74–81

40 Liu W, Tao O, Chen L, Ling Y, Zeng M, Jin H, Jiang D. *RSC Adv*, 2022, 12: 15980–15985

41 Das A, Gao S, Lal RG, Hicks MH, Oyala PH, Arnold FH. *J Am Chem Soc*, 2024, 146: 20556–20562

42 Roncaroli F, Videla M, Slep LD, Olabe JA. *Coord Chem Rev*, 2007, 251: 1903–1930

43 Suárez SA, Bikiel DE, Wetzler DE, Martí MA, Doctorovich F. *Anal Chem*, 2013, 85: 10262–10269

44 Álvarez L, Suárez SA, González PJ, Brondino CD, Doctorovich F, Martí MA. *Inorg Chem*, 2020, 59: 7939–7952

45 Ma Q, Liu S, Xu J, Mao G, Wang G, Hou S, Ma Y, Lian Y. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2024, 323, 124876

46 Zhang CX, Xiang MH, Liu XJ, Wang F, Yu RQ, Jiang JH. *Talanta*, 2019, 193: 152–160

47 Zhang C, He F, Huang F, Xu J, Hu Y. *Dyes Pigm*, 2021, 185: 108889

48 Luo F, Ji Y, Zou Y, Zhao K, Liu L, Zhang S, Yang X, Zhang D, Ji X. *Chin J Inorg Anal Chem*, 2024, 14: 1527–1536 (in Chinese) [罗菲, 姬宇航, 邹杨帆, 赵康颐, 刘力菲, 张士怡, 杨晓朋, 张迪, 姬小明. 中国无机分析化学, 2024, 14: 1527–1536]

49 Maiti D, Islam ASM, Dutta A, Sasmal M, Prodhan C, Ali M. *Dalton Trans*, 2019, 48: 2760–2771

50 Islam ASM, Sasmal M, Maiti D, Dutta A, Ganguly S, Katarkar A, Gangopadhyay S, Ali M. *ACS Appl Bio Mater*, 2019, 2: 1944–1955

51 Liu W, Lan Z, Zou Y, Gan L, Jin H, Zeng M, Jiang D. *Chem Res*, 2023, 34: 217–224 (in Chinese) [刘文波, 兰紫君, 邹玉凤, 甘辽雷, 金洪光, 曾明, 姜登钊. 化学研究, 2023, 34: 217–224]

52 Cline MR, Toscano JP. *J Phys Org Chem*, 2011, 24: 993–998

53 Smulik-Izydorczyk R, Dębowska K, Pięta J, Michalski R, Marcinek A, Sikora A. *Free Radical Biol Med*, 2018, 128: 69–83

54 Pino NW, Davis III J, Yu Z, Chan J. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 18476–18479

55 Szala M, Modrzejewska J, Grzelakowska A, Kolińska J, Michalski R, Artelska A, Sikora A, Podsiadły R. *Dyes Pigm*, 2023, 210: 110996

56 An W, Ryan LS, Reeves AG, Bruemmer KJ, Mouhaffel L, Gerberich JL, Winters A, Mason RP, Lippert AR. *Angew Chem Int Ed*, 2019, 58: 1361–1365

57 Li C, Wang X, Zhu X, Liu J, Ye Y. *Anal Chim Acta*, 2024, 1330: 343265

58 Zhou H, Jin Y, Wang S, Wang Y, Bu M. *J Fluoresc*, 2024, doi: 10.1007/s10895-024-03637-5

59 Xie M, Chen M, Wei H, Wang T, Hu B, Yang T, Jiang Q, Xing P. *Sens Actuat B-Chem*, 2024, 418: 136310

60 Luo F, Zhang Y, Zhang S, Ji Y, Yan D, Lai M, Yang X, Zhang D, Ji X. *Spectrochim Acta Part A-Mol Biomol Spectr*, 2024, 321: 124672

61 Ma Q, Liu S, Xu J, Mao G, Wang G, Hou S, Ma Y, Lian Y. *Spectrochim Acta Part A-Mol Biomol Spectr*, 2024, 323: 124876

62 Liu C, Wang Y, Tang C, Liu F, Ma Z, Zhao Q, Wang Z, Zhu B, Zhang X. *J Mater Chem B*, 2017, 5: 3557–3564

63 Floryszak-Wieczorek J, Sobieszczuk-Nowicka E, Arasimowicz-Jelonek M. *Trends Biochem Sci*, 2023, 48: 748–750

64 Kosmachevskaya OV, Nasybullina EI, Pugachenko IS, Novikova NN, Topunov AF. *Antioxidants*, 2022, 11: 2007

65 Nikoo S. Computational Insights into Bio-Relevant Sulfur Chemistry. 2019

66 Favaloro JL, Kemp-Harper BK. *Am J Physiol-Heart Circulatory Physiol*, 2009, 296: H1274–H1280

67 Velagic A, Qin C, Woodman OL, Horowitz JD, Ritchie RH, Kemp-Harper BK. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 727

68 Keceli G, Majumdar A, Thorpe CN, Jun S, Tocchetti CG, Lee DI, Mahaney JE, Paolocci N, Toscano JP. *J Gen Physiol*, 2019, 151: 758–770

69 Irvine JC, Ritchie RH, Favaloro JL, Andrews KL, Widdop RE, Kemp-Harper BK. *Trends Pharmacol Sci*, 2008, 29: 601–608

70 Chin KY, Michel L, Qin CX, Cao N, Woodman OL, Ritchie RH. *Pharmacol Res*, 2016, 104: 165–175

71 Qin CX, Anthonisz J, Leo CH, Kahlberg N, Velagic A, Li M, Jap E, Woodman OL, Parry LJ, Horowitz JD, Kemp-Harper BK, Ritchie RH. *Antioxid Redox Signal*, 2020, 32: 60–77

72 Sun HJ, Wu ZY, Cao L, Zhu MY, Nie XW, Huang DJ, Sun MT, Bian JS. *Pharmacol Res*, 2020, 159: 104961

73 Velagic A, Li JC, Qin CX, Li M, Deo M, Marshall SA, Anderson D, Woodman OL, Horowitz JD, Kemp-Harper BK, Ritchie RH. *Br J Pharmacol*, 2022, 179: 4117–4135

74 Norris AJ, Sartippour MR, Lu M, Park T, Rao JY, Jackson MI, Fukuto JM, Brooks MN. *Intl J Cancer*, 2008, 122: 1905–1910

75 Sidorkina O, Espey MG, Miranda KM, Wink DA, Laval J. *Free Radical Biol Med*, 2003, 35: 1431–1438

76 Basudhar D, Bharadwaj G, Cheng RY, Jain S, Shi S, Heinecke JL, Holland RJ, Ridnour LA, Caceres VM, Spadari-Bratfisch RC, Paolocci N, Velázquez-Martínez CA, Wink DA, Miranda KM. *J Med Chem*, 2013, 56: 7804–7820
77 Huang Y, Zhang X, He N, Wang Y, Kang Q, Shen D, Yu F, Chen L. *J Mater Chem B*, 2019, 7: 305–313
78 Huang Z, Velázquez C, Abdellatif K, Chowdhury M, Jain S, Reisz J, DuMond J, King SB, Knaus E. *Org Biomol Chem*, 2010, 8: 4124
79 Zhou Y, Wu Z, Cao X, Ding L, Wen ZS, Bian JS. *Pharmacol Res*, 2016, 111: 885–895
80 Choe CU, Lewerenz J, Fischer G, Uliasz TF, Espey MG, Hummel FC, King SB, Schwedhelm E, Böger RH, Gerloff C, Hewett SJ, Magnus T, Donzelli S. *J Neurochem*, 2009, 110: 1766–1773
81 Choe CU, Lewerenz J, Gerloff C, Magnus T, Donzelli S. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14: 1699–1711
82 Eberhardt M, Dux M, Namer B, Miljkovic J, Cordasic N, Will C, Kichko TI, de la Roche J, Fischer M, Suárez SA, Bikiel D, Dorsch K, Leffler A, Babes A, Lampert A, Lennerz JK, Jacobi J, Martí MA, Doctorovich F, Högestätt ED, Zygmunt PM, Ivanovic-Burmazovic I, Messlinger K, Reeh P, Filipovic MR. *Nat Commun*, 2014, 5: 4381

Research on the source of nitric acid and its detection and medical application

Simin Liu, Xuan Gong, Tenggao Zhu, Shuxiang Yan, Manman Qin, Xuwen Chen, Huanwen Chen*

Jiangxi Province Key Laboratory for Diagnosis, Treatment, and Rehabilitation of Cancer in Chinese Medicine, Jiangxi University of Chinese Medicine, Jiangxi 330004, China
**Corresponding author (email: chw8868@gmail.com)*

Abstract: Azanone (HNO) is a nitrogen hydroxide with unique chemical properties and physiological functions. Due to its weak acidity (pK_a = 11.4), HNO exists in large quantities under physiological conditions. And because of its unique chemical properties, it can combine with a variety of life function molecules in the body, to play a physiological role. For example, the oxidation property of HNO oxidizes thiols in proteins and changes the protein structure, which is one of the mechanisms of HNO in the treatment of heart failure. On the other hand, the reducibility of HNO enables it to react with oxidized metal proteins in the body, thereby rapidly achieving the effect of vasodilation. Therefore, the unique molecular structure and chemical properties of HNO endow it with special physiological functions. With increasing attention to the physiological role of HNO, more and more research is devoted to the synthesis, detection and biomedical applications of HNO. In this paper, the source, detection and medical application of HNO are reviewed in combination with Water-nitrogen disproportionation produces HNO of our group, aiming to provide researchers with useful references on the production of endogenous HNO, the synthesis of exogenous HNO, the qualitative and quantitative detection of HNO *in vivo* and *in vitro*, and the physiological role of HNO.

Keywords: azanone, HNO synthesis, water-nitrogen disproportionation, HNO detection, HNO medical application

doi: 10.1360/SSC-2024-0293