

活性氧引起缺氧诱导因子 1 活化参与肺动脉高压血管重塑的分子机制

薛进华^{1,2} 叶超³ 毛露⁴ Dirk Hermann² 陈艾东^{2,3}

(1. 心脑血管疾病研究中心 赣南医学院, 江西 赣州 341000; 2. 神经生物学研究中心 杜伊斯堡-埃森大学, 德国埃森 45122; 3. 心血管疾病靶向干预重点实验室 南京医科大学, 江苏 南京 211166; 4. 东南大学附属中大医院 东南医科大学, 江苏 南京 210096)

【摘要】肺动脉高压的特点是血管收缩和血管平滑肌细胞增生, 导致肺动脉血管的病理性重塑。活性氧介导缺氧诱导因子 1 的活化, 通过一系列的下游细胞信号, 引起肺血管的异常调节, 造成管壁肥大和增厚, 在肺动脉高压的血管重塑中起关键作用。肺动脉高压时, 针对活性氧和缺氧诱导因子 1 的干预, 以调节氧化还原信号为中心的治疗方法, 有望成为本病治疗新的策略和重要靶点, 现就其做一详细阐述。

【关键词】肺动脉高压; 活性氧; 缺氧诱导因子 1; 血管重塑

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.08.015

Molecular Mechanism of Hypoxia-inducible Factor-1 Activation Induced by Reactive Oxygen Species in Vascular Remodeling of Pulmonary Hypertension

XUE Jinhua^{1,2}, YE Chao³, MAO Lu⁴, Dirk Hermann², CHEN Aidong^{2,3}

(1. Research Center for Cardiovascular and Cerebrovascular Diseases, Gannan Medical College, Ganzhou 341000, Jiangxi, China; 2. Center for Neurobiology, Duisburg-Essen University, Essen 45122, Germany; 3. Key Laboratory of Targeting Interventions for Cardiovascular Diseases, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, Jiangsu, China; 4. Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Southeast Medical University, Nanjing 210096, Jiangsu, China)

【Abstract】Pulmonary hypertension (PH) is characterized by vasoconstriction and proliferation of vascular smooth muscle cells, leading to pathological remodeling of pulmonary arteries. ROS mediates the activation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). Through a series of downstream cell signals, it causes abnormal regulation of pulmonary vessels, resulting in hypertrophy and thickening of the vessel wall, which plays a key role in the vascular remodeling of PH. For the intervention of ROS and HIF-1 in PH, the treatment method centering on the regulation of redox signal is expected to become a new strategy and an important target for the treatment of this disease. This paper will elaborate on these in detail.

【Key words】Pulmonary hypertension; Reactive oxygen species; Hypoxia inducible factor 1; Vascular remodeling

慢性缺氧导致肺血管平滑肌细胞增殖和管壁增厚, 导致肺动脉重塑, 进而造成血流阻力增加, 引起肺动脉高压 (pulmonary hypertension, PH)^[1]。这种现象会造成右心室压力超负荷, 可能引起右心功能衰竭, 这是 PH 死亡的主要原因^[2]。这一血管重塑过程由氧传感器启动, 该传感器感知血液中氧分压的降低, 然

后激活导致肺动脉收缩的细胞信号系统^[3]。最终, 通过血管壁的结构重塑使管腔持续变窄。在众多细胞信号中, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 介导缺氧诱导因子 1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 的激活^[4], 触发血管重塑, 在 PH 的病理生理学改变中起到至关重要的作用, 对 ROS 和 HIF-1 的干预, 有望成为

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31571168, 81571246); 国家公派留学基金 (20173059); 中国博士后基金 (2016M591750, 2017T100320)

通信作者: 陈艾东, E-mail: aidongchen@njmu.edu.cn

治疗 PH 的新靶点,本文就此做系统的阐述。

1 ROS 的重要来源

ROS 的产生是诱导 PH 的关键因素,其会造成线粒体结构和功能发生病理和病理生理学改变,细胞呼吸则是 ROS 的重要来源^[5]。研究发现在人和啮齿动物 PH 模型中,促进线粒体融合成长管状结构的分子调节因子(MFN-2)表达减少和线粒体生物发生的转录激活因子(PGC-1 α)下调,进而造成线粒体断裂^[6]。给啮齿 PH 动物注射腺病毒过表达 MFN-2,可增加线粒体融合,减少增殖,降低 PH 的严重性,并提高动物的运动能力。这些结果提示 MFN-2 和 PGC-1 α 的减少可能造成肺血管重塑,并间接证明线粒体来源的 ROS 在 PH 的病理生理学中可能起关键作用^[7]。

ROS 作为脯氨酰-4-羟化酶的激活剂,受 HIF-1 的激活,HIF-1 是触发血管重塑的重要条件。缺氧时,血管平滑肌细胞线粒体释放超氧阴离子,其从复合体Ⅲ到膜间空隙时,通过超氧化物歧化酶转化为 H₂O₂, H₂O₂ 进入胞浆并激活多种反应,促进血管平滑肌收缩和重塑^[8]。使用肺动脉细胞匀浆对缺氧驱动 ROS 生成机制研究发现,在缺氧过程中,ROS 生成增加,此效应可被还原型辅酶Ⅱ(NADPH)黄素蛋白抑制剂二苯亚碘抑制,而不被阻止电子进入复合体Ⅲ的线粒体抑制剂粘噻唑所阻断。研究表明缺氧状态下线粒体 ROS 信号控制基因转录^[9]。使用线粒体抑制剂、缺乏电子传递链的细胞和 ROS 荧光探针的研究发现,低氧需 HIF-1 α 转录因子亚单位的 ROS 依赖性稳定。缺氧造成 ROS 生成的具体机制尚不完全清楚,但有证据表明它们涉及复合体Ⅲ的氧化,这需细胞色素 C 的参与,并导致超氧阴离子的形成,进而由于电子梯度的作用,被喷射到线粒体膜间隙^[10]。事实上,当细胞色素 C 缺乏时,复合体Ⅲ显著减少,从而防止在缺氧状态下产生 ROS,并且不能稳定 HIF-1 α 。以上研究表明复合体Ⅲ在细胞缺氧时起关键作用。研究证明低氧时肺血管收缩,需通过复合体Ⅲ的电子传递,并且低氧会造成 ROS 生成的增加^[11]。

2 ROS 引起 HIF-1 活化

HIF-1 是一种高度保守的转录因子,几乎存在于所有类型的细胞中。它受到氧气供应的严格调控,并调节数百个基因的表达。HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 亚基组成的异源二聚体。HIF-1 β 组成性表达,而 HIF-1 α 在常氧条件下表达水平非常低。在这一背景下,HIF-1 α 蛋白通过蛋白酶体途径被泛素化和降解,

然而,肺动脉平滑肌细胞(pulmonary arterial smooth muscle cells, PASMCs)或内皮细胞对缺氧(1% O₂)的急性暴露导致 HIF-1 α 蛋白水平和 HIF-1 DNA 结合活性增加。因此,HIF-1 α 赋予 HIF-1 转录活性的敏感性和特异性^[12]。

在常氧下,HIF-1 与希佩尔林道蛋白相关,其招募 E3 泛素蛋白连接酶。希佩尔林道蛋白的结合依赖于高氧细胞中 HIF-1 402 和 564 位点的脯氨酸羟化^[13]。哺乳动物细胞中鉴定出三种脯氨酸羟化酶(prolyl hydroxylase, PHD),它们以氧依赖的方式羟化 402 和 564 位点的脯氨酸。这些蛋白质被称为 PHD1、PHD2 和 PHD3,是在其催化中心含有 Fe²⁺ 并利用 O₂ 和 α -酮戊二酸作为底物的双加氧酶超家族的成员。在随后的催化循环中,需用抗坏血酸将催化中心的 Fe³⁺ 还原为 Fe²⁺。在缺氧条件下,由于底物 O₂ 限制和/或通过线粒体产生 ROS 的增加,造成羟化酶活性的减少,这会氧化 Fe²⁺ 并使 PHD 失活。因此,缺氧可导致 PHD 失活和破坏 HIF-1 稳定性。重要的是,至少在急性期,ROS 的产生是缺氧过程中 PH 发生的关键步骤^[14]。

3 HIF-1 介导 PH

通过慢性缺氧对缺少 HIF-1 基因拷贝的杂合子小鼠的影响的研究取得重要进展,纯合子动物由于宫内致死而不能使用^[15]。与野生型对照动物相比,杂合 HIF-1 α 小鼠在慢性缺氧和减毒的右心室肥大反应中表现出肺血管重塑受损。这与血管平滑肌肥大程度较低、瞬时电位受体蛋白和 Na⁺-H⁺ 交换体亚型 1 的调节减弱,以及未能抑制慢性缺氧期间质膜 K1 通道的表达有关。最近,研究证明 HIF-1 是缺氧条件下肺动脉重塑的重要介质。他们还发现,平滑肌中 HIF-1 的功能不影响低氧性心脏重构;提示心肌肥大反应与肺动脉压力的增加无直接联系^[16]。这项发现改变了“血液动力学教条”,即右心室肥厚和最终衰竭完全依赖于肺血管阻力增加引起的压力超负荷,表明心室和血管重塑是不同和独立的过程。

4 HIF-1 引起血管壁重塑

慢性缺氧诱导内皮细胞和平滑肌细胞的功能和结构变化,以及构成肺动脉壁内膜、中膜和外膜的成纤维细胞增生,从而导致 PH。低氧对血管重塑的影响在 PASMCs 研究较多^[17]。急性缺氧导致细胞内钙的增加,在复氧时是可逆的。相反,慢性缺氧导致细胞内钙持续升高,即使在恢复到常氧后仍保持升高。

这种作用是由存储的 Ca^{2+} 通道介导的, Ca^{2+} 通道在慢性缺氧过程中因细胞内 Ca^{2+} 库耗尽而激活。这些通道由瞬时受体电位蛋白组成, 受 HIF-1 控制。事实上, 在非低氧条件下, 腺病毒编码组成型表达活性的 HIF-1 α 转染后, 增加瞬时受体电位蛋白 1 和 6 的表达^[18]。

缺氧抑制电压门控 K^{+} 通道的开放, 这有助于 PASMCs 去极化。在体内或体外进行慢性缺氧的 PASMCs, 这些通道的表达也减少, 并且这些基因表达的改变也是 HIF-1 α 依赖的。除了增加的内 Ca^{2+} , 慢性缺氧也导致 PASMCs 细胞内 pH 的增加, 这是由于 HIF-1 影响了 Na^{+} - H^{+} 交换体。 Ca^{2+} 和 pH 升高促进 PASMCs 肥大和增生信号转导, 导致肺小动脉的内壁增厚, 这是缺氧诱导的 PH 的病理机制^[19]。部分 HIF-1 α 表达不足的小鼠对 PH 的发展具有保护作用, 这表明抑制 HIF-1 可能对 PH 具有很好的治疗作用。这一假说被每日服用地高辛试验证实, 该药是一种已被用于治疗充血性心力衰竭和心律失常几十年的强心苷, 它抑制了 HIF-1 α 蛋白的合成。地高辛治疗可减轻右心室肥厚, 防止慢性缺氧大鼠肺血管重塑^[20]。

5 结论

在低压缺氧过程中, 在 NADPH 氧化酶的作用下 ROS 产生增加, 诱导和激活 HIF-1, 造成肺血管收缩和重塑。阐明 ROS 下游的信号通路及其病理生理机制, 将有助于 PH 新疗法的合理设计, 为临床治疗提供理论依据。笔者阐述了 ROS 在 PH 时激活 HIF-1, 通过一系列下游信号, 最终引起肺血管反应和重塑的分子机制, 并描述了可能的未来新的治疗靶标和研究目标, 给该领域的研究提供系统的参考。

参考文献

- [1] Marushchak M, Maksiv K, Krynytska I, et al. Glutathione antioxidant system of phocytes in the blood of patients in a setting of concomitant chronic obstructive pulmonary disease and arterial hypertension[J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2019, 47 (281): 177-182.
- [2] Zimmer A, Teixeira RB, Bonetto JHP, et al. Role of inflammation, oxidative stress, and autonomic nervous system activation during the development of right and left cardiac remodeling in experimental pulmonary arterial hypertension[J]. *Mol Cell Biochem*, 2020, 464 (1-2): 93-109.
- [3] Zhu N, Xiang Y, Zhao X, et al. Thymoquinone suppresses platelet-derived growth factor-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation, migration and neointimal formation[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23 (12): 8482-8492.
- [4] Yuan XM, Zhuan B, Li P, et al. Expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-reduced oxidase-4/reactive oxygen species and cystathionine- γ -lyase/hydrogen sulfide in patients with chronic obstructive pulmonary disease-related

- pulmonary hypertension[J]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*, 2019, 58 (10): 770-776.
- [5] 张国振, 何庆. 活性氧对高原性肺动脉高压的影响[J]. *心血管病学进展*, 2018, 39 (4): 576-579.
- [6] Marushchak M, Maksiv K, Krynytska I. The specific features of free radical oxidation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and arterial hypertension[J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2019, 47 (279): 95-98.
- [7] Barton M, Meyer MR, Prossnitz ER. Nox1 downregulators: a new class of therapeutics[J]. *Steroids*, 2019, 152 (108): 94-103.
- [8] Suresh K, Servinsky L, Jiang H, et al. Regulation of mitochondrial fragmentation in microvascular endothelial cells isolated from the SU5416/hypoxia model of pulmonary arterial hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 317 (5): L639-L652.
- [9] Daneva Z, Laubach VE, Sonkusare SK. Novel regulators and targets of redox signaling in pulmonary vasculature[J]. *Curr Opin Physiol*, 2019, 9 (4): 87-93.
- [10] Prasad K. AGE-RAGE stress in the pathophysiology of pulmonary hypertension and its treatment[J]. *Int J Angiol*, 2019, 28 (2): 71-79.
- [11] Wu YC, Wang WT, Lee SS, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist attenuates autophagy to ameliorate pulmonary arterial hypertension through Drp1/NOX- and Atg-5/Atg-7/Beclin-1/LC3 β pathways[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (14): 3435.
- [12] Allawzi A, Elajaili H, Redente EF, et al. Oxidative toxicology of bleomycin: role of the extracellular redox environment[J]. *Curr Opin Toxicol*, 2019, 13 (2): 68-73.
- [13] Meng Z, Li HY, Si CY, et al. Asiatic acid inhibits cardiac fibrosis through Nrf2/HO-1 and TGF- β 1/Smads signaling pathways in spontaneous hypertension rats[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105712.
- [14] Wu MM, Liang C, Yu XD, et al. Lovastatin attenuates hypertension induced by renal tubule-specific knockout of ATP-binding cassette transporter A1, by inhibiting epithelial sodium channels[J]. *Br J Pharmacol*, 2019, 176 (18): 3695-3711.
- [15] Zhu J, Kovacs L, Han W, et al. Reactive oxygen species-dependent calpain activation contributes to airway and pulmonary vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31 (12): 804-818.
- [16] Novelli EM, Little-Ihrig L, Knupp HE, et al. Vascular TSP1-CD47 signaling promotes sickle cell-associated arterial vasculopathy and pulmonary hypertension in mice[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 316 (6): L1150-L1164.
- [17] Sch JC, Suresh K, Shimoda LA. Regulation of smooth muscle cell proliferation by NADPH oxidases in pulmonary hypertension[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8 (3): 56.
- [18] de Jesus DS, DeVallance E, Li Y, et al. Nox1/Ref-1-mediated activation of CREB promotes Gremlin1-driven endothelial cell proliferation and migration[J]. *Redox Biol*, 2019, 22: 101138.
- [19] Truong L, Zheng YM, Wang YX. Mitochondrial Rieske iron-sulfur protein in pulmonary artery smooth muscle: a key primary signaling molecule in pulmonary hypertension[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 664: 68-75.
- [20] Qi L, Lv T, Cheng Y, et al. Fasudil dichloroacetate (FDCA), an orally available agent with potent therapeutic efficiency on monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension rats[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29 (14): 1812-1818.

收稿日期: 2020-01-24