doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2015.09.023

论著·实验研究

# eNOS 和 NADPH 氧化酶在慢性缺氧条件下 小鼠肺组织中表达关系的研究

#### 吴西玲 杜立中 徐雪峰

(浙江大学附属儿童医院呼吸科,浙江杭州 310003)

[摘要]目的 探讨 eNOS 和 NADPH 氧化酶在慢性缺氧条件下小鼠肺组织中表达的关系。方法 将野 生型及 eNOS 基因敲除的 C57BL/6 雄性小鼠各 30 只随机分为常氧组、低氧 7 d 组、低氧 21 d 组、治疗 7 d 组和 治疗 21 d 组,每种每组小鼠各 6 只。低氧和治疗组小鼠在 10% 氧浓度条件下进行饲养,治疗组小鼠饮水中加入 10 mmol/L 4-羟基 -2, 2, 6, 6-四甲基哌啶(TEMPOL)进行干预。比较各组小鼠肺小动脉重塑(MT%)及右心室 肥厚指标的变化;ELISA 法检测各组肺组织 ROS 浓度的变化;RT-PCR 法检测各组肺组织 NOX2、4 及 eNOS 基 因表达的变化。结果 野生型及基因敲除低氧组小鼠肺血管重塑及右心室肥厚指标较常氧组和治疗组均明显上 升(P<0.05),而治疗组和常氧组间比较差异无统计学意义(P>0.05)。野生型低氧及治疗组小鼠肺组织 ROS 浓度均低于常氧组(P<0.05),而低氧组和治疗组间比较差异无统计学意义(P>0.05)。野生型低氧组小鼠 eNOS、NOX2 和 NOX4 的 mRNA 表达较常氧组均显著上升(P<0.05),TEMPOL 干预可逆转上述指标的过度表达。基因敲除常氧组小鼠 NOX2 和 NOX4 mRNA 表达高于同组野生型小鼠(P<0.05);慢性缺氧后 NOX4 mRNA 表达较常氧组显著下降(P<0.05);治疗组 NOX2 mRNA 表达较低氧组进一步下降,而 NOX4 mRNA 表达较低氧组明显上升(P<0.05)。结论 eNOS 是低氧条件下 NOX2、4 表达的重要调控因素, eNOS 和 NOX 在低氧性肺血管重塑过程中可能有着重要的联系。

[中国当代儿科杂志,2015,17(9):1001-1006] [关键词] 内皮型一氧化氮合酶; NADPH 氧化酶 2; NADPH 氧化酶 4; 4-羟基 -2, 2, 6, 6-四甲基哌啶; 反应性氧化物;小鼠

# Relationship between expression of endothelial nitric oxide synthase and NADPH oxidase in lungs of mice exposed to chronic hypoxia

WU Xi-Ling, DU Li-Zhong, XU Xue-Feng. Department of Respiratory Disease, Children's Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, China (Du L-Z, Email: dulizhong@zju.edu.cn)

**Abstract: Objective** To explore the relationship between the expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and NADPH oxidase (NOX) in the lungs of mice treated by chronic hypoxic exposure. **Methods** Thirty male wild-type (WT) C57BI/6 mice and thirty male eNOS-knockout (KO) C57BL/6 mice were randomly divided into normoxic groups (exposed to normoxia for 7 days or 21 days), hypoxic groups (exposed to 10% oxygen for 7 days or 21 days), and treatment groups (exposed to 10% oxygen and orally administrated 10 mmol/L 4-hydroxy TEMPO in drinking water for 7 days or 21 days) (*n*=6 in each group). The remodeling of the small pulmonary arteries was evaluated by the percentage of media wall thickness (MT%). The weight ratio of right ventricle to left ventricle plus septum (RV/[LV+S]) was calculated to evaluate the hypertrophy of right ventricle. Real-time PCR was used to measure the mRNA expression of NOX2, NOX4, and eNOS in mouse lungs. ELISA was used to determine the concentration of reactive oxygen species (ROS) in mouse lungs. **Results** In WT mice and KO mice, the hypoxic groups had significantly increased pulmonary vascular remodeling and RV/[LV+S] compared with the normoxic and treatment groups (*P*<0.05), but there were no

<sup>[</sup>收稿日期] 2014-12-11; [接受日期] 2015-02-13

<sup>[</sup>基金项目]浙江省教育厅课题(Y201017396)。

<sup>[</sup>作者简介] 吴西玲, 女, 博士, 副主任医师。

<sup>[</sup>通信作者]杜立中,男,教授。

significant differences between the normoxic and treatment groups (P>0.05). In WT mice, the hypoxic and treatment groups had significantly lower ROS concentrations than the normoxic group (P<0.05), but there were no significant differences between the hypoxic and treatment groups (P>0.05). In WT mice, the mRNA expression of eNOS, NOX2, and NOX4 was significantly higher in the hypoxic group than in the normoxic group (P<0.05), and 4-hydroxy TEMPO reversed their over-expression. In the normoxic group, the KO mice had significantly higher NOX2 and NOX4 mRNA expression than the WT mice (P<0.05); in KO mice, the hypoxic group showed no significant changes in NOX4 mRNA expression (P>0.05), but had significantly reduced NOX2 mRNA expression (P<0.05), as compared with the normoxic group. **Conclusions** eNOS plays a key role in the regulation of expression of NOX2 and NOX4 in the lungs exposed to hypoxia. It suggests that NOX and eNOS may physically interact with one another in pulmonary vascular remodeling induced by chronic hypoxia.

#### [Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(9): 1001-1006]

**Key words:** Endothelial nitric oxide synthase; NADPH oxidase 2; NADPH oxidase 4; 4-hydroxy TEMPO; Reactive oxygen species; Mice

慢性缺氧引起的肺血管收缩和血管重塑是肺 动脉高压的主要病理基础,肺动脉高压的形成和体 内氧化还原失衡有关<sup>[1-2]</sup>。缺氧使得机体处于氧化 应激状态,活性氧簇(reactive oxygen species, ROS) 大量产生。研究表明 ROS 是低氧性肺血管收缩及 重塑的重要上游信号分子。各种类型的细胞都可生 成 ROS,包括内皮细胞、平滑肌细胞及外膜细胞 等<sup>[3-4]</sup>。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamideadenine dinucleotide phosphate, NADPH) 氧化酶, 简 称 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase, NOX) 是血管 内 ROS 生成的最主要酶体,也是体内重要的氧感 受器<sup>[5-6]</sup>。近年来非吞噬细胞 NOX 的研究受到重视, 在不同种类细胞中发现一系列 NOX 催化亚单位, 目前认为它参与了多种病理生理过程。Li等<sup>17</sup>发 现 NOX4 在低氧性肺动脉高压形成过程中起到了重 要的作用。多项实验表明 NOX2 和 NOX4 参与了低 氧性肺血管收缩和重塑<sup>[8-9]</sup>。

内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)也可参与 ROS 的生成,在氧化应 激状态下, eNOS 功能出现异常,合成的终产物为 ROS 非 NO,而且 ROS 可降低 NO 的生物学活性, 从而加剧内皮功能的异常<sup>[10]</sup>。Dikalova 等<sup>[11]</sup>发现 eNOS 和 NOX 之间有着重要的关联。NOX 活化导 致 ROS 的过度生成, ROS 可抑制 eNOS 合成 NO 而是生成更多的过氧化离子,从而推测 eNOS 和 NOX 之间存在平衡制约关系。目前关于 eNOS 在 低氧性肺动脉高压过程中对 NOX 的调节作用,尤 其是体内 NO 缺乏情况下 NOX 表达及 ROS 的变化 尚无研究。

4- 羟基 -2, 2, 6, 6- 四甲基哌啶(TEMPOL)是 一种膜通透性的超氧化物歧化酶,可以直接清除 机体内的活性氧并能选择性降低肺动脉高压<sup>[12]</sup>。 本研究利用它的这一特性,研究了野生型及 eNOS 基因敲除小鼠在慢性缺氧条件下及 TEMPOL 干预 后 NOX2 和 NOX4 mRNA 表达及肺组织 ROS 浓度 的变化。

# 1 材料与方法

# 1.1 实验动物及分组

清洁级健康成年雄性 C57BL/6 小鼠购自浙江 大学医学院动物中心, eNOS 基因敲除健康成年雄 性 C57BL/6 小鼠购自美国 Jackson 实验室(编号 002684)。基因敲除小鼠实验前进行了基因验证。 两种小鼠各挑选 30 只,体重 18~22 g,随机分成 5组,每组每种小鼠各6只。(1)常氧组:将 成年 C57BL/6 小鼠置于自行设计的密封有机玻 璃箱中,维持FiO,在21%左右,21d后处死。 (2) 低氧组:将成年 C57BL/6 小鼠置于 FiO<sub>2</sub> 为 10% 左右的密封有机玻璃箱中饲养7d(低氧7d 组)或21d(低氧21d组)后处死。(3)低氧+ 治疗组:成年C57BL/6小鼠在FiO,为10%左右 的密封有机玻璃箱中饲养,在其饮用水中加入 TEMPOL(10 mmol/L)干预7d(治疗7d组)或 21d(治疗21d组)后处死。饲养过程保持箱内 温度 25~27℃,湿度 50%~70%,每3d 开箱半小 时更换水、食物及垫料。

#### 1.2 肺组织分离及右心室肥厚指标测定

各组小鼠放血处死后,分离肺组织,用生理 盐水进行肺动脉灌洗,直到流出液转清,其左肺 置于液氮中,-80℃保存,用于实时荧光定量多重 聚合酶链反应(RT-PCR)检测;右肺用4%多聚 甲醛固定后,石蜡包埋,用于免疫组化及苏木精-伊红(HE)染色。剪去心房和游离的大血管,沿 着房室间隔剪下右心室壁,分别称量右心室(RV)、 左心室(LV)和室间隔(S)的重量,结果以 RV/(LV+S)表示。

# 1.3 免疫组化法检测肺血管重塑

各组肺组织标本用 SMA 抗体免疫标记后,应 用 Image Pro Plus 对肺组织切片中内弹力层清晰、 平滑肌层完整、形状较规则且直径在 80~120 μm 之间的肺细小动脉膜厚度和管腔直径进行测定, 用血管中膜的厚度与管腔直径的比值 MT% 评价血 管重塑情况。每只小鼠留取 3 张切片,每张切片 随机选取 3~5 个视野,每个视野选择 3~5 个血管。

### 1.4 肺组织 ROS 浓度的测定

取肺组织约 0.1 g, 以 1:20(重量体积比)的 比例加入冰冷的 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液(pH 7.4), 用玻璃匀浆器在 0~4℃下制成匀浆液,将匀浆液 在 4℃下以 1000 g 离心 10 min 后取上清液;加入 1 mmol/L DCFH-DA,混匀,置于酶标仪中 37℃温 浴 30 min,以 485 nm 波长为激发光,于 53 nm 波 长处测荧光强度(OD)值。

# 1.5 RT-PCR 检 测 NOX2、NOX4 及 eNOS 的 mRNA 表达

采用 AXYPrep 总 RNA 小量制备试剂盒抽提 肺组织总 RNA,应用宝生物公司反转录试剂盒逆 转录为 cDNA,引物序列设计见表 1。用荧光定量 PCR 检测 NOX2、4 和 eNOS 的 mRNA 表达量。 PCR 反应体系: CDNA 模板 2  $\mu$ L,上下游引物各 0.5  $\mu$ L, SYBR Premix Ex TaqTM II 12.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足体积至 25  $\mu$ L。PCR 反应条件: 94℃预变性 10 s; 94℃变性 15 s, 60℃退火 50 s, 重复40个循环。

目的/内 参基因	引物序列 (5'→3')	片段长度 (bp)
eNOS	上游:GGCAAGACAGACTACACGAC	275
	下游: ATCGCCGCAGACAAACAT	
NOX2	上游:AAGGTATCCAAGTTAGAATGGCACA	185
	下游: CCAAAGGGTCCATCAACTGCT	
NOX4	上游: ATTTGGATAGGCTCCAGGCAAAC	155
	下游: CACATGGGTATAAGCTTTGTGAGCA	
β-actin	上游: TGACAGGATGCAGAAGGAGA	131
	下游: GCTGGAAGGTGGACAGTGAG	

#### 表 1 引物序列设计

设定在每个循环的退火期结束后程序自动记录该 循环的荧光值,以表示在该循环结束时 PCR 产物 的量。某样本目的基因 mRNA 的表达量以 △ Ct 表示, △ Ct=Ct(目的基因) – Ct(内参基因), △ Ct 越小,该样本目的基因 mRNA 的表达量越大。

# 1.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计学分析,计量资料采用均数 ± 标准差(x±s)表示, 多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较 采用 SNK-q 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

# 2 结果

#### 2.1 各组肺血管重塑及右心室肥厚指标的变化

各组野生型小鼠 MT% 比较差异有统计学意 义(F=15.16, P<0.01);其中低氧21d组 MT% (24.9±4.0)明显高于常氧组(14.3±1.3)和治疗 21d组(23.2±4.6)(P<0.05);常氧组和治疗 21d组比较差异无统计学意义(P>0.05)。各组基 因敲除小鼠 MT% 比较差异有统计学意义(F=9.41, P<0.01);其中低氧21d组 MT%(23.3±4.4) 显著高于常氧组(15.4±2.0)和治疗21d组 (22.6±3.6)(P<0.05);常氧组和治疗21d组 比较差异无统计学意义(P>0.05)。见图 1。

各组野生型小鼠 RV/(LV+S)比值比较差异 有统计学意义(F=29.14, P<0.01);其中低氧 21 d 组 RV/(LV+S)比值(0.353±0.036)明显高于常 氧组(0.246±0.026)和治疗 21 d组(0.267±0.038) (P<0.01);常氧组和治疗 21 d组比较差异无统计 学意义(P>0.05)。各组基因敲除小鼠 RV/(LV+S) 比值比较差异有统计学意义(F=16.42, P<0.01), 其中低氧 21 d组 RV/(LV+S)比值(0.379±0.039) 高于常氧组(0.233±0.022)和治疗 21 d组(0.302± 0.033)(P<0.01);常氧组和治疗 21 d组比较差 异无统计学意义(P>0.05)。见图 2。

#### 2.2 各组肺组织 ROS 浓度的变化

野生型小鼠各组肺组织 ROS 的浓度比较差 异有统计学意义(F=42.4, P<0.01);其中低 氧 21 d 组(264±97 u)和治疗 21 d 组 ROS 浓度 (201±106 u)与常氧组(1000±290 u)比较均 明显下降(P<0.01),治疗 21 d 组与低氧 21 d 组 ROS 浓度比较差异无统计学意义(P>0.05)。基

第17卷第9期	中国当代儿科杂志	Vol.17 No.9
2015年9月	Chin J Contemp Pediatr	Sep. 2015

因敲除小鼠常氧组 ROS 的浓度(688±262u)与同组野生型小鼠比较显著下降(P<0.05)。基因敲

除小鼠各组肺组织 ROS 浓度比较差异无统计学意义(F=3.05, P=0.077)。见图 3。



**图 1 野生型和基因敲除小鼠缺氧及治疗后肺血管重塑情况**(α-SMA 免疫组化, ×400) 标色染色表示 α-SMA 染色阳性,可反映血管中膜厚度;蓝色染色代表细胞核。

# 2.3 各组肺组织 NOX2、 NOX4 和 eNOS mRNA 的表达

野生型小鼠各组 NOX2 mRNA 的表达差异有 统计学意义(P<0.01),其中低氧组 NOX2 mRNA 的表达水平明显高于常氧组(P<0.01);治疗 7 d组 NOX2 mRNA 的表达水平低于低氧 7 d组 (P<0.01)。野生型小鼠各组 NOX4 mRNA 的表达 差异有统计学意义(P<0.01),其中低氧组 NOX4 mRNA 的表达水平高于常氧组(P<0.01);治疗 7 d组和治疗 21 d组 NOX4 mRNA 的表达水平分别 低于低氧 7 d组和低氧 21 d组(P<0.05)。野生 型小鼠各组 eNOS mRNA 的表达差异有统计学意义 (P<0.01),其中低氧组 eNOS mRNA 的表达水平 高于常氧组(P<0.01);治疗 7 d组 eNOS mRNA 的表达水平低于低氧 7 d组(P<0.01)。见表 2。

基因敲除小鼠各组 NOX2 mRNA 的表达差 异有统计学意义(P<0.01),其中常氧组 NOX2 mRNA 表达水平显著高于低氧组和同组野生型小 鼠(P<0.01);治疗 21 d 组 NOX2 mRNA 的表达 水平低于低氧 21 d 组(P<0.05)。基因敲除小鼠 各组 NOX4 mRNA 的表达水平差异有统计学意义 (P<0.05),其中常氧组 NOX4 mRNA 表达水平显 著高于同组野生型小鼠(P<0.05);治疗 7 d 组和 治疗 21 d 组 NOX4 mRNA 的表达水平分别较低氧 7 d 组和低氧 21 d 组显著上升(P<0.05)。见表 2。



**图 2 野生型和基因敲除小鼠缺氧及治疗后右心室肥 厚指标的变化** RV: 右心室; LV: 左心室; S: 室间隔; a示 与同种小鼠常氧组比较, *P*<0.01, b示与同种小鼠低氧 21 d 组比较, *P*<0.01。



图 3 野生型和基因敲除小鼠缺氧及治疗后肺组织 ROS浓度的变化 a示与同种小鼠常氧组比较, P<0.01, b示 与同组野生型小鼠比较, P<0.05。

·				(,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	
<b>2日</b> 見止	野生型小鼠			eNOS 基因敲除小鼠	
组加	NOX2	NOX4	eNOS	NOX2	NOX4
常氧组	$16.31 \pm 1.04$	$10.00\pm0.35$	$9.12 \pm 1.02$	$13.40\pm0.60^{\rm d}$	$9.40\pm0.46^{\rm d}$
低氧7d组	$14.25 \pm 0.82^{\circ}$	$9.23 \pm 0.17^{a}$	$8.34 \pm 0.36^{a}$	$14.26 \pm 0.50^{a}$	$9.77 \pm 0.43$
低氧 21 d 组	$13.40 \pm 0.59^{\circ}$	$8.45 \pm 0.47^{\circ}$	$7.23 \pm 0.25^{a}$	$14.50\pm0.47^{\rm a}$	$9.59 \pm 0.45$
治疗7d组	$16.35 \pm 0.81^{\rm b}$	$9.93 \pm 0.44^{\mathrm{b}}$	$9.23 \pm 0.61^{\rm b}$	$14.40 \pm 1.06$	$9.23\pm0.96^{\rm b}$
治疗 21 d 组	$12.69 \pm 0.65$	$9.23 \pm 0.55^{\circ}$	$7.58 \pm 0.69$	$15.85 \pm 0.78^{\circ}$	$8.68 \pm 0.31^{\circ}$
F 值	26.67	14.16	11.52	7.25	3.52
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.02

表 2 各小组肺组织 NOX2、 NOX4 和 eNOS mRNA 的表达  $(n=6, \bar{x}\pm s)$ 

注: a示与同种小鼠常氧组比较, P<0.01; b示与同种小鼠低氧 7 d 组比较, P<0.05; c示与同种小鼠低氧 21 d 组比较, P<0.05; d示 与同组野生型小鼠比较, P<0.05。

# 3 讨论

本实验中结果发现野生型和 eNOS 基因敲除 小鼠慢性缺氧可导致肺血管重塑及右心室肥厚, TEMPOL 干预可部分逆转上述改变。NOX 是肺血 管 ROS 的主要来源。Liu 等<sup>[13]</sup> 发现 NOX2 基因敲 除的小鼠缺氧后肺血管重塑情况比野生型小鼠轻。 Mittal 等<sup>[14]</sup> 发现 NOX 蛋白家族中 NOX4 在小鼠肺 组织中的表达最高。小鼠慢性缺氧后肺组织 NOX4 mRNA 和蛋白的表达随着缺氧时间的延长逐步升 高,与慢性缺氧肺血管重塑的发展过程一致<sup>[15]</sup>。 NOX4 在人肺动脉平滑肌细胞中广泛表达, 肺动 脉高压患者肺组织 NOX4 基因及蛋白表达明显高 于正常人群<sup>[16]</sup>。这和本实验结果一致。本实验结 果中发现缺氧可诱导野生型小鼠肺组织 NOX2 和 NOX4 mRNA 的过度表达,且随缺氧时间的延长 逐步增加,提示缺氧后机体一直处于氧化应激状 态。从这一途径而言,体内 ROS 的含量应该明显 增加。但是由于整个机体内 ROS 浓度与局部组织 中的 ROS 含量并不一致,所以缺氧后肺组织 ROS 的含量是上升还是下降一直有争议<sup>[17]</sup>。本实验中 结果发现野生型小鼠缺氧后肺组织 ROS 的含量下 降,这与 NOX 的表达趋势相反。对于这个矛盾的 结果,我们认为首先 NOX 基因表达上升和其 NOX 活性上升并不一致;其次,NOX 仅仅是 ROS 的主 要来源之一;此外, ROS 的浓度不仅和 ROS 的合 成有关,还和它的清除密切相关。目前研究认为 NOX 和 eNOS 之间有着密切的关系, NOX 来源的 ROS 会导致 NOS "uncoupling",使得其活性改变。 Sanchez 等<sup>[18]</sup> 报道下调 NOX 的表达,会增加 eNOS 的活性,降低血管压力。本研究首次研究在 NO 缺乏的情况下且缺氧条件下 NOX 和 ROS 的变化。在基因敲除的小鼠中,肺组织 NOX2 mRNA 的表达明显高于野生型,NOX4 mRNA 的表达略高于野生型小鼠;肺组织 ROS 的浓度比野生型小鼠低。我们推测在体内 eNOS 来源的 NO 缺乏情况下,体内 NO 及 NOX 的 ROS 之间的平衡被破坏,推测 eNOS 对 NOX 的表达有一定的抑制作用。基因敲除小鼠缺氧后 NOX2 mRNA 的表达下降而 NOX4 mRNA 及肺内 ROS 的浓度无明显变化,因此 eNOS 可能是 NOX 家族中 NOX2 基因表达的重要调控因素,或者两者之间的表达存在某种负反馈机制。所以,对于基因敲除小鼠,NOX2 在肺动脉形成过程中起到了更重要的作用,低氧性肺血管重塑也可能是通过其他途径实现的。

研究表明 ROS 是低氧性肺血管收缩及重塑的上游信号分子,在低氧早期,它是肺血管重塑的级联反应的起始分子。Victor等<sup>[19]</sup>发现缺氧早期基因敲除小鼠肺小血管肌化程度明显少于野生型小鼠。我们认为这一改变和 NOX2、4 的表达下降有关。文献表明 TEMPOL 可降低细胞内 ROS的浓度,选择性降低肺动脉压力。本研究结果发现 TEMPOL 除了清除体内过度生成的 ROS,还可以降低 NOX2 和 NOX4 的基因表达,这个作用在缺氧早期更明显。实验结果发现 eNOS 的变化和 NOX 的变化相一致,因此推测两者的表达是相互制约的。对于基因敲除小鼠,TEMPOL 干预可降低 RV/(LV+S)的比值。这和 Hodyc 等<sup>[20]</sup>研究小组的结果相吻合。但确切的机制尚不清楚。

本研究认为低氧条件下小鼠肺组织 eNOS 和

NOX2、4的基因表达之间有着重要的关联, eNOS 对 NOX 的表达有重要的调节作用。由于本实验仅 在基因水平做了探讨,关于以上分子的蛋白质的 表达及酶活性尚待进一步研究。

#### 致谢:

感谢浙江大学附属儿童医院内科实验室沈征、 舒小丽对本实验的帮助。

#### [参考文献]

- Paulin R, Michelakis ED. The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension[J]. Circ Res, 2014, 115(1): 148-164.
- [2] 齐建光, 邢长青, 丁亚光, 等.肾上腺髓质素缓解低氧性肺动脉高压大鼠肺动脉中胶原堆积的研究[J].中国当代儿科杂志, 2012, 14(1): 54-58.
- [3] Aggarwal S, Gross CM, Sharma S, et al. Reactive oxygen species in pulmonary vascular remodeling[J]. Compr Physiol, 2013, 3(3): 1011-1034.
- [4] MacKay CE, Knock GA. Control of vascular smooth muscle function by Src-family kinases and reactive oxygen species in health and disease[J]. J Physiol, 2014. [Epub ahead of print].
- [5] Schulz R, Murzabekova G, Egemnazarov B, et al. Arterial hypertension in a murine model of sleep apnea: role of NADPH oxidase 2[J]. J Hypertens, 2014, 32(2): 300-305.
- [6] Chen F, Barman S, Yu Y, et al. Caveolin-1 is a negative regulator of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 73: 201-213.
- [7] Li S, Tabar SS, Malec V, et al. NOX4 regulates ROS levels under normoxic and hypoxic conditions, triggers proliferation, and inhibits apoptosis in pulmonary artery adventitial fibroblasts[J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(10): 1687-1698.
- [8] Frazziano G, Al Ghouleh I, Baust J, et al. Nox-derived ROS are acutely activated in pressure overload pulmonary hypertension: indications for a seminal role for mitochondrial Nox4[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 306(2): H197-H205.
- [9] Norton CE, Broughton BR, Jernigan NL, et al. Enhanced depolarization-induced pulmonary vasoconstriction following chronic hypoxia requires EGFR-dependent activation of NAD(P)H oxidase 2[J]. Antioxid Redox Signal, 2013, 18(14): 1777-1788.

- [10] Harrison IP, Selemidis S. Understanding the biology of reactive oxygen species and their link to cancer: NADPH oxidases as novel pharmacological targets[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2014, 41(8): 533-542.
- [11] Dikalova AE, Góngora MC, Harrison DG, et al. Upregulation of Nox1 in vascular smooth muscle leads to impaired endotheliumdependent relaxation via eNOS uncoupling[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2010, 299(3): H673-H679.
- [12] Rashid M, Kotwani A, Fahim M. Long-acting phosphodiesterase 5 inhibitor, tadalafil, and superoxide dismutase mimetic, tempol, protect against acute hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats[J]. Hum Exp Toxicol, 2012, 31(6): 626-636.
- [13] Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, et al. Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox)[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006, 290(1): L2-L10.
- [14] Mittal M, Gu XQ, Pak O, et al. Hypoxia induces Kv channel current inhibition by increased NADPH oxidase-derived reactive oxygen species[J]. Free Radic Biol Med, 2012, 52(6): 1033-1042.
- [15] Barman SA, Chen F, Su Y, et al. NADPH oxidase 4 is expressed in pulmonary artery adventitia and contributes to hypertensive vascular remodeling[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(8): 1704-1715.
- [16] Lu X, Murphy TC, Nanes MS, et al. PPAR {gamma} regulates hypoxia-induced Nox4 expression in human pulmonary artery smooth muscle cells through NF-{kappa}B[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010, 299(4): L559-L566.
- [17] Fuchs B, Sommer N, Dietrich A, et al. Redox signaling and reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2010, 174(3): 282-291.
- [18] Sanchez M, Galisteo M, Vera R, et al. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats[J]. J Hypertens, 2006, 24(1): 75-84.
- [19] Victor VM, Nuñez C, D'Ocón P, et al. Regulation of oxygen distribution in tissues by endothelial nitric oxide[J]. Circ Res, 2009, 104(10): 1178-1183.
- [20] Hodyc D, Snorek M, Brtnicky T, et al. Superoxide dismutase mimetic tempol inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats independently of nitric oxide production[J]. Exp Physiol, 2007, 92(5): 945-951.

(本文编辑: 万静)