

· 综述 ·

活性氧在新生儿持续性肺动脉高压中的作用

徐雪峰 综述 杜立中 审校

(浙江大学医学院附属儿童医院, 杭州 310003)

[中图分类号] R722.1 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2010)11-0930-04

新生儿持续性肺动脉高压(persistent pulmonary hypertension of the newborn, PPHN)是指生后肺血管阻力持续性增高,肺动脉压超过体循环动脉压使由胎儿型循环过渡至正常“成人”型循环发生障碍,导致卵圆孔及(或)动脉导管水平血液的右向左分流,临床表现为严重的低氧血症,多见于足月儿及过期产儿^[1-3]。PPHN是新生儿重症监护室的一个重要的临床问题,它在新生儿中的发病率可高达7/1 000^[3]。机械通气、吸入一氧化氮(nitric oxide, NO)以及体外膜肺氧合等治疗措施虽然改善了PPHN的预后,但死亡率仍然较高。PPHN的发病机制已经从肺动脉内皮细胞和平滑肌细胞水平进行了研究,但确切的机制尚未完全阐明^[1]。随着活性氧(reactive oxygen species, ROS)在心血管疾病中研究的深入,许多临床和实验研究揭示了PPHN的发生与ROS密切相关^[4-6],而且进一步研究揭示了抗氧化治疗对PPHN的保护作用^[7]。本文将对ROS在PPHN中的研究作一综述。

1 肺血管中的ROS

1.1 肺血管ROS的来源

ROS是体内一类含氧的单电子还原产物,是电子在未能传递到末端氧化酶之前漏出呼吸链而生成的,主要包括超氧阴离子自由基(O_2^-)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)以及活性氮族(包括NO、NOOH)^[8-9]。ROS不仅在生物大分子如脂质、蛋白质、DNA等氧化损伤中起着重要作用,而且也参与细胞信号传导与调控^[10]。

所有肺血管细胞类型,包括内皮细胞、平滑肌细胞、外膜成纤维细胞等都能产生ROS,并且主要由

细胞膜相关的NADPH氧化酶催化生成^[8]。NADPH氧化酶首先发现于吞噬细胞,当受到激素、细胞因子、细菌等刺激后可以产生大量的ROS,从而构成机体天然的防御屏障,但这些酶通常是静止的。在血管的非吞噬细胞中,ROS主要来源于NADPH氧化酶。与吞噬细胞不同,非吞噬细胞的NADPH氧化酶在没有刺激时也有持续的低水平表达,而它产生的ROS不会达到有高爆发活性的吞噬细胞所产生的ROS的水平^[8,11]。而且,由NADPH氧化酶同源物NOX所产生的ROS不主要起细胞防御功能,而是作为第二信使参与细胞分化、增殖、凋亡的调节^[12-13]。

另一个能产生ROS的酶是一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)。NOS在正常情况下主要与NO的形成相关,但在底物精氨酸或共因子四氢生物蝶呤(BH4)缺少、BH2增加、或与热休克蛋白-90(heat shock protein, HSP-90)之间的相互作用失衡时也能产生 O_2^- ,这种现象又被称为NOS脱偶联作用(NOS uncoupling)^[14-15]。NOS脱偶联所产生的 O_2^- 与高血压的发病密切相关;而来源于NADPH氧化酶所产生 O_2^- 可以增强ROS的生物活性,引起BH4的氧化,导致NOS的脱偶联,进一步诱导ROS的产生。黄嘌呤氧化酶、细胞色素P450、髓过氧化物酶等也参与ROS的产生,但与NADPH氧化酶相比,它们的作用较小。同时,细胞内亦存在一系列抗氧化酶,如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、过氧化物酶(peroxidase)等,能清除代谢过程中不断产生的ROS,从而维持细胞内氧化还原水平^[16]。

1.2 ROS的生物学作用

ROS能够刺激血管平滑肌细胞增殖,增加血管张力;能够增加胶原蛋白、纤维连接蛋白等胞外基质

[收稿日期]2010-03-20;[修回日期]2010-05-12

[基金项目]国家自然科学基金资助项目(30672265和30711120575)。

[作者简介]徐雪峰,男,博士研究生,医师。

蛋白的沉积来参与血管重塑^[4,17]。ROS对血管张力的直接作用则可以完全相反,这主要依赖于自身的成分和所作用的血管种类,并与ROS自身浓度相关。而且,ROS也能够通过调节eNOS和NO的功能间接调节肺血管的舒缩功能。越来越多的证据表明内皮素、转化生长因子等细胞因子以及其他的因素可以通过ROS信号通路影响肺动脉的舒缩反应和重塑过程^[4,9,17-19]。

2 ROS在PPHN中的研究进展

宫内动脉导管结扎可以诱导PPHN。在胎羊动脉导管结扎后9d,血管的外膜与平滑肌细胞处的 O_2^- 水平明显增高;SOD蛋白水平没有明显改变,但活性已经明显降低;在结扎后2d,作为ROS主要来源的NADPH氧化酶亚基P67^{phox}在肺动脉明显增加;而且增加的 O_2^- 将导致离体肺动脉对NO供体物质的反应降低^[20]。同时,肺动脉内皮细胞NADPH氧化酶的同源物NOX2和NOX4蛋白表达和活性增加^[6]。Konduri等^[21]对该PPHN模型的研究发现,ATP可以诱导正常肺动脉环剂量依赖的血管扩张,应用NOS的拮抗剂L-NAME或 O_2^- 清除剂Tiron可以逆转或增强ATP的作用;与此相反,ATP诱导了来源于PPHN肺动脉环的收缩反应,应用L-NAME或Tiron可诱导肺动脉环的松弛反应。PPHN的肺动脉内皮细胞和肺动脉环产生的 O_2^- 导致了ATP的异常反应,揭示了NOS依赖的氧化应激将损害PPHN肺动脉对ATP的血管扩张反应。进一步的研究显示HSP90-eNOS之间相互作用发生改变导致eNOS蛋白脱偶联致使 O_2^- 大量产生,同时也导致NO的降低。

PPHN的肺血管收缩与重构与循环内皮素-1(ET-1)的增加和eNOS基因表达的下降密切相关^[1]。有研究揭示ET-1可以通过ROS促进血管平滑肌细胞的增殖^[17]。通过ET-A受体依赖的方式,ET-1能使培养的胎羊肺动脉平滑肌细胞(pulmonary artery smooth muscle cells, PASM)产生明显的 H_2O_2 ;通过ET-B受体,ET-1则能减少培养的胎羊肺动脉内皮细胞(PAEC)产生 H_2O_2 。若将PASM与PAEC两者联合培养,ET-1将使eNOS基因启动子活性减少40%,加用过氧化氢酶后则能恢复基因活性,这显示了在PPHN中ET-1介导的eNOS表达降低是通过 H_2O_2 起作用的^[18]。如果PASM暴露于 H_2O_2 过夜将导致可溶性鸟苷酸环化酶表达减少,从

而使NO依赖的cGMP降低;当加用ROS清除剂后又可以恢复肺动脉对外源性NO的舒张反应^[22]。肺动脉平滑肌细胞 K^+ 通道可以调节NO依赖的和非NO依赖的血管扩张反应,而PPHN的氧化应激则能损害电压门控的钾通道从而影响其功能;应用过氧化物清除剂Tiron能够改善PPHN肺动脉环对4-氨基吡啶的收缩反应,可能与钾通道的功能部分恢复有关^[21]。

由肺血管分流所诱导的PPHN可以引起 O_2^- 明显增加,但对 H_2O_2 的产生影响不大。应用NADPH氧化酶特异的抑制剂apocynin和eNOS抑制剂3-ethylisothiourea均能明显减少由荧光探针DHE所检测到的氧化反应。同时利用高效液相色谱法发现BH4浓度无明显改变,而BH2浓度则明显增加,这提示存在有eNOS的脱偶联作用。这些研究揭示了PPHN中 O_2^- 的增加并不是由于肺部氧自由基清除能力的降低,而是与NADPH氧化酶表达和活性增加相关,并与eNOS的脱偶联作用密切相关^[14]。

2.1 低氧相关的ROS

慢性低氧能够诱导肺动脉的异常收缩和血管重塑,导致肺动脉高压的发生。由NADPH氧化酶所产生的ROS在此过程中起到重要作用^[23-24]。Fike等^[25]研究发现,SOD2丰度在低氧暴露3d的新生猪肺小动脉中无明显变化,但SOD1则降低了20%。而且,如果预先在低氧暴露后的离体肺小动脉中灌注SOD类似物,对乙酰胆碱的反应则由收缩反应转为舒张反应,这表明由于SOD1功能抑制所产生的 O_2^- 将诱导新生猪发生低氧性的肺动脉高压。在低氧暴露10d的模型中,SOD1明显减少,NOX4、SOD2和过氧化氢酶改变不明显,而NOX1和p67^{phox}则明显增加。这些氧化酶与抗氧化酶之间的失衡产生的ROS进一步加剧了慢性低氧所诱导的PPHN的肺小动脉异常反应^[26]。

低氧可以诱导人肺动脉平滑肌细胞表达转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),后者进一步促进肺血管的重塑。而TGF- β_1 促进肺血管重塑作用与ROS的产生相关。Sturrock等^[19]研究发现TGF- β_1 可以通过Smad 2/3信号而非MAPK通路诱导NOX4的表达,同时伴随有ROS的大量产生;并且这种现象可以被NADPH氧化酶黄素蛋白抑制剂DPI或NOX4 siRNA所逆转。

2.2 高氧相关的ROS

用高浓度氧辅助通气对肺动脉血管有扩张作用,因此常被用作PPHN的治疗方法。但高浓度氧也会导致机体产生大量的ROS,从而影响肺动脉的

舒缩反应。新生羊吸入100%的纯氧30 min后可以明显降低肺动脉阻力,但2 h后肺动脉对吸入NO和乙酰胆碱的舒张反应明显下降,推测可能与高氧诱导的ROS产生相关^[27]。

高浓度氧可以通过ROS来直接调节肺动脉,也可以通过磷酸二酯酶-5间接影响肺动脉的张力。将胎儿PASMCM暴露于高浓度的氧可以引起细胞内cGMP的反应下降,导致对外源性NO的反应降低;同时检测到磷酸二酯酶-5的表达和活性明显增加,用磷酸二酯酶-5抑制剂西地那非处理后可逆转对NO的反应。用H₂O₂处理常氧下的胎儿PASMCM也可以获得相似的结果,表明了ROS介导了高氧对胎儿PASMCM的效应^[28]。

3 PPHN的抗氧化治疗研究

目前PPHN的治疗策略如吸入NO和高浓度氧可以减轻一些症状,但不能明显改善疾病的存活率。高氧可导致O₂⁻的形成,而O₂⁻又将使NO失活从而引起血管收缩和氧化反应,进一步损害肺血管。由于这些潜在的副作用,一些抗氧化措施被用来辅助治疗PPHN^[7,29]。Lakshminrusimha等^[30]利用动物PPHN模型发现无论是否吸入NO,气管内注入人重组SOD可以明显增加机体的氧合水平,减弱新生羊的血管收缩反应,降低氧化效应。人重组SOD可通过降低ROS来增加BH₄的水平,恢复eNOS功能;也能恢复GTP环水解酶-1的表达,从而达到肺动脉舒张的治疗效果^[31]。

除了直接给予SOD气管注入外,妊娠晚期应用糖皮质激素也被用来治疗PPHN。糖皮质激素可以降低炎症环境中肺的氧化应激,生前激素处理可以增加胎肺的抗氧化酶活性同时降低ROS。妊娠晚期应用倍他米松可以改善胎羊肺血管对异丙肾上腺素和前列腺素的舒张反应。进一步研究揭示生前2 d肌注倍他米松能够降低PPHN的ET-1水平,增加eNOS和SOD蛋白表达水平;逆转O₂⁻/cGMP的比例,恢复HSP90-eNOS之间的相互作用,从而减少机体的氧化应激并增加PPHN肺动脉对血管舒张剂NO与ATP的扩张反应^[32]。

综上所述,ROS在PPHN发病中至关重要,一些抗氧化治疗也已经在动物PPHN模型中取得较好的治疗效果。由于产前PPHN不易诊断,从而限制了妊娠晚期PPHN的激素治疗^[32]。而气管内SOD滴入将可能成为PPHN的一个有效、方便的治疗措施,但这些抗氧化治疗应用到人类还有待进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Dakshinamurti S. Pathophysiologic mechanisms of persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2005, 39(6):492-503.
- [2] Therese P. Persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. *Paediatr Respir Rev*, 2006, 7(Suppl 1):S175-S176.
- [3] Greenough A, Khatriwal B. Pulmonary hypertension in the newborn[J]. *Paediatr Respir Rev*, 2005, 6(2):111-116.
- [4] Fike CD, Slaughter JC, Kaplowitz MR, Zhang Y, Aschner JL. Reactive oxygen species from NADPH oxidase contribute to altered pulmonary vascular responses in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(5):L881-L888.
- [5] Jankov RP, Kantores C, Pan J, Belik J. Contribution of xanthine oxidase-derived superoxide to chronic hypoxic pulmonary hypertension in neonatal rats[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(2):L233-L245.
- [6] Teng RJ, Eis A, Bakhutashvili I, Arul N, Konduri GG. Increased superoxide production contributes to the impaired angiogenesis of fetal pulmonary arteries with in utero pulmonary hypertension[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(1):L184-195.
- [7] Firth AL, Yuan JX. Bringing down the ROS: a new therapeutic approach for PPHN[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(6):L976-L978.
- [8] Touyz RM, Schiffrin EL. Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension [J]. *Histochem Cell Biol*, 2004, 122(4):339-352.
- [9] Clempus RE, Griendling KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 71(2):216-225.
- [10] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1):44-84.
- [11] Ray R, Shah AM. NADPH oxidase and endothelial cell function [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2005, 109(3):217-226.
- [12] Sanders KA, Hoidal JR. The NOX on pulmonary hypertension [J]. *Circ Res*, 2007, 101(3):224-226.
- [13] Lambeth JD, Krause KH, Clark RA. NOX enzymes as novel targets for drug development [J]. *Semin Immunopathol*, 2008, 30(3):339-363.
- [14] Grobe AC, Wells SM, Benavidez E, Oishi P, Azakie A, Fineman JR, et al. Increased oxidative stress in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension: role of NADPH oxidase and endothelial NO synthase[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(6):L1069-L1077.
- [15] Aschner JL, Foster SL, Kaplowitz M, Zhang Y, Zeng H, Fike CD. Heat shock protein 90 modulates endothelial nitric oxide synthase activity and vascular reactivity in the newborn piglet pulmonary circulation[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292(6):L1515-L1525.
- [16] Forstermann U. Oxidative stress in vascular disease: causes, defense mechanisms and potential therapies[J]. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2008, 5(6):338-349.
- [17] Wedgwood S, Black SM. Role of reactive oxygen species in vascular remodeling associated with pulmonary hypertension [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5(6):759-769.
- [18] Wedgwood S, Black SM. Endothelin-1 decreases endothelial NOS expression and activity through ETA receptor-mediated generation

- of hydrogen peroxide[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(3):L480-L487.
- [19] Sturrock A, Cahill B, Norman K, Huecksteadt TP, Hill K, Sanders K, et al. Transforming growth factor-beta1 induces Nox4 NAD(P)H oxidase and reactive oxygen species-dependent proliferation in human pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(4):L661-L673.
- [20] Brennan LA, Steinhorn RH, Wedgwood S, Mata-Greenwood E, Roark EA, Russell JA, et al. Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase[J]. *Circ Res*, 2003, 92(6):683-691.
- [21] Konduri GG, Bakhutashvili I, Eis A, Pritchard K Jr. Oxidant stress from uncoupled nitric oxide synthase impairs vasodilation in fetal lambs with persistent pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(4):H1812-H1820.
- [22] Wedgwood S, Steinhorn RH, Bunderson M, Wilham J, Lakshminrusimha S, Brennan LA, et al. Increased hydrogen peroxide downregulates soluble guanylate cyclase in the lungs of lambs with persistent pulmonary hypertension of the newborn[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289(4):L660-L666.
- [23] Liu JQ, Zelko IN, Erbynn EM, Sham JS, Folz RJ. Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox)[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(1):L2-L10.
- [24] Mittal M, Roth M, Konig P, Hofmann S, Dony E, Goyal P, et al. Hypoxia-dependent regulation of nonphagocytic NADPH oxidase subunit NOX4 in the pulmonary vasculature[J]. *Circ Res*, 2007, 101(3):258-267.
- [25] Fike CD, Aschner JL, Zhang Y, Salvemini D, Kaplowitz MR. Superoxide and chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets[J]. *Chest*, 2005, 128(6 Suppl):555S-556S.
- [26] Dennis KE, Aschner JL, Milatovic D, Schmidt JW, Aschner M, Kaplowitz MR, et al. NADPH oxidases and reactive oxygen species at different stages of chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn piglets[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2009, 297(4):L596-L607.
- [27] Lakshminrusimha S, Russell JA, Steinhorn RH, Swartz DD, Ryan RM, Gugino SF, et al. Pulmonary hemodynamics in neonatal lambs resuscitated with 21%, 50%, and 100% oxygen[J]. *Pediatr Res*, 2007, 62(3):313-318.
- [28] Farrow KN, Groh BS, Schumacker PT, Lakshminrusimha S, Czech L, Gugino SF, et al. Hyperoxia increases phosphodiesterase 5 expression and activity in ovine fetal pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Circ Res*, 2008, 102(2):226-233.
- [29] Steinhorn RH, Albert G, Swartz DD, Russell JA, Levine CR, Davis JM. Recombinant human superoxide dismutase enhances the effect of inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(5):834-839.
- [30] Lakshminrusimha S, Russell JA, Wedgwood S, Gugino SF, Kazaz JA, Davis JM, et al. Superoxide dismutase improves oxygenation and reduces oxidation in neonatal pulmonary hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 174(12):1370-1377.
- [31] Farrow KN, Lakshminrusimha S, Reda WJ, Wedgwood S, Czech L, Gugino SF, et al. Superoxide dismutase restores eNOS expression and function in resistance pulmonary arteries from neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(6):L979-L987.
- [32] Chandrasekar I, Eis A, Konduri GG. Betamethasone attenuates oxidant stress in endothelial cells from fetal lambs with persistent pulmonary hypertension[J]. *Pediatr Res*, 2008, 63(1):67-72.

(本文编辑:邓芳明)

读者·作者·编者

本刊英文摘要的写作要求

本刊是美国国立图书馆 MEDLINE 收录期刊,对英文摘要的质量要求较高,现将本刊关于英文摘要的撰写提出几点要求:①英文摘要的内容应与中文摘要基本一致。②采用第三人称撰写,内容包括“目的”“方法”“结果”和“结论”四部分。“目的”中需有简要的研究背景介绍,不可简单重复题名中已有的信息;“方法”中必须交代研究对象、分组情况及采用的研究方法;“结果”中重要的阳性结果要提供具体数据及统计学值;“结论”要基于本研究“结果”得出,并与“目的”相呼应。③文字表达应简明、准确、具体,语法准确、严密,符合英文表达习惯。④尽量少用缩略语,需要时,必须在首次出现时写出其全称,且尽量使用国际上常用的缩写形式,如“*Helicobacter pylori*”(幽门螺杆菌)应该缩写为“H. pylori”,而不是“HP”。⑤英文摘要还应包括英文文题、全部作者姓名(汉语拼音)、第一作者单位名称、单位所在城市、邮政编码及通信作者的 Email 地址。⑥英文摘要撰写后,作者应仔细核校,请有关专家审校并指导修改。

中国当代儿科杂志编辑部