

网络出版时间: 2021-05-14 14:54 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20210513.1450.031.html>

特发性肺纤维化中氧化应激调控机制的研究进展

郭春玉¹ 综述 张诗晨², 方 军^{1,3} 审校

摘要 氧化应激是特发性肺纤维化(IPF)的主要致病机制之一,主要通过线粒体和体内酶系统产生的过量活性氧(ROS)引起机体氧化-抗氧化失衡。近年来的研究表明氧化应激主要通过诱导炎症的发生以及调控纤维化相关细胞信号通路影响肺的正常结构与生理功能。该文就氧化应激在IPF的发生发展中相关调控机制的研究进展进行综述。

关键词 特发性肺纤维化; 氧化应激; NOX4; Nrf-2

中图分类号 R 563.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)06-0999-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.06.033

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)是一种慢性、进行性、纤维性的间质性肺炎,其病因及发病机制尚未完全阐明。目前其治疗方法多偏重于对症,治疗效果却并不明显,且确诊后五年生存率小于50%,中位生存期仅约3年。IPF的危险因素包括微生物感染、吸烟、放疗或化疗、长期吸入粉尘或石棉等职业和环境暴露等^[1]。IPF的病理生理学改变主要是由肺泡上皮细胞反复持续性的微损伤与损伤修复失调,其病理特征主要表现为肺泡上皮细胞损伤、炎性细胞浸润、胞外基质的大量堆积、上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、成纤维细胞向肌成纤维细胞的转化(fibroblast-myofibroblast transition, FMT),最终造成气体交换及呼吸功能受损^[2]。许多研究^[3]表明,氧化应激是肺纤维化的主要致病机制之一,IPF的发生与活性氧(reactive oxygen species, ROS)蓄积导致氧化还原平衡紊乱相关。此外,氧化应激与转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 的交互

作用对促进肺纤维化有重要意义。该文主要就氧化应激在IPF的发生发展中相关调控机制的研究进展进行综述。

1 人体内的氧化物及其生物学作用

1.1 氧化物与肺损伤 人体内氧化物与抗氧化物维持动态平衡,当细胞内的抗氧化物不能中和氧化物时发生的不平衡即为“氧化应激”^[4]。氧化应激不仅损伤DNA、蛋白质及脂质,还会改变胞内信号通路、甚至基因的表达,此外,还可通过氧化修饰促进异常细胞生长、炎症和其他生理过程^[5]。ROS的慢性过量产生可刺激I型胶原的过表达,并引发炎症反应。而肺是人体中最容易发生氧化-抗氧化失衡的器官之一,肺的氧分压明显高于心脏、肝脏及大脑中的,而且不断暴露于内源性或外源性氧化物,包括香烟烟雾、空气颗粒物、粉尘、电离辐射等^[6]。

1.2 体内的氧化物 在生理状况下,细胞代谢可产生低浓度的ROS,并且这些低浓度的ROS在细胞的生理过程中起作用。但体内过高浓度的ROS则会对细胞成分进行不利的修饰^[4]。ROS可分为两类:①含有一个或多个未配对电子并具有反应性的自由基,如超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($HO\cdot$)、过氧自由基($ROO\cdot$)、氢过氧自由基($HOO\cdot$)。②两个自由基共用其未成对电子时产生的非自由基,如过氧化氢(H_2O_2)、次氯酸($HClO$)^[4]。氧化剂的产生并不总是有害的,如超氧化物、 H_2O_2 可作为信号分子在生长因子刺激下产生,并在体内对杀灭病原微生物以保护机体方面发挥着重要作用,过量的ROS可引起机体氧化与抗氧化系统失衡并对细胞和胞内结构如细胞膜、蛋白质、DNA及线粒体造成严重损害^[6-7],最终导致机体损伤如纤维化的发生。

1.3 氧化物的来源及其生物学作用 在肺中产生ROS的细胞主要有肺泡上皮细胞、成纤维细胞、免疫细胞、内皮细胞以及血管平滑肌细胞^[8]。ROS是线粒体电子传递链(ETC)有氧代谢的结果,但也可以由各种酶系统产生,包括NADPH氧化酶(NADPH oxidase, NOX)、细胞色素P450酶、烟酰胺氧化酶、

2021-03-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81573512)

作者单位: 安徽医科大学公共卫生学院¹ 卫生毒理学系、² 儿少卫生与妇幼保健学系, 合肥 230032

³ 日本崇城大学药学院, 熊本 日本 860-0082

作者简介: 郭春玉, 女, 硕士研究生;

张诗晨, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zhang-shichen@ahmu.edu.cn;

方 军, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: fangjun@ph.sjo-u.ac.jp

黄嘌呤氧化酶、一氧化氮合酶(NOS)等^[4]。 $O_2^{\cdot-}$ 主要由NOX、黄嘌呤氧化酶或线粒体电子传递系统产生,其产生的主要部位是线粒体^[5]。HClO呈高度氧化状态,并在杀灭气道病原体过程中发挥重要作用。但是,HClO还可以与人体内的多种大分子发生反应,比如与DNA碱基上的氨基发生结合反应,并向DNA碱基中插入氯^[6]。自由基 $ROO\cdot$ 和 $HOO\cdot$ 可引发脂质过氧化链式反应,然后其产物与氧气反应生成 $HO\cdot$, $HO\cdot$ 将多不饱和脂肪酸转化为脂质过氧化物,脂质过氧化物非常不稳定,很容易分解成二次产物,如丙二醛(malondialdehyde,MDA)等^[6]。

2 氧化应激对炎症的影响

2.1 ROS对炎性小体的调控作用 过量氧化物可激发炎症并诱导成纤维细胞的活化和生长^[7]。持续暴露于石棉等危险因素下,诱导机体发生氧化应激反应,细胞线粒体功能失调产生大量的ROS,如 $O_2^{\cdot-}$ 、 H_2O_2 等。ROS是氧化应激的重要产物,可以通过调节生长因子与细胞因子的表达降低抗氧化能力,促进气道上皮细胞凋亡,并引发炎症反应,进而导致胶原沉积^[8]。NOX存在于中性粒细胞、肌成纤维细胞、单核细胞和巨噬细胞中,由NOX产生的ROS可以触发炎症细胞中的NALP3炎性小体的激活,该炎性小体可促进炎症细胞因子如白细胞介素(interleukin,IL)-1 β 的产生^[9-11]。而NLRP3炎性小体可调控炎症因子如IL-1 β 、IL-18,由此通过增强促炎反应通路来促进肺纤维化进程^[12]。线粒体ROS是激活NLRP3炎性小体最重要的激活因子之一,并且广泛参与NLRP3的激活^[13]。ROS/AMPK介导的自噬可以限制线粒体ROS的产生,从而下调NLRP3炎性小体^[14]。同时有研究^[15]表明,ROS可以诱导对氧化还原反应敏感的转录因子相关信号通路的激活,如NF- κ B、MAPK,从而诱导基因表达各种促炎因子,包括TNF- α 、IL-8和IL-1 β 。TNF- α 在IPF患者肺部高表达并参与疾病初始的促炎、促纤维化信号通路^[16]。

2.2 ROS对巨噬细胞极化的调控作用 此外,氧化应激可诱导巨噬细胞的极化,巨噬细胞的极化在肺组织损伤修复调控中发挥着重要作用。目前的研究^[13-14]认为,在炎症初期巨噬细胞通过分泌促炎因子(如IL-12、IL-1 β 、IL-2、IL-6、IL-23、TNF- α 等)和趋化因子并产生NO和ROS继而经细胞毒作用发挥杀伤病原微生物的作用,这个过程被称为巨噬细胞M1表型(即经典活化型巨噬细胞)极化。随后,

巨噬细胞向M2表型(即替代活化型巨噬细胞)极化,M2型巨噬细胞能够促进受损组织的修复与重塑^[13]。然而,IPF主要是由持续性的微损伤与损伤修复失调所造成的^[11]。在此过程中,M2型巨噬细胞可以:①促进成纤维细胞的聚集与增殖;②产生金属蛋白酶组织抑制因子;③诱导EMT与FMT,从而促进肺纤维化的进程^[13]。超氧化物 H_2O_2 由超氧化物歧化酶(SODs)代谢生成,这个过程可调控巨噬细胞的极化^[14]。线粒体氧化应激产生的Cu-SOD、Zn-SOD通过对组蛋白去甲基化酶Jmjd3的氧化还原反应调控来诱导和维持M2型巨噬细胞,从而加速肺纤维化的进程^[17]。

3 氧化应激对间质纤维化进程调控作用

3.1 ROS对肺纤维化进程的影响 持续性的肺部损伤可产生ROS,而ROS可引起肺泡上皮细胞的凋亡和基底膜的损伤和间质向上皮的转化,破坏肺结构,损害肺泡气体交换等。肺泡II型细胞损伤产生ROS引起氧化应激反应,不仅能诱导上皮细胞凋亡,还可以激活细胞内的信号通路,上调促纤维化因子合成与释放,最终导致肺组织损伤和纤维化^[18]。同时氧化应激触发的胞内信号能刺激纤维增生和促纤维化因子的表达,针对氧化-抗氧化平衡的干预则可改善肺损伤动物模型的纤维化进展^[19]。

3.2 NOX4对肺纤维化的调控作用 在肺中与氧化应激调控相关的酶主要是NOX家族。其中,NOX2是呼吸爆发的关键成分,可使巨噬细胞和非特异性免疫系统的其他细胞将氧气转化为ROS用于宿主防御。然而NOX4在体内调控许多生理与病理过程,包括细胞分化、免疫防御与组织纤维化。NOX4被认为是线粒体功能障碍的中介,表明线粒体电子传递链与NOX4两个氧化应激系统之间存在交叉^[20]。NOX4介导的氧化应激可调控TGF- β 诱导的成纤维细胞的分化、细胞骨架的活力以及转录调节^[21]。TGF- β 在组织纤维化进程中起着基础性的作用。TGF- β 是一种多功能蛋白,其主要生物学作用之一就是促进成纤维细胞的募集与基质蛋白的合成,同时TGF- β 还可以通过诱导金属蛋白酶抑制剂的表达抑制基质降解^[22]。不仅TGF- β 可以诱导NOX4的表达,NOX4依赖的氧化还原反应信号通路同样可以通过前反馈的机制激活TGF- β /Smad信号通路^[11,23]。此外,近年的研究^[24]表明NOX4可诱导肺上皮细胞死亡、成纤维细胞分化和胶原沉积,说明NOX4在肺纤维化中发挥着重要作用。同时,

NOX4 可以介导 IPF 成纤维细胞对衰老和凋亡的抵抗。有研究^[23]表明 ROS 生成酶 NOX4 的异常上调,加上核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-derived factor 2-related factor, Nrf-2) 诱导的缺失,会导致持续的氧化还原失衡,使正常修复的细胞拥有抗凋亡表型。并且在纤维化的衰老小鼠模型中对 NOX4 的靶向干预能够减弱衰老、抗凋亡的肌成纤维细胞表型,并导致持续性纤维化的逆转^[23]。因此,通过靶向干预 NOX4 的表达可能是治疗或缓解 IPF 的有效策略。

3.3 氧化应激对 EMT 与 FMT 进程的影响 EMT 与 FMT 是肺纤维化进展的重要过程。EMT 是上皮样细胞向间充质样细胞转化的过程,其主要发生在胚胎形成、组织修复和肿瘤转移过程中。在 EMT 过程中,上皮细胞标志物如 E-钙黏蛋白丢失,同时间充质细胞标志物如整合素、纤维连接蛋白等表达^[8]。氧化应激诱导线粒体 DNA (mtDNA) 损伤肺泡上皮细胞凋亡和肺纤维化,其中 TGF- β 是一种关键且独立的促纤维化细胞因子^[14]。在器官纤维化的发展过程中,氧化应激通过激活 TGF- β 表达参与了对 EMT 进程的调控^[24]。H₂O₂ 是 EMT 与 FMT 过程中 TGF- β 信号通路的中介^[8]。有研究^[24]表明抑制 HIF-1 α /TGF- β 信号通路对肺泡上皮 EMT 具有抑制作用。肌成纤维细胞是活化的成纤维细胞,而肌成纤维细胞在表型与结构上与平滑肌细胞相似,具有收缩性、迁移性并表达 α -SMA 和胞外基质^[25],此外,肌成纤维细胞内氧化产物增多,凋亡敏感性降低^[14]。TGF- β 通过上调 NOX4 从而介导 H₂O₂ 的产生调控肌成纤维细胞的分化^[8, 14]。

4 体内的抗氧化应激调控系统

4.1 体内的抗氧化物 人体内所有器官都能表达各种抗氧化物和细胞调控因子,从而参与氧化应激反应^[24]。人体内源性的抗氧化防御系统包括:①低分子质量的抗氧化物,如维生素 E、褪黑素、谷胱甘肽(GSH)、尿酸等;②抗氧化酶,如 SODs、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px);③Ⅱ相反反应解毒酶,如谷胱甘肽巯基转移酶(GST)同工酶、NAD(P)H、醌氧化还原酶(NQO1)等;④应激反应蛋白,如血红素加氧酶(HO-1)、铁蛋白等;⑤黏蛋白类和金属结合蛋白,如乳铁蛋白、转铁蛋白、金属硫蛋白等;此外,Nrf-2 可诱导大多数抗氧化物与解毒酶的表达^[11]。这些抗氧化酶以细胞特异性的方式表达于支气管、肺泡上皮细胞和肺巨噬细胞^[11],

持续保护肺部免受氧化损伤。

4.2 抗氧化反应的关键转录因子 Nrf-2 Nrf-2 是体内抗氧化反应原件(ARE)的主要调节物,并介导细胞保护性蛋白的表达。体内大量的Ⅱ相反反应解毒酶与应激反应蛋白诱导型 HO-1 都受转录因子 Nrf-2 的调控,该转录因子是维持细胞氧化还原平衡和减少严重氧化损伤的必要的上游调节因子^[27]。Nrf-2 属于通过与 β -球蛋白基因座控制区高敏感位点 NF-E2/AP-1 基序结合激活转录调控的蛋白之一,它属于 bZip 基因的一个子集,共享一个保守的 CNC 结构域^[28]。在哺乳动物中,CNC 家族由 4 个关系密切的蛋白——p45-NFE2、Nrf-1、Nrf-2 和 Nrf-3,以及 Bach1 和 Bach2 两个远亲蛋白组成^[28]。Kelch-like ECH 相关蛋白 1(Keap1)是 Nrf-2 的天然抑制剂,可将 Nrf-2 限制在胞质中并通过 26 S 蛋白酶体促进 Nrf-2 的降解^[28]。应激包括过氧化微环境会损害 Keap1 对 Nrf-2 进行泛素化降解的能力,并可诱导新合成的 Nrf-2 入核与 ARE 结合^[21]。一旦氧化还原反应恢复或有害物质被代谢消除就会引发终止信号,Keap1 入核与 Nrf-2 结合后将其转运回胞质中进行降解^[29]。此外,Nrf-2 可被磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)、PKC、c-Jun、N-末端激酶(JNK)和胞外信号调节蛋白激酶(ERK)磷酸化后上调,而 p38 MAPK 对 Nrf-2 通路呈双向调控^[27]。Nrf-2 参与多种抗氧化相关基因表达的调控,包括: NQO1、HO-1、GSTA1 等^[29]。Nrf-2 可激活对二氧化硅暴露诱导的 EMT 和 TGF- β /Smad 信号通路的抑制作用,从而发挥抗氧化与抗纤维化的作用。最近有研究^[30]表明,氧化应激、细胞凋亡和炎症都参与早期的肺纤维化进程,而通过激活 Keap1/Nrf-2 信号通路可起到对肺纤维化保护作用。Nrf-2 作为上游转录调控因子对体内抗氧化系统的调控可能是 IPF 的有效治疗策略。

5 结语

目前,IPF 的发病机制尚未完全阐明,氧化应激被认为在 IPF 的进程中扮演着不可或缺的角色。其中,NOX4 对肺泡上皮细胞死亡、成纤维细胞分化和胶原沉积的调控在 IPF 发生发展过程中起着重要作用。相反,Nrf-2-ARE 系统所介导的抗氧化相关基因表达是肺免受氧化损伤的重要调控系统之一。因此,针对氧化应激机制相关的治疗策略,如靶向抑制或下调 NOX 的表达、拮抗 NOX4 的作用或促进 Nrf-2 的表达,可能是有效地治疗或缓解 IPF 的潜在治疗策略。

参考文献

- [1] Yang D X, Qiu J, Zhou H H, et al. Dihydroartemisinin alleviates oxidative stress in bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. *Life Sci*, 2018, 205: 176–83.
- [2] Goda C, Balli D, Black M, et al. Loss of FOXM1 in macrophages promotes pulmonary fibrosis by activating p38 MAPK signaling pathway [J]. *PLoS Genet*, 2020, 16 (4): e1008692.
- [3] Veith C, Drent M, Bast A, et al. The disturbed redox-balance in pulmonary fibrosis is modulated by the plant flavonoid quercetin [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2017, 336: 40–8.
- [4] Rafii R, Juarez M M, Albertson T E, et al. A review of current and novel therapies for idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *J Thorac Dis*, 2013, 5 (1): 48–73.
- [5] Vasquez-Garzon V R, Ramirez-Cosmes A, Reyes-Jimenez E, et al. Liver damage in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2019, 392 (12): 1503–13.
- [6] Birben E, Sahiner U M, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense [J]. *World Allergy Organ J*, 2012, 5 (1): 9–19.
- [7] Watson W H, Ritzenthaler J D, Roman J. Lung extracellular matrix and redox regulation [J]. *Redox Biol*, 2016, 8: 305–15.
- [8] Otoupalova E, Smith S, Cheng G, et al. Oxidative stress in pulmonary fibrosis [J]. *Compr Physiol*, 2020, 10 (2): 509–47.
- [9] Bai Y, Li J, Zhao P, et al. A Chinese herbal formula ameliorates pulmonary fibrosis by inhibiting oxidative stress *via* upregulating Nrf2 [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 628.
- [10] 蒋怡芳, 范晓杰, 刘 晓, 等. 柚皮素对博来霉素诱导的小鼠肺纤维化的改善作用及其作用机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 202–7.
- [11] Hosseinzadeh A, Javad-Moosavi S A, Reiter R J, et al. Oxidative/nitrosative stress, autophagy and apoptosis as therapeutic targets of melatonin in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2018, 22 (12): 1049–61.
- [12] Meng Y, Pan M, Zheng B, et al. Autophagy attenuates angiotensin II-induced pulmonary fibrosis by inhibiting redox imbalance-mediated NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 inflammasome activation [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 30 (4): 520–41.
- [13] Tabas I, Bornfeldt K E. Macrophage phenotype and function in different stages of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118 (4): 653–67.
- [14] Liu P S, Wang H, Li X, et al. alpha-ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming [J]. *Nat Immunol*, 2017, 18 (9): 985–94.
- [15] Kolahian S, Fernandez I E, Eickelberg O, et al. Immune mechanisms in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 55 (3): 309–22.
- [16] Kurundkar A, Thannickal V J. Redox mechanisms in age-related lung fibrosis [J]. *Redox Biol*, 2016, 9: 67–76.
- [17] Zhang L, Wang Y, Wu G, et al. Macrophages: friend or foe in idiopathic pulmonary fibrosis? [J]. *Respir Res*, 2018, 19 (1): 170.
- [18] Ballester B, Milara J, Cortijo J. Idiopathic pulmonary fibrosis and lung cancer: mechanisms and molecular targets [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (3): 593.
- [19] Ramirez A, Ramadan B, Ritzenthaler J D, et al. Extracellular cysteine/cystine redox potential controls lung fibroblast proliferation and matrix expression through upregulation of transforming growth factor-beta [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293 (4): L972–81.
- [20] Veith C, Boots A W, Idris M, et al. Redox imbalance in idiopathic pulmonary fibrosis: a role for oxidant cross-talk between NADPH oxidase enzymes and mitochondria [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(14): 1092–115.
- [21] Bernard K, Logsdon N J, Miguel V, et al. NADPH oxidase 4 (NOX4) suppresses mitochondrial biogenesis and bioenergetics in lung fibroblasts *via* a nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (Nrf2)-dependent pathway [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292 (7): 3029–38.
- [22] Jiang F, Liu G S, Dusting G J, et al. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF-beta-mediated fibrotic responses [J]. *Redox Biol*, 2014, 2: 267–72.
- [23] Hecker L, Logsdon N J, Kurundkar D, et al. Reversal of persistent fibrosis in aging by targeting NOX4-Nrf2 redox imbalance [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6 (231): 231–47.
- [24] Zhang H X, Li Y N, Wang X L, et al. Probucol ameliorates EMT and lung fibrosis through restoration of SIRT3 expression [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2019, 57: 101803.
- [25] Hinz B, Phan S H, Thannickal V J, et al. The myofibroblast: one function, multiple origins [J]. *Am J Pathol*, 2007, 170 (6): 1807–16.
- [26] Zhang S, Yu D, Wang M, et al. FGF21 attenuates pulmonary fibrogenesis through ameliorating oxidative stress *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1516–25.
- [27] Liu Q, Gao Y, Ci X. Role of Nrf2 and its activators in respiratory diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 7090534.
- [28] Kensler T W, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses *via* the Keap1-Nrf2-ARE pathway [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47: 89–116.
- [29] Sun Z, Wu T, Zhao F, et al. KPNA6 (Importin {alpha}7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31 (9): 1800–11.
- [30] Yang H, Hua C, Yang X, et al. Pterostilbene prevents LPS-induced early pulmonary fibrosis by suppressing oxidative stress, inflammation and apoptosis *in vivo* [J]. *Food Funct*, 2020, 11 (5): 4471–84.