

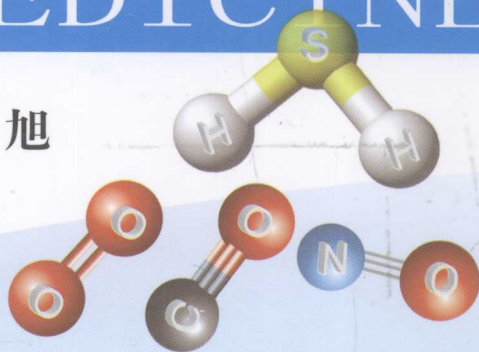


医路新知 系列丛书
Meditrans Academy

气体 生物医学

GASES IN MEDICINE

主编 陶恒沂 刘文武 严 旭



第二军医大学出版社
Second Military Medical University Press

气体生物医学

主 编 陶恒沂 刘文武 严 旭

副主编 姜正林 朱 俐 曹 东 孙学军



第二军医大学出版社

内 容 提 要

本书系统地介绍了目前临床和实验使用气体(主要包括氧气、臭氧、氮气、氢气、甲烷、一氧化氮、一氧化碳、硫化氢以及挥发性麻醉气体)相关生物医学知识,包括理化特性、生物学作用、治疗应用、相关机制及研究进展等。

本书既可作为高等医学院校相关专业教材,也可作为临床医生、对气体感兴趣的研究者及相关管理人员的参考用书。

图书在版编目(CIP)数据

气体生物医学/陶恒沂,刘文武,严旭主编. —上海:第二军医大学出版社,2014.1

ISBN 978-7-5481-0716-3

I. ①气… II. ①陶… ②刘… ③严… III. ①气体—生物工程—医学工程 IV. ①R318

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2013)第 237528 号

出 版 人 陆小新

责任编辑 王 勇

气体生物医学

主 编 陶恒沂 刘文武 严 旭

第二军医大学出版社出版发行

上海市翔殷路 800 号 邮政编码: 200433

电话/传真: 021-65493093

<http://www.smmup.cn>

全国各地新华书店经销

江苏天源印刷厂印刷

开本: 787×1092 1/16 印张: 16 字数: 42.9 万字

2014 年 1 月第 1 版 2014 年 1 月第 1 次印刷

ISBN 978-7-5481-0716-3/R·1486

定价: 52.00 元

编 委 会

主 编 陶恒沂 刘文武 严 旭

副主编 姜正林 朱 俐 曹 东 孙学军

编 委 (以姓氏拼音排序)

蔡志宇 (第二军医大学海军医学系)

曹 东 (上海市第六人民医院)

陈 飏 (解放军 91860 部队后勤部)

陈 涵 (解放军第 411 医院)

陈 语 (沈阳军区总医院)

付尚希 (第二军医大学长征医院)

韩天宇 (沈阳军区总医院)

姜正林 (南通大学航海医学研究所)

刘 刊 (第二军医大学海军医学系)

刘文武 (第二军医大学海军医学系)

马小翠 (辽宁省肿瘤医院)

孙学军 (第二军医大学海军医学系)

陶恒沂 (南通大学航海医学研究所)

田 竞 (沈阳军区总医院)

王 琪 (沈阳军区总医院)

严 旭 (解放军第 455 医院)

郑 娟 (第二军医大学海军医学系)

郑兴峰 (第二军医大学长海医院)

朱 俐 (南通大学航海医学研究所)

编 校 蔡志宇 刘文武 郑 娟

前言

我们生活在一个充满气体的环境下,可以说我们的生命和健康与周围环境中的气体息息相关。环境气体含量和(或)组成的变化都会对人体造成重要的影响。一个最简单的例子就是氧气。我们周围环境的氧含量为 21%,氧过多可造成氧中毒,这一担心早在 Priestly 发现氧气后就已经提出;氧过少可导致缺氧,这一点在我们进入高原地区后感受最为明显。

而对于环境中的气体,即使是临床医生,了解也有限。大部分临床医生对气体可以说既熟悉又陌生。熟悉的是,他们每天面对的患者几乎都可能会涉及到气体在医疗当中的应用;陌生的是,他们对应用的相关气体对机体的影响了解得并不全面,或者是有所了解但也仅限于本科室能接触的气体。氧气是使用最为广泛的一种气体,几乎在每所医院的每个科室、每间病房都可见到。经鼻导管供氧已经成为许多患者治疗方案的一个重要组成部分。然而与氧相关的高压氧治疗,虽然目前已被世界公认为某些疾病治疗(特别是一氧化碳中毒、减压病等的治疗)的重要手段之一,但大部分临床科室的医生对高压氧的治疗机制及其使用、最新进展等了解较少。再如,手术时可能用到麻醉气体(如异氟醚、七氟醚、地氟醚等),麻醉科以外的医生对它们的了解又有多少呢?除了这些常见的气体,临床医生对于一些新型医学相关气体的特性、使用以及研究进展也缺乏了解。随着医学科学的飞速发展,气体在疾病诊断和治疗中的应用也得到了广泛的研究,取得了一些可喜的,甚至是令人瞩目的成果。正因为如此,华裔科学家 John H Zhang 牵头创办了国际上唯一以气体为研究内容的杂志——*Medical Gas Research*。

本书对近年来气体研究中的进展进行简要介绍,以抛砖引玉。高压氧除用于疾病治疗外,还可用作一种预处理手段来预防某些疾病或损伤,并且该手段已经用于某些临床研究。随着 2007 年日本医科大学老年病研究所的 Ohsawa 等人在 *Nature-Medicine* 杂志上发表氢气对脑缺血性疾病的治疗以来,氢分子医学可以说得到了前所未有的繁荣。近几年有关氢的文章已超过 400 篇。最近,日本与我国某些单位已就氢的临床疾病治疗展开了合作,也取得了可喜的成果。匈牙利研究者近期发现,甲烷可通过其抗炎作用对犬肠缺血具有治疗作用,该成果发表在 *Critical Care Medicine* 杂志上。虽然早期提出氦气可用于治疗哮喘和支气管炎,但未能得到推广。近年的研究显示,氦气预处理对疾病具有一定的保护效应。此外,可能大部分医生不曾知道,氦气已用于医院的核磁共振检查之中。氦气作为一种麻醉气体,其与麻醉相关的特性均优于其他麻醉气体,唯一的不足就是稀有。研究还发现,氦气预处理也具有一定的疾病保护效应。臭氧也已用于了疾病的治疗,意大利科学家 Velio Bocci 为此出版了一部专著 *Oxygen-Ozone Therapy*。另一个不得不说的气体家族就是气体



信号分子。气体信号分子可以说在过去 20 多年中赚足了研究者的眼球。自从一氧化氮发现以来,数以万计的研究者对其进行了广泛、深入的研究。随着一氧化碳和硫化氢研究的深入,这三个曾经被认为是“环境污染物”、目前被证实为机体信号分子的气体,已经成为众多医学领域长期研究的热点。我们相信,未来这三种气体信号分子仍然是医学领域的“明星分子”。

基于此,我们编著了此书,对目前临床使用的以及尚未进入临床的气体进行相对全面的介绍。希望此书的出版,能为广大的临床医生、对气体感兴趣的读者以及医学院校的研究、本科生等提供一些基础知识,扩大知识面,抑或激起研究者思想的火花。

因篇幅有限,本书不可能对所有气体都面面俱到,只能是把读者最为关心的、与临床最为密切的气体相关特性及其使用进行介绍。由于本书的出版时间仓促、作者水平有限,难免有欠缺之处。在此,编者恳请各位读者在阅读之中发现问题,阅读之余提出你们宝贵的意见。不当之处,我们将在再版时予以更正。

此书的出版受到南通大学特聘教授启动基金资助,在此表示感谢!

编者

2013 年 10 月

目 录

第一章 氧气	(1)
第一节 概述	(1)
第二节 氧气的生理学与生物化学	(2)
第三节 氧的感受	(5)
第四节 活性氧	(8)
第五节 抗氧化应激	(14)
第六节 氧的毒性作用	(19)
第七节 氧气的临床应用	(35)
第二章 臭氧	(44)
第一节 概述	(44)
第二节 臭氧的生物学作用	(46)
第三章 氦气	(56)
第一节 概述	(56)
第二节 氦气与潜水	(58)
第三节 氦气在医学中的应用	(60)
第四章 氢气	(65)
第一节 概述	(65)
第二节 氢气生物学效应的发现	(68)
第三节 氢气治疗疾病的研究进展	(72)
第五章 氙气	(81)
第一节 概述	(81)
第二节 氙气的化学特性	(82)
第三节 氙气的生物学作用及其机制	(87)
第四节 氙气预处理的保护效应及其机制	(89)
第六章 甲烷	(92)
第一节 概述	(92)
第二节 甲烷与生物医学	(92)
第三节 甲烷的产生与消化道疾病	(97)
第四节 调节产甲烷菌群和治疗应用	(100)

第七章 一氧化氮 (102)

第一节	概述	(102)
第二节	一氧化氮的生物学效应	(109)
第三节	一氧化氮与呼吸系统疾病	(110)
第四节	一氧化氮与心血管疾病	(118)
第五节	一氧化氮与消化系统	(123)
第六节	一氧化氮与神经系统	(127)
第七节	一氧化氮与糖尿病	(132)
第八节	一氧化氮与眼病	(135)
第九节	一氧化氮与耳部疾病	(136)
第十节	一氧化氮与生殖系统	(139)
第十一节	一氧化氮与肿瘤	(143)

第八章 一氧化碳 (147)

第一节	概述	(147)
第二节	一氧化碳生物学和生理学研究	(148)
第三节	一氧化碳的生理学作用	(156)
第四节	异常血红素单加氧酶/一氧化碳系统的病理生理学	(163)
第五节	一氧化碳的作用和分子机制	(170)
第六节	一氧化碳与不同离子通道的相互作用	(171)
第七节	血红素单加氧酶/一氧化碳系统与一氧化氮合成酶/一氧化氮系统的相互作用	(175)
第八节	一氧化碳的治疗性应用	(177)
第九节	结论和展望	(180)

第九章 硫化氢 (182)

第一节	概述	(182)
第二节	哺乳动物细胞内源性硫化氢的产生和代谢	(185)
第三节	哺乳动物硫化氢的生理学功能	(194)
第四节	硫化氢代谢异常的病理学作用	(209)
第五节	硫化氢作用的细胞和分子机制	(222)
第六节	硫化氢与其他气体信号分子的相互作用	(232)

第十章 挥发性麻醉气体 (237)

第一节	挥发性麻醉气体心肌保护作用	(237)
第二节	挥发性麻醉气体神经保护作用	(240)

第一章

氧 气

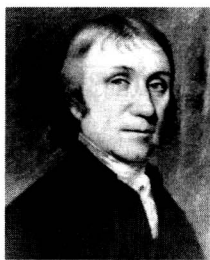
第一节 概 述

大约 40 亿年以前,地球的大气含有约 1 ppm 的氧气。最早的细胞在几乎无氧的环境下通过不依赖于氧的途径进行进化。大约 27 亿年以前,蓝细菌(蓝藻)出现,它们将光合作用作为能量的来源,此时的氧含量约为 1%。与此同时,真核细胞开始出现。这些细胞采用固醇组装外膜,而该过程需要依赖氧。此外,一些真核细胞由于与蛋白菌之间存在着共生关系,从而开始发育出线粒体。氧化磷酸化的出现,表明这些细胞很好地利用了富氧环境这一优势。正如 Lane 所总结的,地球上的氧环境随着时间发生着明显的变化。约 22 亿年以前,大气中氧的浓度急剧升至 5%~18%,随后也经历了氧浓度的显著变化,一直达到目前的氧浓度。

1667 年,Hooke 发现吸入气中有一种生命过程必不可少的物质,但不知道这种物质究竟是什么。7 年之后(即 1674 年),Mayhew 发现 Hooke 所说的那种物质有助燃作用,他当时把这种物质称为“spiritus-nitro-aereus”。1770 年,Scheele 在瑞典的乌普萨拉(Uppsala)Lokk 实验室也发现空气中有类似的物质,他当时把它称为“fire air”。但是在世界上首先获得纯氧的是 Priestly,他是通过加热氧化汞(mercuric oxide)而获得的,当时他将其称为“dephlogistigated air”(脱燃素的空气)。然而,通过加热使液体中气体蒸发的技术是 Scheele 首先发明的,因此他们俩共享“氧气发现者”的盛誉(图 1-1)。也有学者仅将 Priestly 认为是“氧气发现者”。严格意义上讲,“氧气发现者”应该是 Hooke。而 Priestly 和 Scheele 的贡献是通过加热蒸发技术首先分离出了氧气,从而为氧气在医学上的应用奠定了基础。然而究竟何时、何地、由何人首先提出将“spiritus-nitro-aereus”“fire air”和“dephlogistigated air”称为“oxygen”已无从考证。



Carl Wilhelm Scheele



Joseph Priestley

图 1-1 氧气发现中具有重要作用的两位科学家

一、氧的特性

氧(oxygen,旧译作氧)是一种化学元素,其原子序数为 8,相对原子质量为 15.999 4,由符号“O”表示(图 1-2)。在元素周期表中,氧是氧族元素的一员,它也是一个高反应性的第 2 周期非金属元素,很容易与大多数其他元素形成化合物(主要为氧化物)。在标准状况下,两个氧原子结合形成氧气。氧气是一种无色、无嗅、无味的双原子气体,化学式为 O_2 。氧气比空气重,在标准状况(0°C 和大气压强 101.325 kPa)下密度为 1.429 g/L,能溶于水,但溶解度很小。在压强为 101 kPa 时,氧气在约 -180°C 时变为淡蓝色液体,在约 -218°C 时变成雪花状的淡蓝色固体。

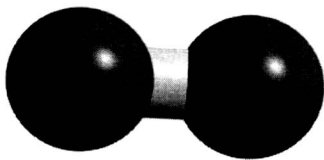


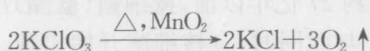
图 1-2 氧分子示意图



地球的大气层在形成初期是不含氧气的。原始大气是还原性的,充满了甲烷、氨等气体。大气层氧气的出现源于两种作用:一个是非生物参与的水的光解;一个是生物参与的光合作用。生物的光合作用对大气层的影响巨大,它造成了大气层由还原氛围向氧化氛围的转变,使得水光解产生的氢气能重新被氧化为水回到地球而不至于扩散到外层空间去,从而防止了地球上水的流失。同时,光合作用也加速了大气层氧气的积累,深刻地改变了地球上物种的代谢方式和形态。

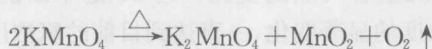
二、氧气的制备

实验室小规模制氧一般会加热氯酸钾和催化剂二氧化锰的混合物,生成氧气和氯化钾。

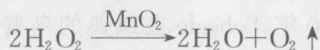


用此方法制得的氧气通常混有少量刺激性气味的气体:氯气。

或者直接加热高锰酸钾来制备:



也可以用过氧化氢溶液加二氧化锰做催化剂的方法,制得氧气,同时产生水。



这种方法简单易操作,节约能源,且生成物没有污染,是实验室制取氧气的常用方法之一。

工业上,普遍利用氮气、氧气沸点的不同,用低温分馏的方法大量制备氧气。中国国家标准规定,氧气气瓶为淡蓝色,黑字;而美国则用橙色。

三、氧的分布

氧元素占整个地壳质量的 48.6%,它在地壳中基本上是以氧化物的形式存在的。每 1 kg 的海水中溶解有 2.8 mg 的氧气,而海水中的氧元素差不多达到了 88%。就整个地球而言,氧的质量分数为 15.2%。无论是人、动物还是植物,他们的生物细胞都有类似的组成,其中氧元素占到了 65% 的质量。而在地球大气层中,氧气的含量占第二,有 20.946%。

构成有机体的所有主要化合物都含有氧,包括蛋白质、糖类和脂肪。构成动物壳、牙齿及骨骼的主要无机化合物也含有氧。蓝藻、藻类和植物经过光合作用产生氧气。几乎所有复杂生物的细胞呼吸作用都需要用到氧气。动物中,除了极少数之外,皆无法终身脱离氧气生存。

第二节 氧气的生理学与生物化学

一、氧气的生理学

氧与体内物质、气体、能量代谢密切相关。正常人体组织细胞的生存需要氧气,损伤组织的恢复更需要氧供的建立。但如果氧供过多,氧分压过高,又会对机体产生毒性作用,因而必须辩证地了解氧对机体的作用,以发挥氧的良性作用,防止和消除氧对机体的损伤和毒性作用。

(一) 氧在肺泡内的弥散

气体弥散的方向、速度取决于氧在体内外的压差梯度,由压力高处向低处弥散。肺泡内氧分



压约为 13.3 kPa(100 mmHg, 1 mmHg $\approx$ 133.3 Pa), 而肺毛细血管静脉血中氧分压仅为 5.3 kPa(40 mmHg), 故氧气可从肺泡向肺泡毛细血管内弥散。虽经过两层细胞(肺上皮细胞和毛细血管内皮细胞)和细胞间质(厚度仅为 1~2 μ m), 但其弥散速度快, 在毛细血管进行的气体交换仅需 0.3 s, 从而保障了机体由外界摄取氧气。

(二) 氧的运输与氧含量

氧是人机体不可缺少的物质, 是机体新陈代谢产生能量的动力。

在正常呼吸空气条件下, 处于安静状态的成年人, 每分钟平均需氧量为 250 ml, 并经肺排出同样数量的二氧化碳。在体力负荷或在病理状态下, 需氧量可通过肺通气量和心输出量的增加和血流速度加快而增加。动脉血中氧分压波动于 10.64~13.3 kPa(80~100 mmHg) 之间, 在该氧气分压下, 这些氧主要与血红蛋白结合。当氧分压增加至 13.3 kPa(100 mmHg) 时, 几乎所有血红蛋白被氧结合形成氧合血红蛋白。倘若血中氧含量进一步增加, 只可能是氧在血浆中的溶解量增加。溶解状态的氧经过毛细血管壁进入细胞外液, 然后通过细胞膜进入细胞内。

血中物理溶解氧量决定于其分压。一般情况下, 呼吸空气时 100 ml 血中含 0.3 ml 溶解氧, 而当呼吸纯氧时为 2.36 ml。在 3 ata 氧压下, 血红蛋白基本上被“解除”了运输氧的功能, 血红蛋白氧近于“饱和”, 在此情况下, 物理溶解在血中的氧含量可达 6.4 ml/100 ml 血, 此时, 组织代谢所需的氧, 除心、脑活动外, 由溶解在血浆中的氧即可满足机体基础代谢之所需。血中氧饱和的这一过程, 保持了血-细胞系统氧的高梯度和氧通向组织的高容量和高速度, 从而改善机体和组织的氧化过程, 纠正缺氧组织和细胞的氧供状态。

(三) 氧在组织中的弥散

组织内毛细血管动脉端血氧分压为 12.0~13.3 kPa(90~100 mmHg), 氧气是以垂直于血流方向向周围组织弥散, 并逐渐减少血中氧张力。当到达毛细血管静脉端时, 氧分压仅为 5.3 kPa(40 mmHg) 左右。氧由毛细血管向细胞弥散也是靠毛细血管动脉端氧分压与组织间的氧分压差和与细胞内的氧分压差进行的, 因为组织内氧分压一般为 4.0~6.0 kPa(30~45 mmHg), 而细胞内只有 0.8~4.7 kPa(6~35 mmHg)。由于氧气不断被组织细胞利用消耗减少, 使细胞内氧分压始终维持在一定水平上(0.8~4.7 kPa), 这就保证了氧气不断地从毛细血管弥散进入组织细胞。

(四) 氧与物质代谢和细胞内能的转换

人体细胞的各种活动, 无论是维持细胞正常生命活动的生理、生化过程, 还是细胞分裂增殖过程, 都要消耗能量。这种能量都是依靠氧将细胞内各种供能物质氧化而得来。细胞供能物质氧化时消耗氧气, 产生二氧化碳和水, 所以又称作细胞的呼吸作用。人体细胞呼吸所需要的氧是由肺吸入, 而产生的二氧化碳, 也是经血液输送到肺部而排出体外。可见, 人体的肺呼吸和细胞呼吸是紧密联系的。

人是绝对需要氧的生物。虽然某些组织细胞, 在暂时缺氧的情况下, 可以暂时维持低水平的生命活动。但是, 如果缺氧时间过长, 细胞将出现不可逆的损伤, 最终导致细胞或个体死亡。细胞氧化需要水分的参与, 体内广泛进行的加水脱氢反应, 实质上是一种间接获得氧、加速脱氢、进行氧化放能的过程。同时, 细胞氧化靠酶的参与, 也是生物氧化的一个特征。

在生命过程中生长、发育、繁殖、组织修复以及机体的其他活动(如脑神经活动、体温调节、消化吸收、分泌活动、排泄、肌肉收缩以及细胞内的一切活动)都需要能量, 机体必须不断地产生能量, 而能量主要来自人体能源物质——糖、蛋白质、脂肪的氧化。一般说来, 全部热量的 70% 来自糖, 5%~10% 来自蛋白质, 15%~20% 来自脂肪。细胞分解能源物质的过程是十分复杂的。据统计, 整个活动不少于 70 个化学反应过程, 但其整个过程可大致分为无氧酵解、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle)和氧化磷酸化三大步骤, 第一步发生在细胞质中, 后两步则发生在线粒



体内。通过这些过程,细胞能够把富有能量的含碳分子,经氧化作用成低能分子,释放自由能,其中一部分自由能可以暂时储存于 ATP 分子中供细胞利用。

二、氧的生物化学

(一) 氧与生物酶

氧化还原是代谢产能、供能、机体耗能的基本环节,在此过程中各种生物酶起着重要作用。氧在燃烧能源物质时,需要各种酶的参与,这也是生物氧化重要特征。

人从体外摄取的能源物质,如糖类、脂肪、蛋白质,不能直接进入细胞内,一定要先分解成小分子才能进入细胞,因此糖类要先在体内降解为葡萄糖或其他六碳糖,脂肪要先降解为脂肪酸和甘油,蛋白质要先降解为氨基酸。但进入细胞的葡萄糖、甘油、脂肪酸和各种氨基酸,仍不能自由地进入线粒体,还要经过进一步分解,才能通过线粒体外、内两层膜而进入到线粒体内;有些还要求在线粒体膜上具有相应载体(如羧酸转位酶等)才能被携带入内。当葡萄糖酵解为丙酮酸(三碳化合物)后,丙酮酸在细胞质中即可进入线粒体参加有氧氧化,从而进一步分解为二氧化碳和水,同时释放更多能量。

(二) 三羧酸循环供能

三羧酸循环或称柠檬酸循环(citric cycle),为一系列反应形成的一个环(图 1-3),即起始为乙酰辅酶 A 与 4 碳的草酰乙酸形成 6 碳的柠檬酸,柠檬酸在顺乌头酸水合酶的催化下形成异柠檬酸,然后再经氧化脱羧转变为 5 碳的 α -酮戊二酸,后者再失去 1 个 CO_2 成为 4 碳的琥珀酸,琥珀酸经过 3 步反应,再产生草酰乙酸,后者又可与另一分子乙酰辅酶 A 结合,开始新一轮循环。每一次循环投入 1 个乙酰基,产出 2 个 CO_2 。循环的 8 步反应中有 4 步是氧化作用,产生还原当量(NADH 或 FADH_2),他们通过电子传递链传氧,可以合成 ATP。

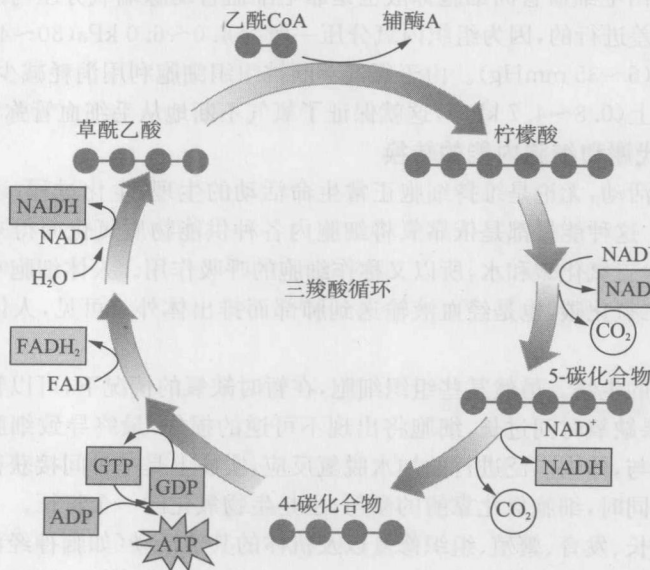


图 1-3 三羧酸循环

氧化磷酸化的任何一个环节失常,都可以影响全部物质氧化供能过程。例如,氰化物中毒主要由于氰化物易与细胞色素中的铁整合,而使细胞色素失去其传递电子的作用,从而迅速抑制细胞呼吸而导致机体死亡。

（三）机体内的抗氧化系统

随着自由基化学和自由基生物学、医学的发展,认识到脂质过氧化与自由基关系甚为密切,而自由基损伤与许多疾病的发生、发展有关。正是由于体内有抗氧化系统,亦称内源性抗氧化系统,与氧自由基保持动态平衡,使得自由基不会对机体造成损害。人体内的内源性抗氧化系统中主要的酶有过氧化物歧化酶、琥珀酸脱氢酶、硒谷胱甘肽氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶等。此外,维生素 C 也是一种清除氧自由基的重要物质。

一、血红素蛋白假说

二、氧敏感性离子通道假说

三、NAD(P)H 氧化酶复合物学说

四、线粒体活性氧逸出假说

||||| 5



酸化停止,可以认为这是低氧反应通路的一种极限情况。线粒体感受到生理范围内不同氧浓度的方式,可能是氧供信号的改变通过电子转运系统的氧化还原状态改变而传导。线粒体抑制剂(如氰化物)并不能解除特异性的低氧适应性反应,这表明了这些反应与线粒体电子转运无关,也就是说线粒体没有参与氧的感受。然而,在颈动脉体中,氰化物可以产生某种刺激,解除低氧适应性反应。一些研究发现,在这些组织中,线粒体与氧信号传导有关。线粒体在不同的氧感受系统可能引起不同的反应,这表明在不同类型细胞的氧感受系统中线粒体的功能可能截然相反。线粒体可能在一些细胞中具有感受氧的能力,而在其他细胞中则没有。细胞线粒体如何感受低氧信号目前还是未知,可能与细胞内 ATP 下降有关或与低氧通过依赖线粒体的信号过程提高 ROS 而激活转录有关。

五、氨基酸羟化酶学说

慢性低氧可以引起氧感受相关基因表达的变化,介导缺氧相关基因表达主要的转录因子为缺氧诱导因子 1α (HIF- 1α),实验已证明 HIF- 1α 介导由低氧所致红细胞生成素(EPO)、血管内皮生长因子(VEGF)、糖酵解酶、葡萄糖转运体、环氧合酶等数十种基因的表达。低氧时 HIF- 1α 变得稳定和高活性是由翻译后的修饰所致,已证明系 HIF- 1α 肽链中氨基酸的羟化、乙酰化、磷酸化修饰的作用。近年提出并受重视的是氨基酸羟化酶学说,认为在常氧时 HIF- 1α 不稳定是由于其中脯氨酸被其羟化酶(PHD/HPH)羟化成羟化脯氨酸,使 HIF- 1α 的赖氧降解域(ODD)结合于一种抗癌基因表达的蛋白质(pVHL),从而经泛素蛋白酶体途径降解;HIF- 1α 中的天冬酰胺被其羟化酶(FIH- 1α)羟化成氢化天冬酰胺,通过阻碍 HIF- 1α 与转录辅因子 P_{300} 等结合而使 HIF- 1α 活性下降。低氧时该羟化酶活性降低,HIF- 1α 中脯氨酸和天冬酰胺不被羟基化,故稳定而不被降解,使细胞中 HIF- 1α 增多,且活性较高,与 HIF- 1β 组成一聚体,与靶基因顺式作用元件结合而促使基因表达,引起细胞的缺氧反应。

六、乙酰转移酶学说

有报道在常氧下乙酰转移酶(ARDF)可将 HIF- 1α 中赖氧降解域的赖氨酸 Lys532 乙酰化,使其与 pVHL 结合,导致 HIF- 1α 经泛素蛋白酶体途径降解。低氧时乙酰转移酶 mRNA 减少,可减少 HIF- 1α 的乙酰化,从而增加 HIF- 1α 的稳定,引起靶基因表达增加和细胞的低氧反应。

七、NO 和 CO 学说

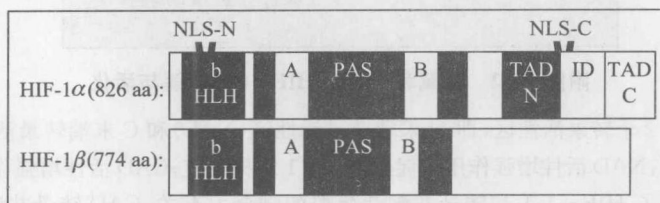
NO 和 CO 可配位结合血红蛋白,并同低氧引起的一系列反应直接相关。NO 和 CO 都能调节 cGMP 水平。已证实 NOPcGMP 系统对 EPO 的生成有调节作用。NO 激活可溶性鸟苷酸环化酶(sGC)产生 cGMP,继而调节 EPO 生成。NOS 和 SGC 的结构中均有血红素。低氧时,在 IPRK 系统中,cGMP 和 EPO mRNA 水平都比正常时高,而且用 NO 抑制剂降低了 cGMP 和 EPO mRNA 水平,证实了 NO 和 cGMP 在 O_2 感受和 EPO 生物合成中有重要作用。

CO 是平滑肌细胞源性的。研究发现,低氧可提高鼠血红素氧化酶 mRNA 水平,刺激 HO-1 的基因转录速度,并提高 HO 活性。HO 促使血红素分解成 CO 和胆绿素,这是内源性 CO 的主要来源。所以低氧增加鼠平滑肌细胞对 CO 的释放,CO 进而刺激 cGMP 水平升高,同时 CO 对 HO-1 mRNA 具有负反馈调节作用。在低氧诱导的 VEGF 基因表达的研究中发现,CO 和 NO 能抑制激活基因转录的低氧增强子,而且阻止 HIF-1 与这些增强子结合。CO 和 NO 能提高 cGMP 水平,而 cGMP 也同样抑制这些低氧诱导的反应。低氧时作为信号分子的 cGMP 在不同类型细胞中表达也有所不同。如在平滑肌细胞中表达升高,在肠上皮细胞中下降。另外,CO、NO 和 cGMP 均阻止

HIF-1 的 DNA 结合, (并且低氧诱导 HIF-1 而 NO 和 CO 抑制其表达与上面所提到的互相矛盾)。说明在低氧感受之后可能存在一种在不同细胞中表达有所不同的额外信号控制环节来调节 NO、CO 和 cGMP 在不同细胞中量的变化, 进而诱导 HIF-1 和基因表达。

附 参与氧感受的重要分子——HIF-1 α

HIF-1 α 是一个氧化还原敏感的转录因子, 在严重低氧和炎症环境下, 能诱导生存反应。HIF-1 属于 DNA 结合蛋白, 是由 α 和 β 两个亚单位组成的异源二聚体, α 和 β 亚单位同属 bHLH/PAS 基因家族, 其中 α 亚单位有 3 种, 分别为 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 。HIF 的 bHLH 区含有 DNA 结合区和 HIF 原发二聚体界面。PAS 区由约 300 个氨基酸残基组成, 含有 PAS-A 和 PAS-B 两个半保守重复区。PAS 区与 HLH 区共同形成继发二聚体界面(附图 1-1)。除 HIF-1 α 外, HIF-1 β 也可与其他许多 bHLH/PAS 蛋白形成具有转录活性的异源二聚体。HIF- $\alpha 1$ 和 HIF- $\alpha 2$ 的生物化学性质非常相似, 能识别同样的 DNA 结合区, 但各自具有独特的生物学效应。如在胚胎发育过程中, HIF- $\alpha 1$ 调节血管生长, HIF- $\alpha 2$ 则调节儿茶酚胺的生成。



附图 1-1 低氧诱导因子的基因结构

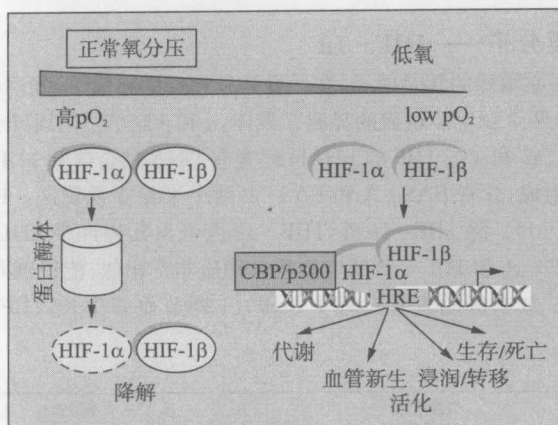
作为转录活化因子, HIF-1 作用于目的基因的增强子序列, 调控多种基因的低氧诱导表达(附表 1-1)。这些基因主要包括葡萄糖代谢、细胞生长、氧运输和传递等。

附表 1-1 受 HIF-1 调控的基因

种 类	靶 基 因
葡萄糖代谢	醛缩酶 A、醛缩酶 C、烯醇酶 1、葡萄糖转运体 1、甘油醛磷酸脱氢酶、己糖激酶 1 和 2、乳酸脱氢酶 A、磷酸果糖激酶 L、磷酸甘油激酶 1、丙酮酸激酶 M
细胞生长	胰岛素样生长因子 2(IGF-2)、IGF 结合蛋白 1 和 3、P21、P35srj
氧转运	瘦素、转铁蛋白、转铁蛋白受体、促红细胞生成素、酪氨酸羟化酶、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、VEGF 受体 FLT-1、纤溶酶原激活物抑制子 1、一氧化氮合成酶 2、血红素加氧酶、肠三叶因子、肾上腺髓质素、铜蓝蛋白、内皮素 1
其他	环氧化酶 2、胶原脯氨酸羟化酶 α 、早老素 1、早老素 2、VL30、P53srj、ETS-1、DEC1

在常氧条件下, HIF-1 α 非常容易被降解, 其降解途径是泛素-蛋白水解酶复合体。抑制蛋白水解酶复合体或缺失泛素依赖酶均能阻断这一过程; 在低氧条件下, HIF-1 α 降解过程被阻断, 导致 HIF-1 α 堆积(附图 1-2)。这一研究结果主要得益于对一种遗传疾病的深入研究, 该疾病被称为 Von Hippel-Lindau (VHL) 综合征, 其主要特点是血管增生, 原因是 VEGF 表达增多。VHL 是一种抑癌基因, VHL 综合征根本原因就是 VHL 缺乏。VEGF 是一种低氧诱导基因, 是 HIF-1 的目标基因之一, 提示 VHL 综合征可能与 HIF-1 有关。Maxwell 等研究发现, 与正常细胞不同, VHL 基因缺陷细胞表达 HIF-1 α 增多, 常氧不能抑制这些细胞的 HIF-1 α 表达水平, VHL 基因被重新导入这些缺陷细胞后, 常氧就能抑制这些细胞的 HIF- α 表达水平, 说明 VHL 基因可能是调控 HIF-1 α 表达的重要因素。HIF-1 $\alpha 1$ 和 HIF-1 $\alpha 2$ 的 PAS 区 C 端(非 PAS 区)附近由 200 个氨基酸残基左右组成的一个氧敏感区, 是影响降解的重要结构, 该区缺失

后,在常氧条件下 HIF-1 α 仍不被降解,因此被称为 ODD。进一步研究表明,VHL 能与 HIF-1 α 的 ODD 结合形成复合物,VHL 复合物类似于泛素连接酶的作用,使 HIF-1 α 与泛素依赖的蛋白水解酶复合体结合并被该酶水解。低氧、铁离子螯合剂(如去铁敏)都可阻断 VHL 这一作用。



附图 1-2 常氧和低氧时 HIF-1 的降解与活化

HIF-1 α 基因含 2 个转录活性区,即 N 末端转录活性区(NAD)和 C 末端转录活性区(CAD)。NAD 与 ODD 有一定的重叠,NAD 活性增强作用是促进 HIF-1 结构稳定;CAD 活性增强作用与结构稳定或蛋白含量无关,而与提高了 HIF-1 α 和转录共激活蛋白的结合力有关,CAD 转录共激活蛋白包括 CBP/p300、类固醇激素受体共激活蛋白和转录中间因子 2。HIF-1 α 2 和 HIF-1 α 1 的结构和功能类似,但 HIF-1 α 3 缺乏 CAD。所以,低氧诱导 HIF-1 α 1 和 HIF-1 α 2 水平增多,除增加蛋白稳定性外,还促进 HIF-1 的转录活性。CAD 和 ODD 的转录活性都具有铁离子依赖性,并受到低氧正向调节,所以它们都被称为 HIF-1 的氧感受区。

经过对 ODD 的 VHL 结合区的细致研究,人们逐渐将目光集中在 HIF-1 α 1 和 HIF-1 α 2 上 ODD 的 VHL 结合区内一小段区域,该区含 20 个氨基酸残基。体外生物合成的该区片段不能与 VHL 结合,加入常氧处理的细胞提取液处理则可使它们结合,而降低反应系统氧分压能使它们分离。也就是说,常氧处理的细胞能产生一种活性物质,这种活性物质可引起这一小段区域与 VHL 结合,而这种结合可被低氧阻断。类似现象也发生在 CAD,常氧诱导的某种活性物质能抑制 CAD 转录共激活蛋白的表达,低氧能阻断这一细胞活性物质发挥作用。对线虫进行的研究表明,这两种生物活性物质分别是脯氨酸羟化酶(PHD)和天冬氨酸羟化酶。PHD 的作用是将 ODD 内的脯氨酸残基羟化,提高 HIF-1 α 1 与 VHL 蛋白的亲合力;天冬氨酸羟化酶的作用是将 CAD 内的天冬氨酸残基羟化,则阻断 p300 与 CAD 的结合。因此,PHD 和天冬氨酸羟化酶均负向调节 HIF-1 的活性,PHD 作用提供 VHL 的结合位点,促进 HIF-1 α 1 水解,而天冬氨酸羟化酶作用是阻断 HIF-1 α 1 与 p300 的结合,抑制 HIF-1 α 1 转录活性。低氧和铁离子螯合剂能阻断脯氨酸羟化酶,限制 VHL 与 ODD 结合,增加 HIF-1 的稳定性,提高 HIF-1 蛋白浓度。低氧和铁离子螯合剂也可阻断天冬氨酸羟化酶,促进 p300 与 CAD 结合,提高 HIF-1 的转录活性。两种羟化酶分别从蛋白含量和功能两个方面调节 HIF-1 α 1。进一步研究发现,PHD 的催化位点为 HIF-1 α 1 的第 402 和 564 位脯氨酸残基;天冬氨酸羟化酶的催化位点为 HIF-1 α 1 的第 803 位天冬氨酸残基。

第四节 活性氧

活性氧(reactive oxygen species, ROS)为含氧的、具有化学活性的物质,包括氧离子(oxygen



ion)及过氧化氢(Peroxide)。因为核外有未配对电子存在,因而活性氧具有很强的化学反应活性。ROS是正常氧代谢的“副产物”,并且通过细胞信号传导,在保持机体恒常性上起了很大作用。

一、细胞内活性氧的生成及其调控

(一) 细胞内活性氧的生成

氧气是多数生物体生命活动的基础物质之一,其作用是参与能量代谢,主要是参与线粒体的呼吸和氧化磷酸化,生成 ATP。其终产物主要是水。但是,氧气在代谢过程中还可产生一系列中间产物,包括氧自由基如超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、羟自由基($\cdot OH$),以及过氧化氢(H_2O_2)和单线态氧(1O_2)等,这些物质具有较强的氧化能力,统称为 ROS(图 1-4)。

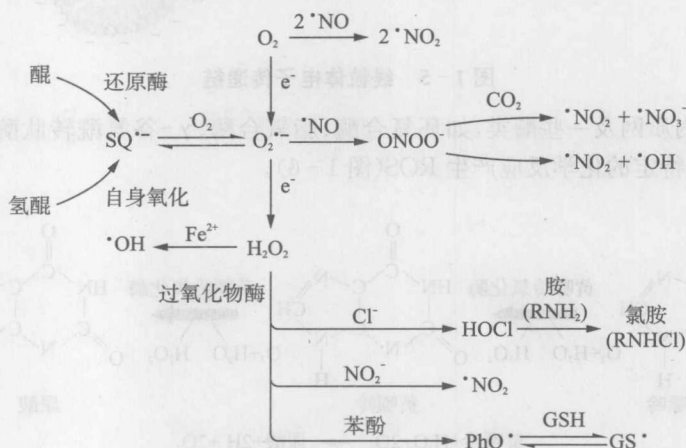


图 1-4 生理性相关 ROS

线粒体是多数真核细胞产生 ROS 的主要部位,在有氧呼吸过程中,大部分电子沿呼吸链传递至末端与分子氧结合生成水,但一小部分(2%~3%)电子可由呼吸链酶复合体 I 和 III 处漏出,使得分子氧单电子还原,生成具有较强氧化作用的超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$),并通过特定的化学反应生成羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)等。实际上,大部分 ROS 的最初来源都是 $O_2^{\cdot-}$ 。

(二) 细胞内活性氧的调控

在正常状态下,线粒体 ROS 的生成速率主要受线粒体内膜跨膜电位($\Delta\varphi_m$)的控制。近年来发现,线粒体中调节氧化磷酸化耦联效率的解耦联蛋白(UCP)可以引起跨膜 H^+ 梯度($\Delta\mu H^+$)的消失而没有任何能量的产生(称为“质子漏”),这种温和的解耦联(mild uncoupling)引起的“质子漏”可直接降低线粒体 $\Delta\varphi_m$,使得 ROS 的生成速度降低(图 1-5)。

结合在细胞质膜上的酶复合体 NADPH 氧化酶是产生 $O_2^{\cdot-}$ 的另一重要部位,主要由胞质中的 $P47^{phox}$ 、 $P67^{phox}$ 和 $Rac1/2$ 以及胞膜上的 $gp91^{phox}$ 和 $P21^{phox}$ 组成。最初发现该酶复合体存在于吞噬细胞,在外界信号(如细菌脂多糖,细胞因子 $TNF-\alpha$ 、 $IL-1$ 、 $IFN-\gamma$ 等)作用下迅速活化,产生大量的 ROS,形成氧化爆发,以清除入侵的病原微生物。

新近有报道指出,具有 NADPH/NADH 氧化酶活性的酶也存在于许多非吞噬细胞中。机体多器官平滑肌均发现 $gp91^{phox}$ 的同源物 Nox1,且在小鼠 NIH3T3 细胞中过表达 Nox1,ROS 的产生增多。由于 NADPH 氧化酶具有激活快、失活也快的特点,故认为其产生的 ROS 可能作为信使分子,在调节机体细胞增殖、分化和凋亡相关的信号传导过程中具有更为重要的意义。