

- mucus [J]. PLoS One, 2010, 5: 15346
- 2 Walsh TJ, Anaissie EJ, Denning DW, *et al.* Treatment of aspergillosis: clinical practice guidelines of the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis, 2008, 46(3): 327 – 360
- 3 Wark P. Pathogenesis of allergic bronchopulmonary aspergillosis and an evidence – based review of azoles in treatment [J]. Resp Med, 2004, 98: 915 – 923
- 4 徐凌, 蔡柏蔷, 徐凯峰, 等. 变态反应性支气管肺曲菌病 23 例临床分析 [J]. 中华内科杂志, 2007, 46(3): 208 – 211
- 5 陆海雯, 李惠萍, 卫平. 变态反应性支气管肺曲霉菌病 22 例临床分析 [J]. 中国实用内科杂志, 2010, 30(5): 441 – 443
- 6 饶会林, 方浩徽, 牛华, 等. 变态反应性支气管肺曲菌病 20 例临床分析 [J]. 临床肺科杂志, 2008, 13: 1574 – 1575
- 7 Agarwal R. What is the current place of azoles in allergic bronchopulmonary aspergillosis and severe asthma with fungal sensitization [J]. Expert Rev Respir Med, 2012, 6(4): 363 – 371
- 8 Noguchi T, Yamamoto K, Moriyama G, *et al.* Evaluation of selqIm levels of carcinoembryonic antigen in allergic bronchopulmonary aspergillosis [J]. J Nippon Med Sch, 2013, 80(6): 404 – 409
- 9 Mou Y, Ye L, Ye M, *et al.* A retrospective study of patients with a delayed diagnosis of allergic bronchopulmonary aspergillosis/allergic bronchopulmonary mycosis [J]. Allergy Asthma Proc, 2014, 35(2): 21 – 26
- 10 金儿, 李婧, 马若冰. 变态反应性支气管肺曲霉菌病临床特点分析 [J]. 医学研究杂志, 2013, 42(2): 147 – 150

(收稿日期: 2015 – 10 – 21)

(修回日期: 2015 – 11 – 10)

吡非尼酮下调 NOX4 减轻由博来霉素诱导的小鼠肺纤维化

曾祥富

摘要 目的 观察 NOX4 在博来霉素诱导的小鼠纤维化肺中的表达及其意义, 探讨 PFD 对 NOX4 表达的影响。方法 72 只 C57 健康雌性小鼠采用数字表法随机分为 PFD 干预组(A 组)、模型组(B 组)、正常对照组(C 组)3 组, 每组各 18 只。采用气管内注入博来霉素(3.5mg/kg)的方法构建小鼠肺纤维化模型。小鼠肺组织行病理切片 HE 和 Masson 染色, 检测肺组织羟脯氨酸(Hyp)含量, 免疫组织化学方法检测 NOX4 在肺组织中的表达。结果 Masson 染色显示: 造模后 B 组于第 7 天、第 14 天、第 28 天 3 个时间点肺纤维化评分较 C 组均增加($P < 0.05$); A 组肺纤维化评分较 B 组降低($P < 0.05$)。造模第 7、14、28 天 3 个时间点 B 组肺组织 Hyp 含量较 C 组均增高($P < 0.05$); A 组肺组织 Hyp 含量较 B 组减低($P < 0.05$)。免疫组化显示造模第 7、14、28 天 3 个时间点 B 组小鼠肺组织均可见在气道平滑肌细胞、上皮细胞、肺泡上皮细胞, 以及血管平滑肌细胞、内皮细胞, 肺成纤维细胞中 NOX4 广泛的强表达; C 组 NOX4 表达较 B 组弱($P < 0.05$); A 组 NOX4 表达较 B 组减弱($P < 0.05$)。结论 NOX4 在肺组织广泛表达, 其表达上调可能与博来霉素诱导的肺纤维化形成相关。PFD 可下调 NOX4 表达, 提示 NOX4 有望成为治疗肺纤维化的新靶点。

关键词 肺纤维化 吡非尼酮 NADPH 氧化酶 4 活性氧族

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.05.041

Pirfenidone Down – regulates the Expression of NOX4 in the Pulmonary Fibrosis in Mice Induced by Bleomycin. Zeng Xiangfu. Department of Respiratory Disease, The Fourth Hospital of Changsha, Hunan 41006, China

Abstract Objective To observe the expression and role of NOX4 in the bleomycin(BLM) – induced pulmonary fibrosis in mice, and to investigate the effects of pirfenidone on the expression of NOX4. **Methods** Seventy – two female adult (C57BL/6) mice were randomly divided into four groups as the following(each group includes eighteen mice): the control group (Group C), the bleomycin group (Group M), the pirfenidone group(Group P). The model of pulmonary fibrosis was established through intratracheally instillation with bleomycin (3.5mg/kg) except group C. Their pathological section of lung tissues were harvested for hemotoxylin and eosin stain and Masson’s trichrome stain, so as to observe the degree of pulmonary fibrosis and to determine hydroxyproline content. Therefore, it aims to examine the distribution and the expression of NOX4 in pulmonary tissues in the above three groups through immunohistochemical method.

Results Masson staining showed that the degree of pulmonary fibrosis in Group M was severer than that in Group C at the 7th, 14th and 28th day separately ($P < 0.05$). The degrees of pulmonary fibrosis in Group P was lower than that in Group M ($P < 0.05$). The content of

hydroxyproline (Hyp) in the lung tissue of Group M was increased than that in Group C ($P < 0.05$). The contents of Hyp in Group P and N were decreased obviously compared with that in Group M respectively ($P < 0.05$). The immunohistochemical studies showed that NOX4 was mainly observed in airway smooth muscle cells, alveolar epithelial cells, lung fibroblast, vascular smooth muscle cells and endothelial cells in lung tissues with a high level expression in Group M on the 7th, 14th or 28th day respectively ($P < 0.05$). Compared with that in Group M, the expression of NOX4 of the lung tissues in Group C was weaker ($P < 0.05$). The expressions of NOX4 of lung tissues in Group P was a little higher than that in Group C ($P < 0.05$), but still lower than that in Group M ($P < 0.05$). **Conclusion** NOX4 was widely expressed in pulmonary fibrosis. The mechanism of up-regulation of the expression of NOX4 may participate in pulmonary fibrosis induced by bleomycin. The pirfenidone can alleviate the degree of pulmonary fibrosis induced by bleomycin, and can play active roles in down-regulating the expression of NOX4. It suggests that NOX4 may become the new target in the treatment of pulmonary fibrosis.

Key words Pulmonary fibrosis; Pirfenidone; NOX4; Reactive oxygen species

肺纤维化 (pulmonary fibrosis, PF) 是多种弥漫性间质性肺疾病的共同病理改变和最终结局, 以特发性肺纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 最为典型。2011 年 IPF 诊治指南提示 IPF 患者早期肺功能可以正常, 但由于不明原因引发肺实质呈进行性不可逆性纤维增殖, 肺功能降低, 最终导致呼吸衰竭, 常于诊断后 2~5 年内死亡, 病死率不低于很多种癌症^[1]。但发病机制仍不十分清楚, 目前缺乏有效的药物治疗。

NOX4 (NADPH oxidase4) 是一种蛋白酶, 以辅酶 NADPH 作为电子供体, 把电子传递给氧气生成超氧阴离子, 后者随后衍生出各种活性氧族 (reactive oxygen species, ROS)^[2]。NOX4 在组织分布和功能上具有特异性, 其产生的 ROS 目前被认为具有信号转导作用, 参与基因表达调控, 影响肌成纤维细胞增殖、分化, 与肺纤维化形成相关^[3]。吡非尼酮 (pirfenidone, PFD) 被认为具有清除氧自由基的作用, 但具体机制不清, 是否可能影响氧化酶 NOX 家族成员, 尤其是干扰肺脏组织细胞中特异的 NOX4 表达从而发挥作用, 目前尚不清楚。为探讨 NOX4 参与上述药物治疗肺纤维化的作用机制, 笔者采用吡非尼酮 (PFD) 灌胃的方法对小鼠肺纤维化模型的形成过程进行干预, 采用检测羟脯氨酸 (Hyp) 值, 病理切片 HE 染色和 Masson 染色观察小鼠肺纤维化动物模型肺组织纤维化程度的改变, 并用免疫组化技术检测肺组织 NOX4 表达的改变, 观察 PFD 对 NOX4 表达的影响。

材料及方法

1. 材料: 博来霉素: 购自日本株式会社, 规格: 15 毫克/支。吡非尼酮: 购自大连美仑生物技术有限公司。羟脯氨酸试剂盒: 购自南京建成生物有限公司。浓缩型 DAB 试剂盒: 购自北京中杉金桥生物有限公司。免疫组化染色试剂盒: 购自北京中杉金桥生物有限公司。兔抗鼠 NOX4 多克隆抗体: 购自北京博奥森

生物技术有限公司。

2. 实验动物预备及管理: 清洁级健康 C57BL/6 雌性小鼠 72 只 (购自中南大学实验动物学部), 体重 16.90 ± 0.99 g, 进入实验前先适应性喂养 1 周并采用数字表法将小鼠随机分成吡非尼酮干预组 (A 组)、模型组 (B 组)、正常对照组 (C 组), 每组动物 18 只; 本实验获中南大学实验动物学部实验动物管理委员会的批准。

3. 实验动物药物干预: 采用气管内注入博来霉素 (BLM) 的方法复制小鼠肺纤维化模型^[4]。造模 24h 后 A 组开始连续强饲法灌胃给予 PFD, 将 PFD 溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠中配成 2.5 mg/ml 浓度, 按 50 mg/kg 的体重给药, 每天 1 次, 直至 28 天^[5]; C 组和 B 组每日胃管内灌注等量生理盐水, 直至 28 天。4 组小鼠每日检测体重和观察一般情况。每组小鼠造模给药后分别于第 7 天、第 14 天和第 28 天 3 个时间点随机选取 6 只小鼠摘眼球取血处死。小鼠左肺全部浸泡于 10% 甲醛溶液中固定备作病理组织学检查 (HE 和 Masson 染色) 及免疫组化检测, 右肺上叶、中叶和下叶于 -70℃ 冰箱用于待测羟脯氨酸的含量。

4. 实验标本采集和指标检测: (1) 碱水解法检测羟脯氨酸 (Hyp) 含量: 羟脯氨酸在氧化剂的作用下所产生的氧化产物和二甲氨基苯甲醛作用呈现出紫红色, 根据其呈色的深浅并和标准管进行光电比色 (吸光度大小比较) 即可计算出羟脯氨酸的含量。(2) 肺标本大体观察: 观察小鼠肺脏表面颜色和光泽, 查看有无水肿、充血、苍白、出血点及结节等, 手感质地、弹性等情况。(3) 小鼠肺间质纤维化模型病理学观察: 行 HE 染色和 Masson 染色, 分别于 100 倍和 400 倍光学显微镜下进行观察肺组织肺泡炎和肺纤维化程度。根据 Szapiel 等^[6]提供的方法确定肺泡炎和肺间质纤维化程度并计算积分。(4) 免疫组织化学染色: 各组小鼠肺组织标本用 10% 甲醛溶液固定, 常规石蜡包

埋,4 μ m连续切片,采用SP法(链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连接法)作免疫组化染色。兔抗鼠NOX4多克隆抗体浓缩液稀释浓度为1:100,以PBS替代一抗作对照。

5. 统计学方法:实验数据利用SPSS 17.0统计软件进行分析。小鼠体重、肺湿重、羟脯氨酸含量和NOX4蛋白表达密度采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示。肺泡炎和肺纤维化程度为等级资料,按下法转化为计量资料后进行统计学处理:0级记0分,1级记1分,2级记2分,3级记3分,依次类推。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),不同组别之间的两两比较采用SNK-q法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 病理组织学观察:肺组织病理标本行HE和Masson染色,在100倍和400倍光镜下观察肺组织纤维增殖改变。造模第7天时,肺组织HE染色400倍光镜观察,见图1。B组(图1B)可见博来霉素诱导的小鼠肺组织内的病理以炎性渗出、肺泡炎为主,炎性细胞总数多,以中性粒细胞为主,肺泡壁和肺泡间隔有一定程度增厚,可见成纤维细胞增殖及细胞外

基质沉积。A组(图1A)也有炎性渗出、肺泡炎,但较B组轻。造模第14天时,HE染色于100倍、400倍光镜下观察各组肺组织病理改变,见图2。B组(图2B)可见肺组织内的病理以成纤维细胞增殖及细胞外基质沉积为主,肺泡炎较轻,炎性细胞总数减少,以淋巴细胞为主,肺泡壁和肺泡间隔增厚明显,A组(图2A)较B组纤维改变少。造模后第28天,HE染色在400倍光镜下观察见B组肺组织纤维增殖,肺组织结构破坏严重,程度较第14天时加重,而A组也见纤维化但较B组轻,见图3。Masson染色病理学观察。造模第7天时100倍和400光镜可见(图4),B组(图4B)大气道及血管壁周围的基质胶原较多,伴纤维组织增生。造模第14天时,B组(图5B)大气道及血管壁周围的基质胶原明显增多,有纤维组织增生,而C组均可见浅蓝色的基质,胶原很少,A组(图5A)较M组轻,但较C组增多。造模第28天时Masson染色则显示不同的改变,C组均可见浅蓝色的基质,胶原很少,而B组肺组织在胸膜下、大气道及血管壁周围的深蓝色基质胶原明显增多,有大量纤维组织增生,A组胶原含量中等(图6)。

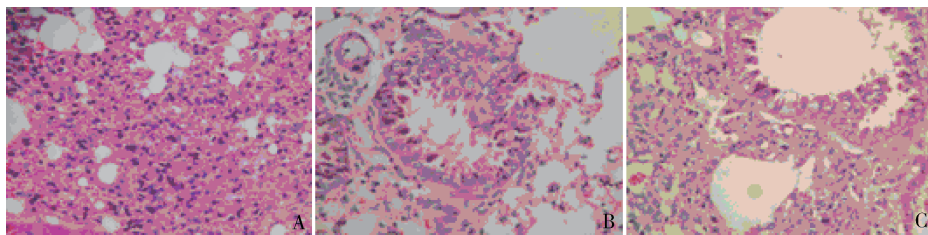


图1 第7天肺组织染色图(HE, $\times 400$)

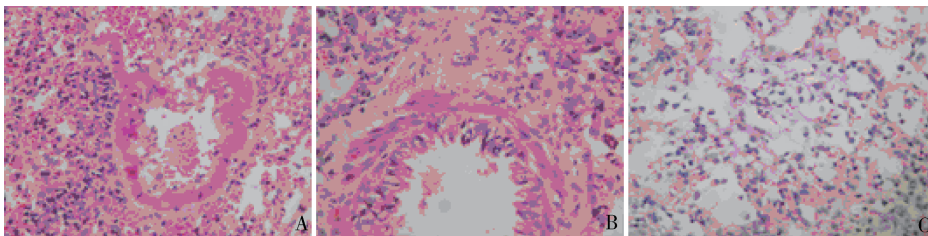


图2 第14天肺组织染色图(HE, $\times 400$)

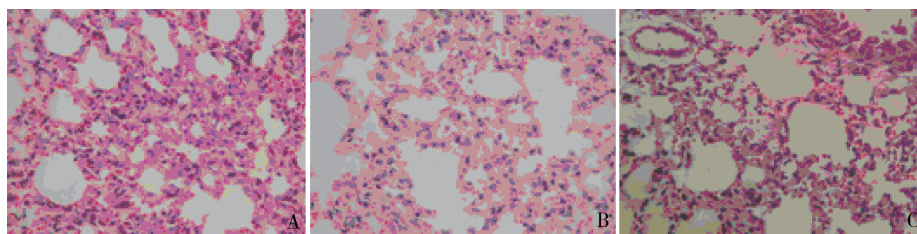


图3 第28天肺组织染色图(HE, $\times 400$)

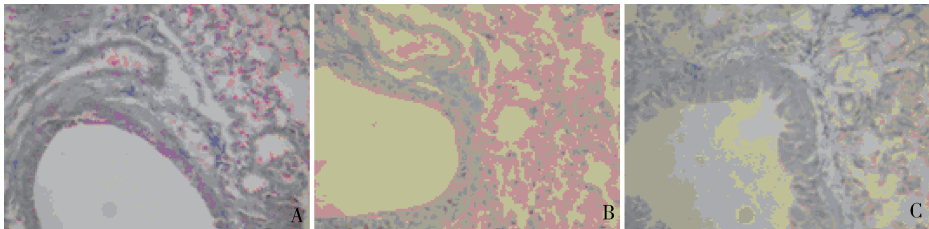


图4 第7天肺组织切片染色图(Masson, ×400)

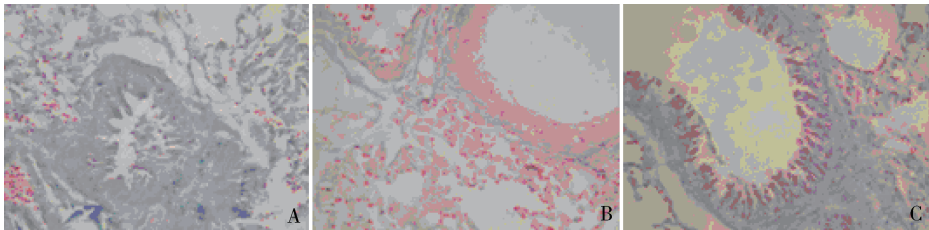


图5 第14天肺组织染色图(Masson, ×400)

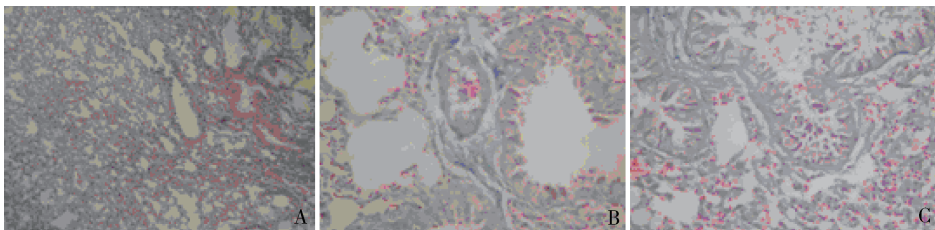


图6 第28天肺组织染色图(Masson, ×400)

肺组织肺泡炎和肺纤维化程度分级和评分:根据HE染色,于100倍光学显微镜下观察早期肺泡炎和后期纤维化程度。B组肺组织在胸膜下、大气道及血管壁周围的基质胶原明显增多,有纤维组织增生,与C组比较差异有统计学意义($P<0.05$);而A组与C组比较仍有增强($P<0.05$)。肺组织切片Masson染色于100倍镜下观察:C组在第7天、第14天和第28天均可见浅蓝色的基质,胶原较少,3组间胶原含量差异有统计学意义($P<0.05$)。B组在第7天、第14天和第28天均可见胸膜下、大气道和血管周围的基质胶原明显增多,少量胶原沉积在肺泡间隔,肺泡间隔及部分肺泡腔被纤维化蛋白占据,成纤维细胞增生,偶有纤维母细胞形成,与C组比较3个时间点胶原含量差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2. 小鼠肺组织羟脯氨酸(Hyp)的含量变化:各组动物肺组织羟脯氨酸(Hyp)含量如表1所示,A组和C组肺组织Hyp含量较B组明显减低($P<0.05$)。

3. 肺组织NOX4蛋白免疫组织化学法检测:造模第7天时,免疫组织化学显示在肺组织内表达的NOX4蛋白,呈棕黄色或棕褐色颗粒状,见图7(400

表1 小鼠肺组织羟脯氨酸测量值($\mu\text{g}/\text{mg}, \bar{x} \pm s$)				
组别	n	羟脯氨酸含量		
		第7天	第14天	第28天
C组	18	$0.521 \pm 0.051^{\#}$	$0.524 \pm 0.024^{\#}$	0.525 ± 0.020
B组	18	0.612 ± 0.026	0.695 ± 0.029	0.825 ± 0.059
A组	18	$0.559 \pm 0.027^{\#}$	$0.625 \pm 0.029^{\#}$	$0.701 \pm 0.015^{\#}$
F		7.966	45.647	59.193
P		0.001	0.000	0.000

与B组比较, $^{\#}P<0.05$

倍)。C组(图7C)肺组织可见NOX4肺组织较弱表达,而B组的肺组织中NOX4广泛表达(图7B),可见表达于气道平滑肌细胞、肺泡上皮细胞、成纤维细胞和血管平滑肌细胞及内皮细胞中,其中在气道平滑肌细胞、血管平滑肌细胞以及肺组织病变严重区NOX4蛋白表达明显。A组介于B组和C组之间。造模第14天,肺组织中NOX4(棕黄色或棕褐色颗粒)的表达情况见图8。B组肺组织NOX4表达较C组明显增强;A组(图8A)的肺组织中NOX4表达水平较B组肺组织的表达减弱。第28天时,B组肺组织的NOX4(棕黄色或棕褐色颗粒)表达明显;A组的肺组织中NOX4表达较B组减低(图9)。

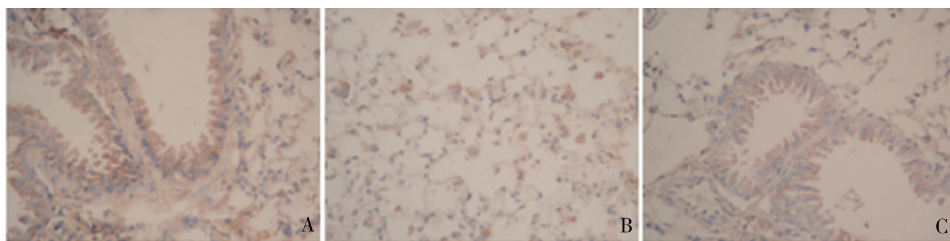


图 7 第 7 天肺组织 NOX4(免疫组化, ×400)

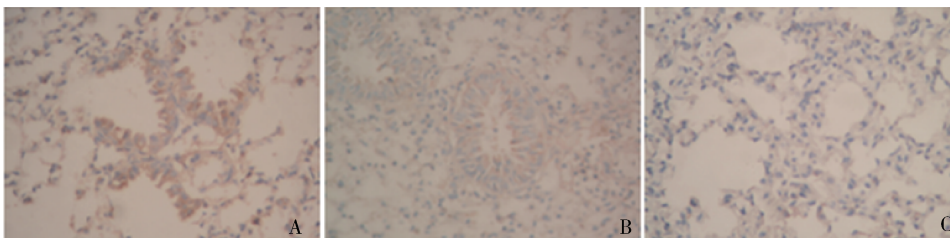


图 8 第 14 天肺组织 NOX4(免疫组化, ×400)

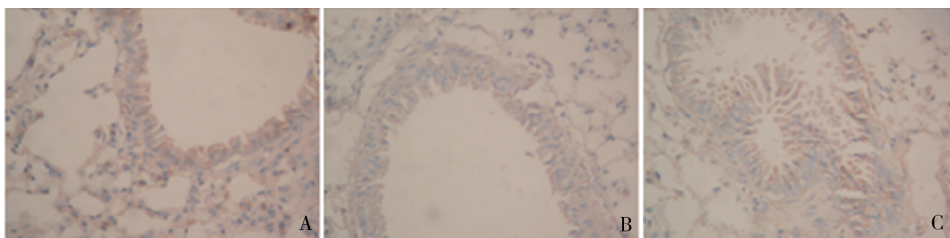


图 9 第 28 天肺组织 NOX4(免疫组化, ×400)

讨 论

近来研究提示 NOX4 可能在机体组织中广泛表达,主要存在于血管平滑肌细胞和内皮细胞,以及成纤维细胞、气道平滑肌细胞中。NOX4 与 p22^{phox} 的复合物可能定位于内质网膜和核膜。由于特异的表达方式、亚细胞结构和亚单位调节,NOX4 产生的超氧阴离子和 H₂O₂ 有了独特的功能^[7]。

本实验免疫组化结果表明 NOX4 蛋白在空白对照组 C 组肺组织中呈低 - 中度广泛表达,主要存在于气道平滑肌细胞、肺泡上皮细胞,以及血管平滑肌细胞和内皮细胞中。B 组病变的肺组织区中 NOX4 蛋白表达增强,尤其是明显见于气道平滑肌细胞、上皮细胞及肺泡上皮细胞、血管平滑肌细胞和内皮细胞以及成纤维细胞。经密度测算结果,造模第 7 天、第 14 天及第 28 天时 B 组与 C 组相比 NOX4 蛋白表达差异均有统计学意义(P < 0.05)。NOX4 蛋白广泛表达于肺组织,提示 NOX4 可能是肺组织的结构蛋白,也进一步表明了 NOX4 基因可能是管家基因的观点。当给予博来霉素致肺组织损伤时,NOX4 蛋白表达上

调。Claussen 等^[8]研究表明博来霉素致肺组织损伤、肺纤维化的机制在于产生超氧阴离子、羟基自由基等活性氧族(reactive oxygen species, ROS)破坏核内 DNA 结构、干扰细胞周期。但是肺组织是如何产生 ROS 的,以及产生 ROS 关键环节在哪里并没有给出明确的答案。2012 年, Weyemi 等^[9]研究证实了定位于核膜(或核周内质网膜)的 NOX4 通过产生 ROS 导致了 DNA 损伤,并发现原癌基因的激活、DNA 的损伤元件与产生氧化介质 H₂O₂ 的 NOX4 之间的关联。Carnesecchi 等^[10]利用 NOX4 基因敲除的小鼠制造肺纤维化模型,发现 NOX4 缺陷的小鼠几乎没有肺纤维化改变,而与此对照的野生型小鼠肺纤维化明显,机制可能是 NOX4 产生大量 ROS 介导了成纤维细胞或肌成纤维细胞的分化形成。此外,体外试验用 TGF-β1 诱导的肺泡上皮细胞凋亡中 NOX4 也起了重要的作用。

本实验也发现 NOX4 在博来霉素诱导的小鼠肺纤维化中表达上调,尤其在病变的气道平滑肌细胞和上皮细胞、肺泡上皮细胞,以及成纤维细胞、血管平滑

肌细胞中 NOX4 表达显著。Hecker 等^[11]研究发现在 IPF 患者的肺纤维化丛集中 NOX4 表达上调。Amara 等^[12]发现从 IPF 患者肺纤维化病灶中分离出来的成纤维细胞 NOX4 表达也增多了。因此,NOX4 在肺纤维化发病过程中扮演了一个重要的角色,NOX4 有望成为治疗肺纤维化的新靶点。

本实验利用 C57 小鼠气管内注入博来霉素的方法制作肺纤维化模型,并用吡非尼酮进行干预,研究发现 A 组较 B 组肺组织病理切片 HE 染色示肺泡结构破坏减少,但与 C 组比较仍可见少量肺间隔增厚,肺泡腔可见少量淋巴细胞和巨噬细胞。而肺组织病理切片 Masson 染色 Szapiel 评分示肺纤维化程度较 B 组明显减轻($P < 0.05$)。肺组织 Hyp 含量发现吡非尼酮干预后与 B 组动物肺组织中 Hyp 含量比较明显减低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,吡非尼酮可减轻博来霉素诱导的小鼠肺纤维化模型中的纤维化程度,减少胶原的沉积。Iyer 等等研究表明 PFD 可以在转录水平抑制肺纤维化动物模型中 TGF- β 基因的表达而减轻胶原的生成。Gurujeyalaks 等研究发现,PFD 可以抑制 PDGF 的产生减少肺纤维化。此外,PFD 还可以抑制 IL-1、IL-6、TNF- α 的生成,提高 MMPS 合成,从而发挥抗炎、抗纤维化的作用。最近 Azuma 等^[13]研究发现在 PFD 临床Ⅲ期试验中肺活量占预计值 >70%、脉搏血氧饱和度 <90% 的 IPF 患者用 PFD 治疗后获益最大,咳嗽、呼吸困难好转,肺活量改善,拥有无进展生存期。对于缺乏有效药物治疗的 IPF 患者来说,PFD 的出现给他们带来了希望。然而,PFD 治疗肺纤维化的疗效和作用机制还有待进一步观察和研究。

本实验免疫组化结果显示 A 组 NOX4 蛋白表达较 B 组的肺组织表达有降低趋势,但较 C 组肺组织表达增多,提示 PFD 可能有降低 NOX4 蛋白表达水平的作用。目前还没有关于 PFD 与 NOX4 之间关系的报道,但有研究发现 PFD 能减少 ROS 的产生。Castro-Torres 等^[14]发现 PFD 与铁螯合成复合物后可以有效清除超氧阴离子和随后形成的 ROS,减轻氧化应激。NOX4 在肺组织广泛表达,其主要功能就是产生 ROS,通过 ROS 的作用 NOX4 有可能参与肺纤维化的形成,而 PFD 具有清除 ROS 和抗纤维化的作用。PFD 可以抑制 NADPH 依赖的微粒体脂质过氧化和清除羟基自由基。因此,笔者推测 PFD 对 NOX4 可能有重要的影响,通过降低 NOX4 的表达发挥抗肺纤维化的作用,但其机制尚需进一步研究。

综上所述,最具代表性的肺纤维性疾病特发性肺纤维化的发病是一个多因素参与的复杂过程,跟老龄化相关,由氧气派生出来的活性氧族(ROS)在 IPF 的病理机制中起了重要作用,减少或清除 ROS 的治疗有助于改善病情,如 PFD-iron 复合物。NOX4 在肺组织中广泛表达,是产生 ROS 的关键酶,针对 NOX4 的治疗也许可以给 IPF 患者增添新的希望。

参考文献

- 1 Maher TM. Idiopathic pulmonary fibrosis: pathobiology of novel approaches to treatment [J]. Clin Chest Med, 2012, 33: 69-83
- 2 Przybylska D, Mosieniak G. The role of NADPH oxidase NOX4 in regulation of proliferation, senescence and differentiation of the cells [J]. Postepy Biochem, 2014, 60(1): 69-76
- 3 Chuong Nguyen MV, Lardy B, et al. NADPH oxidases, Nox: new isoenzymes family [J]. Med Sci:Paris, 2015, 31(1): 43-52
- 4 欧阳彬,肖奇明. 外源性 IL-10 对博来霉素所致小鼠肺纤维化的干预研究 [D]. 长沙,中南大学,2010, 10(1): 6-11
- 5 Schaefer CJ, Ruhrmund DW, Pan L, et al. Antifibrotic activities of pirfenidone in animal models [J]. Eur Respir Rev, 2011, 20(120): 85-97
- 6 Szapiel SV, Elson NA, Fulmer JD, et al. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse [J]. Am Rev Respir Dis, 1979, 120(4): 893-899
- 7 Gordillo G, Fang H, Park H, et al. Nox4-dependent nuclear H2O2 drives DNA oxidation resulting in 8-OHdG as urinary biomarker and hemangioendothelial formation [J]. Antioxid Redox Sign, 2010, 12(8): 3-8
- 8 Claussen CA, Long EC. Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin [J]. Chem Rev, 1999, 99(9): 2797-2816
- 9 Weyemi U, Chevallier OL, Boufraquech M, et al. ROS-generating NADPH oxidase NOX4 is a critical mediator in oncogenic H-Ras-induced DNA damage and subsequent senescence [J]. Oncogene, 2012, 31(2): 1117-1129
- 10 Carnesecchi S, Deffert C, Donati Y. A key role for NOX4 in epithelial cell death during development of lung fibrosis [J]. Antioxid Redox Sign, 2011, 15(3): 77-81
- 11 Hecker L, Vittall R, Jones T, et al. NADPH oxidase-4 mediates myofibroblast activation and fibrogenic responses to lung injury [J]. Nat Med, 2009, 15(9): 1077-1081
- 12 Amara N, Goven D, Prost F, et al. NOX4/NADPH oxidase expression is increased in pulmonary fibroblasts from patients with idiopathic pulmonary fibrosis and mediates TGF- β 1-induced fibroblast differentiation into myofibroblasts [J]. Thorax, 2010, 65(8): 733-738
- 13 Azuma A, Taguchi Y, Ogura T, et al. Exploratory analysis of a phase III trial of pirfenidone identifies a subpopulation of patients with idiopathic pulmonary fibrosis as benefiting from treatment [J]. Resp Res, 2011, 12: 12-18
- 14 Castro-Torres RD, Chaparro-Huerta V. Pirfenidone attenuates microglial reactivity and reduces inducible nitric oxide synthase mRNA expression after kainic acid-mediated excitotoxicity in pubescent rat hippocampus [J]. J Mol Neurosci, 2015, 56(2): 245-254

(收稿日期:2015-09-06)

(修回日期:2015-11-18)