

- 21 Bejerano T, Etzion S, Elyagon S, *et al.* Nanoparticle delivery of miRNA - 21 Mimic to cardiac macrophages improves myocardial remodeling after myocardial infarction[J]. *Nano Lett*, 2018, 18(9): 5885 - 5891
- 22 Xiao N, Zhang J, Chen C, *et al.* miR - 129 - 5p improves cardiac function in rats with chronic heart failure through targeting HMGB1 [J]. *Mamm Genome*, 2019, 30(9 - 10): 276 - 288
- 23 Verjans R, Peters T, Beaumont FJ, *et al.* MicroRNA - 221/222 family counteracts myocardial fibrosis in pressure overload - Induced heart failure[J]. *Hypertension*, 2018, 71(2): 280 - 288
- 24 Wang K, Long B, Liu F, *et al.* A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR - 223 [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(33): 2602 - 2611
- 25 Li G, Song Y, Li YD, *et al.* Circulating miRNA - 302 family members as potential biomarkers for the diagnosis of acute heart failure [J]. *Biomark Med*, 2018, 12(8): 871 - 880
- 26 Liu W, Zheng J, Dong J, *et al.* Association of miR - 197 - 5p, a circulating biomarker for heart failure, with myocardial fibrosis and adverse cardiovascular events among patients with stage C or D heart failure[J]. *Cardiology*, 2018, 141(4): 212 - 225
- 27 Tuday E, Nomura Y, Ruhela D, *et al.* Deletion of the microRNA - degrading nuclease, translin/trax, prevents pathogenic vascular stiffness[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 317(5): H1116 - H1124
- 28 Li FJ, Zhang CL, Luo XJ, *et al.* Involvement of the MiR - 181b - 5p/HMGB1 pathway in Ang II - induced phenotypic transformation of smooth muscle cells in hypertension[J]. *Aging Dis*, 2019, 10(2): 231 - 248
- 29 Sekar D, Shilpa BR, Das AJ. Relevance of microRNA 21 in different types of hypertension[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2017, 19(7): 57
- 30 Jin Y, Zhou TY, Cao JN, *et al.* MicroRNA - 206 downregulates connexin43 in cardiomyocytes to induce cardiac arrhythmias in a transgenic mouse model[J]. *Heart Lung Circ*, 2019, 28(11): 1755 - 1761
- 31 Cheng WL, Kao YH, Chao TF, *et al.* MicroRNA - 133 suppresses ZFHX3 - dependent atrial remodelling and arrhythmia [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2019, 227(3): e13322
- 32 Zhang X, Xiao XP, Ren XA, *et al.* Plasma miRNA - 155 levels predict atrial fibrillation recurrence after cardioversion [J]. *Heart Surg Forum*, 2019, 22(2): E140 - E148

(收稿日期:2020 - 04 - 08)

(修回日期:2020 - 04 - 12)

红细胞抗氧化机制的研究进展

杨 蕾 凌 玲 郝多男

摘 要 氧化应激(oxidative stress)是指机体在遭受各种有害刺激时,体内高活性分子如活性氧自由基(reactive oxygen species,ROS)和活性氮自由基(reactive nitrogen species,RNS)产生过多,从而导致的细胞和组织损伤。红细胞的携氧功能使其不断暴露于内源性和外源性 ROS 所引起的氧化损伤中,因此红细胞建立了强大的抗氧化及损伤修复系统来及时清除 ROS 并保护细胞免受过氧化损伤。本文将重点介绍红细胞抗氧化机制方面的研究进展,以期减轻红细胞的氧化损伤提供更多思路。

关键词 红细胞 活性氧自由基 氧化应激 氧化损伤

中图分类号 R331

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.08.004

氧化应激是德国科学家 Sies H 在 1985 年首次提出的生理概念,指的是机体在受到内外环境有害刺激时,细胞中氧化物与抗氧物的平衡被打破所引起的细胞和组织损伤^[1]。ROS 在一定程度上是必需的,可以帮助机体消灭细菌,清除体内毒素,但是当其产生过多时,不能被抗氧化酶及时清除,就成了危害人体健康的一大危险因素。氧化应激理论一经提出,研究

者们对抗氧化的研究便紧紧相随。

一、研究背景

1. 红细胞的特殊结构:成熟红细胞(red blood cells,RBCs)形如双凹圆盘,是血液中数量最多的一种血细胞,游走于全身组织器官并发挥气体交换、氧化还原、肿瘤免疫等重要生理功能。在这一过程中,RBCs 不断遭到 ROS 攻击,导致其渐进损伤和最终衰老,主要原因是 RBCs 结构的一些特殊性:①红细胞膜脂质富含不饱和脂肪酸,而多不饱和脂肪酸含有双键,持续暴露于高氧水平极易被过氧化^[2];②红细胞总蛋白的 95% 为富含 Fe^{2+} 的血红蛋白(hemoglobin, Hb),铁是自由基反应的催化剂;③正常生理情况下,

基金项目:国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81870096);江苏省高层次双创人才计划——重点科技创新项目[(2013)483]

作者单位:225100 扬州大学医学院、江苏省非编码 RNA 基础与临床转化重点实验室

通讯作者:郝多男,电子信箱:dnyu@yzu.edu.cn

线粒体可以通过多种机制来消除 ROS,但成熟红细胞无线粒体等细胞器,所以损伤后很难自我修复。

2. 红细胞氧化损伤的机制:研究表明,在多种生理病理条件下红细胞都易发生氧化损伤,降低血液供氧能力,加重组织缺氧从而影响机体的运动能力和恢复过程^[3]。红细胞发生氧化损伤后 ROS 会攻击红细胞胞内的主要成分——Hb, Hb 被氧化成高铁血红蛋白(methemoglobin, MetHb)而不能再与氧气结合向组织供氧,当体内 MetHb 含量达到一定浓度时会导致机体昏迷甚至死亡^[4]。微循环是进行气体和物质交换的重要场所,红细胞必须变形才可以穿过比自己直径小的毛细血管到达周围组织发挥供氧功能,维持微循环的有效灌注^[5]。这一过程主要依赖于膜的完整性和变形性。氧化应激时 Hb 氧化会使蛋白交联聚合或形成二硫键,沉积在细胞膜内侧,影响骨架蛋白延展性。ROS 还会攻击红细胞膜脂质,生成脂质过氧化物(lipid peroxide, LPO),如氧化应激的标志物丙二醛,使膜蛋白和磷脂交联,直接破坏质膜的磷脂双分子层结构和膜骨架蛋白,红细胞发生异形改变,导致细胞膜失去良好的流动性,脆性增加,变形能力下降^[6]。这也使得红细胞聚集,血液黏度升高,血管阻力增大,细胞寿命缩短,免疫黏附功能障碍,与许多自身免疫疾病和心脑血管疾病如高血压、冠心病等的发生、发展及不良预后密切相关^[7]。这些都表明了红细胞抗氧化应激机制的研究与维持机体健康密不可分。

二、硫氧还蛋白过氧化物酶-2 的抗氧化作用

红细胞运输氧气导致其不断接触内源和外源性 ROS 而产生氧化应激。为了尽量减少 ROS 对细胞的损伤以及由此产生的应激影响,RBCs 具有广泛的非酶抗氧化系统(如谷胱甘肽和维生素 E)和抗氧化酶系统^[8]。抗氧化酶系统包括:①超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD), SOD 专门清除超氧阴离子自由基;②过氧化氢酶(catalase, CAT), CAT 能通过催化过氧化氢的分解来发挥抗氧化作用;③谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx), GPx 可以清除过氧化氢和脂质过氧化物。

硫氧还蛋白过氧化物酶-2(peroxiredoxin-2, Prx2)是最近发现的抗氧化防御酶家族成员,也是红细胞中第3丰富的蛋白质,利用半胱氨酸残基分解过氧化物,能有效地清除低水平的 H_2O_2 。Nagababu 等^[9]建立的 Prx2 敲除小鼠模型表现为轻度慢性溶血性贫血, Hb 持续自氧化会伴随产生超氧化物,这是一

种相对不活跃的自由基, SOD 迅速将之歧化为 H_2O_2 , Prx2 和 GPx 再进一步分解为水和氧气,降低 Hb 的自氧化作用,减轻 ROS 诱导的 Hb 聚集(图1)。Rocha 等^[8]也指出 Prx2 和 GPx 负责清除细胞内源性/低浓度的 H_2O_2 , 平均 MetHb 水平和血红蛋白降解显著增加,降低了红细胞变形能力。MetHb 可以看作红细胞氧化应激的间接指标,因为它的升高意味着 MetHb 的还原水平难以跟上 Hb 的自氧化。

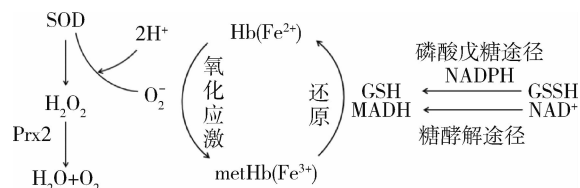


图1 氧化应激时血红蛋白的氧化还原

在红细胞抗氧化酶中, Prx2 是唯一一种至少部分与膜相关的酶。在正常条件下, 约 5% 的 Prx2 通过 C-末端绑定膜带 3 蛋白与膜结合, 被证明可以清除脂质氢过氧化物, 防止血红蛋白降解产物的形成以及所伴随的铁的释放, 抑制红细胞变形能力受损和酶活性的下降^[8,10]。考虑到红细胞中 Prx2 的高浓度, 5% 是不容忽视的。还有进一步的研究表明, Prx2 与膜的结合程度受氧化应激和缺氧的影响, Prx2 是在缺氧条件下与膜结合 Hb 自氧化产生的 H_2O_2 反应的首选酶, 可以抑制细胞骨架蛋白质损伤所导致的红细胞膜形态改变^[11]。

三、miR-144/451 与红系氧化应激

红细胞系由不同发育阶段的红细胞组成, 从原始红细胞分化脱核最终变为成熟红细胞。研究发现, 这一发育过程受到一个庞大且精密的系统调控。miRNA(miRNA)是一类长度为 18~25 核苷酸(nt)的非编码小分子 RNA, 通常降低靶基因转录本的稳定性或抑制靶基因转录本的表达^[12]。miR-144/451 在人和小鼠基因组中分别位于 17 号和 11 号染色体上, 是一个双顺反子基因位点, 编码两个高度保守的 miRNAs; miR-144-3p 和 miR-451a。miR-144/451 在红细胞内表达很丰富, 且几乎完全存在于红细胞中^[13,14]。主要有以下转录因子参与 miR-144/451 红系氧化应激过程。

1. FOXO3a(forkhead box O3a): FOXO3a 作为红系中一个重要的核转录因子, 在氧化应激的多个信号通路中发挥重要作用, 通过转录调控一些凋亡/细胞生长相关基因在凋亡和细胞生长中起着关键作

用^[15]。FOXO 家族的成员具有一个独特的高度保守的叉头 DNA 结构域,该结构域受蛋白激酶 Akt、SGK 和 IKK β 负调控。这些激酶对 FOXO3a 的磷酸化作用导致 FOXO3a 从细胞核移送到细胞质,转录活性被抑制。最近的研究也揭示了 FOXO 在保持造血干细胞自我更新能力方面的重要性,FOXO3a 在应对生理氧化应激中起重要作用,从而调解在 HSC 隔间中静默和增强存活率,这是其长期再生潜力所必需的功能^[16]。小鼠 miR-144/451 基因被敲除后,红细胞氧化应激的敏感度显著增加,这主要由于 miR-451 靶基因 Ywhaz 的表达明显增高所致。ROS 水平增高又使得 AKT 急剧磷酸化,磷酸化后的 FOXO3a 暴露结合位点与 Ywhaz 所编码的 14-3-3 ζ 蛋白形成复合物,从细胞核内转移到细胞核外,并且 14-3-3 ζ 蛋白封闭核定位信号,阻止 FOXO3a 再入核,降低 FOXO3a 转录抗氧化酶的功能,导致红细胞中 CAT 和 GPx-1 生成减少,红细胞氧化应激损伤加剧,贫血加重^[17]。

2. NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2): Nrf2 是调控细胞氧化应激反应的另一个重要转录因子,维持细胞内氧化还原稳态^[18]。氧化应激发生后,原被 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (kelch-like ECH2 associated protein 1, Keap1) 蛋白锚定在细胞骨架上的 Nrf2,与 Keap1 解离进入细胞核,并与抗氧化反应元件结合,启动下游靶基因抗氧化酶的表达,可以减轻 ROS 和亲电体引发的细胞损伤,从而抑制氧化应激反应^[18]。miR-144 和 Nrf2 信号之间的潜在联系已在许多细胞和组织类型中进行了探索^[19-21]。miR-144 通过碱基互补原则结合 Nrf2 的 3'非翻译区 (3'-untranslated region, 3'UTR),抑制 Nrf2 的 mRNA 翻译。由此可见,miR-144 和 miR-451 共同参与红细胞的抗氧化作用。

四、丙酮酸钠的抗氧化机制

丙酮酸钠的抗氧化、抗炎及细胞器官保护作用已经在多个模型中得到验证,也可以改善红细胞功能,减轻红细胞氧化损伤。目前认为主要通过以下几种途径:(1)作为简单的 α -酮酸,能够中和 H_2O_2 的氧化能力,与 H_2O_2 反应生成二氧化碳和水,阻止 H_2O_2 浓度升高杀伤正常细胞,抑制 ROS 的生成^[22]。(2)红细胞因为胞内没有线粒体,主要从血浆中摄取葡萄糖,90%~95% 经糖酵解途径代谢。当细胞发生氧化损伤时,糖酵解途径中的关键酶,即磷酸果糖激酶 1

会失活,使糖酵解途径受阻。而丙酮酸是糖代谢途径中的关键中间产物,在糖酵解途径中,内源性丙酮酸可经由乳酸脱氢酶 (LDH) 催化转化为乳酸供能,同时促进 NAD^+ (氧化型辅酶 I) 向 NADH (还原型辅酶 I) 转化。NADH 可以抑制脂质过氧化反应,作为辅助因子在 NADH 脱氢酶作用下还原 MetHb (图 1)。已有研究证明外源性丙酮酸钠同样可以阻止糖酵解障碍,保持 $NAD^+/NADH$ 的正常比例^[23]。(3)丙酮酸钠升高 GSH/GSSG 比率从而发挥抗氧化作用。磷酸戊糖途径中,丙酮酸钠促进 NADPH (还原型辅酶 II) 的生成,NADPH 是细胞内很重要的还原当量,最关键的一个作用是把氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 重新还原成谷胱甘肽 (GSH),而 GSH 是细胞内重要的自由基清除剂,可以保护膜蛋白和血红蛋白中巯基不被破坏,维持红细胞活性。

上述有关丙酮酸钠抗氧化作用的研究在临床上很有指导意义。例如,输血是外科治疗中挽救患者生命的重要手段之一,但红细胞存储效果的维持也是一大难点。有研究发现,在红细胞储存过程中,添加外源性丙酮酸钠,可以使储存血细胞的能量代谢水平提高而降低氧化应激水平,从而改善红细胞存储损伤问题,减小回输体内后不良反应的发生率^[24]。

五、展 望

氧化应激的概念提出以来,研究者在氧化应激/抗氧化平衡等方面做了很多探索,外源性的热辐射、环境污染、氧化还原类的物质等都能使细胞产生 ROS,人们寻求抗氧化剂来清除自由基以制止氧化应激对身体的伤害。红细胞的重要生理作用和特殊结构特点使其更易受氧化应激损伤。红细胞的损伤影响着与人类健康息息相关的多种血液疾病,但目前针对红细胞体系的相关研究还不是很多,所以进一步科学全面的研究红细胞抗氧化机制来预防血液疾病或改善健康是非常有必要的。希望未来能通过干预红细胞氧化损伤后发生的血红蛋白变性、膜脂质和膜蛋白被破坏、酶活性降低、糖酵解受阻等中间环节,尽可能维持红细胞正常生理形态和功能状态。

参考文献

- 1 Sinha A, Chu TTT, Dao M, *et al.* Single-cell evaluation of red blood cell bio-mechanical and nano-structural alterations upon chemically induced oxidative stress[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:9768
- 2 Harris WS, Luo J, Pottala JV, *et al.* Red blood cell polyunsaturated fatty acids and mortality in the women's health initiative memory study [J]. *J Clin Lipidol*, 2017, 11(1):250-259
- 3 Mohanty JG, Nagababu E, Rifkind JM. Red blood cell oxidative stress impairs oxygen delivery and induces red blood cell aging[J].

Front Physiol, 2014,5:84

- 4 Varlet V, Ryser E, Augsburg M, *et al.* Stability of postmortem met-hemoglobin: artifactual changes caused by storage conditions[J]. Forensic Sci Int, 2018,283:21 – 28
- 5 McMahon TJ. Red blood cell deformability, vasoactive mediators, and adhesion[J]. Front Physiol, 2019,10:1417
- 6 Antwi – Boasiako C, Dankwah GB, Aryee R, *et al.* Correlation of lipid peroxidation and nitric oxide metabolites, trace elements, and antioxidant enzymes in patients with sickle cell disease[J]. J Clin Lab Anal, 2020,13:e23294
- 7 Peters SA, Woodward M, Rumley A, *et al.* Plasma and blood viscosity in the prediction of cardiovascular disease and mortality in the scottish heart health extended cohort study [J]. Eur J Prev Cardiol, 2017,24(2):161 – 167
- 8 Rocha S, Gomes D, Lima M, *et al.* Peroxiredoxin 2, glutathione peroxidase, and catalase in the cytosol and membrane of erythrocytes under h2o2 – induced oxidative stress[J]. Free Radic Res, 2015,49(8):990 – 1003
- 9 Nagababu E, Mohanty JG, Friedman JS, *et al.* Role of peroxiredoxin – 2 in protecting rbcs from hydrogen peroxide – induced oxidative stress [J]. Free Radic Res, 2013,47(3):164 – 171
- 10 Bayer SB, Low FM, Hampton MB, *et al.* Interactions between perox-iredoxin 2, hemichrome and the erythrocyte membrane[J]. Free Rad-ic Res, 2016,50(12):1329 – 1339
- 11 Luo W, Chen I, Chen Y, *et al.* Prdx2 and prdx4 are negative regula-tors of hypoxia – inducible factors under conditions of prolonged hy-poxia[J]. Oncotarget, 2016,7(6):6379 – 6397
- 12 Mohr AM, Mott JL. Overview of microrna biology[J]. Semin Liver Dis, 2015,35(1):3 – 11
- 13 Xu P, Palmer LE, Lechaue C, *et al.* Regulation of gene expression by mir – 144/451 during mouse erythropoiesis[J]. Blood, 2019,133(23):2518 – 2528
- 14 Wang T, Wu F, Yu D. Mir – 144/451 in hematopoiesis and beyond [J]. ExRNA, 2019,1(1):1 – 16

- 15 Mu D, Miao C, Cheng Y, *et al.* The on – off action of forkhead pro-tein o3a in endotoxin tolerance of kupffer cells depends on the pi3k/ akt pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2020,82:106342
- 16 Bigarella CL, Li J, Rimmele P, *et al.* Foxo3 transcription factor is es-sential for protecting hematopoietic stem and progenitor cells from oxi-dative DNA damage[J]. J Biol Chem, 2017,292(7):3005 – 3015
- 17 Wang W, Hang C, Zhang Y, *et al.* Dietary mir – 451 protects ery-throid cells from oxidative stress via increasing the activity of foxo3 pathway[J]. Oncotarget, 2017,8(63):107109 – 107124
- 18 Iranshahy M, Iranshahi M, Abtahi SR, *et al.* The role of nuclear fac-tor erythroid 2 – related factor 2 in hepatoprotective activity of natural products: a review[J]. Food Chem Toxicol, 2018,120:261 – 276
- 19 Zhou S, Ye W, Zhang Y, *et al.* Mir – 144 reverses chemoresistance of hepatocellular carcinoma cell lines by targeting nrf2 – dependent antioxidant pathway[J]. Am J Transl Re, 2016,8(7):2992 – 3002
- 20 Li B, Zhu X, Ward CM, *et al.* Mir – 144 – mediated nrf2 gene silen-cing inhibits fetal hemoglobin expression in sickle cell disease[J]. Exp Hematol, 2019,70:85 – 96
- 21 Zhou C, Zhao L, Zheng J, *et al.* Microrna – 144 modulates oxidative stress tolerance in sh – sy5y cells by regulating nuclear factor erythroid 2 – related factor 2 – glutathione axis[J]. Neurosci Let, 2017,655:21 – 27
- 22 Colleoni, Silvia, Ramos – Ibeas, *et al.* Pyruvate antioxidant roles in human fibroblasts and embryonic stem cells[J]. Mol Cell Biochem, 2017, 429:137 – 150
- 23 Patgiri A, Skinner OS, Miyazaki Y, *et al.* An engineered enzyme that targets circulating lactate to alleviate intracellular nadh:nad(+) im-balance[J]. Nat Biotechnol, 2020,38(3):309 – 313
- 24 Xia S, Chen G, Wang B, *et al.* Addition of sodium pyruvate to stored red blood cells attenuates liver injury in a murine transfusion model [J]. Mediators Inflamm, 2016,2016(1):1 – 9

(收稿日期:2020 – 03 – 21)

(修回日期:2020 – 04 – 01)

(接第 19 页)

- 13 Duan D, Derynck R. Transforming growth factor β (TGF – β) – in-duced up – regulation of TGF – β receptors at the cell surface ampli-fies the TGF – β response[J]. J Biol Chem, 2019,294(21):8490 – 8504
- 14 Kong P, Shinde AV, Su Y, *et al.* Opposing actions of fibroblast and cardiomyocyte Smad3 signaling in the infarcted myocardium[J]. Cir-culation, 2018,137(7):707 – 724
- 15 Lan HY. Diverse roles of TGF – β /Smads in renal fibrosis and infl – ammation[J]. Int J Biol Sci, 2011,7(7):1056 – 1067
- 16 Yuan H, Fan Y, Wang YH, *et al.* Calcium – sensing receptor pro-motes high glucose – induced myocardial fibrosis via upregulation of the TGF – β /Smads pathway in cardiac fibroblasts[J]. Mol Med Rep, 2019,20(2):1093 – 1102
- 17 Chothani S, Schafer S, Adami E, *et al.* Widespread translational c – ontrol of fibrosis in the human heart by RNA – binding proteins[J]. Circulation, 2019,140(11):937 – 951
- 18 Connolly M, Garfield BE, Crosby A, *et al.* miR – 1 – 5p targets TGF – β R1 and is suppressed in the hypertrophying hearts of rats with

pulmonary arterial hypertension [J]. PLoS One, 2020, 15(2):e0229409

- 19 Zhao X, Wang K, Liao Y, *et al.* MicroRNA – 101a inhibits cardiac fi-brosis induced by hypoxia via targeting TGF β R I on cardiac fibro-blasts[J]. Cell Physiol Biochem, 2015,35(1):213 – 226
- 20 Shan H, Zhang Y, Lu Y, *et al.* Downregulation of miR – 133 and miR – 590 contributes to nicotine – induced atrial remodelling in ca-nines[J]. Cardiovasc Res, 2009,83(3):465 – 472
- 21 Tijssen AJ, van der Made I, van den Hoogenhof MM, *et al.* The mi-croRNA – 15 family inhibits the TGF β – pathway in the heart[J]. Cardiovasc Res, 2014,104(1):61 – 71
- 22 Yue Y, Meng K, Pu Y, *et al.* Transforming growth factor beta (TGF – β) mediates cardiac fibrosis and induces diabetic cardiomyopathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2017,133:124 – 130
- 23 Lu B, Su Y, Das S, *et al.* The neuronal channel NALCN contributes resting sodium permeability and is required for normal respiratory rhythm[J]. Cell, 2007,129(2):371 – 383

(收稿日期:2020 – 04 – 20)

(修回日期:2020 – 04 – 29)