

活性氧对低氧诱导因子的调节

孙学军*, 彭兆云, 陈箫莹, 陶恒沂

(第二军医大学海军医学系潜水医学教研室, 上海 200433)

[摘要] 需氧生物的生存离不开氧的供应。如果在物质氧化产生能量过程中, 氧未被完全还原成水, 可导致氧自由基的产生, 氧自由基也可转变成一些非自由基氧活性物质。由于功能上的相似性, 这些物质被统称为活性氧(ROS)。ROS增多可造成蛋白质、DNA和脂质损伤。许多证据表明, 氧分压改变、激素、细胞因子和化学物质等均可引起的ROS增加, 作为细胞信号分子, ROS可参与细胞功能的调节。低氧诱导因子(HIF)是各种低氧诱导基因调节的关键转录因子, 它的活性复合体是由2个亚单位组成的异构体。最近研究发现, 无论是缺氧或非缺氧情况, ROS均参与HIF活性的调节。本文主要就ROS的产生及其对HIF活性调节方面的文献进行综述。

[关键词] 低氧诱导因子; 活性氧; 转录因子

[中图分类号] R 333.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0660-05

Reactive oxygen species in regulation of hypoxia-inducible factor

SUN Xue-jun*, PENG Zhao-yun, CHEN Xiao-ying, TAO Heng-yi (Department of Diving Medicine, Faculty of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Oxygen is a mandatory for all aerobic organisms. Oxygen-containing free radicals are produced when oxygen is not completely reduced to water in energy-producing oxidation reaction. The radicals may also transform into other reactive compounds through electron transfer and all the compounds with similar functions are referred as reactive oxygen species (ROS). Increased ROS is known to cause damage to proteins, DNA and lipids. Much evidence showed that changes in partial oxygen pressure, hormone, cytokine and chemical stimulation could increase ROS, and ROS, acting as signaling molecules, mediates cell functions. Hypoxia-inducing factor (HIF), a key transcriptional factor for most hypoxia-inducible genes, is a heterodimer consisting of 2 subunits. Recent study found that ROS plays an important role in HIF activity regulation under hypoxic and non-hypoxic conditions. This paper reviews the production of ROS and its role in the regulation of HIF activity.

[KEY WORDS] hypoxia-inducible factor; reactive oxygen species; transcriptional factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(6): 660-664]

需氧生物的生存依赖物质氧化代谢产生能量。在氧化代谢过程中, 能量物质提供电子, 氧是最终的电子接受者, 氧不足或缺乏必然导致需氧生物能量供应障碍。因此需氧生物的生存离不开氧的供应。如果在物质氧化产生能量的过程中, 氧未完全还原成水, 则导致氧自由基的产生, 氧自由基也可转变成非自由基氧活性物质。由于功能上的相似性, 这些物质被统称为活性氧(ROS)。ROS增多可造成蛋白质、DNA和脂质损伤。许多证据表明, 作为细胞信号分子, ROS可参与细胞功能的调节。

低氧诱导因子(HIF)是参与细胞缺氧反应的最重要物质。最近研究发现, 非缺氧情况下, HIF还受凝血因子、激素、细胞因子等应激因子的调节。无论是缺氧或非缺氧情况, ROS均参与HIF活性的调节。本文主要就ROS的产生及其对HIF活性调节方面的文献进行综述。

可以变成各种自由基, 如接受1个电子产生超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$), 再接受1个电子产生过氧化氢(H_2O_2), 再接受1个电子产生羟自由基(OH^{\cdot})。

在线粒体内, 通过电子传递链中的细胞色素氧化酶, 氧分子接受4个电子, 被还原成水。正常情况下, 有少量 $O_2^{\cdot-}$ 从电子传递链上泄露出来。当出现电子传递链被过度还原, 会有更多 $O_2^{\cdot-}$ 泄露出来。此外, 过氧化物酶、黄素酶等催化反应均可产生一定量 $O_2^{\cdot-}$ 。在内质网内, 细胞色素P-450还原酶和细胞色素b-5还原酶催化反应可产生 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 。在各种损伤组织特别是缺血再灌注损伤组织中, 黄嘌呤氧化酶催化反应是产生 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的主要来源。吞噬性细胞, 如中性粒细胞被激活时, 在NADPH氧化酶的催化下, 细胞内80%的氧分子形成 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 , 中性粒细胞聚集是炎症

1 ROS的产生

氧分子拥有2个不成对电子, 属于自由基, 但受其特殊结构的限制, 不表现出强的自由基活性。1个氧分子接受4个电子被还原成2分子水。如果氧分子没有被完全还原, 就

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30500579). Supported by General Program of National Natural Science Foundation of China (30500579).

[作者简介] 孙学军, 博士, 副教授, 硕士生导师。

* Corresponding author. E-mail: sunxjk@hotmail.com

组织中 ROS 产生的重要来源。在铁、铜等过渡金属离子参与下, $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 可形成 OH^{\cdot} 。正常情况下, 过渡金属离子以结合状态存在, 或被柠檬酸盐和 ATP 等小分子物质螯合, 所以 OH^{\cdot} 产生的数量很少。当发生缺血和酸中毒情况下, 组织内过渡金属离子被释放出来, OH^{\cdot} 产生的数量会明显增加。与 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 相比, 由于 OH^{\cdot} 的活性强, 半衰期短, 扩散距离小, 只在其生成部位发挥作用。因此, 在这些病理情况下, OH^{\cdot} 可作为 $O_2^{\cdot-}$ 和 H_2O_2 的效应分子发挥毒性作用^[1]。

2 ROS 的信号作用

$O_2^{\cdot-}$ 不能自由扩散, 不具备作为第二信使分子的特征。 $O_2^{\cdot-}$ 歧化产生的 H_2O_2 , 属于非极性分子, 易自由扩散, 具备作为第二信使分子的特征。正常情况下, H_2O_2 在胞质和线粒体内被谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)降解, 在过氧化物酶体内被过氧化氢酶降解。但在 Fe^{2+} 存在情况下, H_2O_2 可转变成 OH^{\cdot} (Fenton 反应), OH^{\cdot} 作用于附近蛋白质中 Fe-S 和半胱氨酸残基, 破坏其功能。

正常情况下, 细胞产生的少量 ROS 被内源性抗氧化系统灭活。内源性抗氧化系统包括抗氧化酶和抗氧化物质。抗氧化酶有(SOD)、GPX、过氧化氢酶等; 抗氧化物质有谷胱甘肽和抗氧化维生素等^[2]。病理情况下, 当体内 ROS 产生数量超过机体抗氧化能力, ROS 就会损伤蛋白质、DNA、多糖和脂质, 这就是氧化应激。

与氧化应激不同的是, 最近许多研究发现, 在一些细胞因子、激素、血管活性物质和金属离子作用下, 一些酶反应可产生少量 ROS, 这些 ROS 作为信号分子发挥调节作用^[3]。典型的例子是 NADPH 氧化酶产生 $O_2^{\cdot-}$ 。NADPH 氧化酶是参与中性粒细胞呼吸爆发的重要物质, 当 NADPH 氧化酶活化, 将 NADPH 上的电子传递给氧分子快速产生 $O_2^{\cdot-}$ ^[3,4]。NADPH 氧化酶也存在于非吞噬细胞, 如血管平滑肌和肿瘤细胞中^[3]。由于组成这些细胞的 NADPH 氧化酶亚单位活性较低, 这些细胞内的 NADPH 氧化酶产生 $O_2^{\cdot-}$ 的数量明显少于中性粒细胞。

3 HIF 的结构与调节

HIF 是作为促红细胞生成素(EPO)基因表达的转录因子被首先确定的, 后来发现, 大多数低氧诱导基因的低氧诱导途径是通过 HIF 实现的。因此, HIF 被称为低氧适应调节的管家转录因子^[5]。HIF 属于 DNA 结合蛋白, 是由 α 和 β 2 个亚单位组成的异源二聚体, α 和 β 亚单位同属 bHLH/PAS 基因家族成员。 β 亚单位一般不受其他因素调节, 在细胞内稳定存在, HIF 的活性主要决定于 α 亚单位的水平。 α 亚单位有 3 种, 分别为 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 和 $\alpha 3$ 。

大量研究表明, 氧分压对 HIF-1 α 的调节主要发生在转录后水平。HIF-1 α 有 1 个位于 C 末端的氧依赖调节区(ODD), 2 个分别位于 C 末端(TADC)和 N 末端(TADN)转

录活性区(TAD)。正常氧分压条件下, ODD 上的 2 个脯氨酸残基(P402 和 P564)被脯氨酸羟化酶(PHD)羟化, 导致 HIF-1 α 与抑癌蛋白 VHL 结合, 启动 HIF-1 α 的泛素化和蛋白水解过程。在这一过程中, PHD 的活性最关键, 其活性受氧分压调节, 并因此被确定为氧感受器。目前已经有 4 种 PHD 被确定^[6]。细胞内还存在一种天冬氨酸羟化酶(FIH), 通过羟化 TADC 上的天冬氨酸残基(N803), 调节 HIF-1 α 的转录活性。此外, TADC 还受到氧化还原因子、甾体激素受体共激活因子和转录中介分子等的调节, 这些调节作用依赖于细胞内的氧化还原水平, 提示 ROS 参与 HIF-1 α 转录活性的调节。

尽管 HIF-1 主要受氧分压调节, 但越来越多的证据表明, HIF-1 也受到其他一些因素的调节, 例如胰岛素、凝血酶、血管紧张素、细胞因子和金属离子等。有证据表明, 非氧分压因素调节 HIF-1 可能有 ROS 参与^[7]。

4 ROS 对 HIF-1 的调节

4.1 低氧情况下 ROS 对 HIF-1 的调节

低氧情况下, 来自线粒体的 ROS 对 HIF-1 具有重要调节作用。最早的证据来自颈动脉体细胞, 抑制该类细胞的线粒体呼吸链能模拟低氧效应^[8]。关于这种调节作用, 存在两种相反的观点。一种观点认为, 低氧使线粒体产生 ROS 减少; 另一种观点认为, 低氧使线粒体产生 ROS 增加。第一种观点基于低氧情况下某些细胞产生 ROS 减少, 如低氧处理可使肺泡上皮、肝和心肌细胞产生 ROS 减少^[9]。更多证据发现, 低氧细胞产生 ROS 增多^[10]。在肝细胞, 当氧分压降低到 0.27~0.40 kPa 以下时, 细胞色素 C 氧化酶活性降低, 使氧化磷酸化过程在细胞色素 C 氧化酶阶段速度降低, 其上游泛醌会有多余电子出现, 电子传递给氧分子, 产生 ROS^[11]。产生相反观点的原因可能是由于低氧与 ROS 产生存在非线性关系, 只有在低氧程度较轻时, 线粒体呼吸链释放 ROS 才会增多, 当细胞内氧分压极端降低时, 线粒体呼吸链释放 ROS 反而会减少。

低氧时线粒体释放 ROS 增加调节 HIF 有两种相反的效应, 一是通过抑制 PHD 活性实现正向调节, 另一个是通过 HIF-1 氧化还原活性调节位点实现负向调节。 H_2O_2 和氧化剂处理可直接破坏 HIF-1 其 DNA 结合活性, 预先加入还原剂可抑制该效应。氧化还原因子和硫氧还蛋白均可增强 HIF-1 的活性。氧化还原因子主要与 TADC 结合, TADC 上的 800 和 848 半胱氨酸残基是 HIF 与共激活因子结合的关键位点^[12]。在 Hep3B 和 HeLa 细胞, 加入 H_2O_2 可使低氧条件下 HIF-1 的稳定性降低。黄嘌呤氧化酶产生的 $O_2^{\cdot-}$ 能抑制低氧诱导的肾髓质细胞 HIF-1 水平升高^[13]。

另外, 细胞色素氧化酶也参与低氧情况下调节 ROS 和 HIF-1 α 的水平。抑制细胞色素氧化酶活性能消除低氧诱导的 EPO 和磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶(PCK)表达。给予 H_2O_2 抑制 HepG2 细胞低氧诱导的 EPO 表达, 也抑制肝细胞和 PC12 细胞低氧诱导的二磷酸果糖酶 A 和葡萄糖激酶

表达。在肝细胞, H_2O_2 可抑制低氧诱导的 PCK 表达下调作用^[14]。

4.2 非低氧情况下 ROS 对 HIF 的调节 常氧情况下, HIF 的含量与活性调节主要包括生长因子、血管活性肽和金属离子等因素, 这些因素可通过促进 ROS 的产生来发挥调节作用。例如, 在肺动脉平滑肌、大动脉平滑肌和前列腺癌 PC3 细胞, 凝血酶和钴能提高 HIF 含量和活性, ROS 清除剂维生素 C 和 E 可抑制这些效应^[15]。在整体动物, 维生素 C 和 E 也能抑制高胆固醇饮食引起的 ROS 和 HIF-1 含量增多和 HIF 活性增强^[16]。内源性谷胱甘肽抗氧化系统也能抑制这些非低氧刺激因素的效应^[17]。有意思的是, 内源性谷胱甘肽抗氧化系统本身也提高 HIF 含量和活性。不过同属于细胞内抗氧化系统, 分布在胞质、线粒体和过氧化氢酶体内的过氧化氢酶, 也可减少 H_2O_2 水平, 过氧化氢酶活性对正常情况下 HIF 的含量和活性没有影响, 但可抑制凝血酶和钴诱导的 HIF 含量增加和活性增强^[15], 外源性过氧化氢酶也可抑制血管紧张素等诱导的平滑肌、上皮和前列腺癌细胞 HIF 含量增加和活性增强^[18]。与谷胱甘肽还原酶和过氧化氢酶不同, Cu/ZnSOD 促进 H_2O_2 生成, 能模拟凝血酶和钴诱导的 HIF 含量和活性效应^[15]。但如果 Hep3B 过度表达 Cu/ZnSOD, 低氧和钴诱导的 HIF 含量增加和活性同样被抑制。这些结果说明, 正常情况下, H_2O_2 发挥正向促进作用, 当外来刺激增强引起 HIF 含量和活性过度增强时, H_2O_2 具有抑制性作用。因此, 在 HIF 含量和活性调节上, 细胞需要适当的 H_2O_2 水平范围, 无论是减少和增多, 只要 H_2O_2 水平变化超过这一范围, HIF 含量和活性就会受到影响。这说明内源性抗氧化系统是稳定细胞内 HIF 含量和活性的重要条件。需要说明的是, 这一 H_2O_2 水平范围不同细胞存在明显差异, 有些细胞甚至缺乏这一机制。另外, 对氧化水平敏感的蛋白 NF κ B 也参与调节 HIF, 某些情况下, ROS 对 HIF 的调节可能是通过 NF κ B 实现的。

证据表明^[17, 18], 许多非低氧刺激因素, 如凝血酶、血管紧张素和机械性刺激等调节细胞 ROS 水平和 HIF 是通过 NADPH 氧化酶实现的。例如, 抑制 NADPH 氧化酶活性, 能抑制凝血酶诱导的平滑肌和内皮细胞 HIF 增加。A549 细胞过度表达 NADPH 氧化酶能提高 HIF 水平。通过转基因技术研究发现, 提高颈动脉体 NADPH 氧化酶表达能明显提高 HIF-1 和 VEGF 水平, 进一步证明 ROS 在非低氧刺激因素调节 HIF 的重要作用。

5 ROS 对 HIF 调节的机制

5.1 ROS 通过羟化酶对 HIF 的调节 HIF-1 在低氧条件下稳定, 常氧条件下迅速被降解。HIF-1 常氧降解过程首先是 402 和 564 位脯氨酸被羟化酶羟化, 然后与 VHL 结合, 泛素化, 最后被蛋白水解酶降解。另外, 常氧条件下 803 位天冬氨酸被 FIH 羟化, 阻断 HIF-1 与 CBP/p300 的结合, 负性调节其转录活性。目前已发现 4 种 PHD 和 1 种 FIH^[19]。

这些酶均属于双加氧酶家族, 催化活性必须有氧分子、 α -酮戊二酸和 Fe^{2+} 参与^[20]。维生素 C 是维持这些酶活性的必需条件, 其作用可能是维持 Fe^{2+} 水平, 这涉及自由基反应, 提示 ROS 参与调节 PHD。实验发现, 维生素 C 可影响血管平滑肌细胞内 HIF-1 的降解^[17]。在 PHD 催化反应中, 维生素 C 的 K_m 为 140~170 μ mol/L, 正常情况下, 细胞内维生素 C 水平在 25~50 μ mol/L, 因此, 增加维生素 C 可明显提高 PHD 活性^[20]。尽管维生素 C 调节羟化酶活性的具体机制尚不完全清楚, Fe^{2+} 自动氧化为 Fe^{3+} 可导致羟化酶失去活性, 推测维生素 C 可通过把 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 实现调节作用, 而维生素 C 还可把细胞内铁蛋白等铁库中的 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} 提供给羟化酶。这也能解释为什么一些铁螯合剂, 如去铁敏能提高 HIF-1 水平, 维生素 C 能阻断其效应^[21]。在前列腺癌 PC3 细胞中加入铁也能促进 HIF-1 降解, 这种效应则可能与 $OH\cdot$ 有关。常氧条件下, 细胞通过 Fenton 反应产生 $OH\cdot$, 并使 Fe^{3+} 还原成 Fe^{2+} , 或将氧化型还原成还原型维生素 C, 从而提高羟化酶活性促进 HIF-1 降解。 $OH\cdot$ 与 HIF-1 和 VHL 共存于内质网内, 清除内质网内 $OH\cdot$, 可抑制羟化酶活性, 抑制 Cys800 的还原, 提高 HIF-1 含量和活性^[22]。PHD2、PHD3 和 FIH 分布在细胞质, PHD1 分布在细胞核, 推测部分羟化酶分布在内质网内。因此, ROS 对 PHD 具有潜在调节作用, 可通过氧化维生素 C 抑制 PHD 的活性, 但在内质网内, ROS 的作用完全相反。

5.2 ROS 通过 PKB 和 MAPK 对 HIF 的调节 在许多细胞中, ROS 可通过激活激酶和灭活磷酸酶发挥调节作用。凝胶电泳迁移率改变法研究发现, 低氧处理的 Hep3B 细胞核成分存在 HIF-1/DNA 复合物, 磷酸酶可破坏 HIF-1/DNA 复合物。低氧情况下, 细胞内许多激酶, 如 PI-3-K/PKB/Akt 和 MAPK 被激活, 并影响 HIF-1 水平和活性^[18, 23]。NIH3T3R 细胞内存在调节 HIF-1 的 PI-3-K/PKB 通路, 抑制该通路可降低低氧诱导的 HIF-1 活性增加。在缺乏 PIP3 磷酸酶和肿瘤抑制蛋白 PTEN 的 PC-3 和 DU145 细胞^[24], 增加 PKB 活性, 同样能提高 HIF-1 水平。在肝细胞和 HepG2 中, PKB 也存在类似效应^[25]。

许多非低氧刺激因素, 如凝血酶、胰岛素和亚硝酸盐等, 也能激活 PI-3-K/PKB 通路, 其作用与细胞氧化还原状态关系密切。例如在平滑肌细胞, 抗氧化物质或抑制 NADPH 氧化酶活性都可阻断凝血酶的上述作用^[17]。在 DU145 细胞, 过氧化氢酶能阻断亚硝酸盐诱导的 PI-3-K/PKB 激活和 HIF-1 水平提高^[26]。事实上, 在平滑肌、内皮细胞和许多肿瘤细胞, H_2O_2 可激活 PKB^[27]。PKB 调节 HIF-1 的稳定性和转录活性不是直接作用, 可能是通过 PKB 的目标基因 HDM2、GSK3、FOXO4 和 mTOR 间接实现的。如 GSK3 可直接与 ODD 作用, 调节 HIF-1 的水平, 这可能与长期低氧引起的 HIF-1 负反馈调节有关^[28]。

除 PI-3-K/PKB 通路外, MAPK 也参与低氧和非低氧刺激因素引起的 HIF-1 调节。低氧处理可通过 p38 激活

MAPK 系统, p38 的上游激酶 MKK3 和 MKK6 高表达能提高 HIF-1 水平, 说明 MAPK 也参与 HIF-1 调节^[29]。在内皮和肝细胞, 低氧可激活 ERK1/2。在血管紧张素诱导平滑肌细胞、IL-1 诱导胎盘细胞滋养层细胞、前列腺素诱导大肠癌细胞和冲击波诱导骨细胞等表达 HIF-1 时, 都涉及到 ERK1/2 激活^[30]。有意思的是, 在骨细胞, 冲击波诱导的 ERK1/2 激活是通过 O_2^- -Rac1 途径, 而在平滑肌细胞, 凝血酶诱导的 NADPH 氧化酶不引起 ERK1/2 激活。说明, ROS-ERK1/2 通路诱导 HIF-1 存在刺激因子和细胞类型特异性。

在生长因子和金属离子刺激下, 细胞可通过 ROS 途径激活 MAPK 系统。抑制 MAPK 能阻断凝血酶通过 ROS 对 HIF-1 的调节。在 DU145 细胞, 铬通过 H_2O_2 对 HIF-1 的调节由 MAPK 介导^[31]。HIF-1 上的 MAPK 和 ERK1/2 的磷酸化位点可能位于 HIF-1 上的调节抑制区^[32], 这些激酶被磷酸酶灭活, 磷酸酶可被氧化灭活, 提示激酶通路受氧化还原调节^[33]。当细胞受到激素和生长因子作用后, 通过来自 NADPH 氧化酶的 ROS 抑制 MKP-1、MKP-3 和 PP2a 等磷酸酶活性, 提高 MAPK 和 ERK1/2 的活性, 发挥对 HIF-1 的磷酸化调节作用^[34]。在成纤维细胞, 尽管抑制 MKP-1 的活性可促进 HIF-1 的磷酸化和转录活性, 低氧开始时磷酸酶活性降低, 但低氧也可诱导 MKP-1 的表达, MKP-3 表达抑制 HIF-1 的磷酸化和转录活性^[35]。这些结果表明, HIF-1 的磷酸化调节作用与磷酸酶活性和氧化还原状态有关。

ROS 对各多种因素调节 HIF-1 都非常重要。低氧和非低氧刺激因素增加 ROS 水平, 通过 PHD、激酶和磷酸酶等上游信号通路, 正向调节 HIF-1 水平和活性。依赖氧分压的细胞色素氧化酶, 如 NADPH 氧化酶、细胞色素 β 型 NAD(P)H 氧化还原酶和线粒体是产生 ROS 的主要来源, 其中 H_2O_2 在调节 PHD、FIH, 募集共激活因子中发挥重要作用。受细胞类型、氧分压和测定方法的影响, 这些调节作用比较复杂。ROS 引起多种信号系统激活, 不同信号系统相互作用可能是造成 ROS 对 HIF-1 水平和活性调节多样性的根本原因。值得注意的是, 尽管各种调节因素都能够通过 ROS 调节 HIF-1, 但这些因素调节 ROS 的部位和方式完全不同。

[参考文献]

[1] Galli F, Piroddi M, Annetti C, et al. Oxidative stress and reactive oxygen species[J]. *Contrib Nephrol*, 2005, 149:240-260.

[2] Brigelius-Flohe R, Banning A, Schnurr K. Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2003, 5:205-215.

[3] Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore[J]! *Trends Biochem Sci*, 2003, 28:502-508.

[4] Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4:181-189.

[5] Wang GL, Semenza GL. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:1230-

1237.

[6] Oehme F, Ellinghaus P, Kolkhof P, et al. Overexpression of PH-4, a novel putative proline 4-hydroxylase, modulates activity of hypoxia-inducible transcription factors[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296:343-349.

[7] Hirota K, Fukuda R, Takabuchi S, et al. Induction of hypoxia-inducible factor 1 activity by muscarinic acetylcholine receptor signaling[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279:41521-41528.

[8] Wyatt CN, Buckler KJ. The effect of mitochondrial inhibitors on membrane currents in isolated neonatal rat carotid body type I cells[J]. *J Physiol*, 2004, 556:175-191.

[9] Hool LC, Arthur PG. Decreasing cellular hydrogen peroxide with catalase mimics the effects of hypoxia on the sensitivity of the L type Ca^{2+} channel to beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes[J]. *Circ Res*, 2002, 91:601-609.

[10] Kaelin WG Jr. ROS: really involved in oxygen sensing[J]. *Cell Metab*, 2005, 1:357-358.

[11] Brunelle JK, Bell EL, Quesada NM, et al. Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation[J]. *Cell Metab*, 2005, 1:409-414.

[12] Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O et al. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia inducible factor 1alpha[J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:402-415.

[13] Yang ZZ, Zhang AY, Yi FX, et al. Redox regulation of HIF-1alpha levels and HO-1 expression in renal medullary interstitial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284:F1207-F1215.

[14] Kietzmann T, Freimann S, Bratke J, et al. Regulation of the gluconeogenic phosphoenolpyruvate carboxykinase and glycolytic aldolase A gene expression by O_2 in rat hepatocyte cultures. Involvement of hydrogen peroxide as mediator in the response to O_2 [J]. *FEBS Lett*, 1996, 388:228-232.

[15] BelAiba RS, Djordjevic T, Bonello S, et al. Redox-sensitive regulation of the HIF pathway under nonhypoxic conditions in pulmonary artery smooth muscle cells[J]. *Biol Chem*, 2004, 385:249-257.

[16] Zhu XY, Rodriguez-Porcel M, Bentley MD, et al. Antioxidant intervention attenuates myocardial neovascularization in hypercholesterolemia[J]. *Circulation*, 2004, 109:2109-2115.

[17] Kietzmann T, Gorchach A. Reactive oxygen species in the control of hypoxia-inducible factor-mediated gene expression[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16:474-486.

[18] Richard DE, Berra E, Pouyssegur J. Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1alpha in vascular smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275:26765-26771.

[19] Lando D, Peet DJ, Whelan DA, et al. Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch[J]. *Science*, 2002, 295:858-861.

[20] Hirsila M, Koivunen P, Gunzler V, et al. Characterization of the human prolyl 4-hydroxylases that modify the hypoxia-inducible factor[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:30772-30780.

[21] Knowles HJ, Raval RR, Harris AL, et al. Effect of ascorbate

- on the activity of hypoxia-inducible factor in cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:1764-1768.
- [22] Liu Q, Berchner-Pfannschmidt U, Moller U, et al. A Fenton reaction at the endoplasmic reticulum is involved in the redox control of hypoxia-inducible gene expression[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101:4302-4307.
- [23] Lee E, Yim S, Lee SK, et al. Two transactivation domains of hypoxia-inducible factor-1 α regulated by the MEK-1/p42/p44 MAPK pathway[J]. *Mol Cells*, 2002, 14:9-15.
- [24] Jiang BH, Jiang G, Zheng JZ, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia inducible factor 1[J]. *Cell Growth Differ*, 2001, 12:363-369.
- [25] Kietzmann T, Samoylenko A, Roth U, et al. Hypoxia-inducible factor-1 and hypoxia response elements mediate the induction of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression by insulin in primary rat hepatocytes[J]. *Blood*, 2003, 101:907-914.
- [26] Gao N, Shen L, Zhang Z, et al. Arsenite induces HIF-1 α and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 255:33-45.
- [27] Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, et al. The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38:616-630.
- [28] Mottet D, Dumont V, Deccache Y, et al. Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3 β pathway in HepG₂ cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278:31277-31285.
- [29] Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E₂ is mediated by hypoxia-inducible factor 1[J]. *Cancer Res*, 2003, 63:2330-2334.
- [30] Kietzmann T, Jungermann K, Görlach A. Regulation of the hypoxia-dependent plasminogen activator inhibitor 1 expression by MAP kinases in HepG₂ cells[J]. *Thromb Haemost*, 2003, 89:666-674.
- [31] Gao N, Jiang BH, Leonard SS, et al. p38 signaling-mediated hypoxia-inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor induction by Cr(VI) in DU145 human prostate carcinoma cells[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277:45041-45048.
- [32] Sodhi A, Montaner S, Patel V, et al. The Kaposi's sarcoma-associated herpes virus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 α [J]. *Cancer Res*, 2000, 60:4873-4880.
- [33] Mishra OP, Delivoria-Papadopoulos M. Effect of hypoxia on the expression and activity of mitogen-activated protein (MAP) kinasephosphatase-1 (MKP-1) and MKP-3 in neuronal nuclei of newborn piglets: the role of nitric oxide[J]. *Neuroscience*, 2004, 129:665-673.
- [34] Furst R, Brueckl C, Kuebler WM, et al. Atrial natriuretic peptide induces mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 in human endothelial cells *via* Rac1 and NAD(P)H oxidase/Nox2-activation[J]. *Circ Res*, 2005, 96:43-53.
- [35] Liu C, Shi Y, Han Z, et al. Suppression of the dual-specificity phosphatase MKP-1 enhances HIF-1 transactivation and increases expression of EPO[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312:780-786.
- [收稿日期] 2005-09-21 [修回日期] 2006-03-01
[本文编辑] 尹 茶

***In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens**

Zhang JD, Cao YB, Xu Z, Sun HH, An MM, Yan L, Chen HS, Gao PH, Wang Y, Jia XM, Jiang YY (Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] Antifungal activity of natural products is being studied widely. Saponins are known to be antifungal and antibacterial. We have isolated eight steroid saponins from *Tribulus terrestris* L., namely TTS-8, TTS-9, TTS-10, TTS-11, TTS-12, TTS-13, TTS-14 and TTS-15. TTS-12 and TTS-15 were identified as tigogenin-3-O- β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)-[α -L-rhamnopyranosyl(1 \rightarrow 2)]- β -D-galactopyranoside and tigogenin-3-O- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 2)-[β -D-xylopyranosyl(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-galactopyranoside, respectively. The *in vitro* antifungal activities of the eight saponins against six fluconazole-resistant yeasts, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Cryptococcus neoformans* were studied using microbroth dilution assay. The results showed that TTS-12 and TTS-15 were very effective against several pathogenic candidal species and *C. neoformans in vitro*. It is noteworthy that TTS-12 and TTS-15 were very active against fluconazole-resistant *C. albicans* (MIC₈₀ = 4.4, 9.4 mg/ml), *C. neoformans* (MIC₈₀ = 10.7, 18.7 mg/ml) and inherently resistant *C. krusei* (MIC₈₀ = 8.8, 18.4 mg/ml). So *in vivo* activity of TTS-12 in a vaginal infection model with fluconazole-resistant *C. albicans* was studied in particular. Our studies revealed TTS-12 also showed *in vivo* activities against fluconazole-resistant yeasts. In conclusion, steroid saponins TTS-12 and TTS-15 from *Tribulus terrestris* L. have significant *in vitro* antifungal activity against fluconazole-resistant fungi, especially TTS-12 also showed *in vivo* activity against fluconazole-resistant *C. albicans*.