

Nox4 在同型半胱氨酸介导的动脉粥样硬化中作用的研究

李慧丹, 赵文鸽, 王学惠

(新乡医学院第一附属医院心血管内科, 河南 卫辉 453100)

摘要:同型半胱氨酸(Hcy)是心血管疾病的独立危险因素之一。Hcy 能够诱导细胞活性氧(ROS)的生成增多引起内皮损伤从而导致动脉粥样硬化(AS)发生发展。内皮细胞中 ROS 主要来源于 Nox4(NADPH oxidases 4)。NLRP3 在冠状动脉粥样硬化及动脉硬化中高表达。NLRP3 是 AS 中 IL-1 家族细胞因子产生的关键介质,特别是当细胞内产生的大量 ROS,可导致 caspase-1 前体大量剪切成具有生物活性的 caspase-1 P10 片段,推动下游 IL-1 β 和 IL-18 等炎症因子的成熟及分泌,使内皮细胞功能受损,引起细胞炎症损伤及凋亡,正反馈加重血管损伤。本文主要探讨 Nox4 在 Hcy 介导的内皮细胞炎症及凋亡的作用,Hcy 导致的 AS 提供可能的机制。

关键词:同型半胱氨酸;动脉粥样硬化;Nox4;NLRP3

中图分类号:R543.5

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2019.15.015

文章编号:1006-1959(2019)15-0045-03

Research on the Role of Nox4 in Homocysteine-mediated Atherosclerosis

LI Hui-dan,ZHAO Wen-ge,WANG Xue-hui

(Department of Cardiology,the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College,Weiwei 453100,Henan,China)

Abstract:Homocysteine (Hcy) is one of the independent risk factors for cardiovascular disease. Hcy can induce the increase of cellular reactive oxygen species (ROS) to cause endothelial damage leading to the development of atherosclerosis (AS). ROS in endothelial cells are mainly derived from Nox4 (NADPH oxidases 4). NLRP3 is highly expressed in coronary atherosclerosis and aortic sclerosis. NLRP3 is a key mediator of IL-1 family cytokine production in AS, especially when a large amount of ROS produced in cells can cause a large amount of caspase-1 precursor to be cleaved into a biologically active caspase-1 P10 fragment, promote the maturation and secretion of downstream inflammatory factors such as IL-1 β and IL-18, impair endothelial cell function, cause cell inflammatory damage and apoptosis, and positive feedback aggravates vascular injury. This study focuses on the role of Nox4 in Hcy-mediated endothelial cell inflammation and apoptosis, and Hcy-induced AS provides a possible mechanism.

Key words: Homocysteine; Atherosclerosis; Nox4; NLRP3

随着社会进步以及人口老龄化,急性心血管事件的发生率在逐年增加,成为威胁人类健康的头号杀手。同型半胱氨酸(homocysteine,Hcy)是体内蛋氨酸代谢循环途径中形成的一种含硫氨基酸,是蛋氨酸循环的中间产物,机体不能自身合成,主要来源于蛋氨酸中间代谢,当机体内维生素 B₁₂ 和叶酸的代谢功能紊乱和胱硫醚- β -合成酶的功能不全或功能缺陷,导致 Hcy 血症及动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS),临床上主要靠口服叶酸及维生素 B₁₂ 降低体内 Hcy 水平。各种临床实验及流行病学研究表明,Hcy 是心血管疾病的独立危险因素^[1]。本文主要探讨 Nox4 在 Hcy 介导的内皮细胞炎症及凋亡的作用,Hcy 导致的 AS 提供可能的机制。

1 同型半胱氨酸与动脉粥样硬化

AS 是缺血性心脑血管病的病理学基础,多因素引起的血管慢性炎症性疾病。Hcy 是动脉粥样硬化性心血管疾病的独立危险因素。中度,甚至轻度的高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia,HHcy)就能使 AS 的危险性增加。血浆 Hcy 水平升高原因有很多,包括:原位基因突变;CBS 基因缺陷

基金项目:1. 河南省基础与前沿技术研究计划项目(编号:142300410191);2. 河南省科技攻关计划项目(编号:152102310114,182102310182)

作者简介:李慧丹(1991.2-),女,河南新乡人,硕士研究生,住院医师,主要从事冠心病的基础与临床研究

通讯作者:王学惠(1970.1-),女,河南新乡人,博士,主任医师,主要从事冠心病的基础与临床研究

的纯合体可以导致血浆中 Hcy 的水平升高,5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因缺陷是叶酸代谢中最常见的遗传性疾病,突变后此酶的活性及功能明显下降,最终导致血浆 Hcy 浓度的升高。另外有营养和饮食、年龄、性别因素等^[2]。近些年来大量的动物实验、流行病学调查及临床试验表明,血浆 Hcy 水平升高是心脑血管疾病及各种原因死亡风险增加的独立危险因素^[3]。

目前的研究已经证实 Hcy 导致动脉粥样硬化基本机制包括:Hcy 可以对 LDL 进行氧化修饰后促进血管平滑肌细胞增殖和引起血管内皮损伤;促进氧化自由基的形成,抑制 NO 的形成及释放,使内皮依赖的血管舒张反应明显减弱;缩短血小板的存活期,提高其黏附性与聚集性,使血栓的发生率大大提高,容易造成冠状动脉堵塞;Hcy 使血栓素 B 合成增加,其缩血管和促进血小板聚集的作用均可加速动脉粥样硬化和血栓疾病的发生^[4]。

Hcy 自身结构具有特殊性,结构中含有高活性巯基,自氧化致使产生炎症反应,致使细胞内可产生大量的 ROS,及其下游一系列应激反应(内质网应激、氧化应激、甲基化等),破坏内皮细胞间完整性及衔接性,致使巨噬细胞释放炎症因子,血栓素形成,最终可导致动脉斑块形成^[5]。

2 NLRP3 炎症小体在 Hcy 导致的动脉粥样硬化中的作用

目前对 AS 的保守治疗主要集中在降低血浆胆

固醇水平,但这种治疗只是为了降低所有患者未来心血管事件的风险^[6]。然而,动脉粥样硬化在变态反应性疾病中被越来越多地认为是一种慢性疾病,这为血管的新治疗方法铺平了道路^[7]。最新的研究证明用单克隆的 IL-1 β 抗体治疗可以降低心脏病发作患者复发心血管事件的风险。鉴于这一试验的积极结果,通过对炎症假说的起源和影响的回顾,探讨 NLRP3(NOD [nucleotide oligomerization domain]-LRR [leucinerich repeat] - PYD[pyrin domain]-containing protein 3) 和白细胞介素-1 家族细胞因子在 AS 形成中的影响^[8]。NLRP3 在冠状动脉粥样硬化及主动动脉硬化中高表达,并且直接与疾病严重程度及多种临床危险因素有关,包括吸烟、高血压、糖尿病、低密度脂蛋白和高密度脂蛋白、胆固醇^[9]。

炎症免疫反应是心血管疾病的重要发病机制,炎症小体在炎症免疫中处于核心地位,在机体许多炎症性反应中都有着很重要的作用。所有 NLR 家族,主要通过释放受体敏感配体结合蛋白(ACP)从其抑制物(ACK)中释放 ROS-敏感配体相互作用蛋白(ACP),使其产生的 DAMPs (Danger associated molecular patterns)、IL 家族、PAMPs(Pathogen-associated molecular patterns),介导细胞炎症及凋亡^[10]。ROS 抑制剂能够明显降低 Hcy 诱导的足细胞 NLRP3 炎症小体成分 NLRP3、caspase-1、ASC(Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD)的表达及 NLRP3 与 caspase-1、NLRP3 与 ASC 的共定位形成,且能够显著抑制 Hcy 介导的足细胞培养上清中 IL-1 β 的表达和分泌,说明 Hcy 可引起血管内皮细胞炎症反应,激活炎症小体及炎症反应受体,其中 NLRP3 在该反应中起到非常重要的角色^[11,12]。

用氧化酶抑制剂处理巨噬细胞,Hcy 诱导巨噬细胞内 ROS 水平的增加,NAC 预处理后,ROS 减少 Hcy 诱导的 NLRP3 炎症小体成分的表达与共定位减少,细胞培养上清 IL-1 β 、IL-18 减少,从而调节炎症反应机制,减轻炎症损伤,抑制细胞凋亡及焦亡^[13]。因此在近几年 Hcy 的致病机制,探讨 NLRP3 与 Hcy 的相关机制及信号通路逐渐成为目前研究的热点。

3 Nox4 在 Hcy 导致的 AS 中的作用

NADPH 氧化酶(NADPH oxidases, Nox)是一特殊的产生 ROS 的酶类家族,它们通过催化电子从 NADPH 转移到分子氧而产生 O₂⁻和 H₂O₂^[14]。目前已鉴定出 7 种亚型(Nox1-5, Duox1-2),其中 Nox2 为经典的 gp91^{phox},是中性粒细胞进行吞噬作用所必需的^[15]。研究证实 Nox 与 AS 的发生、AS 病灶的严重程度密切相关。各种内源性危险因子刺激下, Nox 活性增加,ROS 产生过多,导致氧化损伤,ROS 通过各种信号传导途径,参与血管壁细胞的各种病理生理过

程,如血管平滑肌细胞增殖,影响血管内皮的舒缩功能,激活的血管内皮炎性免疫反应及一系列细胞功能改变等,从而参与 AS 的发生和发展^[16]。

Hcy 引起的内皮损伤中,检测 Nox1、Nox2、Nox4、Nox5 的表达量, Nox1、Nox5 几乎检测不到,而主要检测的到是 Nox2 和 Nox4,但是加入 Nox2 的抑制剂,并不能引起内皮损伤的改变,只有加入 Nox4 的抑制剂才能引起细胞炎症因子的改变,说明在 Hcy 引起的内皮损伤中, Nox4 的表达扮演着非常重要的作用^[17]。Nox2 主要表达在细胞膜,它的激活受蛋白翻译后机制的急性调控,比如浆细胞亚单位 P44^{phox} 的磷酸化和 Rac1 向细胞膜的移位。高酯、高糖、血管紧张素、细胞因子、生长因子、机械刺激等都可激活 Nox2。Nox2 产生 O₂⁻并易于和 NO 作用使之失活^[14]。最近对动物的研究表明,在不同的疾病模型中,ROS 的产生通常是保护性的,尽管这种酶的致病作用也已经被证实。基因证据表明, P22^{phox} 是 NADPH 氧化酶的重要组,实验研究也证明了其生物活性的存在^[18]。此外,在非特异性表达系统中, Nox4 和 Nox1 的活性都是通过共同表达的 P22^{phox} 被激活的。最早的研究认为,敲除 p22^{phox} 亚基对 NLRP3 炎症小体激活起到抑制作用,而 3 种 Nox 复合物(Nox1、Nox2、Nox4)所特有的亚基缺乏的巨噬细胞对激活炎症因子应答较差^[19],认为 NLRP3 的激活可能是 p22^{phox} 依赖性的过程在或者 Nox 存在功能冗余。

Nox4 调节特定的信号通路和细胞的功能,依赖于 Nox4 的表达水平、细胞的位置以及细胞类型。Nox4^{-/-}基因敲除的小鼠,在血压(全身和肺部)、心脏功能、内皮依赖的血管舒缩功能、脑血流量和肾功能方面与野生型小鼠没有差异。然而在众多心血管疾病,如高血压、动脉粥样硬化、肺和心肌纤维化、心衰、应激和糖尿病中表达量增加。因此,在没有疾病刺激条件下, Nox4^{-/-}没有表现出异常,如在血压方面^[20]。Nox4 是一种诱导型 Nox,在面对各种刺激时,它的表达水平是一个动态反应过程,目前还没有完全了解 Nox4 的病理及生理作用。

4 Nox4 是否通过 NLRP3 信号通路参与 Hcy 诱导的内皮细胞凋亡

NADPH 复合物最初被发现负责在细胞呼吸爆发期间产生 ROS,但现在已经清楚地发现,在其他类型的细胞中, Nox 衍生的 ROS 也参与了细胞信号传递。Nox1~4 均有一个重要的功能亚基 P22^{phox},其重要的功能亚基,若加入 P22^{phox} 抑制剂,几乎检测不到相应蛋白的表达,及下游信号同路的激活,特别 NLRP3 炎症小体的激活,认为此激活过程是独立于 Nox4 的 P22^{phox} 依赖的过程^[21]。

内皮细胞的 ROS 主要来源于 Nox4,任何来源

的 ROS 均可以激活 NLRP3 炎症小体,参与炎症反应^[1,20]。最早的研究鉴定激活 NLRP3 的 ROS 来源,加入 ROS 的抑制剂,可抑制 NLRP3 炎症小体的激活,加入特异性的 Nox 的抑制剂,并不能很好的引起 NLRP3 蛋白表达水平的改变。随着近年来关于 Nox4 研究的深入,对于 Nox4 的功能及其参与介导的信号通路,有了新的进展,让我们开始重新探讨 Nox4 在 Hcy 介导的内皮损伤及凋亡中作用,以及 Nox4 是否通过 NLRP3 信号通路参与 Hcy 诱导的内皮细胞的凋亡。有研究另外 NLRP3 蛋白沉默以后, Nox4 蛋白表达水平也受到抑制,猜测 NLRP3 和 Nox4 之间可能存在着一种特殊交互作用,且 caspase-1 的抑制剂对 Nox4 蛋白表达影响不明显^[22]。在炎症激活过程中,特别是 Hcy 诱导的内皮细胞氧化应激及凋亡过程中, Nox4 的表达增加,参与了 NLRP3 炎症小体复合物激活。Nox4 在 Hcy 介导的内皮损伤及凋亡中,扮演着非常重要的作用^[9]。

5 总结

Hcy 是心血管疾病的独立危险因素,其可以增强血管炎症反应,加速动脉粥样硬化的进程。血浆 Hcy 水平升高引起心血管疾病的发病机制尚不完善清楚,依然是目前研究的热点。巨噬细胞中 Hcy 能够激活 NLRP3 炎症小体,同时诱导 IL-1 β 、IL-18 的合成及胞外分泌,促进 ASC、NLRP3 和 caspase-1 的表达增多。在 Hcy 介导的内皮细胞损伤模型中, Nox4 可能起决定性作用,阻断 Nox4 可能是抑制 Hcy 诱导的内皮细胞氧化损伤的关键靶点,为 HHcy 血症导致的血管内皮损伤提供新的理论基础。

参考文献:

- [1]Wen H,Gris D,Lei Y,et al.Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling[J].Nature immunology,2011,12(5):408-415.
- [2]Pushpakumar S,Kundu S.Endothelial dysfunction:the link between homocysteine and hydrogen sulfide [J].Current Medicinal Chemistry,2014,21(32):3662-3672.
- [3]刘鹏,高学良,原建华,等.H 型高血压患者血清同型半胱氨酸水平与冠状动脉狭窄病变程度的关系[J].中华老年心脑血管病杂志,2017,19(3):245-247.
- [4]Lai WK,Kan MY.Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction[J].Ann Nutr Metab,2015,67(1):1-12.
- [5]Fu Y,Wang X,Kong W.Hyperhomocysteinemia and vascular injury:advances in mechanisms and drug targets[J].British Journal of Pharmacology,2018,175(8):1173-1189.
- [6]Ference BA,Ginsberg HN,Graham I,et al.Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease.1.Evidence from genetic,epidemiologic,and clinical studies.A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel[J].European Heart Journal,2017,38(32):2459-2472.
- [7]Libby P,Lichtman AH,Hansson GK.Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis:from mice to humans[J].Immunity,2013,38(6):1092-1104.
- [8]Grebe A,Hoss F,Latz E.NLRP3 Inflammasome and the IL-1 Pathway in Atherosclerosis[J].Circulation Research,2018,122(12):1722-1740.
- [9]谭红梅.同型半胱氨酸激活 NLRP3 炎症小体促进动脉粥样硬化的作用研究 [J].中国病理生理杂志,2015 (10):1813-1814.
- [10]Tschopp J,Schroder K.NLRP3 inflammasome activation:The convergence of multiple signalling pathways on ROS production[J].Nature Reviews Immunology,2010,10(3):210-215.
- [11]Xi H,Zhang Y,Xu Y,et al.Caspase-1 Inflammasome Activation Mediates Homocysteine-Induced Pyroptosis in Endothelial Cells [J].Circulation Research,2016,118 (10):1525-1539.
- [12]Shao BZ,Cao Q,Liu C.Targeting NLRP3 Inflammasome in the Treatment of CNS Diseases [J].Frontiers in Molecular Neuroscience,2018(11):320.
- [13]Sun W,Pang Y,Liu Z,et al.Macrophage inflammasome mediates hyperhomocysteinemia-aggravated abdominal aortic aneurysm [J].Journal of Molecular and Cellular Cardiology, 2015,81(2):96-106.
- [14]Ochoa CD,Wu RF,Terada LS.ROS signaling and ER stress in cardiovascular disease [J].Molecular Aspects of Medicine, 2018,63(3):18-29.
- [15]Konior A,Schramm A,Czesnikiewicz-Guzik M,et al. NADPH oxidases in vascular pathology [J].Antioxidants&Redox Signaling,2014,20(17):2794-2814.
- [16]Montezano AC,Touyz RM.Oxidative stress,Noxs,and hypertension:Experimental evidence and clinical controversies [J].Annals of Medicine,2012,44(sup1):S2-S16.
- [17]Bao XM,Wu CF,Lu GP.Atorvastatin inhibits homocysteine-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial progenitor cells involving Nox4 and p38MAPK [J].Atherosclerosis,2010,210 (1):114-121.
- [18]Ma MW,Wang J,Dhandapani KM,et al.NADPH Oxidase 2 Regulates NLRP3 Inflammasome Activation in the Brain after Traumatic Brain Injury [J].Oxidative Medicine and Cellular Longevity,2017(2017):6057609.
- [19]Van Bruggen R,Koker MY,Jansen M,et al.Human NLRP3 inflammasome activation is Nox1-4 independent [J].Blood, 2010,115(26):5398-5400.
- [20]Takac I,Schroder K,Brandes RP.The Nox family of NADPH oxidases:friend or foe of the vascular system[J].Current Hypertension Reports,2012,14(1):70-78.
- [21]Van De Veerdonk FL,Smeekens SP,Joosten L AB,et al.Reactive oxygen species-independent activation of the IL-1 inflammasome in cells from patients with chronic granulomatous disease [J].Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010,107(7):3030-3033.
- [22]杨仁强,黄玲,马晓欣,等.NLRP3 炎症小体介导血管紧张素 II 诱导的人脐静脉血管内皮细胞炎症因子 IL-1 β 的表达 [J].南方医科大学学报,2016,36(6):790-795.

收稿日期:2019-4-3;修回日期:2019-4-18

编辑/杨倩