

氧化应激与动脉粥样硬化

刘虹彬, 温进坤, 韩梅

(河北医科大学基础医学研究所生物化学研究室, 石家庄 050017)

[关键词] 活性氧; 氧化应激; 动脉粥样硬化; 蛋白质磷酸化; 转录因子

[摘要] 活性氧是细胞内多种氧化还原反应的正常代谢产物,但是,当活性氧的生成速率大于清除速率时,即造成活性氧的蓄积。过多的活性氧除直接损伤细胞外,还可通过信号转导系统调控某些基因的表达,并引发一系列病理生理过程。在心血管系统中,各种氧化物前体可刺激血管细胞产生活性氧,后者通过介导低密度脂蛋白氧化、促进细胞内多种蛋白质磷酸化及转录因子活化而激活炎症相关基因的表达,进而加速动脉粥样硬化的形成和发展。

[中图分类号] R543.5

[文献标识码] A

活性氧(reactive oxygen species, ROS)的蓄积,即氧化应激,与动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)、老年性痴呆和癌症等多种疾病的发生有关。已经证明,活性氧除了能直接发挥细胞毒性作用外,还能通过影响细胞信号转导系统调控某些基因的表达。As是血管系统氧化还原作用失调导致的一种慢性炎症病变,本文就此方面的研究进展予以综述。

1 活性氧的产生及其与动脉粥样硬化的关系

细胞内活性氧的来源多种多样,除线粒体呼吸链代谢产生外,NADPH氧化酶、一氧化氮合酶、环氧合酶、脂氧合酶(lipoxygenase, LO)、细胞色素P₄₅₀单氧酶和黄嘌呤氧化酶所催化的反应均伴有活性氧的生成。正常情况下,细胞所具有的抗氧化机制如过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶可清除活性氧,维持细胞氧化还原自稳态。当某些因素作用于细胞使这一稳态失调,活性氧产生的速率大于被清除的速率时,就会造成活性氧的蓄积。高脂血症、糖尿病、高血压和吸烟是公

认的As发生发展的危险因素,虽然这些危险因素的致病机制并不十分清楚,但是近年研究显示,细胞内氧化应激信号选择性诱导炎症相关基因表达是它们引发As共同的分子机制之一^[1]。不同氧化物前体可直接刺激或“致敏”血管细胞,使其产生活性氧,后者和/或它们修饰的靶分子将细胞外信号传入胞内,使致As基因表达上调,并进一步促进单核细胞向血管壁浸润及释放炎症分子,从而形成一个正反馈环,不断加强局部炎症反应,损伤内皮细胞(endothelial cell, EC)的正常功能。

细胞因子和生长因子如肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、血管紧张素 $\text{I}\alpha$ (angiotensin $\text{I}\alpha$, Ang $\text{I}\alpha$)和干扰素- γ (interferon γ , IFN- γ)可激活EC膜结合的NADPH氧化酶,后者催化产生的活性氧作为信号分子调节血管细胞粘附分子-1(vascular cell adhesion molecule, VCAM-1)和细胞内粘附分子-1(intercellular adhesion molecule, ICAM-1)基因的表达;NADPH氧化酶抑制剂可阻断该类因子的致炎作用^[2,3]。一氧化氮(nitric oxide, NO)自由基可由EC、巨噬细胞、平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)、成纤维细胞等多种细胞产生,它对组织所具有的效应不仅与细胞种类有关,同时也取决于它和其它活性氧之间的相互作用。一方面,NO可减少过氧化物的产生,抑制低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)的氧化和脂质过氧化物的生成;另一方面,NO可与超氧化物相互作用产生潜在的氧化剂ONOO⁻。另外,NO还可通过直接调节信号通

[作者简介] 刘虹彬,女,1970年出生,博士研究生,讲师。温进坤,男,1954年出生,博士研究生,教授,生物化学与分子生物学专业博士研究生导师,主要从事心血管病发病机制方面的研究。韩梅,女,1961年出生,博士研究生,教授,生物化学与分子生物学专业博士研究生导师。

路影响 VCAM-1 和单核趋化蛋白-1 (macrophage chemoattractant protein, MCP-1) 等炎性基因的表达^[4,5]。高血糖也可刺激 EC 中超氧化物的产生, 增强 LDL 的氧化^[6]。糖化终末产物与其细胞表面受体的相互作用可导致活性氧产生, 减少还原型谷胱甘肽水平^[7]。增加血流和血管剪切力可以改变 EC 氧化还原状态及氧化还原敏感基因的表达, 引起 ICAM-1 和血红素氧合酶-1 等基因表达上调, 该作用可被 SOD 或 CAT 所阻断^[8]。As 的早期事件之一是脂蛋白, 特别是 LDL 在血管壁的氧化修饰。氧化型低密度脂蛋白 (oxidized low density lipoprotein, oxLDL) 具有复杂的结构, 由多种化学性质独特的氧化产物组成, 该蛋白作为 As 发生过程中的氧化物前体产生过氧化物, 使细胞内的氧化还原状态发生改变。许多研究提示, oxLDL 和脂肪酸氢过氧化物 (富含于 oxLDL 中的一种组份) 是调节 VCAM-1、ICAM-1、转录因子 AP-1、NF- κ B 表达的信号^[9,10]。催化 LDL 氧化的物质主要有 LO、髓过氧化物酶、活性氮及铁、铜等金属离子^[11]。兔和人动脉硬化斑块中的 15-LO 活性明显升高, 而且其表达上调可增加 TNF- α 诱导的 VCAM-1 在 EC 中的表达; 5-LO 抑制剂可阻断 IL-1 β 诱导的 VCAM-1 的表达^[12,13]。这些结果提示, oxLDL 具有调节氧化还原敏感基因表达的作用。迄今为止, 导致脂类氧化的细胞信号系统仍不清楚, 但能确定 LO 在其中扮演重要角色。相反, 抗氧化剂可通过清除活性氧改变氧化环境或直接调节氧化还原敏感信号传导通路, 阻断致 As 基因的表达而起到保护血管细胞的作用。

2 活性氧对蛋白质磷酸化的调节作用

活性氧通过基因表达的长时程改变影响多种生物效应, 这个过程是由多条信号传递途径参与的。在多种情况下, 蛋白质磷酸化是信号传递至终端的重要方式, 转录因子或与其相互作用的上游蛋白质分子常常是磷酸化修饰的直接靶点, 其中研究最多的是丝/苏氨酸蛋白激酶和酪氨酸蛋白激酶。实验显示, 血小板源性生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 刺激 SMC 后, 可依次引起细胞内过氧化物短暂增多、酪氨酸磷酸化、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 活化, 这些效应可通过增加细胞内自由基清除酶类而消除。以 MAPK 为例, MAPK 是传递细胞外刺激到达细胞核的一系列连续蛋白激酶级联反应中的最后环节, 靶分子是转录因子。大量实验证明, 活性氧引起的细胞氧化还原状态的改变可激活由不同 MAPK 家族成员参与的信号传导通路。有学者报道, 用产生过氧化物的因子 LY83583 处理 SMC 可导致剂量依赖的 MAPK 活性升高。诸如 oxLDL、Ang II、Lac-Cer、亚油酸及其代谢产物等可引起血管功能障碍的物质均可通过使 SMC 产生活性氧而激活 MAPK, 表现为 p42/44 MAPK 和 p38 MAPK 的快速磷酸化。NADPH 氧化酶抑制剂和过氧化氢酶的过表达可阻断 Ang II 参与的 p38 MAPK 的磷酸化。Lac-Cer 是一种在 As 斑块中大量存在的鞘糖脂, 可通过活化 NADPH 氧化酶使主动脉平滑肌细胞内源性过氧化物产生增加, 从而导致 MAPK 通路活化、c-fos 表达和细胞增殖。用抗氧化剂 PDTC 和 NAC 处理细胞, 改变细

胞氧化还原状态可抑制 Lac-Cer 对过氧化物的诱生作用, 阻断 p44 MAPK 的磷酸化和活化^[14-16]。上述结果说明, 活性氧不仅可通过氧化细胞组分直接损伤细胞, 而且也可通过诱导炎症基因的表达使局部炎症反应加剧而间接损伤细胞。可见, 活性氧作为一种刺激因素可启动血管系统 MAPK 信号传导, 从而将细胞外刺激信号和细胞内基因表达的改变及细胞功能相联系。

3 活性氧对转录因子活性的调节作用

特异的 DNA 结合蛋白——转录因子是氧化还原敏感信号通路调节炎症基因表达的最终靶点。理论上, 氧化还原作用通过两条途径调节转录因子活性, 一是细胞内活性氧直接氧化修饰转录因子; 二是通过磷酸化/去磷酸化修饰的级联反应调节转录因子活性。

NF- κ B 和 AP-1 是受细胞氧化还原状态影响的主要转录因子。它们通过调控多种基因的表达, 参与细胞的炎症反应、组织损伤和生长控制。c-jun 和 c-fos 原癌基因家族的同源二聚体和异源二聚体构成转录因子 AP-1。H₂O₂、oxLDL 和脂质过氧化产物 4-hydroxy-2-nonenal 可诱导 EC 中 AP-1 的表达或增强其 DNA 结合活性^[17]。H₂O₂ 对血管炎症基因 MCP-1 和 ICAM-1 的调节是通过改变 AP-1 与其顺式作用元件的相互作用而实现的。活性氧使 AP-1 激活的确切机制目前尚不清楚, 但从 H₂O₂ 对 AP-1 的激活需要酪氨酸及丝/苏氨酸的磷酸化可知, 氧化对 AP-1 的活化可能与 Jun 蛋白的磷酸化有关, 也说明活性氧可通过翻译后修饰调节 AP-1 活性^[18]。

硫氧还蛋白 (thioredoxin, TRX) 和 Ref-1 对 AP-1 活性的调节代表了一种细胞氧化还原状态活化转录因子的模式。TRX 是一种多向性的细胞因子, 其巯基参与氧化还原反应, 可通过使 AP-1 分子中的半胱氨酸残基还原增强其与 DNA 之间的相互作用。该效应需要氧化还原因子 Ref-1 的介导。此外, Ref-1 也能刺激其他真核转录因子与 DNA 的结合^[19]。

NF- κ B 是一种由 p50 和 p65 两种亚基构成的异源二聚体, 是第一个被证实能直接对氧化应激起反应的转录因子。细胞内氧化还原作用失衡通过影响 NF- κ B 的活性而引起基因表达的改变。活性氧介导 NF- κ B 的活化过程, 抗氧化剂既可阻断活性氧的产生, 也可抑制 NF- κ B 的活化。在某些细胞中, H₂O₂ 及含过氧化物的分子可导致 NF- κ B 的快速活化。然而, 当 NF- κ B 与超氧化物、羟自由基或 NO 源性复合物共同孵育时并不能被活化, 提示 NF- κ B 的活化机制是复杂的^[20]。在过氧化氢酶高表达的细胞系, TNF- α 对 NF- κ B 的活化作用受到抑制, 加入过氧化氢酶抑制剂则可解除这种抑制。此外, 许多羟基过氧化物以及 15-LO、5-LO、环氧合酶的产物也可激活 NF- κ B。

过氧化物体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 由核激素受体超家族的转录因子组成, 参与配体依赖的转录因子活性的调节, 在脂类和葡萄糖代谢中起关键作用。最近的报道表明, 血管细胞中的 PPAR 可被氧化修饰的脂肪酸选择性激活, 说明 PPAR 是血管中氧化还

原敏感转录因子,并参与As及血管再狭窄发生发展的炎症反应过程^[21,22]。

PPAR γ 是 PPAR 家族中的一员,它的功能是调节能量平衡和脂肪细胞分化。单核细胞 oxLDL 对 PPAR γ 的激活可促使其向泡沫细胞转化,具有潜在的加速 As 发生发展的作用。oxLDL 是 PPAR γ 的内源性配基,可上调 PPAR γ 表达和刺激 PPAR γ 依赖的转录,诱导 CD36 表达,促使单核细胞成熟。因此,PPAR γ 的活化和 CD36 表达构成一个正反馈环,进一步增强 oxLDL 的作用。但是,也有人报道 PPAR γ 及其家族另一成员 PPAR α 特异的激活剂可抑制单核细胞中炎症基因的表达。据推测,PPAR α 的这一作用可能是通过抑制 NF- κ B 的活化,减少炎性细胞因子的产生而实现的^[23],但至今仍不清楚 oxLDL 或其组份是否具有类似的效应。

参考文献

- [1] Alexander RW. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective [J]. *Hypertension*, 1995, **25**: 155-161
- [2] Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease [J]. *Circ Res*, 2000, **86**: 494-501
- [3] Kranzhofer R, Schmidt J, Pfeiffer CA, et al. Angiotensin induces inflammatory activation of human vascular smooth muscle cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, **19**: 623-629
- [4] Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, et al. Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecular 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 114-119
- [5] Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, et al. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human endothelial cells [J]. *Circ Res*, 1995, **76**: 980-986
- [6] Maziere C, Auclair M, Rose-Robert F, et al. Glucose-enriched medium enhances cell-mediated low density lipoprotein peroxidation [J]. *FEBS Lett*, 1995, **363**: 277-279
- [7] Yan SD, Schmidt AM, Anderson GM, et al. Enhanced cellular oxidative stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptor/binding protein [J]. *J Biol Chem*, 1994, **269**: 9889-9897
- [8] Chiu JJ, Wung BS, Shyy JYJ, et al. Reactive oxygen species are involved in shear stress-induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1997, **17**: 570-577
- [9] Cominacini L, Ulisse G, Pasini AF, et al. Antioxidants inhibit the expression of intercellular cell adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 induced by oxidized LDL on human umbilical endothelial cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 1997, **22**: 117-127
- [10] Maziere C, Auclair M, Djavaheri-Mergny M, et al. Oxidized low density lipoprotein induces activation of the transcriptional factor NF- κ B in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1996, **39**: 201-207
- [11] Jay W Heinecke. Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for oxidized low density lipoprotein hypothesis [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **141**: 11-15
- [12] Wolle J, Welch KA, Devall LJ, et al. Transient overexpression of human 15-lipoxygenase in aortic endothelial cells enhances tumor necrosis factor-induced vascular cell adhesion molecule-1 gene expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **220**: 310-314
- [13] Lee S, Felts KA, Parry GC, et al. Inhibition of 5-lipoxygenase blocks IL-1 β -induced vascular adhesion molecule-1 gene expression in human endothelial cells [J]. *J Immunol*, 1997, **158**: 401-407
- [14] Auge N, Escargueil-Blanc I, Lajoie-Mazenc I, et al. Potential role for ceramide in mitogen-activated protein kinase activation and proliferation of vascular smooth muscle cells induced by oxidized low density lipoprotein [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 893-900
- [15] Yang CM, Chien CS, Hsiao LD, et al. Mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on vascular smooth muscle cells mediated by activation of Ras/Raf/MEK/MAPK pathway [J]. *Br J Pharmacol*, 2001, **132**(7): 531-541
- [16] Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, et al. p38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by angiotensin II: role in vascular smooth muscle cell hypertrophy [J]. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 15022-15029
- [17] Maziere C, Kjavaheri-Mergny M, Frye-Fressart V, et al. Copper and cell-oxidized low density lipoprotein induces activator protein 1 in fibroblasts, endothelial and smooth muscle cells [J]. *FEBS Lett*, 1997, **409**: 351-356
- [18] Del Arco PG, Martine-Martinez S, Calvo V, et al. Antioxidants and AP-1 activation: a brief overview [J]. *Immuno Biology*, 1997, **198**: 273-278
- [19] Hirota K, Matsui M, Iwata S, et al. AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 633-638
- [20] Li D, Saldeen T, Romeo F, et al. Oxidized LDL upregulates angiotensin II type 1 receptor expression in cultured human coronary artery endothelial cells: the potential role of transcription factor NF- κ B [J]. *Circulation*, 2000, **102**(16): 970-976
- [21] Law RE, Goetze S, Xi XP, et al. Expression and function of PPAR γ in rat and human vascular smooth muscle cells [J]. *Circulation*, 2000, **101**(11): 311-318
- [22] Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines [J]. *Nature*, 1998, **391**: 82-86
- [23] Han KH, Chang MK, Boullier A, et al. Oxidized LDL reduces monocyte CCR2 expression through pathways involving peroxisome proliferator-activated receptor gamma [J]. *J Clin Invest*, 2000, **106**(6): 793-802

(此文 2000-10-31 收到, 2001-09-14 修回)

(此文编辑 文玉珊)