

尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶与动脉粥样硬化

屈顺林^{1,2}, 唐蔚青¹, 黎健¹

(1. 卫生部北京医院, 卫生部北京老年医学研究所, 北京市 100730; 2. 南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 病理学与病理生理学; 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶与动脉粥样硬化; 综述; 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶; 动脉粥样硬化

[摘要] 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶是一种多亚单位酶复合体, 是细胞中一种可诱发的电子传递系统。尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶目前被认为是血管内生成活性氧的主要酶体, 它的激活受蛋白激酶 C 等信号途径介导。研究表明 NADPH 氧化酶和近年来新发现的 gp91phox 同工酶即 NOX 蛋白家族可能通过损伤血管内皮、促进低密度脂蛋白氧化等参与动脉粥样硬化的发生和发展。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是调节血管结构和功能状态的重要信号分子, 血管内皮细胞、平滑肌细胞和动脉外膜细胞等均可产生活性氧, 活性氧过多却是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的危险因素之一。体内有多种酶参与了活性氧的生成, 如尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide vadenine dinucleotide phosphate, NADPH 氧化酶)、黄嘌呤氧化酶、脂氧合酶、线粒体呼吸链酶复合体和内皮型一氧化氮合酶等, 研究表明 NADPH 氧化酶目前被认为是血管内生成活性氧的主要酶体, NADPH 氧化酶参与了 As 的发生和发展过程。

1 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的结构特性及其表达

最早在吞噬型细胞(粒性白细胞、单核/巨噬细胞)中发现 NADPH 氧化酶, 包含胞膜成分细胞色素 b558(gp91phox 和 p22phox, 其中 gp91phox 有 NADPH、heme、FAD 的潜在结合位点)和胞浆成分 p47phox、p67phox 及小的 GTP 结合蛋白 rac(单核细胞为 rac1, 嗜中性粒细胞为 rac2)等五个亚组分。phox 的晶体结构显示, p47phox 的两个前后排列的 Src 同源区相互作用能抑制其与 p22phox 结合。当 p47phox 被磷酸化时这种抑制作用消失, 胞质侧的亚组分易位到胞膜与细胞色素 b558 结合, 且在 rac 的参与下激活 NADPH 氧化酶而启动呼吸链, 爆发级联反应^[1]。最近又发现在非吞噬型细胞如血管平滑肌细胞、内皮细胞、动脉外膜细胞、成纤维细胞、心肌细胞、上皮细胞和脂肪细胞等也表达 NADPH 氧化酶的所有亚组分^[2,3], 其中 p22phox 在各种细胞中都高表达, gp91phox 主要

在单核细胞表达, 而在内皮细胞、SMC 和成纤维细胞中表达甚低^[4]。血管细胞 NADPH 氧化酶与吞噬型细胞 NADPH 氧化酶存在一些区别: 血管细胞 NADPH 氧化酶常以 NADPH 或 NADH 为电子供体, 而吞噬型细胞氧化酶仅以 NADPH 为电子供体; ④无刺激时血管细胞 NADPH 氧化酶也持续产生低水平的 O₂, 在某些病理刺激下 O₂ 的水平能被上调, 但其 O₂ 生成量仍远低于激活的嗜中性粒细胞所产生的 O₂, 这可能是由于血管细胞 NADPH 氧化酶的表达量低于嗜中性粒细胞。Uwe 等^[5]发现在人脐静脉内皮细胞和白细胞中 p47phox 和 p22phox 的表达无明显差别, 而 hUVEC 中 p67phox 和 gp91phox 的表达却远低于白细胞(其中 gp91phox 的表达仅为白细胞的 1%); ⑤在未受刺激的内皮细胞中大部分 NADPH 氧化酶亚组分在胞内表达, 且功能性 NADPH 氧化酶亚组分与胞内的细胞骨架(细胞色素 b558)相连处于组装前状态, 这种状态能使 NADPH 氧化酶维持较低的活性而持续产生低水平的 O₂;

血管细胞 NADPH 氧化酶产生的 O₂ 大部分在细胞内, 而吞噬型细胞 NADPH 氧化酶产生的 O₂ 却在胞外^[6]。

近年来至少发现了两种新的 gp91phox 同工酶家族即 NOX(NADPH oxidase)和 DUOX(dual oxidase)。现已发现的 NOX 家族有 NOX1、NOX2(gp91phox)、NOX3、NOX4 和 NOX5 等成员^[7]。NOX1 基因又名 MOX1(mitogenic oxidase)或 NOH1(NADPH oxidase homologue), 它位于 X 染色体上。NOX1 至少有三种剪切变构体(splice variants), 即 NOX1a(外显子 1~13)、NOX1b(外显子 1~10, 12, 13)、NOX1v(外显子 1~5, 14)。NOX1 主要在结肠表达, 前列腺、子宫和 VSMC 也有少量表达; NOX2 即 gp91phox 主要在粒细胞和单核吞噬细胞表达, 而 B 淋巴细胞、内皮细胞和神经细胞也有少量表达; NOX3 主要在胎肾(fetal kidney)表达, 可能与生长发育有关; NOX4 主要在成年肾(adult kidney)表达, 它可能作为一种敏感性氧感受器, 此外, NOX4 mRNA 亦在非吞噬型细胞(内皮细胞、SMC 和成纤维细胞)中表达, 而在单核细胞中表达很低。在血管细胞中, 内皮细胞主要表达 NOX4, 而 VSMC 主要表达 NOX4 和 NOX1。Wingler 等^[8]发现将 1 μmol/L 血管紧张素 Ⅱ(angiotensin Ⅱ, Ang Ⅱ)与大鼠 VSMC 系 A7r5 孵育 4 h, NOX1 mRNA

[收稿日期] 2004-07-19

[修回日期] 2005-02-23

[基金项目] 国家自然科学基金(30440065)和北京自然科学基金(7052059)资助

[作者简介] 屈顺林, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病的发病机制。唐蔚青, 副研究员, 主要从事血脂与动脉粥样硬化关系的分子生物学研究。通讯作者黎健, 研究员, 博士研究生导师, 主要从事血脂与动脉粥样硬化关系的分子生物学研究, 联系电话为 010-65237929, E-mail 为 lijianly@yahoo.com。

和 NOX4 mRNA 水平分别升高 4 倍和 6 倍, 来自动脉阻力血管(resistance arteries)处的成纤维细胞和 VSMC 也表达 NOX2。NOX5 主要在睾丸、淋巴组织和脾脏表达, 它可能参与了精子与卵子的融合、细胞增殖以及细胞因子的分泌等。DUOX1 和 DUOX2 的氨基酸末端都有一过氧化物区域(an amino-terminal peroxide domain), 目前在甲状腺、唾液腺、直肠、气管和支气管中发现有其表达, 它们在甲状腺中表达可能与甲状腺激素的生物合成有关。

2 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶的活化信号通路

血管细胞中 NADPH 氧化酶被认为是产生活性氧的重要酶之一, 它被 Ang ①、凝血酶、机械力、各种炎性细胞因子和生长因子激活。目前对 Ang ①研究较多, Ang ①与 Ang ①1 型受体(angiotensin ① type 1 receptor, AT1-R)通过与 G 蛋白 α 亚单位($G\alpha$)结合而激活磷脂酶 C(phospholipase C, PLC), 继而生成三磷酸肌醇(inositol trisphosphate, IP3)和二酰甘油(diacylglycerol, DG)。IP3 可介导钙离子的释放并与 DG 一起激活蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC), 使 p47phox 磷酸化而激活 NADPH 氧化酶, 启动活性氧的生成。而且, 释放的钙离子能激活磷脂酶 A2(Phospholipase A2, PLA2)而生成脱脂酸磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC)和花生四烯酸(arachidonic acid, AA), LPC 和 AA 均能增加 NADPH 氧化酶的活性。Ang ①也能通过与 G 蛋白 $\beta\gamma$ 亚单位结合而激活 Src 激酶, 活化的 Src 能激活上皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)、蛋白酪氨酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)、Rac 和磷脂酶 D(Phospholipase D, PLD), 并进一步激活磷酸肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol 3 kinase, PI3K)而生成磷脂酰肌醇 3, 4, 5-三磷酸(phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate, PIP3), 最终使 rac-1 活化并易位到胞膜, 协助 NADPH 氧化酶的组装, 启动活性氧生成。生成的活性氧又能激活 EGFR, 加速活性氧生成, 形成正反馈循环^[9]。

2.1 蛋白激酶 C

现已证明 PKC 介导的 p47phox 的磷酸化对吞噬型细胞 NADPH 氧化酶的活化很重要。在非吞噬型细胞 VSMC 中加入 PKC 抑制剂 Ro31-8220、chelerythrine、calphostin C 或 GF109203X 均能降低由血小板源生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)或 Ang ①诱发的活性氧生成。GF10920 也能降低由 LPC 诱发的 raf-1 和细胞外信号调节蛋白激酶 1/2(extracellular signal-regulated protein kinases 1/2, ERK1/2)磷酸化而介导的活性氧生成。在内皮细胞中加入 calphostin C, chelerythrine 或 PKC- ζ 特异性抑制剂能抑制由肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)诱发的 p47phox 易位, PKC- ζ 特异性抑制剂还能阻断由 TNF- α 诱发的 p47phox 磷酸化及其与 gp91phox 的结合。相反, 在没有 p47phox 激动剂时若激活 PKC- ζ 能增加 p47phox 磷酸化^[10]。因此, PKC 可能通过促进 NADPH 氧化酶亚单位的磷酸化和易位来激活血管细胞 NADPH 氧化酶而影响活性氧的生成。

2.2 磷脂酶 D

脂质代谢物可能参与了血管细胞 NADPH 氧化酶的活化。外源性磷脂酸(phosphatidic acid, PA)和由激活的 PLD 产生的内源性 PA 均能显著增加 VSMC 内 NADPH 氧化酶活性。将非特异性 PLD 抑制剂 sphinganine 或 suramin 与 VSMC 一起孵育, 能降低由 Ang ①诱发的活性氧生成, 而加入 PA 能恢复活性氧的生成。NADPH 氧化酶抑制剂二甲苯碘(diphenylene iodonium, DPI)能阻断由外源性 PA 介导的信号途径。PLD 可能通过 DG 或生成 PA 而激活血管细胞 NADPH 氧化酶。PA 和 DG 也能通过刺激 PKC 途径而激活 NADPH 氧化酶。最终, DG 及其代谢物被水解成 NADPH 氧化酶的另一强激动剂 AA^[11]。

2.3 磷脂酶 A2

研究发现, 当 PLA2 被激活时自由脂肪酸和 LPC 生成增多。加入外源性 PA 能激活吞噬型细胞 NADPH 氧化酶, 而加入 AA 或亚油酸也能增加 VSMC 中 NADPH 氧化酶活性。在内皮细胞和 VSMC 中加入外源性 LPC 也能激活 NADPH 氧化酶而使活性氧生成增多^[12]。而且, 在内皮细胞中加入 PLA2 抑制剂能减少由凝血酶诱发的活性氧生成, 抑制 AA 的代谢能显著降低内皮细胞和 VSMC 内由 Ang ①或凝血酶诱发的活性氧生成。这些结果表明, 血管细胞中由 PLA2 介导的脂质代谢物也参与了 NADPH 氧化酶的激活。

2.4 rac

rac 是吞噬型细胞中 NADPH 氧化酶的重要激动剂之一。Ang ①、去极化剂和凝血酶在增加 VSMC 和内皮细胞 NADPH 氧化酶活性的同时, 也增加 rac 表达及 GTP 酶活性。Statins 可能通过抑制 rac GTP 酶活性及其易位而抑制 VSMC 中 NADPH 氧化酶的激活, 从而降低由 Ang ①或 EGFR 诱发的活性氧的生成。在内皮细胞中抑制小 G 蛋白 Rho 家族如 rac 能降低活性氧生成^[7]。在 rac 表达缺陷的转基因鼠或细胞中, 由机械力、PDGF 或 Ang ①诱发的活性氧生成明显受抑, 相反, rac 过表达却能增加由 Ang ①诱发的活性氧生成。

3 尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶在动脉粥样硬化发生和发展过程中的作用

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)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)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清除的速率时, 就会造成活性氧的蓄积。过多的活性氧可能通过增加钙离子水平来激活胞内信号通路和改变细胞内蛋白的氧化还原状态, 使脂质氧化、黏附分子表达、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)激活、内皮细胞功能失调/凋亡、VSMC 增殖和迁移以及血管收缩性改变, 最终导致 As 的发生与发展。细胞内活性氧来源多种多样, 如 O_2^- 、 H_2O_2 、 $HO\cdot$ 、脂自由基、 $ONOO\cdot$ 、含巯基的自由基等, 体内有多种酶参与了活性氧的生成。NADPH 氧化酶是一种多亚单位酶复合体, 是细胞中一种可诱发的电子传递系统, 可将电子从 NADPH 传递给 O_2 而生成 O_2^- , 最新的研究表

明 NADPH 氧化酶和新发现的 NOX 蛋白家族与 As 的发生以及 As 病灶的严重程度密切相关。

3.1 损伤血管内皮

正常生理条件下,体内的抗氧化防御机制能使一氧化氮(nitric oxide, NO)与 O_2 保持平衡,而各种病理状态可打破此平衡而使血管内皮细胞功能失调。内皮细胞功能失调即依赖内皮的血管舒张功能下降被认为是 As 的危险因素之一。有生物活性的 NO 是主要的内皮舒张因子。NO 的生物活性下降可能与 eNOS 表达降低、eNOS 底物缺乏、胞内信号改变以及活性氧增多而加速 NO 的降解有关。研究发现高胆固醇喂养的兔血管 eNOS 功能是完整的,当用乙酰胆碱或钙离子载体 A23187 刺激时能激活 eNOS,使 NO 生成增多。而用多聚乙炔-羟乙酸盐-超氧化物歧化酶(polyethylene glycolated-SOD)治疗高胆固醇喂养的兔,能显著改善其血管舒张功能,但对正常组没影响。这可能是由于高胆固醇血症时 NADPH 氧化酶被激活使 O_2 生成增多,增多的 O_2 可抑制内皮细胞中 NO 合酶活性并加速 NO 的降解而使有生物活性的 NO 减少,增多的 O_2 也可与细胞内多不饱和脂肪酸发生氧化作用,导致胞膜正常结构被破坏, SOD 可将过多的 O_2 转化为 H_2O_2 而增加 NO 的生成,改善血管舒张功能^[13]。Tomasz 等^[14]通过检测 133 例冠脉搭桥手术病人的隐静脉中过氧化物生成和 NADPH 氧化酶活性发现, NADPH 氧化酶是人隐静脉中生成过氧化物的主要酶体之一,它的活性增高能使依赖 NO 的内皮舒张功能失调,且能增加患 As 的危险性。Wingler 等^[8]发现,在肾素-血管紧张素系统活性高表达的转基因雄性大鼠的主动脉和肾脏中, NOX1 mRNA、NOX4 mRNA 和 NOX4 蛋白水平较野生型大鼠明显增高,由 NOX1 和 NOX4 介导的 O_2 生成增多,这些 O_2 能灭活 NO 而使内皮功能失调,加速心血管疾病的发展。本实验室用高浓度 Ang II 与人脐静脉内皮细胞共同孵育发现, Ang II 处理组的 NOX4 mRNA 表达增高且细胞内活性氧生成增多,这表明 NOX4 可能参与了细胞内活性氧的生成。

3.2 促进低密度脂蛋白(LDL)的氧化

由于生成大量的活性氧,可使 LDL 发生氧化作用,形成 ox -LDL, ox -LDL 在 As 的发生发展中起极其重要的作用。当 LDL 穿过内皮细胞层时,由活化的 NADPH 氧化酶产生的 O_2 与 LDL 相互作用而引起 LDL 的氧化,由此产生的 ox -LDL 可能是泡沫细胞吞噬的 ox -LDL 的主要来源^[15]。而由 ox -LDL 诱导生成的亚油酸过氧自由基(linoleic hydroperoxy)和烷氧自由基也能与 NO 作用而灭活 NO。过多的 O_2 能与 NO 结合形成过氧化氮,过氧化氮是一种很强的氧化剂,它能氧化 LDL,引起内皮细胞黏附分子表达、血管舒张功能下降、单核细胞渗透和 MMPs 的激活,导致血管重塑。Alexandra 等^[16]发现低浓度($5 \mu g/mL$)的 ox -LDL 能诱导 O_2 生成而促进 hUVEC 增生。加入 NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 或将 p22phox 的反义寡核苷酸转染到细胞都能大大减少 O_2 生成,这说明低浓度的 ox -LDL 可激活 NADPH 氧化酶使 O_2 生成增加而促进 hUVEC 增殖。Uwe 等^[5]发现 ox -LDL 诱发 hUVEC 中 NOX2 的表达和过氧化物释放有短暂的剂量依赖关系,而冠脉疾病的患

者用 statins(3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂)治疗后能下调 NOX2 表达,这可能是 statins 治疗后血清总胆固醇和 LDL-胆固醇降低而使进入内膜的 LDL 减少,继而 ox -LDL 形成减少有关。Tham 等^[17]发现 ox -LDL 可通过激活人冠状动脉内皮细胞中 NOX4 而促进活性氧生成。因此,由活化的 NADPH 氧化酶生成的过多的活性氧能氧化 LDL,而氧化的 LDL 又能促进 NADPH 氧化酶的活化,进而形成恶性循环,促进 As 的形成。

3.3 加速动脉粥样硬化的发展

研究发现人冠状动脉管壁的各种细胞都能生成 O_2 ,且成纤维细胞、巨噬细胞、新生内膜和中膜的 SMC、内皮细胞都有 p22phox 表达, p22phox 表达与 O_2 生成有关。有 As 病变的血管各层均有明显的 O_2 生成,以 As 斑块肩部 O_2 生成最明显,易破裂的斑块的 O_2 生成量较稳定斑块(含大量胶原、小量巨噬细胞)明显增高;同时有 As 病灶(atherosclerotic lesions)的冠脉 p22phox 表达远高于没病灶的冠脉,斑块肩部的巨噬细胞显示 p22phox 呈强表达^[4, 18]。Wamholtz 等^[19]发现在有高胆固醇血症的兔主动脉中, O_2 生成、NADPH 氧化酶活性和 AT1 受体表达均明显增高,而用 AT1 受体拮抗剂 Bay10-6734 治疗能抑制 NADPH 氧化酶活性,降低 O_2 生成,改善内皮功能,减少 As 早期斑块形成。这说明 p22phox 可能通过生成 O_2 而参与了 As 斑块的形成。NOX1 可能通过诱导血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和 MMP 的表达使活性氧生成增多而促进血管新生(angiogenesis)和肿瘤形成(tumorigenicity)。用含反义 NOX1 mRNA 的腺病毒载体能完全抑制 VSMC 中由 Ang II 或 PDGF 诱发的早期阶段的 O_2 生成,它也能抑制由 Ang II 或 PDGF 诱发的 P38 有丝分裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen activated protein kinase, p38 MAPK)和肌动蛋白调节激酶(activating protein kinase, Ark)的活化。将 p22phox 的反义寡核苷酸转染到 VSMC 能降低 O_2 生成^[20]。因此, NOX1 可能与 p22phox 结合形成功能性细胞色素而激活 NADPH 氧化酶生成 O_2 , 促进 As 的发展。

动物实验发现^[21-23],将喂正常饮食(standard chow)或高脂饮食的载脂蛋白 $E^{-/-}$ / p47phox $^{-/-}$ 小鼠和载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠的主动脉窦(aortic sinus)分别用油红 O 染色,它们的主动脉窦平均 As 病灶面积(mean aortic sinus lesion area)没有显著差异。但 Patricia 等对整个主动脉(从主动脉弓到分支处)进行油红 O 染色发现,在喂正常饮食或高脂饮食的载脂蛋白 $E^{-/-}$ / p47phox $^{-/-}$ 小鼠组的总的 As 病灶较载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠组均明显降低(其中喂正常饮食时载脂蛋白 $E^{-/-}$ / p47phox $^{-/-}$ 小鼠组较载脂蛋白 $E^{-/-}$ 小鼠组降低 75%),但它们的血脂如胆固醇和 TG 水平没有显著差异。从野生型小鼠和 p47phox 缺陷型小鼠分离大动脉 SMC 后的研究发现在正常生理条件或受刺激时, p47phox 缺陷型小鼠的 SMC 的 O_2 生成均较野生型明显降低,这表明 p47phox 可能通过参与 O_2 生成而促进 As 的形成,而各组的主动脉窦平均 As 病灶没有明显区别,可能是由于主动脉窦处的 As 病灶发展迅速不易测出。Sorescu 等^[4]通过检测 20 例心脏移植病人的冠状动脉 NOX2 mRNA 和 NOX4 mRNA 并依照美国心脏学会(American Heart Association, AHA)

对 As 病灶的严重程度分类标准发现, NOX2 mRNA 在 As 的第 ④和 v 阶段分别较第 iv 阶段增加 3.9 倍和 8.6 倍, NOX4 mRNA 水平在 As 的第 ④阶段是第 iv 阶段的 2.3 倍, 但在最严重的 As 复合性斑块中 NOX4 mRNA 却只有第 ④阶段的 12.8%。进一步研究发现, NOX2 和 NOX4 在人冠脉中表达广泛, 而 NOX1 表达较低。在 As 斑块肩部和 As 病灶严重区 NOX2 均高表达, NOX2 的高表达主要与动脉管壁中的巨噬细胞浸润增多有关, 而在斑块脂质中心周围 NOX4 表达增高, NOX4 高表达主要与 As 病灶处 SMC(α 肌动蛋白表达呈阳性) 在 As 不同阶段的比例有关。Katalin 等^[24] 发现大鼠颈动脉在气囊损伤后增多的 O₂ 不是由浸润的炎性细胞产生而是由中膜和新生内膜 SMC 以及动脉外膜细胞产生, 且伴有 NOX1、NOX4 和 NOX2 的表达增高。这提示 NOX2、NOX4 和 NOX1 可能都参与了 As 的形成和发展, 它们的表达与 As 病灶的严重程度有关。

4 抑制剂对尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶活性的影响

以前研究较多的是以肽为基础的抑制剂。抗生素肽 PR-39 的氨基末端的 26 个氨基酸残基能与 p47phox 的 SH3 区 (Src homology domain) 结合, 阻断 p47phox 与 p67phox 的结合而抑制 NADPH 氧化酶活性。它过去被用于心肌再灌注损伤时 NADPH 氧化酶的作用观察。但近来发现, PR-39 还能结合其它含 SH3 区的蛋白, 也能与膜脂相互作用。因此, 它不是一种特异的 NADPH 氧化酶抑制剂。Pagano 等^[25] 设计出一种由 HIV 包被蛋白的 9 个氨基酸和 gp91phox 的 9 个氨基酸组成的嵌合肽 (chimeric peptide) gp91ds-Tat, 它能与 p47phox 结合而干扰 p47phox 与 gp91phox 的结合, 是一种高效的依赖 gp91phox 的 NADPH 氧化酶抑制剂。它能调节内皮细胞中单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1) 的表达、气囊损伤后新生内膜的形成和由 Ang ②诱发的高血压等, 但 gp91ds-Tat 只能抑制含 gp91phox 的 NADPH 氧化酶, 而对其它 NOX 如 NOX1、NOX3、NOX4 和 NOX5 无抑制作用。

近来发现了一些小分子如夹竹桃麻素 (Apocynin) 和 DPI 能抑制 NADPH 氧化酶的组装, 但均是非特异性的^[26, 27]。Raloxifene 是选择性雌激素受体调节子家族成员 (selective estrogen receptor modulators, SERMs), 它可能作为雌激素受体拮抗剂抑制高胆固醇喂养兔的胆固醇聚集和脂质氧化, 通过调节 NO 和钙离子依赖的信号通路而扩张冠状动脉。用 Raloxifene 处理的大鼠血管 rac1 的活性和表达均降低, 将 Raloxifene 与鼠主动脉 SMC 孵育能降低由 Ang ②诱发的活性氧生成^[21]。然而, 长期应用 Raloxifene 是否能改善血管舒张功能还有待研究。SI17834 (苯吡喃的衍生物) 和 Azelnidipine (一种钙离子拮抗剂) 都能通过抑制 NADPH 氧化酶活性而阻断内皮细胞中由 TNF- α 诱发的 VCAM-1 和 IL-8 的表达, 且 SI17834 能减轻载脂蛋白 E 缺陷鼠的 As 病灶^[28, 29]。Wassmann 等^[7] 发现 Atorvastatin (3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂) 能使自发性高血压大鼠 (spontaneously hypertensive rats, SHR) 主动脉 NOX1 mRNA 表达下调, 同时能上调主动脉过氧

化氢酶 mRNA, 它还能抑制主动脉 rac1 的易位而影响 NADPH 氧化酶活性, 降低 O₂ 的生成而改善血管舒张功能。但其作用目前只在 SHR 模型上得到了证实。

5 展望

动脉粥样硬化是当前严重危害人类生命和健康的最主要疾病之一, 而 NADPH 氧化酶在 As 发病中的作用, 正日益为人们认识和重视。尽管目前众多学者对 NADPH 氧化酶在 As 发病中的作用做了大量研究, 但对吞噬型细胞和非吞噬型细胞 NADPH 氧化酶结构和功能的异同、酶的亚单位结构及其相互作用、酶的活性调控机制和有效的特异性抑制剂还有待研究。在今后几年中, 随着 As 和 NADPH 氧化酶关系的分子机制的进一步阐明, 新的特异性 NADPH 氧化酶抑制剂可能为 As 的治疗带来新的前景。

[参考文献]

- [1] Groemping Y, Lapouge K, Smerdon SJ, Rittinger K. Molecular basis of phosphorylation-induced activation of the NADPH oxidase. *Cell*, 2003, **113** (3): 343-355
- [2] Jiar-Mei L, Nick PG, David JG, Mingyou C, Ajay MS. Activation of NADPH oxidase during progression of cardiac hypertrophy to failure. *Hypertension*, 2002, **40** (4): 477-484
- [3] Christophe H, Jennifer KB, Philippe R, Alison CC, Jane LS, Gerd H, et al. Increased myocardial NADPH oxidase activity in human heart failure. *J Am Coll Cardiol*, 2003, **40** (12): 2164-171
- [4] Dan S, Daiana W, Bernard L, Roza EC, Katalin S, Geroge PS, et al. Super-oxide production and expression of NOX family protein in human atherosclerosis. *Circulation*, 2002, **105** (12): 1429-435
- [5] Uwe R, Jan G, Juergen H, Hans-Reinhard Z, Henning M. Induction of NAD(P)H oxidase low-density lipoprotein in human endothelial cells. *Circulation*, 2001, **104** (15): 1767-772
- [6] Li JM, Shah AM. Intracellular Localization and pre-assembly of the NADPH oxidase complex in cultured endothelial cells. *J Biol Chem*, 2002, **277** (22): 19952-960
- [7] Wassmann S, Laufs U, Muller K, Konkol C, Ahlbiy K, Baumer AT, et al. Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (2): 300-305
- [8] Kirstin W, Sandra W, Reinhold K, Lars R, Martin P, Harald HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms NOX1 and NOX4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Rad Biol Med*, 2001, **31** (11): 1456-464
- [9] Bernard L, Roza EC. Vascular NAD(P)H oxidase: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2003, **285** (2): R277-R297
- [10] Frey T, Rahman A, Kefer JC, Minshall RD, Malik AB. PKC ζ regulation TNF α -induced activation of NADPH oxidase in endothelial cells. *Circ Res*, 2002, **90** (9): 1012-019
- [11] Touyz RM, Schiffrin EL. Increased generation of superoxide by angiotensin ② in smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive patients: role of phospholipase D-depend NAD(P)H oxidase-sensitive pathways. *J Hypertens*, 2001, **19** (7): 1245-254
- [12] Yamakawa T, Tanaka S, Yanaka S, Kamei J, Numaguchi K, Motley ED, et al. Lysophosphatidylcholine activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 through reactive oxygen species in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (5): 752-758
- [13] Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Homfneyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res*, 1991, **69** (5): 1293-300
- [14] Tomas JG, Nick EJ, West EB, Edward B, Denise M, Chandi R, et al. Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase association with endothelial

- dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res*, 2000, **86** (9): E85-90
- [15] Janie WM, Mark ES. A central role for the endothelial NADPH oxidase in atherosclerosis. *FEBS*, 2000, **472** (1): 1-4
- [16] Alexandra H, Kathrin H, Ulrike R, Christophe W, Jan G. Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induced proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, 2000, **11** (10): 1 819-825
- [17] Thum T, Borlak J. Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein induced vascular injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism? *Circ Res*, 2004, **94** (1): e1-13
- [18] Hiroshi A, Nobutaka I, Sari T, Yoshiyuki R, Seinosuke K, Yoshitake H, et al. Expression of NADH/NADPH oxidase P22phox in human coronary arteries. *Circulation*, 1999, **100** (14): 1 494-498
- [19] Ascan W, Georg N, Eberhard S, Roland M, Jan HB, Mikhail S, et al. Increased NADPH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis. *Circulation*, 1999, **99** (15): 2 027-033
- [20] Bernard L, Dan S, Katalin S, QiQin Y, Marjorie A, Yong Z, et al. Novel gp91phox homologues in vascular smooth muscle cells NOX1 mediates angiotensin II-induced superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways. *Mol Med*, 2001, **88** (9): 888-894
- [21] Kirk EA, Dinanier MC, Rosen H, Chait A, Heinecke JW, LeBoeuf RC. Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, **20** (6): 1 529-535
- [22] Eileen H, Brahm HS, Patrick JP, Federico ER, Beverly P, John D, et al. Vascular effects following homozygous disruption of P47phox an essential component of NADPH oxidase. *Circulation*, 2000, **101** (11): 1 234-236
- [23] Patricia AB, Cam P, Marie M, Zhaoyong H, Stephen MH, Edward HY, et al. p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE^{-/-} mice. *J Clin Invest*, 2001, **108** (10): 1 513-522
- [24] Katalin S, Bernard L, Dan S, Lula LH, Liisa V, Tracey LC, et al. Upregulation of NOX-based NAD (P)H oxidase in restenosis after carotid injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, **22** (1): 21-27
- [25] Rey FE, Cifuentes ME, Kiarash A, Quinn MT, Pagano PJ. Novel competitive inhibitor of NAD(P)H oxidase assembly attenuates vascular O₂(⁻) and systolic blood pressure in mice. *Circ Res*, 2001, **89** (5): 408-414
- [26] Engels F, Renirie BF, Gart BA, Labadie RP, Nijkamp FP. Effects of apocynin, a drug isolated from the roots of *Picrohiza kurroa*, on arachidonic acid metabolism. *FESB Lett*, 1992, **305** (3): 254-256
- [27] Sven W, Ulrich L, Djordje S, Wolfgang L, Johannes-Peter S, Katja A, et al. Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension reduced oxidase stress oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation*, 2002, **105** (17): 2 083-091
- [28] Cayatte AJ, Rupin A, Oliver-Krasinski J, Maitland K, Sansilvestre-Morel P, Boussard MF, et al. S17834, a new inhibitor of cell adhesion and atherosclerosis that targets NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, **21** (10): 1 577-584
- [29] Yamagishi S, Inagaki Y, Nakamura K, Imaizumi Y. Azelnidipine, A newly developed long-acting calcium antagonist, inhibits tumor necrosis factor- α induced interleukin-8 expression in endothelial cells through its anti-oxidative properties. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2004, **43** (5): 724-730

(此文编辑 胡必利)

《中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)》 (生物医药类)一览表(2003 年度)

中国普通外科杂志

中国普外基础与临床杂志

中国全科医学

中国人兽共患病杂志

中国烧伤创疡杂志

中国神经精神疾病杂志

中国神经科学杂志

中国神经免疫学和神经病学杂志

中国生化药物杂志

中国生物工程杂志

中国生物化学与分子生物学报

中国生物医学工程学报

中国生物制品学杂志

中国实验动物学报

中国实验方剂学杂志

中国实验血液学杂志

中国实验诊断学

中国实用儿科杂志

中国实用妇科与产科杂志

中国实用护理杂志

中国实用内科杂志

中国实用外科杂志

中国食品卫生杂志

中国食用菌

中国输血杂志

中国疼痛医学杂志

中国危重病急救医学

中国微创外科杂志

中国微侵袭神经外科杂志

中国微循环

中国卫生检验杂志

中国卫生统计

中国误诊学杂志

中国现代手术学杂志

中国现代医学杂志

中国现代应用药学

中国消毒学杂志

中国斜视与小儿眼科杂志

中国心理卫生杂志

中国心脏起搏与心电生理杂志

中国新药与临床杂志

中国新药杂志

中国行为医学科学

中国胸心血管外科临床杂志