

## 氧化应激 – 炎症在动脉粥样硬化发生发展中 作用研究的新进展

陈 媛, 周 玫

(南方医科大学自由基医学研究所, 广东省广州市 510515)

**[作者简介]** 陈媛, 原第一军医大学自由基医学研究室主任, 教授, 博士研究生导师, 享受国家特殊津贴。国家自然科学基金第四、第五届学科评审成员, 自由基医学专业委员会理事, 广东省生物物理学会副理事长, 广东省自由基医学专业委员会主任委员。所在实验室被全国动脉粥样硬化专业委员会评为“全国知名实验室”。获得面上国家自然科学基金 7 项, 以第一参与者获得重点国家自然科学基金一项。以第一或第二作者获得国家科学进步贰等奖、叁等奖以及中华医学科技进步壹等奖各一项, 军队科技进步贰等奖三项。发表论文 240 余篇, SC1 收录论著 39 篇。发表在中华医学杂志上的论文由于被引用频次数较多被授予中华医学杂志创刊 90 周年金笔奖。先后主编专著四部: 自由基医学(北京人民军医出版社, 1991 年); 自由基医学基础与病理生理(北京人民卫生出版社, 2002 年); 自由基与衰老(北京人民卫生出版社, 2004 年)和自由基 – 炎症与衰老性疾病(北京科学出版社, 2007 年)。



**[关键词]** 病理学与病理生理学; 氧化应激; 炎症; 动脉粥样硬化

**[摘要]** 氧化应激和炎症是动脉粥样硬化发展的两个关键成分, 是动脉粥样硬化从脂肪条纹形成到斑块破裂和血栓形成这一发展过程的主要因素。本文从氧化应激在动脉硬化发生中的作用及其分子和细胞机制, 动脉粥样硬化发生发展的炎症性质以及转录因子核因子  $\kappa$ B 是活性氧诱导动脉硬化炎症反应的介导剂三个方面说明, 这两个看似不相关的独立致病因子是相互调控共同存在, 相伴而行的。同时说明活性氧是动脉粥样硬化炎症发生的始动因素, 活性氧及其修饰低密度脂蛋白形成的氧化型低密度脂蛋白是内皮损伤和诱导内皮细胞促炎症细胞因子和促炎症分子表达的主要原因。

**[中图分类号]** R363

**[文献标识码]** A

随着自由基生物学与自由基医学的发展, 80 年代初就有很多学者探索动脉粥样硬化 (atherosclerosis As) 与活性氧的关系, 并提出了 As 发生的活性氧机制。1999 年 Ross 提出 As 是一种炎症性疾病。近年来从信号传导和基因调控水平的研究揭示氧化应激和炎症是 As 发生的两个关键成分, 是 As 从脂肪条纹形成到斑块破裂和血栓形成这一发展过程的主要因素。这两个看似不相关的独立致病因素是相互调控, 共同存在, 相伴而行的。同时揭示, 活性氧是 As 炎症发生的始动因素, 活性氧及其修饰低密度脂蛋白 (low density lipoprotein LDL) 形成的氧化型低密度脂蛋白 (oxidized LDL, ox-LDL) 是内皮损伤和诱导内皮细胞促炎症细胞因子和促炎症分子表达的主要原因<sup>[1-4]</sup>。As 发生的危险因子, 如糖尿病、高血压、高血脂、肥胖、高同型半胱氨酸血症及吸烟等, 都存在活性氧的过量产生或诱导活性氧生成<sup>[4-6]</sup>。

### 1 氧化应激在动脉粥样硬化发生中的作用及其分子和细胞机制<sup>[4 7-11]</sup>

越来越多的事实说明, 在 As 和急性冠状动脉综合征有

关的心血管功能障碍的发生和发展中, 氧化应激起主要作用。氧化应激是过量的活性氧与内源性清除活性氧的抗氧化系统间失去平衡。活性氧对不同细胞有不同的功能效应。As 主要是血管性病变。在血管细胞中最重要的活性氧是超氧阴离子自由基  $O_2^{\cdot-}$ , 其是由单价还原氧生成的。虽然  $O_2^{\cdot-}$  对血管本身无作用, 但主要是由它生成的其它活性氧。如超氧化物歧化酶歧化  $O_2^{\cdot-}$  生成较稳定的活性氧  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  能与还原性过度金属反应生成高活性的羟自由基  $\cdot OH$ , 它还能被髓过氧化物酶 (myeloperoxidase MPO) 代谢生成活性氧次氯酸 HOCl 事实上所有的血管细胞都能产生  $O_2^{\cdot-}$  和  $H_2O_2$ 。血管壁细胞生成活性氧酶包括 NADPH 氧化酶家族、黄嘌呤氧化酶和 NO 合酶, 以及线粒体氧化反应时漏出的活性氧。单核/巨噬细胞由于受内皮细胞释放的趋化因子的作用, 在血管内膜下积聚, 单核/巨噬细胞的吞噬型还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate NADPH) 氧化酶的呼吸爆发生成的活性氧也参与血管壁损伤, 特别是斑块的形成、破裂与血栓形成。活性氧能介导血管内皮细胞和平滑肌细胞表型调节如生长、凋亡和存活。

#### 1.1 活性氧对血管细胞的效应

活性氧影响内皮的很多功能, 内皮依赖的血管扩张, 由

于血管壁失去 NO 生物活性而受损, 活性氧引起内皮细胞凋亡、增加单核细胞粘附和血管生成中起作用。(1) 损伤内皮依赖的血管扩张: 动物模型中, 在很多疾病的情况下, 内皮功能障碍与活性氧增加有关。由于  $O_2^{\cdot -}$  灭活 NO, 重要的是超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 能改善高胆固醇动物内皮依赖性血管扩张, 血管紧张素  $\text{I}\alpha$  输注和去氧皮质酮酸盐致的内皮功能障碍或心力衰竭可被 SOD 逆转。此外 GPx 杂合子缺失导致内皮依赖的血管扩张受损。因为 GPx 是负责去除过氧化物, 这些资料说明除了  $O_2^{\cdot -}$  外其它活性氧也调控血管运动功能。(2) 诱导内皮细胞凋亡: 内皮损伤或暴露于  $O_2^{\cdot -}$  和  $H_2O_2$  诱导的细胞凋亡, 导致内皮细胞丧失, 造成 As 发生和促凝血状态。ox-LDL、血管紧张素  $\text{I}\alpha$ 、高葡萄糖和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) 致的内皮细胞凋亡, 能被 SOD、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和抗氧化剂 N-乙酰氨基半乳糖 (N-acetylgalactosamine, NAC) 和维生素抑制。这些资料说明, 活性氧对不同种类刺激剂诱导的凋亡机制有调控作用。内皮细胞从细胞外基质脱落, 这是另一类型的细胞程序性死亡称为 Anoikis, 这一过程也是与细胞内活性氧增加有关, 可能是通过线粒体, 这种凋亡能被 NAC 和黄素蛋白酶如 NADPH 氧化酶抑制剂 (diphenyleneiodonium, DPI) 抑制。(3) 诱导内皮细胞粘附分子表达: 内膜在正常情况下, 存在无炎症的表面, 但很多促炎症因子刺激剂诱导内皮细胞粘附分子表达, 导致单核细胞粘附和最终形成 As 损伤。血管内皮粘附分子 1 和细胞间粘附分子 1 的表达是活性氧依赖的。IL-1 和 TNF $\alpha$  诱导 VCAM-1 基因表达能被抗氧化剂 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC) 和 NAC 抑制。此外, 由振荡切变力应激诱导的 VCAM-1 和 ICAM-1 表达也能被 NAC 抑制。总之这些结果说明活性氧促发炎症细胞粘附。(4) 血管新生: 血管新生不仅对生理过程, 如胚胎发育和创伤修复, 而且对病理过程如癌症、糖尿病视网膜病和 As 的发生是重要的。内皮细胞迁移、增殖和血管形成都是血管生成过程的必须事件, 活性氧可能直接参与这些机制, 因为已知  $H_2O_2$  诱导内皮细胞增殖和迁移, 以及介导淋巴细胞激活的血管形成。活性氧也作为血管生长因子如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的介导剂。

血管平滑肌细胞很多功能也依赖活性氧的生成。这些过程研究得最清楚的是细胞生长, 但活性氧也涉及平滑肌细胞迁移, 以及炎症介导剂和基质成分表达。此外, 活性氧还参与血管平滑肌细胞收缩。(1) 血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 生长: 合成性 VSMC 的表型已发生改变, 有利于生长, 见于血管病, 如高血压、As 和气囊血管成形术后再狭窄。活性氧生成参与很多导致肥大和增殖性 VSMC 生长。已知血管活性肽血管紧张素  $\text{I}\alpha$  (angiotensin  $\text{I}\alpha$ , Ang $\text{I}\alpha$ ) 能诱导 VSMC 肥大。事实证明活性氧参与 VSMC 肥大反应。Ang $\text{I}\alpha$  诱导 VSMC 肥大能被 CAT 和反义 p22phox 抑制, 由此, 提出在 VSMC 生长反应中有 NADPH 氧化酶衍生的活性氧。活性氧也介导激动剂血小板源生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF) 和凝血酶致的增殖反应。

$H_2O_2$  本身诱导 VSMC 增殖, 虽然这效应主要依赖于细胞暴露于  $H_2O_2$  浓度。此外, PDGF 和凝血酶致 VSMC 增殖需要  $H_2O_2$  生成, 因为这种 VSMC 增殖被 CAT、NAC 或 DPI 抑制。内源性产生的  $H_2O_2$  对调节 VSMC 成活和增殖也是重要的, 因为 CAT 过表达抑制平滑肌细胞基础增殖, 同时增加细胞凋亡速率。(2) VSMC 迁移: VSMC 迁移是血管性疾病发生的主要病变之一。已知 PDGF 诱导的 VSMC 趋化性能被 CAT 表达抑制, PDGF 诱导 VSMC 迁移被 NAC、DPI 和 Ebselen 以及显性负性 Rac 抑制, 说明通过 NADPH 氧化酶生成的  $O_2^{\cdot -}$  是激动剂刺激 VSMC 迁移的关键。搞清负责活性氧依赖的 VSMC 迁移的主要信号传导分子将有很大意义。(3) 基质的调控: 在生理和病理性血管重建中基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMP) 降解和重组细胞外基质是重要事件。最近研究显示 MMP 活性能被活性氧调节。VSMC 分泌 MMP-2 和 Pro-MMP-9 是由活性氧激活的。MPO 衍生的 HOCl 通过半胱氨酸残基氧合作用, 激活 MMP-7, 这机制不同于已知的 MMP 前酶蛋白能裂解。MMP 基因表达也受活性氧调控。机械伸长 VSMC, MMP-2 mRNA 含量增加, 这时肌细胞处于 NADPH 氧化酶衍生的活性氧敏感状态。因此, 活性氧在多个水平上调节基质重建。

## 1.2 血管细胞生成活性氧的酶表达活性与动脉粥样硬化

活性氧是血管细胞重要的信号分子, NADPH 氧化酶是血管细胞生成活性氧的重要来源。血管细胞的血管型 NADPH 氧化酶是组成性激活, 在基础条件下产生低水平的活性氧, 但对刺激剂如生长因子和细胞因子则显示较高水平的反应。血管型 NADPH 氧化酶结构类似于但又不同于吞噬细胞的吞噬型 NADPH 氧化酶。NADPH 氧化酶是由多个亚单位组成。这些亚单位包括与膜结合的细胞色素 b558 样的分子, 其负责电子从 NADPH 转移至  $O_2$ , 产生  $O_2^{\cdot -}$ 。这个色素由 p22phox 和 黄素蛋白 gp91phox 或它的一个同源物构成。两个胞浆亚单位 p47phox 和 p67phox 以及小 G 蛋白 Rac 也起调控作用。血管型 NADPH 氧化酶存在于整个血管壁细胞, 内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞。血管型 NADPH 氧化酶与吞噬型 NADPH 氧化酶不同, gp91phox (NOX2) 同源物 NOX1、NOX3、NOX4 和 NOX5 在非吞噬型 NADPH 氧化酶中存在。这些同源物与 gp91phox 一样都具有 NADPH、黄素蛋白结合位点和血红素结合组氨酸。平滑肌细胞 NOX1 和 NOX4 的表达明显高于 gp91phox 内皮细胞 p67phox 和 gp91phox 的表达远较吞噬细胞为低, 说明 gp91phox 表达的调控可能决定内皮细胞 NADPH 氧化酶生成  $O_2^{\cdot -}$  的能力。虽然血管壁的很多细胞能产生  $O_2^{\cdot -}$ , 但在 As 损伤部位单核细胞/巨噬细胞 NADPH 氧化酶可能是生成  $O_2^{\cdot -}$  的重要源。在人冠状动脉粥样硬化斑块易受损的肩区显示 gp91phox 广泛表达, 这与巨噬细胞定位相一致。此外, 当斑块期时 NOX4 表达上调, 在晚期损伤时表达减轻。这些酶系统的功能意义由动物实验得到证实。在 apoE 敲除 (载脂蛋白 E $^{-/-}$ ) 小鼠, p47pho 基因缺失, 与 apoE $^{-/-}$  小鼠相比, 使降主动脉的损伤面积降低, 这说明 NADPH 氧化酶衍生的活性氧是 As 损伤形成所必要的。对 As 和非 As 冠状动脉 NADPH

氧化酶的关键性成分 p22phox 表达研究揭示, As 动脉 p22phox 表达明显增加, 横跨血管壁。随着病变进展, p22phox 表达增加。同时对冠状动脉 NOX 家族蛋白测定发现 gp91phox、p22phox 和新 NOX 蛋白细胞型特异性表达与 As 病变严重性相关。p22phox 在所有类型细胞中高表达, 而 gp91phox 在巨噬细胞最丰富, 平滑肌细胞和成纤维细胞 gp91phox 表达明显较低, NOX4 在非吞噬细胞高水平表达, 但 NOX1 在各型细胞中则是低水平表达。对稳定型和不稳定型心绞痛患者冠状动脉切除样品中 NADPH 氧化酶的功能作用研究显示, 活性氧含量与 p22phox 和 ox-LDL 的分布密切相关, 以及活性氧不仅由炎症细胞产生, 而且由平滑肌细胞和成纤维细胞产生。因此, 在冠状动脉基于 p22phox 的 NADPH 氧化酶生成的活性氧可能介导 LDL 的氧化修饰。不稳定型心绞痛患者冠状动脉生成的活性氧明显较稳定型心绞痛患者高。在不稳定型心绞痛患者 NADPH 氧化酶引起氧化应激增加, 可能对 As 斑块的易损性起重要作用, As 斑块的稳定性主要依赖于它的纤维帽结构的完整性, MMP, 锌依赖蛋白家族, 其功能是更新细胞外基质蛋白成分, 在冠状动脉能被 NADPH 氧化酶生成的活性氧激活, 它们的激活贡献于急性冠状动脉综合征的发病。

在某些情况下, NO 合酶 (NOS) 除了能生成 NO 外还能生成  $O_2^{\cdot-}$ 。NOS 利用 L-精氨酸作为基质, 在四氢生物蝶呤 (tetrahydrobiopterin, BH4) 调节下合成 NO。L-精氨酸或 BH4 浓度较低或 BH4 被氧化, NOS 脱偶联, 生成大量  $O_2^{\cdot-}$ 。对 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠转 eNOS 基因研究显示, eNOS 过表达影响 As 的发生和进展。内皮细胞过表达 eNOS 不是抑制而是加速 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠 As 的发展。eNOS 过表达的功能障碍在内皮细胞是明显的, 这是由于 NO 的生成减低和  $O_2^{\cdot-}$  生成增加, 同时伴有血管 BH4 含量降低。氧化应激能导致 As 血管 BH4 过量氧化和耗竭。补充 BH4 能逆转 eNOS 功能障碍和抑制 As 病变进展, 说明 NOS 辅因子 BH4 不足, 与 As 的发生和发展有关。As 血管 BH4 耗竭是继发于 BH4 合成受损和 BH4 氧化增加以降低 BH4 的再循环。由 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠分离的主动脉研究说明, NOS 酶解偶联与 OONO 有关, 不仅通过氧化细胞内 BH4 而且阻止 eNOS 与 BH4 结合。MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/CI 系统和 HOC1 能氧化亚硝酸生成非自由基氧化剂亚硝基氯化物 (NO<sub>2</sub>Cl) 和自由基·NO<sub>2</sub>, 两者都能促进硝基化作用, 使酪氨酸转变成 3-硝基酪氨酸。最近研究发现 MPO 实际上在体内生成硝基种中起主要作用, 以及 3-硝基酪氨酸的形成, 严格地依赖于·NO<sub>2</sub> 的利用度。例如小鼠的炎症模型中野生型小鼠 3-硝基酪氨酸浓度增加, 而缺乏功能性 MPO 小鼠则否, 说明当亚硝酸盐/硝酸盐存在时, MPO 能在体内生成活性氮 (reactive nitrogen species, RNS), 近来 MPO 在血管病理学中的作用受到关注。MPO 在吞噬细胞中很丰富, 能催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 生成 HOC1 和其它活性氧。它也利用 NO 生成活性氧, 由此降低 NO 生物利用度和增加氧化应激。现在知道 MPO 生成的氧化产物与 As 斑块发展的不同期相关。MPO 和它的氧化产物能氧化修饰 LDL, 以及在人 As 斑块和有破裂倾向的斑块中富含 MPO 及其氧化产物。临床研究已经说明,

MPO 含量与冠心病和内皮功能障碍之间有相关性。

## 2 动脉粥样硬化的炎症性质<sup>[1, 5, 12-18]</sup>

### 2.1 动脉粥样硬化病变的主要特征与炎症

斑块的形成和破裂: As 是冠心病的主要原因。As 损伤呈现的粥样表现为非对称性、病灶性的动脉最内层的内膜增厚。粥样包含细胞、结缔组织成分和碎片。炎症性免疫细胞是构成粥样瘤的重要部分, 其余是血管内皮和平滑肌细胞。粥样瘤形成之前是脂肪条纹, 脂肪条纹是在内皮下脂细胞聚集, 这些载脂细胞中的大部分是巨噬细胞和 T 淋巴细胞。脂肪条纹在青年人中占优势, 但从不起症状, 它可能进展为粥样瘤或最终消失。在粥样瘤中心泡沫细胞和细胞外的脂滴形成核心区, 周围为平滑肌细胞和富含基质的帽。T 细胞、巨噬细胞、肥大细胞浸润损伤区, 以及在粥样瘤生长的肩区特别丰富。很多免疫细胞显示激活征象以及产生炎症细胞因子。当 As 瘤进展到阻止血流通过冠状动脉时发生心肌梗死, 以前认为由于斑块中平滑肌细胞不断生长而引起管腔狭窄是主要原因。血管造影照片研究证实损伤部位并不引起明显的狭窄, 主要是明显的斑块激活而不是狭窄, 参与缺血和梗死, 一定程度上涉及冠状动脉痉挛, 但大多数心肌梗死的例子是由于在斑块的表面形成阻塞性血栓。冠状动脉血栓形成有两个主要原因: 斑块破裂和内皮腐蚀。斑块破裂的危险性是它使斑块核心区的促血栓物质磷脂、组织因子、血小板和血小板粘附基质暴露于血液。破裂好发生在纤维帽薄的和部分受损处, 在这些地方含有丰富的激活的免疫细胞, 它们产生很多炎症分子和蛋白水解酶。这些酶能减弱纤维帽和激活核心区细胞, 使稳定的斑块转变成脆弱的、不稳定的、易破裂的结构, 由此, 诱导血栓形成和引发急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS)。什么原因使静止的斑块破裂? 激活的巨噬细胞、T 细胞和肥大细胞在斑块破裂处产生几种类型的分子, 促炎症细胞因子、蛋白酶、凝血因子、自由基和血管活化分子。它们使病变斑块不稳定。它们抑制形成稳定的纤维帽, 攻击帽中的胶原, 引发血栓形成。可以想象所有这些反应都能导致斑块激活和破裂, 血栓形成和缺血。在斑块激活中两种类型的蛋白酶起关键作用: MMP 和半胱氨酸蛋白酶, MMP 活性在几个水平上受到调控, 促炎症细胞因子诱导 MMP 基因表达, 血纤维蛋白溶酶激活此酶的前身, 抑制蛋白 (组织金属蛋白酶抑制剂) 抑制它们的作用。类似的半胱氨酸蛋白酶被某些细胞因子诱导, 以及被抑制剂 Cystatins 抑制。在形成主动脉瘤中, 这些分子中一些起着决定性作用。

LDL 储留和内皮细胞激活: 对动物和人的研究已经显示, 高胆固醇血症能引起大动脉和中动脉内皮局灶性激活, LDL 浸润动脉内膜和在内膜内引发动脉壁炎症反应。在内膜内通过氧化或酶性作用修饰 LDL 导致能激活内皮细胞的磷脂释放, 特别好发生在血流动力学应变部位, 对好发生 As 倾向的节段具有典型的低平均切变力和高振荡切变力的血液动力学血流谱, 可引起内皮细胞粘附分子和与炎症有关的基因表达增加, 因此, 血液动力学的应变和脂类的积聚能引

发动脉的炎症过程。激活的内皮细胞表达几种类型的白细胞粘附分子,引起血细胞沿着血管表面滚动和在激活处粘着。因为 VCAM-1 是典型的对高胆固醇血症反应而上调,带有 VCAM-1 受体的单核细胞和白细胞好附着在这些部位。一旦白细胞到达,内膜下产生趋化因子,刺激它们通过内皮连接,迁移至内膜下。对单个核细胞的某些趋化因子和粘附分子的基因抑制或药物阻断,能抑制小鼠 A<sub>s</sub> 的发生。内皮细胞损伤是 A<sub>s</sub> 斑块发生的主要原因。炎症性反应来自对内皮不同类型攻击,导致 A<sub>s</sub> 内皮功能障碍,可能的原因包括 LDL 增加和氧化修饰,吸烟、高血压和糖尿病引起的自由基,以及血浆同型半胱氨酸浓度增加等。血管内皮功能障碍的原因,内皮对损伤的反应,除上面提高的粘附性外,还有通透性、增生性和血栓形成。

泡沫细胞形成与巨噬细胞作用:炎症内膜产生的细胞因子和生长因子如巨噬细胞集落刺激因子,诱导单核细胞进入斑块分化成巨噬细胞这是 A<sub>s</sub> 发生的关键一步,它与上调受体清道夫受体和 Toll 样受体相关。清道夫受体内吞广范围的带有病原体分子谱的分子和颗粒。细菌的内毒素、凋亡细胞片段和 ox-LDL 颗粒都能通过这个通路被摄取和分解破坏。假如从摄取的 ox-LDL 颗粒衍生的胆固醇不能被细胞充分代谢,它将聚集在细胞内成为脂滴,最终细胞转变成泡沫细胞,它是 A<sub>s</sub> 的原型细胞。Toll 样受体也与带有病原体样的分子谱的分子结合,但与清道夫受体不同,它们能引发诱导细胞激活的信号级联,激活的巨噬细胞产生促炎症细胞因子、蛋白酶、活性氧和活性氮。树突状细胞 (dendritic cell DC)、肥大细胞和内皮细胞也表达 Toll 样受体。细菌毒素、应激蛋白和 DNA 基元都能被不同的 Toll 样受体辨认。此外,人热休克蛋白 60 和 ox-LDL 颗粒也激活这些受体。人 A<sub>s</sub> 损伤区的细胞都显示 Toll 样受体,斑块炎症可能部分依赖于这一通路。支持这一概念的事实是,去除 Toll 样受体信号传导通路中的一个分子基因,就能抑制 apoE<sup>-/-</sup> 小鼠 A<sub>s</sub> 的发生。

## 2.2 动脉粥样硬化炎症的循环标志物

A<sub>s</sub> 作为慢性炎症,很多标志物,如慢性反应蛋白 (chronic reactive protein CRP)、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、粘附分子和 E 选择素,以及与凝血系统有关的急性相反应剂纤维蛋白原等的含量在血浆中增加。近年来的研究揭示,这些非特异性的循环急性相标志物,不仅是心血管病进一步发展的预示器而且对炎症的发展起着致病作用。并由此出现了直接靶向 A<sub>s</sub> 标志物的抗炎治疗,缓解和稳定心血管病的发展。IL-18 在炎症级联中起关键作用,它是先天性和获得性免疫的重要调节剂。它诱导 NF $\kappa$ B 和 T 细胞产生,在人 A<sub>s</sub> 病变部位已检测到 IL-18 其是稳定型和不稳定型心绞痛患者死于心血管病的独立预示器。抑制 IL-18 能减轻炎症和损伤的发展。纤溶酶原激活物抑制剂 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 在非特异性循环急性相标志物中是关键性的、直接致病的介导剂。组织型纤溶酶原激活物 (tissue plasminogen activator, tPA) 是血浆中的一个重要的溶解纤维蛋白的成分。血小板和内皮细胞衍生的蛋白 PAI-1, 是缓解 tPA 活性的主要

抑制剂。在功能上 PAI-1 通过在凝血块的表面与 tPA 和纤维蛋白形成三元复合物,促进新形成的血栓扩大和稳定,由此阻止 tPA 的纤维蛋白溶解活性和稳定血栓,防止其在成熟前溶解,在严重 A<sub>s</sub> 斑块中,高浓度的 PAI-1, 其可能与炎症细胞的迁移、平滑肌细胞激活、血管重建和斑块断裂和破裂后急性血栓形成相关。在临床上 PAI-1 含量和活性增加与血栓形成、不稳定型心绞痛和未来心肌梗死和移植后的冠状动脉病、胰岛素抵抗、高胰岛素血症、血脂障碍和肥胖相关。MMP-9 是由巨噬细胞和其它炎症细胞分泌。很多疾病过程,如全身性炎症、肿瘤转移、呼吸系统疾病、心肌损伤、血管动脉瘤和血管重建都可以检测到。在不稳定型心绞痛患者 MMP-9 含量升高。MMP-9 基础含量与心血管病未来死亡危险性之间强相关。其与 IL-18 是独立的, MMP-9 和 IL-18 同时升高有很高的危险性。最近研究发现 A<sub>s</sub> 损伤区 MMP-9 表达增强,以及它通过降解细胞外基质减弱血管壁 MMP 的转录、酶加工,以及组织 MMP 抑制剂调控上述反应。动物实验和临床研究显示 MMP-9 的表达和激活与 MMP 抑制剂抑制作用之间的平衡对于发生血管狭窄和动脉瘤是关键性的。MMP 基因启动子的多态性,说明个体之间对冠心病敏感性的差异。发展特异性靶向 MMP-9 的药物可能对防止 A<sub>s</sub> 损伤区的发展、斑块破裂和再狭窄是有用的。C 反应蛋白 (C-reactive protein CRP) 是由 206 个氨基酸组成的多肽。它是由内皮细胞、巨噬细胞和脂肪细胞衍生的促炎症细胞因子诱导肝脏产生的。在 A<sub>s</sub> 斑块中,激活的免疫细胞产生的促炎症细胞因子 (NF $\kappa$ B、IL-1 和 TNF $\alpha$ ) 诱导 IL-6 生成,由此刺激肝脏产生 CRP。血液 IL-6 的存在是 CRP 产生的关键。在历史上 CRP 被认为是一个参与免疫细胞趋化性、巨噬细胞吞噬作用、补体激活、血小板激活以及参与免疫复合物、坏死细胞和细菌碎片清除的下游炎症标志物。除了作为对急性炎症的全身性肝脏反应的一个成分外,CRP 可能通过组织巨噬细胞和血管平滑肌细胞在 A<sub>s</sub> 斑块局部产生。CRP 作为急性相反应剂和炎症标志物预示早期和晚期急性冠状动脉综合征患者的死亡率,是一个未来心血管事件的预示器。它与不能确诊的外周动脉、冠状动脉和脑动脉病相关;能鉴别不稳定型和稳定型心绞痛患者,预示心血管患者心肌梗死、中风和突然死亡、心肌梗死大小以及预示心脏移植患者移植失败。它还能预示颈动脉狭窄的存在、程度和症状学;冠状动脉旁路移植后早期发病率和晚期死亡率;以及经皮心脏干预后的晚期再狭窄。已有很多事实说明,CRP 不仅是一个生物标志物还是 A<sub>s</sub> 发生发展活性介导剂。它上调内皮细胞通透性,促进内皮细胞粘附分子表达,在内膜下斑块中不均衡地分布,固定补体,募集单核细胞和巨噬细胞到血管内炎症中心,以及刺激局部血小板激活和血栓形成。CRP 也参与泡沫细胞形成,它具有高的亲和性与 ox-LDL 结合,由此形成 CRP-LDL 聚合物,在体外被巨噬细胞主动吸收。总之,这些发现说明 CRP 能通过放大和加重局部炎症过程,在斑块水平上直接介导血管组织损伤。因此,已有文献报道靶向 CRP 以预防和治疗 A<sub>s</sub>。

### 3 核因子 $\kappa$ B 是活性氧诱导动脉粥样炎症反应的介导剂<sup>[7, 19-23]</sup>

活性氧通过激活核因子  $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 诱导促炎症细胞因子基因表达, 促炎症细胞因子 TNF 和 IL-1 通过活性氧激活 NF- $\kappa$ B 诱导包括 TNF 和 IL-1 自己在内的促炎症细胞因子基因表达。活性氧和促炎症细胞因子 TNF 和 IL-1 间通过 NF- $\kappa$ B 形成恶性循环, 不断地促使促炎症细胞因子、炎症细胞因子和炎症蛋白基因表达, 引起炎症反应。炎症反应时在一系列促炎症细胞因子以及趋化性细胞因子和粘附分子等的的作用下, 炎性细胞受到激活, 炎性细胞向损伤部位迁移, 白细胞募集于炎症部位及其与血管内皮细胞粘附等, 并以恶性循环的形式使炎症反应不断放大和持续存在, 成为慢性炎症。因此慢性炎症反应的关键是 NF- $\kappa$ B。现在知道, 很多刺激剂诱导 NF- $\kappa$ B 激活, 除氧化应激剂外包括促炎症细胞因子 TNF 和 IL-1 在内的其它 NF- $\kappa$ B 激活剂, 它们对 NF- $\kappa$ B 的激活作用都与活性氧有关。NF- $\kappa$ B 调控的基因除促炎症细胞因子基因外, 还包括炎症细胞因子如趋化性细胞因子、粘附分子以及炎症酶如环加氧酶 2 和脂加氧酶 5 等基因。所谓的炎症酶又称炎症蛋白是其催化产物参与 NF- $\kappa$ B 的调控作用和参与炎症反应。NF- $\kappa$ B 对基因的调控是因为这些基因的启动子区含有 NF- $\kappa$ B 的结合位点, NF- $\kappa$ B 通过与靶基因上游 (5') 启动子区专门的识别元件结合, 调控靶基因转录。NF- $\kappa$ B 调控与炎症反应有关的很多基因表达。

#### 3.1 动脉粥样硬化中核因子 $\kappa$ B 的激活

在人 As 斑块中已检测到激活的 NF- $\kappa$ B。在 As 损伤部位的内膜和中膜, 在平滑肌细胞、巨噬细胞、内皮细胞以及较少程度的 T 细胞中存在 NF- $\kappa$ B 亚单位 RelA (p65), 正常血管壁原位分析 p50 和 RelA 显示胞质内弥漫性表达但核内无聚积, 说明这个系统是处于静止状态。在 As 急性合并症如急性冠状动脉综合征时, NF- $\kappa$ B 结合活性, 可见于不稳定型心绞痛患者外周血单核细胞和心肌活组织检查, 而且也存在于稳定型心绞痛患者。除了人 As 的报道外, 主要的信息来自实验性 As 模型。在饲以高胆固醇血症饮食的猪冠状动脉和大鼠气球损伤后的动脉平滑肌细胞中检测到激活的 NF- $\kappa$ B。

#### 3.2 核因子 $\kappa$ B 调控动脉粥样斑块的主要特征

与 As 发病有关的很多刺激剂通过生成活性氧激活 NF- $\kappa$ B 信号传导通路, 诱导很多下游事件。实质上, 参与斑块生成和进展的所有细胞如内皮细胞和平滑肌细胞, 巨噬细胞与免疫细胞, 都可以激活 NF- $\kappa$ B 通路。

激活内皮细胞和募集单个核细胞: 血管内皮细胞激活是 As 显著的特征, 传统认为这是导致 As 的初始一步。内皮细胞表达编码 p50/p105, p65 和 c-rel 转录本, TNF $\alpha$  增加其水平。对脂多糖、IL-1 和 TNF $\alpha$  反应的内皮细胞表达的大多数基因在它们的启动子区含有 NF- $\kappa$ B 结合位点。对 E-selectin 基因 5' 侧翼区序列分析显示至少有三个 NF- $\kappa$ B 的 DNA 结合序列。另外 NF- $\kappa$ B 调控的基因包括 VCAM-1, E-selectin, IL-1, IL-6, TF (tissue factor)、PAI-1, COX2 和 NOS。例如腺病毒介导  $\kappa$ B $\alpha$  过表达和显性负性型 IKK-2 抑制

TNF $\alpha$  诱导 E-selectin, VCAM-1 和 ICAM-1 表达。对 IL-6, MCP-1 和 Gro $\alpha$  以及 TF 的诱导作用也被抑制。这与单核细胞减轻抑制、伸张、迁移有关。这些炎症介导剂中的一些, 如 IL-1 和 TNF $\alpha$  本身也能激活 NF- $\kappa$ B, 由此建立维持 NF- $\kappa$ B 激活的一个自我调控环, 放大炎症反应。

引发 As 的免疫反应: 在 As 免疫反应的可能抗原包括 ox-LDL 和 HSP。从人动脉粥样硬化斑块中得到的 T 细胞克隆识别 ox-LDL (一个典型的 HLA DR 依赖的抗原)。apoE<sup>-/-</sup> 小鼠在主动脉损伤部位显示修饰的 LDL 和血清抗修饰 LDL 的抗体浓度增加。呈递抗原和激活抗原特异性 T 细胞的关键是 DC, 它们不断地从组织到二级淋巴器官循环, 在此, 它们激活 T 细胞对识别的抗原引发适应性免疫。DC 已在人 As 发生部位发现。参与调控这一过程的主要信号之一, 可能是在 DC 和 T 细胞间 CD40-CD40 配体相互作用。T 细胞表达的 CD40 配体激活 DC 和增强 DC T 细胞刺激能力, 其机制是通过诱导细胞因子产生和上调抗原呈递和共刺激分子。在这过程中需要 IKK2 但不需要 NIK。不同的是, 脂多糖激活 DC 不需要 IKK2 或 IKK。

动脉粥样硬化中单核细胞/巨噬细胞: 在 As 损伤部位的巨噬细胞来源于血液单核细胞和表达细胞因子、趋化因子和生长因子, 如 TNF $\alpha$ 、IL-6、IL-8 和 MCP-1。对 NF- $\kappa$ B 需要是复杂的, 随刺激剂和研究的物种而变化。例如人巨噬细胞  $\kappa$ B $\alpha$  过表达抑制 LPS 诱导 TNF $\alpha$ 、IL-1、IL-6 和 IL-8 生成, 但对抗炎症细胞因子 IL-10 和 IL-11 则无诱导作用。并非所有刺激剂都用 NF- $\kappa$ B 上调促炎症促细胞因子, 在对酵母多糖刺激的反应中则不受影响。最近研究显示, 显性负性 IKK-2 能减弱脂多糖诱导 VEGF 表达, 但并不抑制 LPS 诱导细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-8 的生成; 由 CD40 配体激活的巨噬细胞释放细胞因子和 VEGF 则需要 IKK-2。与人单核/巨噬细胞不同, 缺失 p50 的小鼠巨噬细胞减弱 LPS 诱导对修饰 LDL 的内吞作用, 延长 TNF- $\alpha$  分泌, 增加 IL-10 和 IFN $\alpha$  生成, 以及减弱 MCP-1、IL-1 和 IL-12 生成, 表现有抗炎症和减轻 As 损伤作用。此外, 还有实验显示, 缺失 IKK-2 小鼠的巨噬细胞能减弱 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-10 的生成, 使 As 坏死更为明显, 推测在体内 NF- $\kappa$ B 参与炎症的消退作用。从这些不同的实验结果说明, 为了寻找这一通路中的最佳治疗靶点, 还需要对人巨噬细胞作进一步的研究。

平滑肌细胞的存活和死亡: 平滑肌细胞从中膜迁移至内膜, 并在内膜增殖。平滑肌细胞增殖是 As 斑块形成的标志。此外以平滑肌细胞增生为特征的新内膜增生是经皮导管治疗后血管狭窄的主要特点。血管损伤是 NF- $\kappa$ B 激活和平滑肌细胞增生的主要刺激剂。NF- $\kappa$ B 通过诱导存活和保护功能基因, 对平滑肌细胞增生和存活是重要的。细胞存活是通过 Caspase 与凋亡抑制剂 (inhibitor of apoptosis IAP) 成员和 Bcl2 家族间平衡调控的。当 Caspase 被激活, 它们裂解不同的蛋白, 使其功能发生改变, 通过细胞凋亡杀死细胞。Caspase 功能是受 IAP 调节, 包括 NAIP, cIAP-1, cIAP-2, XIAP 和 Survivin。死亡受体如 Fas/CD95 或 TNF 受体 1 能触发 Caspase 激活。TNF 受体 1 的 DD 与 TRADD 相互作用和由

此与 FADD 相互作用,依次与 Procaspase-8 和 Procaspase-10 结合。被带至相互最近处,这些 Procaspases 裂解它的最近者,形成具有活性的成熟 Caspase 其能有效地裂解 Procaspase-3 和它的 Procaspase 使细胞凋亡开始进行。此外, TRAF-1/TRAF-2 异型复合物能与 c-IAP-1 和 c-IAP-2 相互作用。对 TNF $\alpha$  反应的信号传导由此通过 FADD 和 Caspase 触发非固有的凋亡通路或通过 TRAFs/IAPs 触发细胞存活。在 IAP 和 NF- $\kappa$ B 通路间存在密切的相互作用。TRAF 是在 NF- $\kappa$ B 激活的上游。TNF $\alpha$  激活纤维肉瘤细胞系表达的一型不能被 IKK 磷酸化的 IKB $\alpha$  抑制 Caspase-8 激活。一些研究也证实内皮细胞过表达 IKB $\alpha$  通过抑制 IAP 引起 TNF $\alpha$  诱导细胞死亡。在平滑肌细胞诱导 cIAP-2 也已经发现是 NF- $\kappa$ B 依赖的。最后,平滑肌细胞在斑块内细胞外基质的产生和降解中起关键作用。NF- $\kappa$ B 介导 MMP 转录。

NF- $\kappa$ B 激活调控斑块血栓形成:与斑块破裂和侵蚀有关的血栓形成,大都是 As 急性合并症的基础,例如不稳定型心绞痛和急性心肌梗死。几个分子参与了这病理生理过程,TF 是体内凝血级联的引发剂, MMP 降解胶原纤维,导致纤维帽完整性丧失,以及促炎症细胞因子促使炎症细胞浸润和激活,诱导 TF 和 MMP。这些介导剂的表达是转录因子如 NF- $\kappa$ B 控制的。TF 是细胞因子受体超家族的成员,作为因子 I $\alpha$  形成复合物必需的辅因子,其裂解因子  $\text{C}^{\text{a}}$  和  $\text{C}^{\text{b}}$  由此激活血液凝固级联。一些研究已证实不稳定型心绞痛患者动脉内膜切除标本 TF 含量远较慢性稳定型心绞痛患者高。在人 As TF 主要由巨噬细胞、平滑肌细胞和内皮细胞表达,这些细胞覆盖着斑块和在细胞外基质中。在人 TF 启动子含有非共同 NF- $\kappa$ B 结合位点,与共同 NF- $\kappa$ B 结合位点有一个硷基差异。Chloramethyketone 类蛋白酶抑制剂抑制人单核细胞 TF 转录,可能是由于抑制 IKB 降解。NF- $\kappa$ B 通路较特异性抑制剂 PDTC 对 LPS, PMA, TNF $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  诱导内皮细胞 TF 合成有同样的抑制效应。IKB $\alpha$  过表达或显性负性型 IKK2 抑制内皮细胞 TF 表达。在单核细胞/巨噬细胞,细胞内调控 TF 的信号传导通路迄今尚未确定,但可能是 NF- $\kappa$ B 通路。导致纤维帽完整性丧失的关键是,降解基质的酶过表达和由此蛋白质如胶原减少。在人斑块中的巨噬细胞组成性表达 MMP-1, MMP-3 和 MMP-9。如前面所述, MMP 的释放是受 NF- $\kappa$ B 调控,但这可能决定于细胞类型和刺激剂。在成纤维细胞已知 IKB $\alpha$  过表达抑制 MMP-1, MMP-3 和 MMP-13 但并不是抑制剂 TMP-1。在人和兔的平滑肌细胞 IL-1 激活 NF- $\kappa$ B 上调 MMP-1, MMP-3 和 MMP-9 表达。然而人巨噬细胞自发性分泌似乎不涉及 NF- $\kappa$ B,但在对 CD40 配体的反应中 MMP-1 分泌被 IKB $\alpha$  抑制。与 As 有关的另一刺激剂 ox-LDL 已发现能增加巨噬细胞 MMP-9 与 NF- $\kappa$ B 和 AP-1 与核结合增加相关。

#### [参考文献]

- [1] 陈 瑗,周 玫. 自由基-炎症与衰老性疾病 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 252-287.
- [2] Ross R. Atherosclerosis: an inflammation disease [J]. *Nat Engl J Med*, 1999; **340** (2): 115-126
- [3] Shishebor MH, Hazen SL. Inflammatory and oxidative markers in atherosclerosis: relationship to outcome [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2004; **6** (3): 243-250
- [4] Stocker R, Keaney JF JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis [J]. *Physiol Rev*, 2003; **84**: 1381-478
- [5] Altmann R. Risk factor in coronary atherosclerosis: inflammation: the meeting point [J]. *Thromb J*, 2003; **1** (4): 1-11
- [6] Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004; **24**: 816-823
- [7] Yokoyama M. Oxidant stress and atherosclerosis [J]. *Current Opin Pharmacol*, 2004; **4**: 110-119
- [8] Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms [J]. *Hypertension*, 2003; **42**: 1075-081
- [9] Heerebeek LV, Meischi C, Stoker W, et al. NADPH oxidase(s): New source(s) of reactive oxygen species in the vascular system [J]? *J Clin Pathol*, 2002; **55**: 561-568
- [10] Nambi V. The use of myeloperoxidase as a risk marker for atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2005; **7** (2): 127-131
- [11] Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contribution to atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004; **24**: 23-28
- [12] Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis and coronary artery disease [J]. *Nat Engl J Med*, 2005; **352**: 1685-695
- [13] Mullenix PS, Andersen CA, Stames BW. Atherosclerosis as inflammation [J]. *Ann Vasc Surg*, 2005; **19**: 130-138
- [14] Plutzky J. Inflammation in atherosclerosis and Diabetes Mellitus [J]. *Endocrine Metabolic Disorders*, 2004; **5**: 255-259
- [15] Watanabe N, Ikeda U. Matrix metalloproteinases and atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2004; **6** (2): 112-120
- [16] Labarrere CA, Zaloga GP. C-reactive protein: from innocent bystander to pivotal mediator of atherosclerosis [J]. *Am J Med*, 2004; **117** (7): 499-507
- [17] Libby P, Ridker PM. Inflammation and atherosclerosis: role of C-reactive protein in risk assessment [J]. *Am J Med*, 2004; **116**(suppl 6A): 9S-16S
- [18] Shishebor MH, Bhatt DL. Inflammation and atherosclerosis [J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2004; **6** (2): 131-139
- [19] 陈 瑗,周 玫. 自由基-炎症与衰老性疾病 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 18-46
- [20] 陈 瑗,周 玫. 自由基-炎症与衰老性疾病 [M]. 北京: 科学出版社, 2007: 74-98
- [21] Lavrovsky Y, Chatterjee B, Clark RA, et al. Role of redox-regulated transcription factors in inflammation, aging and age-related diseases [J]. *Experimental Gerontology*, 2000; **35**: 521-532
- [22] Apoli C, Nigam S, Palinski W. Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall [J]. *J Cell Biochem*, 2001; **82**: 674-682
- [23] Monaco C, Paleolog E. Nuclear factor  $\kappa$ B: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis [J]. *Cardio Res*, 2004; **61**: 671-682

(此文编辑 李小玲)