

DAMP-PRR-巨噬细胞途径与动脉粥样硬化斑块的易损性

何小丽¹, 顾 宁²

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏省南京市 210023; 2. 南京中医药大学第三附属医院心血管内科, 江苏省南京市 210001)

[关键词] 易损斑块; 损伤相关分子模式; 模式识别受体; 巨噬细胞

[摘要] 动脉粥样硬化(As)是一种慢性炎症性疾病,并与自身免疫相关。易损斑块是大多数急性心血管事件的元凶。巨噬细胞对 As 斑块的易损性起关键作用。本文重点论述巨噬细胞通过“DAMP-PRR”途径如何影响 As 斑块的易损性,探讨新的抗 As 治疗策略。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The Vulnerability of Atherosclerosis Plaque and DAMP-PRR-Macrophage Way

HE Xiao-Li¹, and GU Ning²

(1. The First Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China; 2. Department of Cardiovascular, The Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210001, China)

[KEY WORDS] Vulnerable Plaque; Damage Associated Molecular Pattern; Pattern Recognition Receptor; Macrophage

[ABSTRACT] Atherosclerosis (As) is a chronic inflammatory disease, and has relationship with self-immunity. Vulnerable plaque is crime culprit of most of acute cardiovascular events. Macrophage plays an essential role on plaque vulnerability of As. This paper focuses on how macrophage influences plaque vulnerability of As through “DAMP-PRR” pathway, and discusses new anti-As treatment therapy.

1 动脉粥样硬化、炎症免疫与 As 斑块的易损性

对动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发病机制的研究已有一个多世纪,主要围绕四种学说:脂肪浸润学说、血小板聚集和血栓形成学说、平滑肌细胞克隆学说、损伤反应学说;近年来又历经了三大重要转变:从重视“管腔狭窄”到强调“易损斑块”、从“脂质沉积”学说为主导到“炎症反应”学说的公认、从“易损斑块”到“易损患者”的新概念^[1]。

1999 年 Ross 等在其损伤反应学说的基础上,明确提出“As 是一种炎症性疾病”。同时还发现 As 的发生与病原感染及内源性配体引发的免疫反应相关,又提出“As 是一种自身免疫性疾病”。近 20 年来围绕“炎症”和“自身免疫”对 As 进行了大量的研究,Galkina 等^[2]将 As 的免疫和炎症机制总结为:

①As 是侵袭大、中动脉的复杂的慢性炎症性疾病,表现为动脉粥样斑块以及血管细胞表型变化;②As 的早期阶段是低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)在动脉壁的滞留;③单核细胞募集至大动脉并形成泡沫细胞是 As 的重要标志,免疫细胞向大动脉募集受到黏附分子和趋化因子的调控;④一些可能的自身抗原参与了 As,包括热休克蛋白 60(heat shock protein 60, HSP60)和氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL);⑤促 As 的免疫反应主要以 Th-1 细胞为基础;⑥单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、T 细胞族、NK 细胞、NKT 细胞、中性粒细胞、血小板和肥大细胞均有促 As 作用;⑦Tregs 和 B 细胞(通过产生天然抗体)抑制 As 过程中的炎症反应;⑧慢性炎症产生的炎症介质,如被修饰的 LDL、活性氧(reactive oxygen species, ROS)以及晚期糖基化终末产物(advanced glycation

[收稿日期] 2013-09-12

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81173399);江苏省研究生科研创新基金资助项目(CXZZ11-0759)

[作者简介] 何小丽,博士研究生,主要从事中医及中西医结合心血管病研究。通讯作者顾宁,博士,主任医师,教授,主要从事中医及中西医结合心血管病研究,E-mail 为 guning@medmail.com.cn。

end product, AGE), 均加剧了血管炎症和 As; ⑨一些自身免疫性疾病, 如系统性红斑狼疮和糖尿病均能加剧 As, 可能是由凋亡细胞清除障碍所致。

易损斑块 (vulnerable plaque, VP) 对心血管事件负中心性责任, 因而受到重视被深入研究。现已明确易损斑块的组织学亚型有三种: ①薄帽纤维粥样斑块; ②富含糖蛋白基质或炎症导致内皮受侵蚀和血栓形成; ③钙化结节斑块。研究显示急性心血管事件中的血栓 65% ~ 70% 是由①引起, 25% ~ 30% 来源于②, 2% ~ 5% 由③导致^[3]。薄帽纤维粥样斑块的组织学特征是: 具有细胞外脂质的大核、高浓度的富含脂质的巨噬细胞、数目减少的平滑肌细胞以及薄纤维帽。“薄”是指在受损的血管内皮细胞下, 细胞外基质 (主要是胶原纤维、弹力纤维及蛋白聚糖) 因被降解而变薄, 最新的易损斑块的概念与薄帽纤维粥样瘤 (thin-cap fibroatheroma, TCFA) 的定义相提并论, 提出纤维帽厚度 $< 65 \mu\text{m}$ 的标准^[4]。斑块经历的炎症免疫反应由量变到质变, 或在应激时, 由最薄处破裂, 血栓形成, 部分或全部堵塞血管, 故 VP 的破裂是急性冠状动脉综合征 (acute cardiac syndrome, ACS) 的扳机点, 也是整个 As 慢性隐匿性炎症过程中的并发症之一。VP 的破裂与否取决于斑块的不稳定性, 即“易损性”。从临床意义上讲, “易损斑块”概念提出的目的是为了尽早着眼于预防斑块的破裂。但在实际应用中, 当从诊断学上可确认 TCFA 已经形成时, 才着手于防治, 无疑是“临阵磨枪”, 不能获得满意疗效。为提高临床疗效, 必须对斑块“易损性”有所再认识。斑块的易损性由多种因素构成, 从内因、外因的角度分析: 内因指构成 VP 本身的细胞及相关细胞因子等, 外因则包括斑块所处的位置、血流动力学变化、机体的应激状态等。“构成易损斑块本身的细胞”是斑块“易损性”的始作俑者, 从治疗学角度可命名为“易损斑块靶细胞”, 该类细胞主要成员为: 血管内皮细胞 (vascular endothelial cell, VEC)、血管平滑肌细胞 (vascular smooth muscle cell, VSMC) 和巨噬细胞 (macrophage, MΦ)。回顾 As 的形成过程及 VP 被触发破裂的病理状态, 不难发现, 正是这些细胞的形态功能变化才导致斑块向不稳定化方向发展: VEC 功能障碍是致 As 级联病变程序的触发点, 随后在内皮损伤部位脂质、单核细胞侵入和结构改造, VSMC 向内膜移行、增殖、吞噬大量脂质, 单核巨噬细胞向内膜侵入并活化, 血小板黏附、聚集和激活等共同形成了 As 的细胞学病理生理基础; 在此过程中, VEC、VSMC 和 MΦ 释放的细胞因子是形成细

胞间复杂炎症免疫反应网络的节点; VP 被触发破裂可以看作是“决堤式”或“瀑布样”细胞崩溃和细胞因子释放。

并非所有的 As 损伤都会发展成为易损斑块, 有些斑块发生纤维化, 有些发生钙化, 有些会成为稳定的斑块; 不同个体的斑块有不同的发展方向; 同一个体动脉系统的不同部位斑块也有不同的发展方向。不同的结局意味着不同的内部机制, 这提示单个的斑块可以看做是小型的系统, 有自身发展的方向性。炎症和免疫反应是斑块系统发生发展的中心环节, 其发展存在着多个方向, 特定的方向有特定的细胞和因子的相互作用, 犹如力和矢量, 有方向及数量, 其合力或矢量之和才是真正方向, 同理, 斑块内部向“易损”方向发展的因子和细胞的效力超过了向“稳定”方向发展的因子和细胞时, 就可以认为该斑块具有“易损性”。维持自身稳态是有机系统的共性, 斑块也不例外, 斑块系统维持自身的稳态即在不稳定和稳定之间寻求平衡点, 当炎症和免疫反应处于消减状态时, 斑块表现为稳定化, 而炎症和免疫反应处于持续激活状态时, 斑块即可走向不稳定, 故而让炎症和免疫反应消减是稳定斑块的有效途径。

由薄帽纤维粥样斑块的组织学特征可知, 巨噬细胞在此类易损斑块的形成中起重要作用。As 病灶内的巨噬细胞来源于循环中的单核细胞, 主要通过内质网应激、吞噬和转运脂蛋白失调 (泡沫化)、介导免疫炎症反应三个环节参与 As 的发生发展, 在 As 的各个发展阶段: 从脂肪纹的形成到斑块破裂发生 ACS, 巨噬细胞都起着关键作用。Finn 等^[5]提出对冠状动脉硬化药物治疗的四个关键性因素, 即巨噬细胞源性泡沫细胞、新生血管生成、坏死核的大小以及纤维帽的厚度。巨噬细胞被认为最有可能成为新的抗 As 治疗策略中的靶细胞, 在治疗因素中处于核心地位。抑制巨噬细胞泡沫化及免疫炎症反应持续激活可减轻斑块的易损性。

2 损伤相关分子模式、模式识别受体与巨噬细胞

作为免疫细胞, 巨噬细胞是固有免疫系统的主要效应细胞之一, As 斑块中巨噬细胞泡沫化、免疫炎症反应激活与该角色紧密相关。

在固有免疫系统中机体能识别的“非我”或“受损的自我”主要有两大类: 损伤相关分子模式 (damage associated molecular pattern, DAMP) 和凋亡细胞

相关分子模式 (apoptotic cell-associated molecular pattern, ACAMP), 即由凋亡细胞释放的相关分子。DAMP 包括病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP)、应激受损细胞和 (或) 死亡细胞释放的 alarmin 以及酶分解的基质成分。PAMP 指病原微生物表面存在的一些人体宿主所没有的但可为许多微生物所共享、结构恒定进化保守的分子结构, PAMP 不仅仅在病原表面表达, 也存在于溶液中, 例如细菌内毒素、变性的蛋白、细菌和变性的真核 DNA、甘露聚糖、磷壁酸以及多种其他成分。ox-LDL 及最低程度氧化型低密度脂蛋白 (minimally oxidized low density lipoprotein, mmLDL) 是致 As 的重要脂蛋白, 属于变性蛋白, 有关 mmLDL、ox-LDL 病理作用的研究显示其脂质过氧化衍生结构与 DAMP 类似^[6,7], 巨噬细胞以转变为泡沫细胞为代价, 将这些 DAMP 以不同的结合受体和吞噬机制从组织中去除^[6]。人体通过一系列受体识别 PAMP 监察病原, 但病原不是导致组织和细胞损伤的唯一因素。组织损伤在分子水平的识别, 是通过监察由死亡细胞释放的细胞内蛋白而实现的。“alarmin”即指组织细胞损伤相关信号分子^[8]。alarmin 可能是许多慢性非感染性炎症性疾病包括自身免疫性疾病、肿瘤、As 等内源性致病因素。目前被公认的 alarmin 有高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1)、S100 蛋白、肝细胞瘤衍化生长因子 (hepatoma-derived growth factor, HDGF)、热休克蛋白 (heat shock protein, HSP)、白细胞介素 1 α (interleukin-1 α , IL-1 α)、尿酸 (uric acid, UA)、cathelicidin、防卫素、脂联蛋白、半乳凝素、胸腺肽、核仁素、嗜曙红细胞衍生神经毒素 (eosinophil-derived neurotoxin, EDN) 等。其中 HSP60 参与 As 炎症免疫反应已被实验和临床研究证实。

DAMP 被细胞膜表面或细胞内的模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 识别, 从而引发级联的免疫反应。PRR 被分为三类^[9]: ①细胞吞噬受体, 在细胞表面表达, 介导细胞对微生物或微生物成分的识别和吞噬, 包括糖磷脂酰肌醇锚定的脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 受体 CD14、清道夫受体 (scavenger receptor, SR) 以及 C 型凝集素受体 (C-type lectin receptor, CLR) 家族; ②信号受体, 包括 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR)、NOD 样受体 (NOD-like receptor, NLR)、RIG-I 样受体 (RIG-I-like receptor, RLR) 以及维甲酸诱导基因 I (retinoic acid inducible gene I, RIG) 解旋酶, 微生物的组成如蛋白、多糖、脂蛋白和核酸通过该类信号受体的识别

而诱导相应反应, 可在细胞膜或细胞内表达; ③可溶性桥接分子, 可易化吞噬细胞识别抗体以及释放配体, 包括 collectin、ficolin 和 pentraxin。

2.1 巨噬细胞吞噬和转运脂蛋白失调

LDL 在 As 发生发展中的作用非常重要, 在正常情况下, LDL 由 LDL 受体 (LDL receptor, LDLR) 识别, 并被结合、内吞入细胞, 与溶酶体结合, 在溶酶体酶的作用下, 蛋白质降解为氨基酸, 胆固醇水解为游离胆固醇和脂肪酸。LDLR 受到细胞内胆固醇含量的负调节, 即当细胞内胆固醇含量增多时, LDLR 的量便会减少。故 LDL 经该途径代谢, 不会引起胆固醇酯在细胞内堆积。然而, 在高脂血症、脂质代谢失常时, 血浆中增多的脂质以 LDL 的形式经血管内膜侵入内皮下, 这一过程呈现 LDL 浓度依赖性, 位于内皮下的 LDL 可以被氧化修饰, 形成 ox-LDL, ox-LDL 丧失了与 LDLR 结合的能力, 通过 SR 途径代谢, 该途径不受细胞内胆固醇含量的负调节, 即 SR 不因胆固醇含量的增加而下调, 巨噬细胞通过 SR 摄取 ox-LDL, 是形成泡沫细胞的关键, 泡沫细胞聚集形成大块的脂肪最终导致粥样斑块损伤恶化。故巨噬细胞转变为泡沫细胞是 As 进程中的重要标志, 是吞噬和转运脂蛋白失调 (吞噬 > 转运) 的表现, 是内质网应激、免疫炎症激活的初始因素, 可促进 As 及增加斑块易损性。

As 斑块中的巨噬细胞源性泡沫细胞呈现非 I 型巨噬细胞 (M1/classically activated macrophage, CAM) 或 II 型巨噬细胞 (M2/alternatively activated of macrophage, AAM) 的独特中间表型^[10]。巨噬细胞吞噬 ox-LDL 的介质主要有清道夫受体 A (SR class A, SRA)、CD36 和凝集素样氧化型低密度脂蛋白受体 1 (lectin-like oxidized low density lipoprotein-1, LOX-1)。SRA 和 CD36 在介导摄取 ox-LDL 促进 As 过程中起重要作用; LOX-1 是内皮细胞、巨噬细胞及平滑肌细胞等血管壁细胞上主要的 ox-LDL 受体之一, 多种致 As 因子都可以上调 LOX-1 的表达, 从而促进血管内皮细胞及单核巨噬细胞吞噬大量的 ox-LDL, 加速泡沫细胞的形成, LOX-1 与 ox-LDL 结合后还可活化细胞内信号传导, 包括丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 和核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B), 增加促炎症因子的表达。

当巨噬细胞内胆固醇水平增加时, 可通过抑制甾醇调节因子结合蛋白 (sterol response element binding protein, SREBP) 通路, 抑制内源性胆固醇合成, 下调 LDLR 表达; 以及 SR-B I 在高密度脂蛋白

(high density lipoprotein, HDL)介导下将胆固醇酯输出细胞,再转运至肝脏,以维持细胞内脂蛋白的平衡。故 SR-B I 可能有抗 As 作用。然而在由 SR 介导的胆固醇过度摄取情况下,这些转运通路不足以维持细胞内胆固醇稳态。肝 X 受体(liver X receptor, LXR)是胆固醇代谢产物和氧化甾醇的核受体。据不同的基因分为 LXR α 和 LXR β 两亚型,前者分布于肝脏、肾脏、脂肪、肾上腺组织和巨噬细胞,后者在全身广泛低表达。LXR 是一种“胆固醇感受器”,可以降低胆固醇水平,与 SREBP 工作方不同,其作用途径为:增加与逆转运胆固醇相关靶基因的表达、将胆固醇转变为胆汁酸以及促进肠道胆固醇吸收。相关靶基因包括 ATP 结合盒转运体(ATP-binding cassette, ABC) A1/G1/G5/G8 家族、磷脂转运蛋白、载脂蛋白 E/C I/C II/C IV 以及胆固醇 7 α -羟化酶。LXR 可通过上调 ABC 家族转运体促进胆固醇外流,加强胆固醇逆转运,以对抗巨噬细胞转变为泡沫细胞。目前 LXR 激动剂经实验和临床证实有上调巨噬细胞膜蛋白 ABCA1 和 ABCG1,增加胆固醇外流,抑制 As 的作用^[11],此过程分别依赖于载脂蛋白 A I 和 HDL。LXR 影响巨噬细胞的生物活性,不但是通过调节脂质代谢,还通过固有免疫效应。LXR 抗炎反应主要机制是调节 TLR2/TLR4/MyD88 通路、降低 NF- κ B 靶基因基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)的表达及促进凋亡细胞的清除等^[12]。脂质负荷下 LXR 通路通过诱导和抑制靶基因来调节脂质代谢和炎症反应。鉴于胆固醇的调节和炎症反应在心血管疾病中的重要性,故 LXR 通路的激活能通过多种机制减弱 As 进展。

综上所述,抑制巨噬细胞 SRA、CD36 和 LOX-1,上调 SR-B I 和 LXR α ,可增加胆固醇转运,从而阻抑泡沫细胞形成,起到抗 As 及增加斑块稳定性作用。

2.2 巨噬细胞免疫炎症反应持续激活

近年来,固有免疫系统中 PRR 之一的 TLR4,在 As 发病中的作用已有了较多证据。固有免疫和 TLR4 信号级联通路不仅参与 As 的发病,而且对斑块的易损性也起重要作用。As 斑块中多种细胞均表达 TLR4 以及能激活 TLR4 的致 As 配体。TLR4 在人类和鼠类的单核细胞上均有表达,在 As 中表达增加。一项对斑块破裂所致急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)患者、稳定型心绞痛(stable angina pectoris, SAP)患者和年龄匹配的对照组 TLR4 表达水平的研究中,循环中 TLR4、单核细胞上 TLR4 mRNA 和蛋白的表达在 AMI 患者和 SAP 患者中均较对照组

升高^[13]。AMI 患者斑块破裂局部的 TLR4 表达较循环中单核细胞高^[14]。经皮血管内斑块旋切术中的犯罪血管样本显示浸润的巨噬细胞表达主要的 TLR4。循环中单核细胞表达的 TLR4 与易损斑块、斑块破裂相关。TLR4 在单核细胞分化成巨噬细胞后表达持续升高。TLR4 可辅助巨噬细胞的分化和激活。激活 TLR4 可诱导 NF- κ B 和致炎症因子的激活,促进炎症反应并导致 As 斑块的不稳定。As 斑块中巨噬细胞 TLR4 激活后产生基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP),降解细胞外基质;还可导致血管平滑肌细胞凋亡,继而细胞外基质生成减少,导致纤维帽变薄,增加斑块易损性。故 TLR4 能成为预防易损斑块发生的治疗性靶点^[15]。

在 As 和斑块不稳定化进程中,TLR4 的内源性配体及相关细胞,候选配体激活 TLR4 在 As 和易损斑发生发展中的分子机制仍需要进一步阐释和确认。mmLDL 和 HSP60 是目前研究较为深入的候选配体,其作用于巨噬细胞 TLR4 的机制未完全明确,较公认的机制如下述。

2.2.1 mmLDL-TLR4-巨噬细胞

不同形式的 ox-LDL 在 As 的所有发展阶段都是关键的促炎症因子^[16]。ox-LDL 较天然 LDL(natural LDL, nLDL)更能增加体外培养的人单核细胞衍生巨噬细胞 TLR4 mRNA 的表达^[17]。然而,ox-LDL 是否与 TLR4 结合及相关信号通路尚未得到确认^[15]。最近的研究显示,CD36 介导了 ox-LDL 对 TLR4/TLR6 二聚体的激活,且该激活反应发生在细胞内而不是细胞表面^[18]。mmLDL 是 ox-LDL 的早期形式,能够诱导肌动蛋白聚合以及巨噬细胞迁移,均依赖 TLR4 途径的激活^[19]。mmLDL 诱导的巨噬细胞产生细胞因子,部分呈 TLR4 依赖性^[20]。作为 TLR4 内源性配体,mmLDL 及其活性成分胆固醇酯氢过氧化物,可诱导巨噬细胞典型的 TLR4 依赖的液相摄取作用。该通路为:mmLDL 诱导脾酪氨酸激酶(spleen tyrosine kinase, Syk)募集, Syk 的 N 端 SH2 区域与 TLR4 的 C 端区域结合,形成 TLR4-Syk 复合体,TLR4 磷酸化,激活 Vav1-Ras-Raf-MEK-ERK1/2 信号级联,接着桩蛋白 paxillin 磷酸化,激活 Rac、Cdc42 和 Rho,形成 N-WASP/Arp2 复合物^[21]。该系列信号事件导致肌动蛋白聚合,即细胞骨架蛋白的重组,是细胞膜波动的必需步骤,使巨噬细胞对小分子、葡聚糖,尤其是 nLDL 和 ox-LDL 的摄取增强,最终细胞内脂质聚集,加速了巨噬细胞的泡沫化及 As 进程。同时,该途径可抑制巨噬细胞对凋亡细胞的吞噬,导致凋亡细胞及其成分成为炎症和免疫反应的

介质,使 As 进程恶化。mmLDL 还可通过 TLR4 依赖途径促进巨噬细胞产生 ROS,介导相关促炎症因子的表达,具体途径为:mmLDL 结合 TLR4 激活 Syk,导致 PLC γ 1 磷酸化,接着诱导蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 激活 Rac 和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 2 (NADPH oxidase 2, Nox2),最终参与促炎症因子 IL-1 β 、IL-6 和活化 T 细胞表达和分泌的调节因子 (regulated on activation normal T cell expressed and secreted, RANTES) 的表达^[22]。

2.2.2 HSP60-TLR4-巨噬细胞 HSP60 在机体发生应激免疫反应过程中具有非常重要的作用。HSP60 是一种高度保守的分子蛋白,原核生物 HSP60 的同源性可以达到 97%,而原核生物与人 HSP60 的同源性也达到了 70%。因此,原核生物 HSP60 的 B 细胞或 T 细胞位点可能与人 HSP60 同源,引发机体对自身 HSP60 的攻击,最终导致组织损伤。细菌等携带的外源性 HSP60 不仅能诱导内皮细胞产生前炎症因子和黏附分子,也能以分子模拟形式刺激产生应答内源性 HSP60 的自身免疫。正常条件下,HSP60 以稳定状态存在于细胞质和线粒体基质中,应激时 HSP60 迅速从胞质中转移到线粒体基质以修复线粒体基质中的变性蛋白,保护细胞免受应激伤害作用,提高细胞的“应急耐受”能力^[23]。外源性 HSP60 可直接引起免疫反应。内源性 HSP60 既可以直接与固有免疫细胞作用,激活固有免疫;也可以通过与 PAMP 结合,促进抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 对病原体的抗原提呈,从而激活适应性免疫。在 90 年代早期,HSP60 和 HSP70 就被在人 As 损伤中所描述,并被认为是 TLR4 的内源性配体,可能通过 TLR4 对 As 起作用^[24]。越来越多的证据表明,HSP60 介导的免疫反应在 As 及易损斑块的发生发展中起重要作用。已知的 As 的大多数危险因子,如 ox-LDL、高血压、感染、氧化应激均能导致血管内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞 HSP60 表达的增加。As 患者抗 HSP60 自身抗体的水平显著升高,斑块内存在 HSP60 特异性 T 细胞。抗 HSP60 抗体能促发巨噬细胞产生促炎症因子,内皮细胞产生黏附因子^[2]。老龄载脂蛋白 E 基因敲除鼠在高脂喂养后其主动脉弓 As 斑块中的 HSP60 和 HSP70 表达水平较正常胆固醇鼠增加^[25],当斑块稳定时这种上调作用减弱。

Ohashi 等^[24]研究发现 HSP60 和 LPS 的固有免疫反应是通过相同的跨膜信号受体 TLR4 介导的,HSP60 可在细胞坏死后释放或应激时易位至细胞膜,

它通过 TLR4 介导能刺激巨噬细胞分泌肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),并合成一氧化氮 (nitric oxide, NO)。人 HSP60 能刺激单核细胞释放细胞因子,TLR4 抗体能阻断其作用。然而,将低剂量的 Gp96 (HSP 家族中的成员) 与 LPS 进行前孵化,尽管它们在各自浓度下都不能活化细胞,但同时作用时却能加强炎症反应,这说明 HSP 可能增强 TLR4 的病原体配体 LPS 的作用。内源性配体尽管是 TLR 的较弱激动剂,但可能放大病原体感染引起的信号转导。尽管 HSP60-TLR4-巨噬细胞间信号传导通路和分子作用机制尚未完全阐明,较公认的信号通路为:HSP60 通过 CD14、MD2 与 TLR4 结合,经过内吞作用进入细胞内,再通过髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 依赖性途径,最终激活 NF- κ B/MAPK 通路,启动免疫反应基因的转录,调节相关炎症因子、趋化因子等基因的表达。

综上所述,通过调节“mmLDL/HSP60-TLR4”这一巨噬细胞信号通路,使巨噬细胞向炎症和免疫反应的消减方向发展,可成为抗 As 和增加斑块稳定性的有效治疗策略之一。

3 降低 As 斑块易损性的新策略

通过抑制炎症和免疫反应降低 As 斑块的易损性是新的治疗策略之一。他汀类药物、血管紧张素转化酶抑制剂、抗血小板药、过氧化体增殖物激活型受体 (peroxisome proliferator activated receptor, PPAR) 激动剂、抗炎药物、抗生素、抗氧化剂等经研究发现抑制炎症和免疫作用;基因治疗、基质金属蛋白酶抑制剂、抗 As 疫苗、免疫调节剂等均被研究用于稳定易损斑块。但目前而言,这些治疗方式仍有值得关注的缺陷,如药物只能部分抑制炎症,大部分炎症反应逃逸,治疗 As 最成功的药物——他汀类在心肌梗死的一级和二级预防中仍对 2/3 的患者无效^[5],疫苗的安全性和持久性尚未得到进一步验证。As 中免疫和炎症反应相当复杂,单一的治疗手段不足以获得理想的疗效,随着信号通路和分子机制的不断精确化,多靶点治疗的策略可能会实现,但开发之路必将漫长。上述两条可降低斑块易损性的途径,在具体实施时有很大的挑战性;如果要抑制巨噬细胞泡沫化,必须同时抑制多个摄取脂质的受体,同时激活多个转运脂质的受体;如果要抑制巨噬细胞炎症免疫激活,必须同时阻断多条信号通路。

降低 As 斑块的易损性以预防心血管事件,与中医学“治未病”(包括未病先防、既病防变)思想一

致。目前中医学 As 病因病机以本虚标实为主,肾、心、脾虚为本,痰、瘀、毒为标等;对 As 斑块包括易损斑块形成的认识主要有痰浊说、脏虚痰瘀说、瘀毒致变说等;治则上多强调以扶正祛邪为主,具体包括:益气活血、益气温阳、通阳逐瘀、益气化痰通瘀、益气养阴化痰祛瘀以及活血解毒等。对具有稳定斑块作用的中药复方或单味药的研究发现,它们可以一定程度改善脂质代谢,减少斑块的脂质含量,抗氧化,保护血管内皮细胞,抑制血管平滑肌细胞异常增殖,减轻炎症,减低 MMP 活性等,作用于多个环节而稳定斑块、预防破裂。因传统中医认识疾病手段的局限性,易损斑块基础及临床理论均存在不足,以及中药制剂的复杂性,中医药抗 As 及干预易损斑块的作用机制尚未阐明。

总之,西医的问题在于:知晓疾病的病理机制即治疗靶点,但较难获得理想的药物;而中医的问题是:中医药在临床有一定的疗效,但缺乏验证结论及充分的机制阐释。希望通过对中医药抗 As 机制的研究,开发出具有多效多靶点作用的新药。

[参考文献]

- [1] Naghavi M, Libby P, Falk E, et al. From vulnerable plaque to vulnerable patient—a call for new definitions and risk assessment strategies: Part II [J]. *Circulation*, 2003, 108 (15): 1 772-778.
- [2] Galkina E. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27: 165-197.
- [3] Valgimigli M, Agostoni P, Serruvs PW. Acute coronary syndromes: an emphasis shift from treatment to prevention; and the enduring challenge of vulnerable plaque detection in the cardiac catheterization laboratory [J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2007, 8 (4): 221-229.
- [4] Finn AV, Nakano M, Narula J, et al. Concept of vulnerable/unstable plaque [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30: 1 282-292.
- [5] Finn AV, Kramer MC, Vorpahl M, et al. Pharmacotherapy of coronary atherosclerosis [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2009, 10 (10): 1 587-603.
- [6] Miller YI, Choi SH, Wiesner P, et al. Oxidation-specific epitopes are danger-associated molecular patterns recognized by pattern recognition receptors of innate immunity[J]. *Circ Res*, 2011, 108: 235-248.
- [7] Berliner JA, Subbanagounder G, Leitinger N, et al. Evidence for a role of phospholipid oxidation products in atherogenesis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2001, 11: 142-147.
- [8] Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81 (1): 1-5.
- [9] Jeannin P. Pattern recognition receptors in the immune response against dying cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2008, 20 (5): 530-537.

- [10] 熊思东. 疾病发病中巨噬细胞极化: 机制与作用[J]. *现代免疫学*, 2010, 30 (5): 353-360.
- [11] Khera AV, Rader DJ. Future therapeutic directions in reverse cholesterol transport[J]. *Curr Atheroscler Rep*, 2010, 12: 73-81.
- [12] Calkin AC, Tontonoz P. Liver X receptor signaling pathways and atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2010, 30: 1 513-518.
- [13] Ishikawa Y, Satoh M, Itoh T, et al. Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2008, 115 (4): 133-140.
- [14] Methe H, Kim JO, Kofler S, et al. Expansion of circulating Toll-like receptor4-positive monocytes in patients with acute coronary syndrome[J]. *Circulation*, 2005, 111 (20): 2 654-661.
- [15] den Dekker WK, Cheng C, Pasterkamp G, et al. Toll like receptor 4 in atherosclerosis and plaque destabilization[J]. *Atherosclerosis*, 2010, 209: 314-320.
- [16] Miller YI, Chang MK, Binder CJ, et al. Oxidized low-density lipoprotein and innate immune receptors [J]. *Curr Opin Lipidol*, 2003, 14: 437-445.
- [17] Xu XH, Shah PK, Faure E, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL[J]. *Circulation*, 2001, 104 (25): 3 103-108.
- [18] Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, et al. CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer[J]. *Nat Immunol*, 2010, 11: 155-161.
- [19] Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, et al. Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (3): 1 561-568.
- [20] Miller YI, Viriyakosol S, Worrall DS, et al. Toll-like receptor 4-dependent and -independent cytokine secretion induced by minimally oxidized low-density lipoprotein in macrophages[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (6): 1 213-219.
- [21] Choi SH, Harkewicz R, Lee JH, et al. Lipoprotein accumulation in macrophages via Toll-like receptor-4 dependent fluid phase uptake[J]. *Circ Res*, 2009, 104: 1 355-363.
- [22] Bae YS, Lee JH, Choi SH, et al. Macrophages generate reactive oxygen species in response to minimally oxidized LDL: TLR4- and Syk-dependent activation of Nox2[J]. *Circ Res*, 2009, 104 (2): 210-218.
- [23] Itoh H, Komatsuda A, Ohtani H, et al. Mammalian HSP60 is quickly sorted into mitochondria under conditions of dehydration [J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269 (23): 5 931-938.
- [24] Ohashi K, Burkart V, Flohe S, et al. Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex[J]. *J Immunol*, 2000, 164 (2): 558-561.
- [25] Schoneveld AH, Hoefer I, Sluijter JP, et al. Atherosclerotic lesion development and Toll like receptor 2 and 4 responsiveness[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 197 (1): 95-104.

(此文编辑 文玉珊)