

巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中的作用

许秋莲, 杨 阳, 田 野

(哈尔滨医科大学附属第一医院心血管内科, 黑龙江省哈尔滨市 150001)

[关键词] 自噬; 巨噬细胞; 胆固醇流出; 炎症体; 动脉粥样硬化

[摘 要] 自噬通过溶酶体依赖的降解途径维持细胞稳态。最新研究显示巨噬细胞自噬可以促进胆固醇流出, 抑制炎症体活化从而抑制动脉粥样硬化进展。在进展期斑块内, 巨噬细胞自噬水平降低, 斑块易损性增高, 极易导致斑块破裂, 引起急性冠脉综合征。因此, 调控巨噬细胞自噬已成为心血管领域的关注热点, 深入探究其机理将为动脉粥样硬化的防治提供新思路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

The Effect of Macrophage Autophagy in Atherosclerosis

XU Qiu-Lian, YANG-Yang, and TIAN Ye

(Department of Cardiovascular, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China)

[KEY WORDS] Macrophage; Autophagy; Cholesterol Efflux; Inflammasome; Atherosclerosis

[ABSTRACT] Autophagy is a lysosomal degradation pathway for cellular homeostasis. Recent research has shown that macrophage autophagy inhibits progression of atherosclerosis by promoting efflux of cholesterol and restraining inflammasome activation. However macrophage autophagy is defective in the advanced plaques, which results in increasing of plaque vulnerability and risk of plaque rupture to cause acute coronary syndrome. Afterwards how to regulate the macrophage autophagy in plaque turns out to be a hot spot in the management of atherosclerosis. Further investigation on the mechanism of macrophage autophagy may provide new ideas for the prevention and treatment of atherosclerosis.

自噬与人类多种疾病密切相关。动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是以脂质沉积、单核-巨噬细胞浸润及斑块形成为主要病理特征的慢性炎症疾病^[1]。近期文献报道了巨噬细胞自噬与脂代谢及炎症体的关系。本文主要针对巨噬细胞自噬在 As 的发生发展过程中的作用做一综述。

1 巨噬细胞在 As 发生发展过程中的作用

As 斑块内含大量巨噬细胞来源的泡沫细胞, 参与斑块形成与破裂的各个阶段^[1]。巨噬细胞具有极化性。M1 型巨噬细胞通过分泌炎症因子和趋化因子发挥促炎作用, M2 型巨噬细胞则可分泌 IL-10 及转化生长因子等产生抗炎修复作用^[2]。在早期

As 斑块内, 浸润细胞以 M2 型巨噬细胞为主, 其具有良好的胞葬作用。胞葬作用是吞噬细胞将程序性死亡的凋亡细胞安全移除的过程, 避免死亡细胞的膜系统破裂后将其有毒的酶、氧化物以及蛋白酶抗体和胱蛋白酶等细胞内容物释放到周围组织引起炎症和损害^[3], 从而维持斑块的稳定性。而在进展期斑块中, 巨噬细胞发生型别转换, M1 型巨噬细胞逐渐占据主导, 产生活性氧引起内质网应激, 巨噬细胞凋亡增多, 坏死核心形成; 分泌金属蛋白酶降解胶原纤维, 使斑块纤维帽变薄, 斑块易损系数增加, 加快 As 进程^[4-5]。在不稳定型心绞痛及心肌梗死患者中, M1 型巨噬细胞分泌的 IL-6 升高往往提示预后不良^[6]。研究显示自噬通过调节巨噬细胞功能发挥 As 保护作用^[7]。

[收稿日期] 2015-08-31

[修回日期] 2015-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81371709)

[作者简介] 许秋莲, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化针对巨噬细胞的靶向治疗, E-mail 为 396424183@qq.com。杨阳, 博士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化针对巨噬细胞的靶向治疗, E-mail 为 807280703@qq.com。通讯作者田野, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化针对巨噬细胞的靶向治疗, E-mail 为 yetian@ems.hrbmu.edu.cn。

2 自噬的过程

自噬在遗传进化中是高度保守的代谢过程,当细胞发生营养缺乏,氧化应激,细胞器功能紊乱等情况时自噬通过溶酶体依赖的途径降解毒性物质维持细胞稳态。自噬包括巨自噬,微自噬,分子伴侣介导的自噬^[8]。巨自噬以降解大分子物质及损伤细胞器为主,是本综述的叙述重点,其他类型的自噬在 As 斑块内作用尚不明确。自噬始于双层膜自噬体结构形成,自噬体在延伸过程中包裹脂滴,蛋白质聚合物,损伤细胞器等胞内物质。当其与溶酶体融合时,转变为单层膜结构的自噬溶酶体。溶酶体的酸性环境及大量水解酶使物质变性水解,进一步降解为氨基酸,脂肪酸,碳水化合物及核苷酸,供细胞再利用^[9]。自噬相关基因(autophagy related gene, Atg)编码的蛋白 Beclin-1, ATG-5 分别参与自噬起始及膜性结构延长。在基础实验中, Beclin-1 和 ATG-5 是动物模型实验最常敲除的自噬关键蛋白^[6, 10]。另一方面,自噬受控于多种上游信号,其中哺乳动物雷帕霉素靶蛋白复合物 1 (mammalian target of rapamycin complex 1, mTORC1)是非常重要的自噬抑制因子。营养足够时, mTORC1 磷酸化 ATG-1/ULK1 (在酵母中命名为 ATG-1,其哺乳动物同源蛋白质命名为 ULK1) 复合物,自噬启动受阻,反之,饥饿条件下, mTORC1 与 ATG-1/ULK1 复合物分离,启动下游自噬过程^[11]。因此雷帕霉素及其衍生物作为自噬诱导剂治疗 As 的研究受到越来越多的学者关注。

3 巨噬细胞自噬与 As 脂代谢及炎症反应的关系

As 斑块进展的根本原因是多因素的,但很大程度上归结于以下几点。首先胆固醇流出减少,泡沫细胞形成增加;其次是炎症体超活化,促动脉粥样硬化因子 IL-β 产生增多;再者损伤细胞器及毒性蛋白累积使巨噬细胞凋亡增多,吞噬功能下降。文献报道巨噬细胞内氧化低密度脂蛋白的累积会引起氧化应激和内质网应激,作为胞内对抗应激的重要组成部分,自噬能在动脉粥样硬化的环境内触发^[12]。Liao 等^[13]证实巨噬细胞自噬对 As 具有保护作用。通过敲除斑块内巨噬细胞自噬关键蛋白 ATG-5 后,细胞凋亡和氧化应激水平明显增加。并且自噬缺陷的凋亡细胞不能有效表达“寻找我”信

号,被吞噬细胞识别并清除作用减弱,斑块内坏死核心增加。脂质代谢的过程中,巨噬细胞通过脂自噬促进胆固醇流出。除此之外,自噬能够调节巨噬细胞的极化性,使促炎型的 M1 向抑炎型 M2 转化,促进炎症转归^[14]。同时,巨噬细胞自噬能够促进蛋白质聚集体及损伤细胞器的降解,降低细胞内的毒性效应。

3.1 巨噬细胞内脂自噬与胆固醇流出

巨噬细胞通过清道夫受体吞噬脂质转变为泡沫细胞。脂滴是甘油三酯及胆固醇酯在泡沫细胞中主要的储存形式。其在巨噬细胞及血管平滑肌聚集被视为 As 的诊断特征之一^[15]。ATP 结合转运盒 1 (ATP-binding cassette transporter A1, ABCA1) 作为细胞膜上一种重要的胆固醇流出调节蛋白,可将游离胆固醇转运到细胞外与高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 结合,然后运至肝脏代谢成胆汁酸排出。此过程称为胆固醇逆转运 (reverse cholesterol transportation, RCT)。泡沫细胞内脂滴的平衡取决于 RCT^[16]。脂自噬最早在动物肝脏中被发现,是细胞通过自噬途径降解脂滴促进脂质代谢的过程。营养缺乏时,脂自噬可以促进肝细胞内甘油三酯水解。在肝细胞自噬抑制的小鼠模型中,细胞内甘油三酯累积增多,脂肪肝程度加重。肝细胞脂自噬的现象提示一种可能性,巨噬细胞自噬是否也能促进胆固醇流出,答案是肯定的。体内动物实验中,敲除巨噬细胞 Atg-5 基因后可以观察到 RCT 受到抑制^[15, 17]。脂滴累积伴随自噬标记物水平升高,脂滴被双层膜结构的自噬体包裹后与溶酶体融合,甘油三酯及胆固醇酯在溶酶体中被酸性脂肪酶水解为游离胆固醇。同时,巨噬细胞脂质负荷可以产生 27-羟基胆固醇激活肝 X 受体转录因子,上调 ABCA1 的表达水平,提高 RCT 效率。研究发现 LXR 激动剂能有效促进 RCT,当巨噬细胞自噬被抑制时,这种促进作用被消除^[18]。另一方面,持续的脂质沉积会使巨噬细胞自噬功能受损,形成胆固醇结晶。胆固醇结晶是死亡巨噬细胞及坏死核心的惰性产物,近年来被视为损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMP),可促进促动脉粥样硬化斑块因子 IL-1β 的分泌。在 Atg-5 敲除或溶酶体酸性脂肪酶抑制剂处理的巨噬细胞中,胆固醇逆转运明显受到抑制,被修饰的脂质蓄积增多,形成恶性循环,恶化斑块环境^[19]。推测巨噬细胞脂自噬通过溶酶体降解脂滴产生游离胆固醇后与 ABCA1 结合,转运至外周 HDL,减轻脂质沉积,减慢 As 进程。自噬不足时,游离胆固醇减少,载脂

蛋白 A-I (apolipoprotein A-I, ApoA-I) 运脂减少, 负反馈降低外周血中的 HDL, 加速 As 进程。

3.2 巨噬细胞自噬与炎症反应

自噬具有调节巨噬细胞极化功能的作用, 可使促炎型 M1 型巨噬细胞向抑炎型 M2 型巨噬细胞转化。在易损斑块内, M1 型巨噬细胞内核转录因子 κ B (nuclear Factor Kappa B, NF- κ B) 激活, 促进分泌 IL-1 β , IL-6, 活性氧中间物及含氮氧化物等促炎因子, 继而引起强烈的细胞氧化应激及内质网途径依赖的细胞凋亡。在稳定斑块内, M2 型巨噬细胞占多数, 能有效吞噬细胞碎片及凋亡小体, 减轻周围炎症反应^[19]。自噬通过分子伴侣蛋白 P62 识别泛素化的 NF- κ B 并转运至溶酶体进行降解, 调节 M1 向 M2 转化。巨噬细胞自噬抑制后, 可使 M2 细胞分泌类 M1 细胞的细胞因子^[20]。另一方面, 激活骨髓来源的巨噬细胞自噬相关通路 PI3K - mTOR 后, M2 细胞数量增多, 反之, 抑制 PI3K - mTOR 通路, M2 细胞减少^[21]。自噬通过促进巨噬细胞型别转换稳定易损斑块。

当大量异常蛋白质在细胞内聚积时可对细胞产生毒性效应。临床上帕金森病, 亨廷顿病, 阿尔兹海默症等主要病理特征是蛋白质聚集^[22]。细胞通过蛋白酶体及自噬溶酶体途径降解蛋白质, 两者均通过泛素化信号识别蛋白。泛素样结合蛋白 P62/SQSTM1 (sequestosome-1, SQSTM1) 可以结合泛素化的蛋白质与微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 相互作用后将泛素化蛋白转运至自噬溶酶体, 同时自身也被降解。在进展期斑块内, 巨噬细胞 P62 水平显著提高, 自噬功能受损^[13]。巨噬细胞自噬抑制后, As 斑块内损伤蛋白不能被及时清除, 从而激活炎症体及凋亡信号。另一方面, 线粒体自噬缺陷导致细胞内活性氧显著增加, 活性氧是激活炎症体的潜在因子, 损伤线粒体破裂后引起细胞色素 C 释放, 导致细胞凋亡^[23]。Kaga 等^[24]发现在脂质长期慢性作用下, 溶酶体膜的流动性发生改变, 引起自噬体与溶酶体融合障碍, 使得氧化修饰的脂质不能被水解, 形成的胆固醇结晶在细胞内不断蓄积, 进一步破坏溶酶体膜的稳定性, 激活炎症体, 这可能解释 As 进展后期巨噬细胞自噬功能受损的原因。故巨噬细胞自噬可以通过清除损毒性蛋白及降解脂质抑制炎症信号激活。

4 巨噬细胞自噬与 As 的治疗关系

早期斑块中, 促动脉粥样硬化因子能有效诱导

巨噬细胞发生基础水平的自噬, 增强巨噬细胞胞葬作用及抗炎修复能力, 从而延缓早期斑块增大和坏死核心生成。As 进展后期, 巨噬细胞自噬不足, 促炎作用占据主导, 基质金属蛋白酶分泌增多, 斑块面积及坏死核心均扩大。故而精准调控巨噬细胞自噬水平有可能成为治疗 As 的靶点之一。经典 mTOR 抑制剂雷帕霉素或其衍生物可通过改善斑块巨噬细胞功能, 减小斑块面积抑制 As 进展^[25]。然而雷帕霉素及其衍生物会引起某些副作用, 比如高血糖、高血脂。因此可以联合使用他汀类药物降低血脂及二甲双胍防止高血糖并按时监测生化指标警惕副作用产生^[26]。体内体外实验证明异源性 Beclin-1 复合体的表达, 可以诱导自噬的起始^[27]。将 Beclin-1 与 TAT 蛋白转导肽 (人类免疫缺陷病毒 1 型编码的多肽) 结合, 制造出一种自噬诱导剂多肽 Tat-Beclin-1, 可渗透进细胞。Tat-Beclin-1 具有清除蛋白聚合体, 降低病毒效价, 提高杀死微生物的能力^[28]。利用生物工程的高效特异性, 可以提供一个高效临床治疗手段。

5 总结与展望

除外巨自噬, Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 介导的微生物胞吞作用涉及到多种自噬相关蛋白包括 LC3, ATG-5, ATG-7, Beclin-1, 该过程与自噬无关。这是所谓的 LC3-相关胞吞作用 (LC3-associated phagocytosis, LAP), LAP 与坏死凋亡细胞的清除相关^[29]。关于 As 斑块内 LAP 与自噬的关系目前没有相关研究, 需要进一步探讨。

另外, 文献中提到斑块中巨噬细胞内显著提高的 p62/SQSTM 蛋白水平代表自噬介导的溶酶体降解途径紊乱^[13]。分子伴侣蛋白 P62/SQSTM1 通过泛素化结合局域 (Ubiquitin-binding domain, UBD) 及 LC3 作用区域 (LC3-interacting region, LIR) 转运泛素化标记的蛋白到溶酶体降解, 同时还参与线粒体自噬, 从而清除损伤细胞器及某些异常蛋白质聚合体^[30-31]。p62/SQSTM 蛋白在 As 巨噬细胞自噬中的作用具有研究意义。

再者, 转录因子 EB (transcription factors EB, TFEB) 是降解途径的前体信号, 被视为“关键调节因子”, 能够介导几乎 2/3 自噬及溶酶体相关基因转录水平的上调^[32], 激活多种自噬调节因子包括 mTORC1 从而诱导自噬及改善溶酶体功能^[33]。破译巨噬细胞内 TFEB 功能也许可以解开自噬治疗 As 之谜。

总而言之,近年的研究表明巨噬细胞自噬对 As 斑块稳定性具有重要作用。在 As 早期,巨噬细胞自噬功能正常,可促进胆固醇流出减轻胞内脂负荷,抵抗氧化低密度脂蛋白引起的氧化应激,发挥有效吞噬作用防止斑块的形成和发展。但是,随着 As 病程进展,促炎型 M1 巨噬细胞逐渐占据主导,巨噬细胞溶酶体功能异常导致自噬-溶酶体途径缺陷,胆固醇结晶形成,炎症体与凋亡信号激活,导致易损斑块形成^[34]。因此通过自噬调控巨噬细胞的型别及功能对治疗 As 将具有重要意义,为预防急性心血管事件提供了新的治疗靶点。

[参考文献]

[1] Moore KJ, and Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. Cell, 2011, 145(3): 341-355.

[2] David M, Mosser and Justin P. Edwards. Exploring the full spectrum of macrophage activation[J]. Nat Rev Immunity, 2008, 8(12): 958-969.

[3] Jamila Khallou-Laschet, Aditi Varthaman, et al. Macrophage Plasticity in Experimental Atherosclerosis. [J]. Plos One, 2010, 5(1): e8 852.

[4] Liu Yan-Cun, Zou Xian-Biao, Chai Yan-Fen, et al. Macrophage polarization in inflammatory diseases [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(5): 520-529.

[5] 周瑶瑶. 巨噬细胞极化与动脉粥样硬化 [J]. 心血管病学进展, 2014, 35(1): 21-24.

[6] Kirbis S, Breskvar UD, sabovic M, et al. Inflammation markers in patients with coronary artery disease--comparison of intracoronary and systemic levels [J]. wien Klin wochenschr, 2010, 122 (suppl 2): 31-34.

[7] Schrijvers DM1, De Meyer GR, Martinet W. Autophagy in atherosclerosis: a potential drug target for plaque stabilization[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(12): 2 787-791.

[8] Boya P1, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(7): 713-720.

[9] Zhifan Yang; Klionsky, Daniel J. Eaten alive: a history of macroautophagy [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(9): 814-822.

[10] Kroemer G1, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response[J]. Mol Cell, 2010, 40(2): 280-293.

[11] 郭凤霞. 自噬与动脉粥样硬化 [J]. 生命的化学, 2013, 33(4): 461-465.

[12] Sergin I1, Razani B. Self-eating in the plaque: what macrophage autophagy reveals about atherosclerosis [J]. Trend Endocry Metab, 2012, 25(5): 225-234.

[13] Xianghai Liao, Judith C Sluimer, Ying Wang, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis[J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 545-553.

[14] Peiwen Chen, Matilde Cescon, Paolo Bonaldo. Autophagy-mediated regulation of macrophages and its applications for cancer[J]. Autophagy, 2014, 10(2): 192-200.

[15] Singh R. Autophagy regulates lipid metabolism[J]. Nature, 2009, 458(7 242): 1 131-135.

[16] 谢彬. ATP 结合盒转运蛋白 A1 研究进展 [J]. 国际内科学杂志, 2009, 36(1): 37-40.

[17] Mireille Ouimet, Vivian Franklin, Esther Mak, et al. Autophagy Regulates Cholesterol Efflux from Macrophage Foam Cells via Lysosomal Acid Lipase [J]. Cell Metab, 2011, 13(6): 655-667.

[18] Ghosh S1, Zhao B, Bie J, et al. Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis[J]. Vasc Pharmacol, 2010, 52(1-2): 1-10.

[19] Festuccia WT, Pouliot P, Bakan I, et al. Myeloid-specific Rictor deletion induces M1 macrophage polarization and potentiates in vivo pro-inflammatory response to lipopolysaccharide [J]. PLoS ONE, 2014, 9: e95 432.

[20] Chang Chih-Peng, Su Yu-Chi, Lee Pei-Huan. et al. Targeting NFKB by autophagy to polarize hepatoma-associated macrophage differentiation[J]. Cell Death Differ, 2013, 20: 515-523.

[21] Zhai Chungang, Cheng Jing, Mujahid Haroon, et al. Selective inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway regulates autophagy of macrophage and vulnerability of atherosclerotic plaque [J]. PLoS ONE, 2014, 9(3): e90 563.

[22] Doyle SM1, Genest O, Wickner S, et al. Protein rescue from aggregates by powerful molecular chaperone machines[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(10): 617-629.

[23] Geisler S1, Holmström KM, Skujat D. et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(2): 119-131.

[24] Koga H1, Kaushik S, Cuervo AM. Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion[J]. FASEB J, 2010, 24(8): 3 052-065.

[25] Duewell P1, Kono H, Rayner KJ. et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals[J]. Nature, 2010, 464(7 293): 1 357-361.

[26] Martinet W, De Looft H, De Meyer GR. mTOR inhibition: A promising strategy for stabilization of atherosclerotic plaques[J]. Atherosclerosis, 2014, 233(2): 601-607.

[27] Spencer B1, Potkar R, Trejo M. et al. Beclin-1 gene transfer activates autophagy and ameliorates the neurodegenerative pathology in a-synuclein models of Parkinson's and Lewy body diseases [J]. Neurosci, 2009, 29(43): 13 578-588.

[28] Shoji-Kawata S1, Sumpter R, Leveno M. et al. Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide[J]. Nature, 2013, 494(7 436): 201-206.

[29] Sanjuan MA1, Dillon CP, Tait SW, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis [J]. Nature, 2007, 450(7 173): 1 253-257.

[30] Lamark T, and Johansen T. Aggrephagy: selective disposal of protein aggregates by macroautophagy [J]. Cell Biol, 2012, 736 905.

[31] Geisler S1, Holmström KM, Skujat D. et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1[J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(2): 119-131.

[32] Settembre C and Ballabio A. TFEB regulates autophagy: an integrated coordination of cellular degradation and recycling processes[J]. Autophagy, 2011, 7(11): 1 379-381.

[33] Settembre C1, De Cegli R, Mansueto G. et al. TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(6): 647-658.

[34] Jerome WG. Lysosomes, cholesterol and atherosclerosis[J]. Clin Lipidol, 2010, 5(6): 853-865.

(此文编辑 李小玲)