

NADPH 氧化酶 2 在脑缺血再灌注损伤中作用机制研究进展

任洪梁, 席宏杰*

哈尔滨医科大学附属第二医院 麻醉科, 黑龙江 哈尔滨 150081

摘要: 在脑缺血再灌注损伤的病理过程中, 现有的文献数据表明氧自由基在其中发挥重要作用, 而其来源有多种途径。在许多细胞中, NADPH 氧化酶是过氧化物产生的一个主要因素, 与氧自由基的病理作用关系密切。NADPH 氧化酶 2 (NOX2) 是 NADPH 氧化酶的一个亚型, 近年研究表明, 其过度表达与脑缺血再灌注损伤的发生发展关系密切。主要对 NOX2 在脑缺血再灌注损伤中的作用机制进行综述。

关键词: NADPH 氧化酶 2; 脑缺血再灌注损伤; 活性氧; 兴奋性氨基酸; 自噬

中图分类号: R966 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2017)06-1161-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.06.046

Research progress on mechanism of NADPH oxidase 2 in cerebral ischemia reperfusion injury

REN Hong-liang, Xi Hong-jie

Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150081, China

Abstract: Oxygen free radicals generated from different ways play a significant role in the pathogenesis of cerebral ischemia reperfusion injury (CIRI) according to available literatures. As a key factor in the production of peroxides in many cells, NADPH oxidase is closely related to the pathogenesis of oxygen free radicals. Recent studies have shown that the expression of NADPH oxidase 2 (NOX2), a subtype of NADPH oxidase, which plays an important role in the development of CIRI. The mechanism of NOX2 in CIRI is reviewed in this paper.

Key words: NOX2; cerebral ischemia reperfusion injury; reactive oxygen species; excitatory amino acid; autophagy

目前, 脑缺血性疾病已经成为世界范围内最重要的死亡原因之一。早期恢复脑血流灌注是救治脑缺血患者最有效的手段。然而脑血流的再灌注很有可能引发脑缺血再灌注损伤 (CIRI)。CIRI 的发病机制与缺氧及能量代谢障碍、兴奋性氨基酸的神经毒性、氧自由基损伤、细胞内 Ca^{2+} 超载、炎症反应及细胞凋亡等诸多因素相关, 各因素之间彼此交叉, 相互影响, 形成恶性循环, 最终导致神经细胞凋亡或坏死。迄今为止, 关于 CIRI 的确切发病机制及各学说间的因果关系仍有待于进一步明确。研究显示, 过度的氧化应激会导致机体活性氧 (ROS) 增多, 从而会引发脑组织损伤及细胞凋亡。NADPH 氧化酶有多种亚型, 近年研究表明 NADPH 氧化酶 2 (NOX2) 在 CIRI 中发挥最主要的作用^[1]。

NOX2 的基因位于 X 染色体 p21.1, 是一种含有 570 个氨基酸的蛋白复合体, 主要是由位于细胞膜的 gp91phox、gp22phox 以及位于细胞质的 gp40phox、p47phox、p67phox 和 rac 组成, 其中 gp91phox 是其主要的功能亚单位, p22phox 的 C 末端有一富含脯氨酸的尾巴, 可能用来结合 NOX 的胞质激活因子, 从而发挥胞内调节作用。只有上述各亚基结合才能共同发挥作用, 导致 NOX2 的活化与表达, 进而导致 ROS 和炎症因子的产生。目前认为脑内神经元、小胶质细胞、星型胶质细胞都可以表达 NOX2, 其中以小胶质细胞为主^[1-3]。NOX2 通过产生大量 ROS、产生兴奋性氨基酸、介导自噬引起神经损伤, 本文主要对 NOX2 在 CIRI 中的作用机制进行综述。

收稿日期: 2017-03-17

作者简介: 任洪梁, 男, 研究方向为器官保护作用。Tel: 18445864096 E-mail: 1015787829@qq.com

*通信作者 席宏杰, 男, 硕士生导师。E-mail: 2549723593@qq.com

1 产生大量的 ROS

生理条件下,小胶质细胞表达的 NOX2 介导生成 ROS 对神经细胞、血管有调节作用。然而 CIRC 发生时,局部的小胶质细胞/巨噬细胞会促使 NOX2 活化以及其亚基的表达,产生大量的 ROS,导致 ROS 的生成与分解之间的平衡被打破,当局部组织内的 ROS 增加后,会直接损伤膜脂质、蛋白质及 DNA 等大分子物质,引起蛋白质功能障碍、脂质过氧化、基因不稳定,从而导致细胞死亡,同时,ROS 还可以通过抑制线粒体功能而激活各种凋亡信号通路,引起细胞凋亡^[2,4]。这是 NOX2 在 CIRC 中最主要的机制。虽然目前有很多抗氧化剂应用于临床以减轻过氧化反应,如生育酚、维生素 C、黄酮类等,但是这些药物只是在于清除氧自由基,并没有从根本上抑制 NOX2 的表达,减少活性氧的产生,从而使得其在脑缺血再灌注损伤应用中效果有限^[3,5]。

2 产生兴奋性氨基酸

除了直接导致 ROS 生成增多对脑组织造成的直接损伤,NOX2 还可能通过增强 CIRC 时兴奋性氨基酸的神经毒性和炎症反应而导致血脑屏障破坏、功能受损。谷氨酸是一种重要的兴奋性神经递质,在正常生理条件下,对中枢神经系统有很重要的作用,然而过量的谷氨酸会产生神经毒性,在 CIRC 的发生机制中有着重要作用。研究发现清开灵注射液具有抗脑缺血作用,陈发峰^[6]实验证明了精制清开灵能够抑制 NOX2 的表达,从而减轻脑缺血再灌注损伤,在给脑缺血模型的大鼠注射精制清开灵注射液 12 h 后,取脑发现缺血局部谷氨酸含量比对照组要少,遗憾的是研究者没有进一步明确 NOX2 与谷氨酸之间的关系,但是这说明 NOX2 可以通过增加谷氨酸的生成而产生神经毒性作用。Wang 等^[7]对 NOX2 与谷氨酸之间的关系进行了相关实验,实验表明在脑缺血再灌注损伤中,NOX2 表达增加,可以调控 complexin II 介导的可溶性 N-己基顺丁烯二酰亚胺敏感因子结合蛋白复合体释放谷氨酸,引起神经毒性,产生神经损伤。

3 介导自噬

在正常生理情况下,机体的自噬水平很低,当机体处于强烈应激情况下,为了能够适应内外环境的变化和代谢生存的需要,自噬水平会出现升高^[8]。激活 Akt/mTOR 信号转导通路在调控细胞的增殖、存活与凋亡等活动中发挥重要的生物学功能,同时最近研究也发现 AKT/mTOR 信号转导通路在细胞

自噬过程中发挥主要作用^[9]。而 Akt/mTOR 信号转导通路位于 NADPH 氧化酶的下游,抑制 NADPH 氧化酶的激活可以上调 Akt/mTOR 通路中相关蛋白的磷酸化水平,增强该信号转导通路的活性;NADPH 氧化酶的激活促进了 Akt/mTOR 信号通路的脱磷酸化,表明 NADPH 氧化酶可以经 Akt/mTOR 信号转导通路介导体外培养的细胞发生自噬^[10-12]。也有研究认为自噬可以通过各种途径清除活性氧,如分子伴侣介导的自噬、线粒体自噬、p62 传递途径等,在细胞内各分子之间相互作用错综复杂,还需要大量的研究^[13]。益母草中水苏碱可以通过抑制 NOX2 活化与其亚基的表达,然后经磷酸化 Akt/mTOR 信号转导通路从而抑制自噬反应,减轻缺血损伤^[14]。

4 其他

在脑缺血再灌注损伤中,NOX2 与炎症应答有关,NOX2 的敲基因鼠在脑缺血中较野生型大鼠能产生较少的促炎因子^[15]。Qin 等^[16]应用 NOX2 的靶向治疗剂 apocynin 后发现除了活性氧减少,还发现炎症蛋白如 NLRP3 ASC、caspase-1、IL-1 和 IL-18 都相应的减少,CIRC 时 NOX2 基因敲除的小鼠较野生型小鼠相比,脑梗死面积减少且血脑屏障损伤减轻^[17]。Tuo 等^[15]研究表明,NOX2 阻断剂 VAS2870 可显著改善溶栓治疗引起的血脑屏障紊乱,减轻脑组织水肿和出血,可以明显改善急性缺血后脑功能恢复。除了上述因素外,还有研究表明 NOX2 还可能与 CIRC 时发生的细胞内 Ca^{2+} 超载有关,给予 NOX2 抑制剂可明显减轻 CIRC 时的细胞内 Ca^{2+} 超载现象^[18-23],其具体的机制目前还不太清楚,同时闵昱源^[24]在心肌中发现 NOX2 能够调节磷酸化的变化从而改变内质网对 Ca^{2+} 的重吸收,或许 NOX2 在大脑中引起的钙超载的机制和在心肌上的机制是相同的,这有待进一步研究。

综上所述,NOX2 参与 CIRC 可能的机制有:(1)产生大量的 ROS 对组织细胞的直接毒性作用,这是其主要机制;(2)加重 CIRC 时兴奋性氨基酸的神经毒性;(3)介导细胞的自噬作用从而引起神经损伤;(4)导致各种炎症因子过量生成, Ca^{2+} 超载和破坏血脑屏障等。然而,NOX2 在 CIRC 中的整个确切机制目前还不明确,有待进一步研究。

目前发现还有很多中药成分或制剂广泛应用于心脑血管疾病中,能够靶向抑制 NOX2 的表达,如灯盏花乙素、益心解毒方、梓醇等^[24-25],虽然这些

中药广泛应用于临床,但是这些真正应用于临床中处理 CIRI 中有效性和安全性尚缺乏足够有效的证据,需要进行大规模的临床 RCT 研究。其原因认为可能有两点:(1)脑缺血再灌注损伤的机制复杂,细胞间分子机制错综复杂,相互作用,仅仅单独针对一个靶点难以有效,得多个靶点共同治疗方能有效;(2)各种中药成分复杂,作用靶点不具有特殊性,有多种副反应和不良反应。

5 结语

目前有很多证据表明源于 NOX2 产生的 ROS 有助于神经发育和信号转导,也对星型胶质细胞和小胶质细胞发挥巨大的生理作用。然而当脑部受到巨大刺激,如缺血以及后续的再灌注,NOX2 的表达水平就会过度增加,脑损伤面积也会进一步加重。目前越来越多的专家学者关注于把 NOX2 作为减轻 CIRI 的治疗靶点,然而遗憾的是至今还没有发现方便有效的药物以及方法。随着各种生物学技术的发展,或许在不久的将来将看到以 NOX2 为治疗靶点的治疗方法在 CIRI 中的应用,从而为 CIRI 的治疗打开一片新天地。

参考文献

- [1] Nayernia Z, Jaquet V, Krause K H. New insights on NOX enzymes in the central nervous system [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(17): 2815-2837.
- [2] Rojo A I, McBean G, Cindric M, et al. Redox control of microglial function: molecular mechanisms and functional significance [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 21(12): 1766-1801.
- [3] Taylor C J, Weston R M, Dusting G J, et al. NADPH oxidase and angiogenesis following endothelin-1 induced stroke in rats: role for nox2 in brain repair [J]. *Brain Sci*, 2013, 3(1): 294-317.
- [4] Kumar A, Singh A. A review on mitochondrial restorative mechanism of antioxidants in Alzheimer's disease and other neurological conditions [J]. *Front Pharmacol*, 2015, 6: 206.
- [5] Zhang J, Wang X, Vikash V, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016: 4350965.
- [6] 程发峰. 精制清开灵注射液对脑缺血的治疗作用及对兴奋性毒性级联损伤的调控机制 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2011.
- [7] Wang Z, Wei X, Liu K, et al. NOX2 deficiency ameliorates cerebral injury through reduction of complexin II-mediated glutamate excitotoxicity in experimental stroke [J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 65: 942-951.
- [8] Chern C M, Liou K T, Wang Y H, et al. Andrographolide inhibits PI3K/AKT-dependent NOX2 and iNOS expression protecting mice against hypoxia/ischemia-induced oxidative brain injury [J]. *Planta Med*, 2011, 77(15): 1669-1679.
- [9] Zhan L, Wang T, Li W, et al. Activation of Akt/FoxO signaling pathway contributes to induction of neuroprotection against transient global cerebral ischemia by hypoxic pre-conditioning in adult rats [J]. *J Neurochem*, 2010, 114(3): 897-908.
- [10] Liu S Y, Chen C L, Yang T T, et al. Albumin prevents reactive oxygen species-induced mitochondrial damage, autophagy, and apoptosis during serum starvation [J]. *Apoptosis*, 2012, 17(11): 1156-1169.
- [11] Pal R, Bajaj L, Sharma J, et al. NADPH oxidase promotes Parkinsonian phenotypes by impairing autophagic flux in an mTORC1-independent fashion in a cellular model of Parkinson's disease [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22866.
- [12] Kazumura K, Yoshida L S, Hara A, et al. Inhibition of neutrophil superoxide Generation by shikonin is associated with suppression of cellular Ca(2+) fluxes [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2016, 59(1): 1-9.
- [13] Li L, Tan J, Miao Y, et al. ROS and autophagy: interactions and molecular regulatory mechanisms [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(5): 615-621.
- [14] 曹童童, 陈会花, 章 忱, 等. 益母草水苏碱经 Nox2/ROS/mTOR 途径降低心肌过度自噬 [J]. 中国病理生理杂志, 2015(10): 1790.
- [15] Tuo Y H, Liu Z, Chen J W, et al. NADPH oxidase inhibitor improves outcome of mechanical reperfusion by suppressing hemorrhagic transformation [J]. *J Neurointerv Surg*, 2017, 9(5): 492-498.
- [16] Qin Y Y, Li M, Feng X, et al. Combined NADPH and the NOX inhibitor apocynin provides greater anti-inflammatory and neuroprotective effects in a mouse model of stroke [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 104: 333-345.
- [17] Jumnonprakhon P, Govitrapong P, Tocharus C, et al. Melatonin promotes blood-brain barrier integrity in methamphetamine-induced inflammation in primary rat brain microvascular endothelial cells [J]. *Brain Res*, 2016, 1646: 182-192.
- [18] Lopez-Gonzalez R, Lu Y, Gendron T F, et al. Poly(GR) in

- C9ORF72-Related ALS/FTD compromises mitochondrial function and increases oxidative stress and DNA damage in iPSC-Derived motor neurons [J]. *Neuron*, 2016, 92(2): 383-391.
- [19] Esteras N, Rohrer J D, Hardy J *et al.* Mitochondrial hyperpolarization in iPSC-derived neurons from patients of FTDP-17 with 10+16 MAPT, mutation leads to oxidative stress and neurodegeneration [J]. *Redox Biol*, 2017, 12: 410-422.
- [20] Cho R W, Buhl L K, Volfson D, *et al.* Phosphorylation of complexin by PKA regulates activity-dependent spontaneous neurotransmitter release and structural synaptic plasticity [J]. *Neuron*, 2015, 88(4): 749-761.
- [21] Ye Q, Huang B, Zhang X, *et al.* Astaxanthin protects against MPP⁺-induced oxidative stress in PC12 cells via the HO-1/NOX2 axis [J]. *BMC Neurosci*, 2012, 13: 156.
- [22] Altenhöfer S, Kleikers P W, Radermacher K A, *et al.* The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(14): 2327-2343.
- [23] Zhang M, Prosser B L, Bamboye M A, *et al.* Contractile function during angiotensin-II activation: increased Nox2 activity modulates cardiac calcium handling via phospholamban phosphorylation [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2015, 66(3): 261-272.
- [24] 闵昱源. 梓醇对大鼠脑缺血/再灌注损伤的保护作用及其机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2015.
- [25] 解 华, 麻春杰, 郭淑贞, 等. 益心解毒方对 Nox2 和 Nox4 亚基过表达的心肌细胞 NADPH 氧化酶活性的影响 [J]. *现代中医临床*, 2015, 22(2): 24-28.