

巨噬细胞自噬：稳定动脉粥样硬化斑块的潜在治疗靶点

仲昭宇 田 野 杨力明

【摘要】 巨噬细胞能够摄取脂蛋白, 积累脂质, 形成泡沫细胞, 并释放多种酶、炎症介质, 在动脉粥样硬化的发生、进展中起重要作用。研究发现, 诱导巨噬细胞自噬能够稳定动脉粥样硬化斑块。该文主要介绍巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中的作用, 以及其作为治疗靶点稳定动脉粥样硬化斑块的研究成果。

【关键词】 巨噬细胞; 自噬; 动脉粥样硬化; 转录因子 EB
doi:10. 3969/j. issn. 1673-6583. 2015. 04. 009

自噬是真核细胞利用溶酶体降解细胞内受损的细胞器及蛋白等大分子物质的过程, 在营养缺乏、组织缺氧、氧化应激、DNA 损伤等环境压力下被激活。机体可通过自噬回收利用内源性细胞成分(氨基酸、游离脂肪酸、核苷酸)以维持细胞稳态^[1]。动脉粥样硬化是以脂质积累、炎症细胞浸润为特征的慢性过程^[2-3]。巨噬细胞是引起斑块炎症反应的关键因素。减少斑块中的巨噬细胞浸润, 增加易损斑块的稳定性已成为动脉粥样硬化的治疗方法。研究表明, 动脉粥样硬化斑块中具有自噬样特征, 包括髓鞘样结构、泛素化包涵体聚集、空泡增多等。雷帕霉素及其衍生物可诱导巨噬细胞自噬, 增加斑块稳定性。

1 动脉粥样硬化进展过程中巨噬细胞的作用

脂肪分子、脂蛋白在血管内膜的积累是动脉粥样硬化的始动因素^[4]。脂蛋白的过度积累可激活内皮细胞, 产生趋化因子, 促使单核细胞进入血管内膜。单核细胞在内膜分化为成熟的巨噬细胞, 并通过受体介导的内吞作用, 摄取被修饰的脂蛋白, 如氧化低密度脂蛋白等。被修饰的脂蛋白的摄取与内化可加剧内膜的氧化环境, 加速脂质的修饰及摄取过程^[5]。同时, 巨噬细胞可分泌炎症细胞因子, 建立正反馈调节, 诱导更多单核细胞进入血管内膜并促进巨噬细胞增殖。当脂质过载, 超过巨噬细胞的

代谢能力时, 巨噬细胞内聚集大量脂质, 转化为泡沫细胞。泡沫细胞清除率降低以及泡沫细胞凋亡进一步激活炎症反应, 促进血管内膜生长与坏死核的形成, 增加斑块破裂的风险^[6]。

巨噬细胞参与活性氧(ROS)中间产物、组织蛋白酶和基质金属蛋白酶的合成或分泌, 加剧血管内膜的毒性环境。斑块内毒性环境的危险因素包括坏死与凋亡细胞的碎片、组织缺氧、ROS 水平升高以及脂质的积累^[7-8]。巨噬细胞自噬作为一种代偿机制, 能够减轻上述因素对斑块的不良影响。

2 自噬及其调控机制

典型的自噬始于双层膜结构的形成, 称为吞噬泡(phagophore)。吞噬泡包裹细胞内需要降解的蛋白聚集体、脂滴、细胞器, 并逐步延伸、成熟, 形成自噬体(autophagosome), 之后与溶酶体融合形成自噬溶酶体(autolysosome)。自噬体外膜与溶酶体膜融合后, 溶酶体水解酶降解自噬体内膜及底物, 生成可被细胞循环利用的代谢产物^[9]。30 多种自噬相关基因(autophagy-associated gene, ATG)编码的特殊蛋白参与吞噬泡的成熟、延伸以及自噬体与溶酶体的融合, 包括 Beclin 1、ATG5-ATG12 复合物以及微管相关蛋白(LC3) II-磷脂酰乙醇胺(PE)复合物等^[10], 它们的具体作用见表 1。

表 1 自噬溶酶体相关蛋白的作用

| 自噬溶酶体相关蛋白 | 作用 |
|----------------|------------|
| Beclin 1 | 参与双层膜结构的形成 |
| ATG5-ATG12 复合物 | 参与双层膜结构的延伸 |
| LC3 II-PE 复合物 | 参与双层膜结构的延伸 |

基金项目:国家自然科学基金(81271734, 81000688), 黑龙江省自然科学基金(H2015006)

作者单位:150081 哈尔滨医科大学病理生理教研室

通信作者:杨力明, Email:cooperationyang@126. com

2.1 自噬的主要调控通路

自噬的主要调控通路包括哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路与磷酸酰肌醇 3 激酶(PI3K)通路。mTOR 分为对雷帕霉素敏感的 mTORC1 和对雷帕霉素不敏感的 mTORC2。活化的 mTORC1 能抑制丝氨酸/苏氨酸激酶 ATG1(即哺乳动物细胞中的 Ulk1),起抑制自噬的作用^[11]。当营养不足或加入 mTOR 抑制剂(如雷帕霉素)时,mTORC1 不能激活,ATG1 形成 ATG1 蛋白激酶自噬调控复合物,诱导自噬的发生。Ⅲ型 PI3K 可以促进前自噬

体结构(PAS)游离膜的形成,并与 Beclin 1 结合形成 ATG1 蛋白激酶自噬调控复合物,激活两种泛素连接体系(ubiquitin-like conjugation system),募集自噬相关蛋白,从而促进自噬^[12]。研究表明,抑制 mTOR 通路可促进巨噬细胞自噬,减少斑块内巨噬细胞数目,起到稳定动脉粥样硬化斑块的作用^[13-15]。此外,调控肌糖/三磷酸肌醇、钙离子、多巴胺等自噬相关因子也可促进自噬,减轻动脉粥样硬化^[16-18],见表 2。

表 2 促进自噬稳定动脉粥样硬化斑块的研究

| 文献 | 药物 | 机制 | 模型 | 结果 |
|-----------------------------|------------|----------------------------|--------------------------------|------------------|
| Zhai 等 ^[13] | 雷帕霉素 | 抑制 PI3K/蛋白激酶 B/ mTOR 通路 | 兔 | 减少斑块内巨噬细胞数目,稳定斑块 |
| | LY294002 | | | |
| | mTOR-siRNA | | | |
| Chen 等 ^[14] | 雷帕霉素 | 抑制 mTOR | 兔 | 稳定斑块 |
| Verheye 等 ^[15] | 依维莫司 | 抑制 mTOR | 兔 | 减少斑块内巨噬细胞数目 |
| Zhao 等 ^[16] | — | — | 不稳定型心绞痛患者 | 单核细胞自噬参与斑块的形成与破裂 |
| | | | 急性心肌梗死患者 | |
| | | | 稳定型心绞痛患者 | |
| Kyselovic 等 ^[17] | 拉西地 | 阻断钙离子通道 | 载脂蛋白 E(ApoE) ^{-/-} 小鼠 | 减轻动脉粥样硬化 |
| Mohindroo 等 ^[18] | 三氟拉嗪 | 拮抗多巴胺 | 猕猴 | 减轻动脉粥样硬化 |

转录因子 EB(TFEB)是近年来新发现的蛋白,可由 mTOR、细胞应激等自噬调节因子激活,介导自噬、溶酶体相关因子的表达,调节脂质代谢^[19]。正常情况下,TFEB 存在于细胞质,营养缺乏时 TFEB 快速转移至核内进行基因转录调控^[20-21]。TFEB 的核转位可以被血清、氨基酸或生长因子所抑制,这表明 TFEB 的激活对营养和生长因子较为敏感。Sardiello 等^[22-23]研究发现,TFEB 可通过调控协同溶酶体表达和调控(coordinated lysosomal expression and regulation, CLEAR)元件相关基因,调节溶酶体的合成及自噬。Mizushim 等^[24]发现,在 HeLa 细胞中过表达 TFEB 可增加自噬体的数量。类似的现象也出现在 TFEB 过表达的猴肾脏成纤维细胞以及小鼠胚胎成纤维细胞中^[25]。上述结果均表明,TFEB 参与调控自噬。

2.2 巨噬细胞自噬的检测

自噬的检测方法包括透射电镜法、自噬标记蛋白 Western blot 法、绿色荧光蛋白-LC3 观察法等。透射电镜是检测自噬的金标准,但巨噬细胞具有很强的吞噬能力,通过透射电镜很难判断细胞质中的

囊泡是源自自噬或是异物吞噬。通过免疫电镜观察荧光标记的自噬体特异性蛋白 LC3 是相对特异的检测方式,但 LC3 在巨噬细胞中的表达量较低,会产生假阴性结果。自噬标记蛋白 Western blot 法也存在一定的弊端。自噬形成时,LC3 I 会转变为 LC3 II,因此 LC3 II / I 的比值可用于评估自噬水平,但 LC3 抗体对 LC3 II 的亲合力更高,易造成假阳性。巨噬细胞高表达自噬相关的溶酶体标记蛋白,如组织蛋白酶 D(cathepsin D),也会产生假阳性结果^[26]。

3 巨噬细胞自噬与动脉粥样硬化

在高脂饮食喂养下,与对照组小鼠相比,自噬相关基因 ATG5 缺失的小鼠更易形成动脉粥样硬化斑块,血清白细胞介素-1(IL-1)水平升高,且斑块内脂质含量较高、坏死核的数目较多、炎症反应加剧^[27]。巨噬细胞缺失 ApoE 与低密度脂蛋白受体基因的小鼠也有上述表现^[28]。

脂质过载的泡沫细胞是导致炎症环境和斑块进展的主要原因。除了脂肪水解途径外,自噬溶酶体系统已成为介导胆固醇流出的重要途径。自噬

溶酶体可将脂质水解为胆固醇,之后游离的胆固醇可经 ATP 结合盒转运蛋白 A1(ABCA1)介导流出细胞,起到缓解炎症环境及稳定斑块的作用^[29-30];巨噬细胞自噬不足使泡沫细胞大量聚集,并导致脂噬(lipophagy)缺陷,减少胆固醇的流出。

巨噬细胞自噬不足时,受损的线粒体可在巨噬细胞内聚集,造成细胞内 ROS 水平上升,ROS 可激活炎症体,造成 DNA 损伤^[31-33]。此外,自噬不足也可能导致溶酶体膜的不稳定与炎症体的激活。炎症体激活后通过 caspase-1 途径,促进前 IL-1 β 分子转化为 IL-1 β ,IL-1 β 的水平升高,造成斑块不稳定。

泡沫细胞清除率低以及泡沫细胞的凋亡进一步激活炎症反应。巨噬细胞自噬不足导致巨噬细胞凋亡增加,同时伴有 ROS 水平上升,并可抑制胞葬作用,降低凋亡巨噬细胞的清除率。凋亡细胞的积累可引发继发性坏死,增加坏死核数量、斑块的大小及复杂性^[34]。

4 巨噬细胞自噬作为动脉粥样硬化治疗靶点

基础状态下的自噬及适当诱导的自噬能够清除细胞内的受损成分,以抵御各种应激状态,抑制凋亡、坏死的发生。过度自噬可造成自噬性细胞死亡^[35]。巨噬细胞自噬性死亡可以降低金属蛋白酶水平,防止平滑肌细胞死亡,保护胶原纤维,增加斑块表面纤维帽的稳定性,减少斑块破裂的风险。平滑肌细胞与内皮细胞的自噬性死亡则不利于斑块稳定。平滑肌细胞会造成胶原纤维合成减少,使纤维帽变薄。内皮细胞的死亡可导致血栓形成,增加斑块破裂风险。因此,特异性地诱导巨噬细胞自噬十分必要。

研究表明,药理学方法能够特异性诱导巨噬细胞自噬以稳定动脉粥样硬化。依维莫司和咪喹莫特均可特异性地诱导动脉粥样硬化斑块中的巨噬细胞自噬,而不影响斑块内平滑肌细胞的数量^[36-37]。依维莫司作为一种有效的 mTOR 抑制剂,可以促进巨噬细胞自噬。高浓度的依维莫司可造成巨噬细胞自噬性死亡,降低斑块内巨噬细胞数量,促进斑块稳定^[38]。咪喹莫特可通过激活 Toll 样受体 7(TLR7)信号通路,抑制 Beclin 1 与 Bcl-2 的结合,促进髓样分化因子 88 与 Beclin 1 结合,诱导巨噬细胞自噬却不引起巨噬细胞自噬性死亡。然而,另一方面自噬又会引起 IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α 等细胞因子水平升高,促进内皮细胞表达血管细胞黏附分子-1 等黏附因子,募集单核细胞及 T 淋

巴细胞,激活炎症反应,促进斑块进展^[39]。因此,在诱导自噬的过程中应当使用抗炎药物控制炎症反应,避免斑块进展。

5 展望

巨噬细胞自噬参与动脉粥样硬化的发生、发展。诱导巨噬细胞自噬可作为治疗靶点,用以稳定动脉粥样硬化斑块^[40]。然而,巨噬细胞自噬的相关机制尚未阐明,例如巨噬细胞自噬稳定动脉粥样硬化斑块的作用机制,mTOR 抑制剂雷帕霉素及其衍生物可以特异性地诱导巨噬细胞自噬的作用机制;何种程度的巨噬细胞自噬可以稳定斑块而不引发斑块进展等,均有待深入探讨。

参 考 文 献

- [1] Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpter RM, et al. Autophagy is a Na⁺, K⁺-ATPase - regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia - ischemia [J]. P Natl Acad Sci USA, 2013, 110 (51): 20364-20371.
- [2] Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword [J]. Science, 2004, 306 (5698): 990-995.
- [3] Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics: 2013 update: a report from the American Heart Association [J]. Circulation, 2013, 127(1): 143-146.
- [4] 于 佳,倪唤春,罗心平. 脂质代谢相关基因多态性与动脉粥样硬化 [J]. 国际心血管病杂志, 2014, 41(3): 173-175.
- [5] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance [J]. Nat Rev Immunol, 2013, 13(10): 709-721.
- [6] Ley K, Miller YI, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during atherogenesis [J]. Arterioscl Throm Vas, 2011, 31(7): 1506-1516.
- [7] Morrell CN. Reactive Oxygen Species Finding the Right Balance [J]. Circ Res, 2008, 103(6): 571-572.
- [8] Newby AC. Metalloproteinase expression in monocytes and macrophages and its relationship to atherosclerotic plaque instability [J]. Arterioscl Throm Vas, 2008, 28 (12): 2108-2114.
- [9] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy [J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(7): 713-720.
- [10] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation [J]. Curr Opin Cell Biol, 2010, 22(2): 124-131.
- [11] Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, et al. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. Cell Death Differ, 2011, 18(4): 571-580.

- [12] Sergin I, Razani B. Self-eating in the plaque; what macrophage autophagy reveals about atherosclerosis [J]. Trends Endocrin Met, 2014, 25(5): 225-234.
- [13] Zhai C, Cheng J, Mujahid H, 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): e90563.
- [14] Chen WQ, Zhong L, Zhang L, et al. Oral rapamycin attenuates inflammation and enhances stability of atherosclerotic plaques in rabbits independent of serum lipid levels[J]. Brit J Pharmacol, 2009, 156(6): 941-951.
- [15] Verheye S, Martinet W, Kockx MM, et al. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy[J]. J Am Coll Cardiol (JACC), 2007, 49(6): 706-715.
- [16] Zhao K, Xu X S, Meng X, et al. Autophagy of monocytes attenuates the vulnerability of coronary atherosclerotic plaques[J]. Coronary Artery Dis, 2013, 24(8): 651-656.
- [17] Kyselovic J, Martinka P, Batova Z, et al. Calcium channel blocker inhibits Western-type diet-evoked atherosclerosis development in ApoE-deficient mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 315(1): 320-328.
- [18] Mohindroo A, Ahluwalia P. Effect of trifluoperazine on certain arterial wall lipid-metabolizing enzymes inducing atherosclerosis in rhesus monkeys[J]. Lipids, 1997, 32(8): 867-872.
- [19] Rocznik-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, et al. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis [J]. Sci Signal, 2012, 5(228): ra42.
- [20] Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, et al. A gene network regulating lysosomal biogenesis and function [J]. Science, 2009, 325(5939): 473-477.
- [21] Settembre C, Zoncu R, Medina DL, et al. A lysosome - to - nucleus signalling mechanism senses and regulates the lysosome via mTOR and TFEB[J]. EMBO J, 2012, 31(5): 1095-1108.
- [22] Sardiello M, Ballabio A. Lysosomal enhancement: a CLEAR answer to cellular degradative needs[J]. Cell Cycle, 2009, 8(24): 4021-4022.
- [23] Palmieri M, Impey S, Kang H, et al. Characterization of the CLEAR network reveals an integrated control of cellular clearance pathways [J]. Hum Mol Genet, 2011, 20(19): 3852-3866.
- [24] Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research[J]. Cell, 2010, 140(3): 313-326.
- [25] Carmine Settembre, Chiara Di Malta, Vinicia Assunta Polito, et al. TFEB Links Autophagy to Lysosomal Biogenesis[J]. Science, 2011, 332(6036): 1429-1433.
- [26] Martinet W, De Meyer GR, Andries L, et al. In situ detection of starvation-induced autophagy [J]. J Histochem Cytochem, 2006, 54(1): 85-96.
- [27] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease [J]. Cell, 2008, 132(1): 27-42.
- [28] Liao X, Sluimer JC, Wang Y, et al. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis [J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 545-553.
- [29] Ghosh S, Zhao B, Bie J, et al. Macrophage cholesteryl ester mobilization and atherosclerosis [J]. Vasc Pharmacol, 2010, 52(1): 1-10.
- [30] Robinet P, Ritchey B, Smith JD. Physiological difference in autophagic flux in macrophages from 2 mouse strains regulates cholesterol ester metabolism [J]. Arterioscl Throm Vas, 2013, 33(5): 903-910.
- [31] Tschopp J, Schroder K. NLRP3 inflammasome activation: The convergence of multiple signalling pathways on ROS production? [J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(3): 210-215.
- [32] Scherz-Shouval R, Elazar Z. Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology [J]. Trends Biochem Sci, 2011, 36(1): 30-38.
- [33] Schrijvers DM, De Meyer GRY, Martinet W. Autophagy in atherosclerosis: a potential drug target for plaque stabilization [J]. Arterioscl Throm Vas, 2011, 31(12): 2787-2791.
- [34] Duewell P, Kono H, Rayner KJ, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. Nature, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [35] Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? [J]. Autophagy, 2011, 7(5): 457-465.
- [36] Martinet W, De Meyer I, Verheye S, et al. Drug-induced macrophage autophagy in atherosclerosis: for better or worse? [J]. Basic Res Cardio, 2013, 108(1): 1-11.
- [37] Mueller MA, Beutner F, Teupser D, et al. Prevention of atherosclerosis by the mTOR inhibitor everolimus in LDLR^{-/-} mice despite severe hypercholesterolemia [J]. Atherosclerosis, 2008, 198(1): 39-48.
- [38] Lavigne MC, Grimsby JL, Eppihimer MJ. Antirestenotic mechanisms of everolimus on human coronary artery smooth muscle cells; inhibition of human coronary artery smooth muscle cell proliferation, but not migration [J]. J Cardiovasc Pharm, 2012, 59(2): 165-174.
- [39] De Meyer I, Martinet W, Schrijvers DM, et al. Toll-like receptor 7 stimulation by imiquimod induces macrophage autophagy and inflammation in atherosclerotic plaques [J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107(3): 1-13.
- [40] Martinet W, De Loof H, De Meyer GR. mTOR inhibition: A promising strategy for stabilization of atherosclerotic plaques [J]. Atherosclerosis, 2014, 233(2): 601-607.

(收稿:2015-01-09 修回:2015-06-05)

(本文编辑:梁英超)