

模式识别受体 NOD2 在心血管疾病中的研究进展

钟豪轩 罗心平

【摘要】 核苷酸结合寡聚化结构域 2(NOD2)属于 NOD 样受体家族,作为一种胞内模式识别受体,NOD2 通过识别配体胞壁酰二肽参与宿主细胞对病原体的识别,介导免疫炎症反应。近年来研究发现,NOD2 在心肌炎、动脉粥样硬化、心肌梗死等多种心血管疾病的发生发展过程中发挥重要作用。该文介绍 NOD2 在心血管疾病中的研究进展。

【关键词】 核苷酸结合寡聚化结构域 2;心血管疾病;血栓;Toll 样受体

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2019.04.010

核苷酸结合寡聚化结构域 2(NOD2)属于 NOD 样受体家族(NLR),作为一种细胞内模式识别受体(PRR),NOD2 通过识别细菌细胞壁成分胞壁酰二肽(MDP)参与固有免疫反应^[1],介导炎症介质释放。研究发现,NOD2 的基因突变与克罗恩病的发生密切相关^[2],近年来发现 NOD2 还在多种心血管疾病中发挥作用。本文介绍 NOD2 在心血管疾病中的作用。

1 NOD2 的结构和信号转导

NLR 主要由 3 个结构域组成:N 端为与信号转导相关的效应结构域,中心位置为具有三磷酸腺苷(ATP)酶活性的核苷酸结合结构域(NOD),C 端富含亮氨酸的重复序列(LRR)。根据 N 端效应结构域的不同,NLR 又可分为 5 个亚家族。NOD2 的 N 端为 2 个串联的胱天蛋白酶激活募集域(CARD)。LRR 识别 MDP 后发生构象改变,NOD 自身寡聚化,N 端串联的 CARD 与受体相互作用蛋白 2(RIP2)结合,引起 RIP2 的激活。活化的 RIP2 可以通过核因子 κ B(NF- κ B)抑制蛋白激酶 γ (IKK γ)发生泛素化,磷酸化 IKK β ,激活 NF- κ B 信号通路,引起炎症介质释放,还可以激活丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路,活化 c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、胞外信号调节激酶(ERK)、p38MAPK 及其下游特异性转录因子。此外,NOD2 还可以激活胱天蛋白酶,诱导白细胞介素(IL)-1 β 生成^[1]。

2 NOD2 与心血管疾病

2.1 NOD2 与病毒性心肌炎

病毒性心肌炎最常见的病因是柯萨奇病毒感染。研究发现,在柯萨奇病毒 B3(CVB3)引起的心肌炎中,NOD2 表达增加,敲除小鼠 NOD2 受体可以改善心肌炎症状,减少心功能损害^[3]。而间充质干细胞(MSC)可以通过抑制 NOD2 的表达和减少炎症介质的释放,改善 CVB3 所致心肌炎的症状^[4]。这些研究提示 NOD2 在病毒性心肌炎中发挥重要作用。

2.2 NOD2 与心肌肥大以及心肌纤维化

心肌肥大常见于缺血性心肌病、高血压、瓣膜关闭不全等疾病。作为心脏的适应性反应^[5],心肌肥大在一定程度上增强心肌收缩力,维持心输出量,但长时间的心肌肥大会造成心肌重构、心力衰竭甚至猝死。Zong 等^[6]对 NOD2 基因敲除小鼠进行降主动脉结扎,发现其心功能恶化较野生型小鼠明显加重,同时心脏质量/体质量比值、心脏质量/胫骨长度比值和心肌细胞横截面积等心肌肥大相关指标显著升高,间接证明了 NOD2 对心肌肥大和心肌纤维化具有抑制作用。此外,在降主动脉结扎后,野生型小鼠心肌组织的 NOD2 和 Toll 样受体 4(TLR4)的表达都升高,而 NOD2 基因敲除小鼠 TLR4 表达的增加幅度更大。研究发现,用 siRNA 抑制巨噬细胞中 NOD2 后,再用 TLR4 受体激动剂脂多糖(LPS)刺激巨噬细胞,小鼠炎症反应明显增强^[7]。Zong 等^[6]在研究中还发现,NOD2 敲除组 NF- κ B 的下游信号表达增加,提示 NOD2 对心肌肥大和心肌纤维化的保护作用可能与 NOD2 抑制

TLR4 介导的信号通路相关。Richardson 等^[8]的研究也发现,NOD2 激活能抑制肠上皮细胞 TLR4 介导的 NF- κ B 信号通路,减少 TLR4 引起的肠道损伤。此外,NOD2 能抑制 Toll 样受体 2(TLR2)的信号转导^[9],而 TLR2 可通过 NF- κ B 介导后负荷增加,促进心肌肥大和心肌纤维化^[10]。因此,NOD2 对心肌肥大和心肌纤维化的保护作用还可能与 NOD2 对 TLR2 的抑制有关。但 Shen 等^[11]发现抑制 NOD2 可以改善糖尿病小鼠的心肌细胞凋亡和心肌纤维化,糖尿病小鼠中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 、IL-6、I / III 型胶原表达增加;抑制 NOD2 后这些蛋白的表达降低,心肌细胞凋亡和心肌纤维化减少。糖尿病患者中 NOD2 及其下游信号通路的表达均增强^[12],提示 NOD2 与高血糖相关,抑制 NOD2 改善糖尿病小鼠的心肌损害有可能是抑制高血糖介导的炎症反应的一种间接效应。

2.3 NOD2 与内膜增生及移行

血管损伤后的内膜增生和移行与血管成形术后狭窄以及高血压、动脉粥样硬化等多种心血管疾病密切相关^[13],血小板源性生长因子(PDGF)可以通过激活 ERK、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)等信号介导内膜增生^[14]。Kwon 等^[15]在股动脉损伤小鼠模型上观察到,敲除 NOD2 可以促进 PDGF 引起的血管平滑肌细胞的增殖、迁移及新生内膜的形成,运用 PI3K 抑制剂和 MDP 可以抑制这一现象,提示 NOD2 具有抑制内膜增生和血管平滑肌迁移的作用。另外,在 NOD2 敲除小鼠中,血管平滑肌细胞 TLR2 和 TLR4 的表达只有轻微增加,但脾中 TLR2 的表达却大幅增加,这与 Zong 等^[6]的研究相似。有研究显示,TLR2 和 TLR4 可以促进血管内膜增生。小鼠敲除 TLR4 后,PDGF 刺激引起的内膜增生减少^[16],TLR2 和 TLR4 的共同抑制剂能通过抑制 PI3K 信号通路抑制 PDGF 介导的老鼠血管平滑肌细胞增殖、迁移和脂质积聚^[17];牙龈卟啉单胞菌感染小鼠后,可以通过 TLR2 和 TLR4 相关的信号通路调控损伤血管的内膜增生^[18-19]。NOD2 敲除后内膜增生是否与 TLR2 和 TLR4 有关需要进一步验证。

缺氧可使小鼠肺动脉平滑肌细胞 NOD2 表达增加,在缺氧条件下,NOD2 敲除小鼠与野生型小鼠相比,其血管重构、血管平滑肌肥大以及肺动脉高压都加重^[20],提示在慢性阻塞性肺疾病和其他缺氧性疾病中 NOD2 可能有延缓心力衰竭发生的作用。

2.4 NOD2 与动脉粥样硬化

动脉粥样硬化是冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑梗死、外周血管疾病的主要病理原因。Yuan 等^[21]用牙龈卟啉单胞菌感染载脂蛋白 E(ApoE)、NOD2 基因双敲小鼠,发现与 ApoE 单敲小鼠相比,其血清总胆固醇水平明显升高,主动脉及主动脉窦病变增加,炎症因子表达水平升高,未被感染的双敲小鼠与 ApoE 单敲小鼠相比同样可以观察到动脉粥样硬化加重,提示 NOD2 有延缓动脉粥样硬化发展的作用。在该研究中,NOD2 敲除小鼠的 TLR2 和其下游蛋白表达增加,进一步用 MDP 刺激牙龈卟啉单胞菌感染的 ApoE 敲除小鼠,发现其 NOD2 和 RIP2 的表达增加,而 IKK β 、NF- κ B 和 TNF- α 的表达却下降,由于牙龈卟啉单胞菌感染能促进 TLR2 介导的动脉粥样硬化^[22],这一结果提示 NOD2 在感染中的保护作用可能是通过抑制 TLR2 信号通路实现的。Levin 等^[23]在巨噬细胞 RIP2 特异性敲除大鼠中也发现动脉粥样斑块增加,考虑与 RIP2 敲除后 TLR4 表达增加有关,TLR4 抑制剂可抑制 RIP2 敲除引起的脂质聚集。以上结果提示 NOD2 在动脉粥样硬化形成中的作用与 TLR2 和 TLR4 有关。而 Johansson 等^[24]的研究得到了相反的结果,其用 MDP 刺激低密度脂蛋白(LDL)受体敲除小鼠,最终加重了小鼠的血管炎症反应,促进了动脉粥样硬化的形成。MDP 刺激可以促进氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)的吸收,加速泡沫细胞的形成,增加巨噬细胞的浸润,通过 p38 和 NF- κ B 信号通路使炎症因子表达增加。而 Johansson 等^[24]发现 NOD2 敲除小鼠的主动脉病变和炎症介质的表达并没有明显变化,仅富脂质的坏死区域面积减小约 25%。

2.5 NOD2 与心肌梗死

心肌梗死多发生在冠状动脉粥样硬化狭窄的基础上,心脏血供中断或供血不足导致心肌缺血坏死。研究显示,固有免疫系统的活化与心肌梗死的发生有密切关系^[25]。Li 等^[26]发现小鼠梗死心肌区域 NOD2 的表达水平显著升高,而 NOD2 基因敲除小鼠梗死心肌区域炎症介质和趋化因子的表达水平显著降低,基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的活性也被抑制,心肌梗死后心室重构和心肌功能得到改善,提示 NOD2 参与心肌梗死引起的炎症反应。

2.6 NOD2 与心肌缺血再灌注损伤

血管及时再通可挽救心肌梗死患者的生命,但

伴随的缺血再灌注损伤却成为另一需要解决的难题。研究发现,NOD2 基因敲除可以改善缺血再灌注损伤,减少缺血再灌注条件下的炎性因子水平以及炎性细胞浸润^[27]。Liu 等^[28]发现,NOD2 通过活化 JNK、p38MAPK 以及 NF- κ B 信号通路,促进心肌细胞凋亡,加重炎性反应,促进了缺血再灌注损伤;同时 NOD2 被 MDP 激活后可以抑制肿瘤坏死因子 α 诱导蛋白 8-2(TIPE2)的表达,而 TIPE2 的过度表达可以抑制 NOD2 介导的信号通路,减轻缺血再灌注损伤。抑制 TLR4 可以使小鼠心脏缺血再灌注损伤减轻^[29-30]。LPS 激活 TLR4 后也可以下调 TIPE2 的表达,而当 TIPE2 过度表达时又反过来抑制 TLR4 的活化效应^[31]。O'Neill 等^[32]发现热休克蛋白 90 (HSP90) 抑制剂可以通过抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻肾脏缺血再灌注损伤。HSP90 在生理情况下能与 NOD2 结合,维持静息状态下 NOD2 的稳定性,当 NOD2 被 MDP 激活后,HSP90 便从 NOD2 上解离下来,继而 NOD2 被降解^[33],这或许能解释 Mayor 等^[34]发现的 HSP90 抑制剂能够抑制 NOD2 介导的 NF- κ B 信号通路的活化,同时提示 HSP90 抑制剂具有减轻肾脏缺血再灌注损伤的作用,并参与 NOD2 信号通路,这种机制可能同样存在于心脏。

2.7 NOD2 与血栓

血小板活化在血栓形成中具有重要作用。Zhang 等^[35]发现人和鼠的血小板上都表达 NOD2,用 MDP 刺激 NOD2 虽不能单独引起血小板聚集,但可以增强凝血酶和胶原引起的血小板聚集和 ATP 释放;MDP 刺激后加速了血小板的收缩,但不影响血小板的铺展,在促进止血的同时也增加了血栓形成的风险。

3 NOD2 与 TLR2 和 TLR4

NOD2 与 TLR2/TLR4 作为 PRR,在被活化后,都能激活 MAPK 以及 NF- κ B 信号通路^[36],虽然属于不同家族,但是 NOD2 与 TLR2/TLR4 之间存在一定的相互作用。Tsai 等^[7]认为 NOD2 对 TLR4 信号通路具有双向调控作用,即 MDP 刺激巨噬细胞后,NOD2 对 TLR4 介导的 NF- κ B 信号通路有正向调控作用,而在用 siRNA 抑制 NOD2 后,同样增强了 LPS 刺激 TLR4 引起的炎性反应。Kim 等^[37]发现用 LPS 或 TLR2 的激动剂脂磷壁酸 (LTA) 预刺激巨噬细胞,可以增强 24 h 后 MDP 刺激引起的炎性反应;而用 MDP 预处理,也增强了

24 h 后 LPS 或 LTA 刺激介导的炎性反应;在 RIP2 敲除后则不会出现这些变化,表明 RIP2 在其中具有重要作用。这些研究说明 NOD2 与 TLR2/TLR4 在固有免疫中的相互作用,在研究 NOD2 与心血管疾病的关系时,应考虑到这一方面。

参 考 文 献

- [1] Strober W, Murray PJ, Kitani A, et al. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2[J]. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(1):9-20.
- [2] McGovern DP, van Heel DA, Ahmad T, et al. NOD2 (CARD15), the first susceptibility gene for Crohn's disease [J]. *Gut*, 2001, 49(6):752-754.
- [3] Tschöpe C, Muller I, Xia Y, et al. NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain 2) is a major pathogenic mediator of Coxsackievirus B3-induced myocarditis[J]. *Circ Heart Fail*, 2017, 10(9):e003870.
- [4] Miteva K, Pappritz K, Sosnowski M, et al. Mesenchymal stromal cells inhibit NLRP3 inflammasome activation in a model of coxsackievirus B3-induced inflammatory cardiomyopathy[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):2820.
- [5] Shimizu I, Minamino T. Physiological and pathological cardiac hypertrophy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 97(1):245-262.
- [6] Zong J, Salim M, Zhou H, et al. NOD2 deletion promotes cardiac hypertrophy and fibrosis induced by pressure overload [J]. *Lab Invest*, 2013, 93(10):1128-1136.
- [7] Tsai WH, Huang DY, Yu YH, et al. Dual roles of NOD2 in TLR4-mediated signal transduction and -induced inflammatory gene expression in macrophages [J]. *Cell Microbiol*, 2011, 13(5):717-730.
- [8] Richardson WM, Sodhi CP, Russo A, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 inhibits toll-like receptor-4 signaling in the intestinal epithelium[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(3):904-917.
- [9] Watanabe T, Kitani A, Murray PJ, et al. Nucleotide binding oligomerization domain 2 deficiency leads to dysregulated TLR2 signaling and induction of antigen-specific colitis [J]. *Immunity*, 2006, 25(3):473-485.
- [10] Higashikuni Y, Tanaka K, Kato M, et al. Toll-like receptor-2 mediates adaptive cardiac hypertrophy in response to pressure overload through interleukin-1 β upregulation via nuclear factor κ B activation[J]. *J Am Heart Assoc*, 2013, 2(6):e000267.
- [11] Shen L, Li L, Li M, et al. Silencing of NOD2 protects against diabetic cardiomyopathy in a murine diabetes model [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(6):3017-3026.
- [12] Shiny A, Regin B, Balachandrar V, et al. Convergence of innate immunity and insulin resistance as evidenced by increased nucleotide oligomerization domain (NOD) expression and signaling in monocytes from patients with type 2 diabetes[J]. *Cytokine*, 2013, 64(2):564-570.

- [13] Tian DY, Jin XR, Zeng X, et al. Notch signaling in endothelial cells: is it the therapeutic target for vascular neointimal hyperplasia? [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18 (8):e1615.
- [14] Li PC, Sheu MJ, Ma WF, et al. Anti-restenotic roles of dihydroaustrasulfone alcohol involved in inhibiting PDGF-BB-stimulated proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. *Mar Drugs*, 2015, 13(5):3046-3060.
- [15] Kwon MY, Liu X, Lee SJ, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain protein 2 deficiency enhances neointimal formation in response to vascular injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(11):2441-2447.
- [16] Zhang LL, Gao CY, Fang CQ, et al. PPAR γ intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells[J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 92 (3):484-493.
- [17] Liu Q, Li JP, Liang QL, et al. Sparstolonin B suppresses rat vascular smooth muscle cell proliferation, migration, inflammatory response and lipid accumulation [J]. *Vascul Pharmacol*, 2015, 67-69:59-66.
- [18] Kobayashi N, Suzuki J, Ogawa M, et al. Porphyromonas gingivalis promotes neointimal formation after arterial injury through toll-like receptor 2 signaling [J]. *Heart Vessels*, 2014, 29(4):542-549.
- [19] Kobayashi N, Suzuki JI, Aoyama N, et al. Toll-like receptor 4 signaling has a critical role in Porphyromonas gingivalis-accelerated neointimal formation after arterial injury in mice[J]. *Hypertens Res*, 2016, 39 (10):717-722.
- [20] Kwon MY, Hwang N, Park YJ, et al. NOD2 deficiency exacerbates hypoxia-induced pulmonary hypertension and enhances pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(16):12671-12681.
- [21] Yuan HP, Zelka S, Burkatovskaya M, et al. Pivotal role of NOD2 in inflammatory processes affecting atherosclerosis and periodontal bone loss[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(52):e5059-e5068.
- [22] Pan S, Lei L, Chen S, et al. Rosiglitazone impedes Porphyromonas gingivalis-accelerated atherosclerosis by downregulating the TLR/NF- κ B signaling pathway in atherosclerotic mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23 (2):701-708.
- [23] Levin MC, Jirholt P, Wramstedt A, et al. Rip2 deficiency leads to increased atherosclerosis despite decreased inflammation[J]. *Circ Res*, 2011, 109(11):1210-1218.
- [24] Johansson ME, Zhang XY, Edfeldt KA, et al. Innate immune receptor NOD2 promotes vascular inflammation and formation of lipid-rich necrotic cores in hypercholesterolemic mice[J]. *Eur J Immunol*, 2014, 44(10):3081-3092.
- [25] Frangogiannis NG. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair[J]. *Circ Res*, 2012, 110(1):159-173.
- [26] Li X, Li F, Chu Y, et al. NOD2 deficiency protects against cardiac remodeling after myocardial infarction in mice [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(6):1857-1866.
- [27] Zhang H, Zhu T, Liu W, et al. TIPE2 acts as a negative regulator linking NOD2 and inflammatory responses in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2015, 93(9):1033-1043.
- [28] Liu Y, Yang H, Liu LX, et al. NOD2 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and inflammation [J]. *Life Sci*, 2016, 149:10-17.
- [29] Shigeoka AA, Kambo A, Mathison JC, et al. Nod1 and nod2 are expressed in human and murine renal tubular epithelial cells and participate in renal ischemia reperfusion injury[J]. *J Immunol*, 2010, 184(5):2297-2304.
- [30] Wang YH, Chen KM, Chiu PS, et al. Lumbrokinase attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting TLR4 signaling[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2016, 99: 113-122.
- [31] Zhang Y, Shao Z, Zhang X, et al. TIPE2 play a negative role in TLR4-mediated autoimmune T helper 17 cell responses in patients with myasthenia gravis [J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2015, 10(4):635-644.
- [32] O'neill S, Humphries D, Tse G, et al. Heat shock protein 90 inhibition abrogates TLR4-mediated NF- κ B activity and reduces renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:12958.
- [33] Lee KH, Biswas A, Liu YJ, et al. Proteasomal degradation of Nod2 protein mediates tolerance to bacterial cell wall components[J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(47):39800-39811.
- [34] Mayor A, Martinon F, De Smedt T, et al. A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses [J]. *Nat Immunol*, 2007, 8(5):497-503.
- [35] Zhang S, Zhang S, Hu L, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain 2 receptor is expressed in platelets and enhances platelet activation and thrombosis[J]. *Circulation*, 2015, 131(13):1160-1170.
- [36] Caruso R, Warner N, Inohara N, et al. NOD1 and NOD2: signaling, host defense, and inflammatory disease [J]. *Immunity*, 2014, 41(6):898-908.
- [37] Kim YG, Park JH, Shaw MH, et al. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to toll-like receptor ligands [J]. *Immunity*, 2008, 28(2):246-257.

(收稿:2018-12-11 修回:2019-04-14)
(本文编辑:胡晓静)