巨噬细胞自噬与动脉粥样硬化

杨 洋 夏 豪 李 晶 刘浙波

摘 要 动脉粥样硬化是以脂蛋白堆积、炎性细胞浸润为特征的慢性炎性疾病,自噬是依赖溶酶体系统进行分解代谢的自我保护过程,巨噬细胞自噬参与了动脉粥样硬化的发生、发展,本文主要探讨巨噬细胞自噬与动脉粥样硬化之间的关系、可能机制及以自噬为潜在靶点治疗动脉粥样硬化的最新进展。

关键词 巨噬细胞 自噬 动脉粥样硬化 机制

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.10.038

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是一种严重危害人类健康的常见病,是冠心病、脑梗死和外周血管病等缺血性心脑血管病的主要病理基础。AS 的发生机制尚未完全阐明,存在多种学说,临床上缺乏有效的防治药物。巨噬细胞、血管平滑肌细胞以及血管内皮细胞在动脉粥样硬化的发生、发展中都起着重要作用,但是近年来巨噬细胞的作用引起研究者越来越多的关注。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、炎性介质,影响 AS 斑块进展。斑块中巨噬细胞凋亡以及胞葬作用缺陷,也会促进斑块坏死,从而导致斑块的不稳定,血栓形成,最终引起急性心脑血管事件。自噬又叫自食,研究发现,巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化发生、发展中起着保护作用,它具有抑制炎性反应、抗细胞凋亡、促进胆固醇外流等作用。这为治疗动脉粥样硬化提供了新的研究方向。本文主要探讨巨噬细胞自噬与动脉粥样硬化之间关系,可能机制及以自噬为靶点治疗动脉粥样硬化的最新研究进展。

一、自噬的定义与调控机制

细胞自噬是广泛存在于真核细胞中维持细胞内环境稳态的一种自我保护机制,在营养缺乏、组织缺氧、氧化应激等环境压力下被激活,细胞内的病原体、异常的蛋白质、细胞器和部分胞质成分等通过自噬作用被包裹、自我消化,降解以被循环利用,从而维持细胞的正常代谢功能和生存。许多证据表明,自噬与许多疾病的发生、发展密切相关,包括恶性肿瘤、神经退行性疾病、心血管疾病、免疫性疾病等[1~3]。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81270184)

作者单位:430060 武汉大学人民医院心内科

通讯作者:夏豪,博士生导师,电子信箱:xiahao1966@163.com

目前,根据包裹胞质物质及转运方式的不同,细胞自噬可以分为巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬,但目前研究最广泛的是巨自噬,也就是通常所称的自噬。自噬的过程可分为自噬的发生、自噬体的形成、自噬体与溶酶体融合成自噬溶酶体并降解物质的 3 个阶段[4]。在自噬发生过程中,首先是来源不明的分隔膜凹陷形成月牙形或杯状的双层膜结构,将部分细胞质及受损细胞器包裹,形成具有双层膜结构的自噬体,随后自噬体降解膜表面的外壳蛋白(LC3 - Ⅱ)后与溶酶体融合形成单层膜的自噬溶酶体,自噬体中的包含物被降解,将产物诸如氨基酸、脂肪酸之类输送到胞质中,重新利用供能,残渣则被排出细胞外或滞留于胞质。30 多种自噬相关基因(autophagy related gene,Atg)及编码的自噬相关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 Beclin1,Atg5,微管相关蛋白(LC3) - Ⅱ等。其中 LC3 - Ⅱ及双层膜的自噬体可作为检测自噬活性的重要标志物。

目前为止,两种主要的信号通路已经被阐明:一种抑制通路,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路,即 Class Ⅰ PI_3K - mTOR 信号通路,一种诱导通路,磷酸酰肌酶 3 激酶(PI_3K)通路,即 Class - Ⅲ PI_3K - Beclin1 信号通路[5]。当丰富的营养素、生长因子、胰岛素存在并与膜受体结合时,Ⅰ类 PI_3K(Class Ⅰ PI_3K)就会被诱导从而通过信号蛋白 AKT 通路引发哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及雷帕霉素靶蛋白复合体(mTORC1)的激活,进而抑制自噬通路最初的启动蛋白 Atg1,从而阻止自噬体形成。当营养缺乏,活性氧等压力刺激时,Class Ⅲ PI_3K - Beclin1 复合体就会被激活,从而促进 Atg12 - Atg5 - Atg16L 复合体和 Atg8/LC3 的合成,随后自噬体合成,自噬过程便被诱导。

二、巨噬细胞与动脉粥样硬化的关系

巨噬细胞属于单核－吞噬细胞系统，前体为从骨髓进入血液循环的单核细胞，其通过内皮渗出到组织并分化为巨噬细胞。他们主要负责吞噬细胞外病原体、细胞碎片，抗原表达和激活适应性免疫系统，而促炎或抗炎细胞因子的分泌则取决于他们的激活状态[6]。近年来巨噬细胞对动脉粥样硬化的发生、发展，促进血管壁炎症方面的作用得到了广泛的认可[7]。内皮下脂蛋白的过度堆积可激活内皮细胞分泌趋化因子引起单核细胞向内膜迁移。近来一些研究表明通过趋化因子/趋化因子受体封锁降低循环单核细胞或防止与内皮细胞的相互作用可显著降动脉粥样硬化斑块的负担[8]。

成熟分化的巨噬细胞通过 Toll 样受体和清道夫受体吞噬低密度脂蛋白，并在溶酶体内被水解为未结合胆固醇，一部分未结合胆固醇被运送到细胞膜等处通过 ATP 结合盒转运子 A1（ATP binding cassettetransporter A1，ABCA1）和 ATP 结合盒转运子 G1（ATP binding cassette transporter G1，ABCG1）等转运到细胞外，另一部分运送到内质网由乙酰胆固醇酰基转移酶 1（acetyl cholesterol acyltransferase 1，ACAT1）转化为胆固醇酯并在细胞质中积聚形成脂肪滴，当脂肪滴占据大量细胞质的体积后，巨噬细胞转化为泡沫细胞。受体介导的细胞内吞作用，细胞内脂质水解和代谢，脂质的重新包装储存构成了经典的泡沫细胞形成过程。另外脂蛋白的修饰及其内部化的吸收也会导致下游炎症通路的激活，促炎细胞因子的分泌，从而建立一个正反馈回路进一步促进单核细胞招募和内膜的迁移。巨噬细胞凋亡造成的 AS 斑块形态学改变（尤其是帽/核比值的变小），也会影响斑块易损性，从而造成斑块的不稳定。另外泡沫细胞清除率降低以及泡沫细胞凋亡也会进一步激活炎性反应，促进血管内膜的生长与坏死核的形成，增加斑块破裂的风险性[9]。总之，巨噬细胞自噬作为一种代偿机制，可以通过影响炎性反应、细胞凋亡及脂质流出等减轻上述因素对斑块的不良影响。

三、巨噬细胞自噬对细胞凋亡、炎性反应的影响

如今，许多研究者已经达成了一种共识，在动脉粥样硬化斑块中，基础水平的细胞自噬起着重要的细胞保护作用，可对抗氧化应激，减少细胞凋亡，增加斑块的稳定性。Maatinet 等[10]发现，7－酮基胆固醇（7－ketocholesterol，7－KC）是一种自噬诱导物，能够有效降低血管平滑肌细胞凋亡从而促进斑块的稳定性。相反，过度诱导自噬则可能导致血管平滑肌细胞和血管内皮细胞自噬性细胞死亡，胶原蛋白的合成减少，纤维帽的变薄，最终导致斑块破裂的风险增加。在动脉粥样硬化斑块中，虽然自噬在血管内皮细胞，平滑肌细胞和巨噬细胞方面都扮演重要角色，但是巨噬细胞自噬却引起学者更广泛的关注。

2012 年 4 月发表在《细胞代谢》上的两篇文章让人们对自噬功能有了更全面的认识。Liao 等[11]指出自噬可抑制斑块内巨噬细胞凋亡及有缺陷的胞葬作用，在高脂喂养的 $Ldlr^{-/-}$ 小鼠中，通过敲除自噬基因 Atg5 引起自噬缺失，会导致细胞凋亡与氧化应激（主要发生在巨噬细胞），增强斑块坏死，表明自噬能够抗细胞凋亡，并保护 AS 斑块中巨噬细胞对抗活性氧、内质网及 7－KC 等 AS 压力。Razani 等[12]提供的证据表明，自噬功能受损的自噬缺陷，在某种程度上会引起炎症体活化，进一步促进 AS 的发展。这两篇文章的作者使用 LC3/Atg8、自噬体膜相关受体蛋白 p62/SQSTM1 和双层膜自噬小体作为自噬标志物。其中 p62/SQSTM1 是一个自噬降解底物，其积累表明自噬不足。Liao 等发现西方饮食增加了 p62/SQSTM1，却相对减少 mRNA 的表达，进一步证明 p62/SQSTM1 积累和自噬之间存在相关性。此外，有研究者发现自噬也可能通过减少炎症的激活和炎症体的形成起到抑制细胞凋亡的作用[13]。

四、巨噬细胞自噬对胆固醇流出的影响

巨噬细胞胆固醇逆向运输（RCT）是指胆固醇从巨噬细胞流出运用 apoA－Ⅰ或高密度脂蛋白作为载体运输回肝脏，最后再由肝脏以胆汁或胆汁酸的形式排出体外的过程。因此巨噬细胞胆固醇流出，是第 1 步也是 RCT 过程的主要步骤。细胞内胆固醇逆转运由多个胆固醇转运蛋白调节，最具代表性的分别为三磷酸腺苷结合盒转运蛋白 A－1（ABCA－1）、三磷酸腺苷结合盒转运蛋白（ABCG－1）和 B 族Ⅰ型清道夫受体（SR－BI），它们统称为胆固醇流出调节蛋白。ABCA1 主要介导胆固醇运送至 apoA－Ⅰ，在 apoA－Ⅰ介导胆固醇转运中起到关键限速作用。而 ABCG1 and SR－B1 主要介导胆固醇运送到成熟的 HDL 过程。最近，Fu 等[14]发现 ABCA12 缺失，可增加 ABCA1 降解，巨噬细胞来源泡沫细胞的形成中胆固醇的积累，破坏巨噬细胞 RCT 过程，促进 AS 发展。他们证明了 ABCA12 可调节 ABCA1 依赖的巨噬细胞胆固醇流出，加强巨噬细胞胆固醇流出的过程可有效地减少巨噬细胞来源泡沫细胞的形成，促进斑块的稳

定性。

长期以来，脂滴(LDs)一直被认为是一种简单的能量储存器。然而，随着对 LDs 认识的增加，研究发现他们往往是动态的多功能细胞器，在胆固醇流出中扮演的着重要角色。有证据表明，当细胞无法吸收多余的自由胆固醇时，则先酯化成无毒的酯类(CEs)，然后储存在 LDs 中。脂滴由极性单分子层(如磷脂和胆固醇)、非极性核心(如 CEs、甾醇酯和甘油三酯)以及表面的许多功能蛋白构成。而与脂滴相关的蛋白主要包括 perilipin、TIP47、DGAT2，起到检测 LDS 标志物的作用[15]。因此，探讨如何提高胆固醇从 LDS 流出巨噬细胞已经成为治疗动脉粥样硬化研究重点。

研究发现，自噬可促进巨噬细胞胆固醇从 LDS 流出。这种特殊类型的选择性自噬被称为脂自噬(lipophagy)[16]。其主要机制是自噬体与溶酶体融合后，LDS 上的 CEs 由特定的酶水解成游离胆固醇，再通过细胞膜传输，然后由 apoA－Ⅰ或高密度脂蛋白运输到肝脏代谢[17]。Quimetet 等[18]认为自噬调节胆固醇从巨噬细胞流出是通过溶酶体酸性脂肪酶(LAL)实现的，LDS 通过巨噬细胞脂自噬被运送到溶酶体中继而 CEs 再通过 LAL 在溶酶体中被水解，最后，依赖 ABCA1 通路介导巨噬细胞泡沫细胞胆固醇流出。此外，LeGuezennec 等[19]展示了野生型 P53 诱导磷酸酶 1(Wip1)依赖的通路调节自噬对动脉粥样硬化斑块巨噬细胞胆固醇流出影响。鼠缺乏 Wip1 磷酸酶，将降低蛋白激酶 Atm 依赖的信号调节，抑制脂肪堆积和巨噬细胞向泡沫细胞的转化，从而防止通过 Atm－mTOR 信号通路和 Wip1 依赖的选择性自噬。这些数据显示，自噬在巨噬细胞胆固醇流出所发挥的积极作用。

五、药物对自噬的干预在动脉粥样硬化治疗中的潜在作用

基础水平的自噬可以保护细胞抵御各种环境压力，对粥样斑块起着保护作用。因此近年来许多研究者开始以调控细胞自噬作为治疗靶点，用以稳定动脉粥样硬化斑块。各种诱导剂包括一些中药成分已经被证明可有效调节细胞自噬，对动脉粥样硬化的防治起着重要作用。

已有报道称 MTOR 抑制剂在许多恶性肿瘤如乳腺癌，肾细胞癌治疗方面都具有重要的意义。依维莫司是 MTOR 抑制剂中一种研究最广泛的自噬诱导物。在神经退行性疾病的治疗研究中许多研究者发现依维莫司通过抑制 MTOR 诱导细胞自噬可增加有毒物质的清除。由于依维莫司具有自噬的诱导效用，因此它在 AS 的治疗方面引起广泛关注。有证据表明依维莫司可促进斑块的稳定性。最近 Holdaas 等[20]报道称，依维莫司的应用可显著降低冠状动脉内膜的增厚及心脏异体移植血管病变的发生率。结合其他临床研究发现，运用依维莫司洗脱支架是防止心脏移植或其他心脏外科手术后血管再狭窄，心脏异体移植血管病变发生的最佳选择。

白藜芦醇是另外一种通过抑制 MTOR 发挥作用的自噬诱导剂。它是一种植物来源的多酚提取液，主要在葡萄、花生、红酒等中发现。因为传统上认为这种化合物具有抗氧化、抗炎等特性，所以它在对抗各种类型的疾病方面发挥着重要的保护作用，包括心血管疾病、恶性肿瘤、肾脏疾病、感染以及某些神经性失调。也有报道表明白藜芦醇在抗动脉粥样硬化及血管舒张方面发挥重要作用。例如，Liu 等[21]证明在 RAW264.7 细胞中白藜芦醇可以通过激活 Sirt1 调节的自噬促进其对氧化低密度脂蛋白(oxLDL)诱导的凋亡细胞的胞葬作用。这些都表明了白藜芦醇在体外实验 AS 方面发挥保护作用，白藜芦醇对 sirt－1 调节通路的自噬的激活可能将成为 AS 潜在的治疗措施。但是也有研究者发现当白藜芦与阿托伐他汀共同应用时，它并不能增加阿托伐他汀抗动脉粥样硬化的作用。因此当白藜芦醇和其他减脂药物共同使用时，其各自的药理功能还需要进行更多的研究给予更充分的证明。

近年来研究发现某些中药及其有效成分可调节多种细胞自噬，比如说黄连素，一种重要的生物碱，是我国应用很久的中药。可从黄连、黄柏、三颗针等植物中提取，它具有抗心力衰竭、抗心律失常、改善胰岛素抵抗、降低胆固醇等作用。因而在心血管系统和神经系统疾病方面将有广泛、重要的应用前景。最近 Fan 等[22]证明黄连素在抗 AS 方面起到保护性作用，他们发现黄连素的运用可以通过诱导细胞自噬抑制 J774A.1 细胞的炎性反应，这种调节主要通过 AMPK/mTOR 信号通路发挥作用。芹菜素另一种存在于多种中药当中的一种天然的黄酮类化合物，如紫巧地了、玄参、密蒙花等具有清热解毒功效的中药中都已经被检测出含有一定比例的芹菜素。芹菜素具有多种生物学活性和药理作用，包括抗炎、抗肿瘤、神经保护、调节免疫抑制细胞增殖等。王群[23]通过体外实验发现芹菜素不仅能诱导巨噬细胞源性泡沫细

胞发生 caspase 依赖的凋亡,还能诱导自噬小体的形成从而发生自噬。而自噬抑制后不仅激活 caspase 通路,还加速了 Bax 的活化而激活线粒体凋亡通路。此项研究在中药防治动脉粥样硬化的未来,结合自噬抑制策略从而调控 AS 的进展的防治方面上提供了新的方向和思路。

巨噬细胞自噬参与了动脉粥样硬化的发生、发展。在氧化应激,oxLDL 等刺激下,巨噬细胞自噬被激活,受损伤的细胞器,异常蛋白被清除,从而抑制了细胞凋亡,维护细胞胞葬作用,促进胆固醇外流。尽管自噬对动脉粥样硬化的保护机制逐渐被揭晓,但是对它的认识仍然存在不足,许多机制仍需要去探究。如今虽然许多自噬诱导剂在治疗动脉粥样硬化方面被证明具有一定的效果,但是最佳剂量及可能存在的不良反应仍需要给予充分的描述。综上所述,通过自噬调控巨噬细胞在动脉粥样硬化中的作用,将会为动脉粥样硬化的治疗提供新的靶点。

参考文献

1 Qi H, Su FY, Wan S, *et al*. The antiaging activity and cerebral protection of rapamycin at micro – doses[J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(11): 991 – 998

2 He PX, Che YS, He QJ, *et al*. G226, a novel epipoly – thiodioxopiperazine derivative, induces autophagy and caspase – dependent apoptosis in human breast cancer cells in vitro[J]. Acta Pharmacol Sin, 2014;35(8): 1055 – 1064

3 Shao BZ, Wei W, Ke P, *et al*. Activating cannabinoid receptor 2 alleviates pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis via activation of autophagy and inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. CNS Neurosci Ther, 2014, 20(12): 1021 – 1028

4 孙源超, 秦训思, 陈宏, 等. 细胞自噬发生的表观遗传调节[J]. 遗传, 2014, 36(5): 447 – 455

5 Salabei JK, Conklin DJ. Cardiovascular autophagy: crossroads of pathology, pharmacology and toxicology[J]. Cardiovasc Toxicol, 2013, 13(3): 220 – 229

6 Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(11): 723 – 737

7 Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance[J]. Nat Reviews Immunol, 2013, 13(10): 709 – 721

8 Koenen RR, Weber C. Therapeutic targeting of chemokine interactions in a Therosclerosis[J]. Natu Rev Drug Disc, 2010, 9(2): 141 – 153

9 Leyk MY, Hedrick CC. Monocyte and macrophage dynamics during athrogenesis[J]. Arterioscl Throm Vas, 2011, 31(7): 1506 – 1516

10 Martinet W, Schrijvers DM, Timmermans JP, *et al*. Interactions between cell death induced by statins and 7 – ketocholesterol in rabbit aorta smooth muscle cells[J]. Br J Pharmacol, 2008, 154(6): 1236 – 1246

11 Liao X, Sluimer JC, Wang Y, *et al*. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis[J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 545 – 5318

12 Razani B, Feng C, Coleman T, *et al*. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression[J]. Cell Metab, 2012, 15(4): 534 – 544

13 Li R, Ji Z, Qin H, *et al*. Interference in autophagosome fusion by rare earth nanoparticles disrupts autophagic flux and regulation of an interleukin – 1beta producing inflammasome[J]. ACS Nano, 2014, 8(10): 10280 – 10292

14 Fu Y, Mukhamedova N, Ip S, *et al*. ABCA12 regulates ABCA1 – dependent cholesterol efflux from macrophages and the development of atherosclerosis[J]. Cell Metab, 2013, 18(2): 225 – 238

15 Ouimet M, Marcel YL. Regulation of lipid droplet cholesterol efflux from Foam cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(3): 575 – 581

16 Narabayashi K, Ito Y, Eid N, *et al*. Indomethacin suppresses LAMP – 2 expression and induces lipophagy and lipoapoptosis in rat enterocytes via the ER stress pathway[J]. Int J Cell Biol, 2015, 50(5): 541 – 554

17 Liu K, Czaja MJ. Regulation of lipid stores and metabolism by lipophagy[J]. Cell Death Differ, 2013, 20(1): 3 – 11

18 Ouimet M, Franklin V, Mak E, *et al*. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase[J]. Cell Metab, 2011, 13(6): 655 – 667

19 Le Guezennec X, Brichkina A, Huang YF, *et al*. Wip1 – dependent regulation of autophagy, obesity, and atherosclerosis[J]. Cell Metab, 2012, 16(1): 68 – 80

20 Holdaas H, Potena L, Saliba F. mTOR inhibitors and dyslipidemia in transplant recipients: a cause for concern? [J]. Transplant Rev, 2015, 29(2): 93 – 102

21 Liu B, Zhang B, Guo R, *et al*. Enhancement in efferocytosis of oxidized low – density lipoprotein – induced apoptotic RAW264.7 cells through Sirt1 – mediated autophagy[J]. Int J Mol, Med 2014, 33(3): 523 – 533

22 Fan X, Wang J, Hou J, *et al*. Berberine alleviates ox – LDL induced inflammatory factors by up – regulation of autophagy via AMPK/mTOR signaling pathway[J]. J Transl Med, 2015, 13: 92

23 王群. 芹菜素调控巨噬细胞自噬和调亡防治动脉粥样硬化的机制研究[D]. 南方医科大学, 2015: 3

(收稿日期:2016 – 03 – 13)
(修回日期:2016 – 03 – 25)