

巨噬与细胞泡沫化在动脉粥样硬化中的研究进展

杨永兆 陈 鹏

摘 要 泡沫细胞是积聚于动脉粥样硬化病变部位的主要细胞,参与了脂质斑块的形成和发展。研究发现,血管平滑肌细胞和巨噬细胞大量吞噬脂质后会向泡沫细胞转化,而激活基础自噬可以介导脂质的逆向转运,减少泡沫细胞形成。本文综述了自噬以及细胞泡沫化与动脉粥样硬化的关系,为动脉粥样硬化的防治提供参考。

关键词 巨噬 细胞泡沫化 泡沫细胞 动脉粥样硬化

中图分类号 R965

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.09.004

随着人们生活水平的提高和全球人口老龄化的加剧,心血管疾病(cardiovascular diseases, CVDS)已成为威胁人类生命健康的主要因素之一,其发生率和病死率已经超过恶性肿瘤而跃居首位,成为近年来主要疾病负担^[1]。作为 CVDS 的主要发病基础,动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)与缺血性心脏病、缺血性脑卒中和外周动脉疾病等密切相关^[2]。据文献报道,富含胆固醇酯的泡沫细胞(foam cell, FC)是 AS 斑块的重要组成部分,FC 坏死会诱发大量炎性细胞因子释放,并最终导致 AS 斑块的进展和不稳定^[3]。因此,在逆转 AS 进程方面,阻止 FC 形成和坏死一直备受关注。即使有各种各样的药物和疗法可用,但目前仍没有针对 FC 来治疗 AS 的有效方法。已有研究表明,自噬可以促进脂滴降解为胆固醇,并促进后者的外排,有利于 AS 的转归,提示通过靶向调节自噬,减少 FC 内脂质沉积有望成为 AS 治疗的新策略^[4]。本文就自噬在细胞泡沫化形成中的作用与 AS 的关系做重点阐述,为 AS 的防治研究提供理论依据。

一、细胞泡沫化与 AS

血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)、血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)和巨噬细胞(macrophages, M ϕ)是 AS 发生、发展过程中的 3 种关键细胞,都参与了 FC 的形成^[5]。FC 根据来源不同被划分为两类,即 M ϕ 源性 FC 和 VSMC 源性 FC^[6]。

M ϕ 源性 FC 的形成是 AS 早期病变的标志性事

件^[7]。早期内皮损伤后,伴随着炎症的发生,VEC 通透性增强,低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)携带大量胆固醇透过 VEC,聚集到 VEC 的间隙中,随后 VEC 表达单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)和血管细胞黏附分子 1(vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1),诱导单核细胞黏附到血管内膜并分化为 M ϕ , M ϕ 被激活后,通过产生 NO、超氧化物阴离子、羟基自由基等活性氧介导 LDL 氧化修饰,形成氧化型低密度脂蛋白胆固醇(oxidized low density lipoprotein cholesterol, ox-LDL-C),随后 ox-LDL-C 被 M ϕ 表达的清道夫受体 CD36、CD68、SR-A、SRB1 等迅速识别, M ϕ 捕获吞噬修饰后的 LDL,导致大量胆固醇在胞内蓄积,进而转化为 FC,随着 M ϕ 泡沫化程度的加深和非受体介导的大颗粒脂蛋白吞噬,胆固醇酯在胞内不断堆积,形成早期脂质条纹病变^[8~10]。

长期以来,人们一直认为 AS 病变部位的 FC 全部来源于 M ϕ ,然而,有研究者在人体的研究中发现, VSMC 也是 FC 的主要来源之一^[11]。AS 的发展期,在血小板源生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)和成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)的共同刺激下,位于动脉中膜的 VSMC 迁入内膜,与 M ϕ 类似, VSMC 在炎症刺激下发生表型转化,转化为具有与 M ϕ 相似吞噬功能的细胞,大量摄取 ox-LDL 形成 FC,随着 VSMC 源性 FC 的大量聚集,斑块纤维帽形成^[12]。

无论是 M ϕ 源性 FC 还是 VSMC 源性 FC,它们都参与了斑块的形成和发展。早期 M ϕ 源性 FC 在内膜的聚集,促进了脂纹的形成,随着脂质的不断堆积,大量 VSMC 发生增殖、迁移和表型转化,在内膜中蓄积吞噬脂质,位于脂纹深层的 VSMC 会发生凋亡,引起

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81860641)

作者单位:650500 昆明医科大学药学院暨云南省天然药物药理重点实验室

通信作者:陈鹏,教授,博士生导师,电子信箱:ynkmcp@gmail.com

M ϕ 进一步积聚和微泡,而后者可以钙化,促进脂纹转化为纤维斑块,斑块中胆固醇在 FC 里大量沉积,会导致 FC 分泌基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs),降解斑块中的胶原纤维,同时 FC 通过凋亡、自噬等机制不断死亡吸引更多的 M ϕ 迁移到内膜区域,形成恶性循环,进一步加剧 AS 斑块的不稳定性^[13]。总之,FC 堆积是 AS 的标志,其数量反映了 AS 发病的严重程度。

二、细胞自噬及其调控因子

细胞自噬(autophagy)是一种主要通过形成溶酶体系统来降解自身受损细胞器、异常蛋白等物质的生理过程。当细胞受到理化刺激,如饥饿、缺氧时,可通过自噬的方式来维持细胞的健康状态^[14]。根据细胞内物质的转运方式和降解机制的不同,可将自噬分为 3 类,即巨自噬、微自噬和分子伴侣介导的自噬。其中巨自噬参与了 AS 脂质代谢过程,因此,本文主要综述巨自噬在细胞泡沫化中的作用。

由于自噬在生物进化过程中高度保守,其调控机制十分复杂,至今尚未完全阐明。目前,与调控细胞自噬有关的基因被统一命名为自噬相关基因(auto-phagy-related gene, ATG),这些基因编码的不同蛋白参与了细胞自噬过程的各个环节,形成了多个复杂的调控网络^[15]。其中微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Beclin1、p62 等是自噬调控的关键蛋白,可作为自噬发生的标志^[16]。Beclin1 是 Atg6 在哺乳动物中的同源基因,在自噬的起始阶段,其与 III 型磷脂酰肌醇-3-激酶(PI₃K III)形成复合物,募集自噬特异性蛋白定位到自噬泡,参与自噬体的形成,其表达量随着自噬程度加深而增加^[17]。此外,unc-51 样激酶 1(Ulk1)在这个过程中会与 Atg5、Atg12、Atg13 和 Atg16 相互作用,之后泛素样蛋白 Atg12 和 Atg8/LC3 结合,参与自噬体的延伸和成熟^[18, 19]。与 Beclin1 类似,LC3 是 Atg8 在哺乳动物中的同源物,包括 LC3-I 和 LC3-II 两种亚型。在自噬体形成过程中,LC3-I 经泛素化处理转化为 LC3-II,之后 LC3-II 靶向结合到自噬体膜上,促进自噬体的成熟,LC3-II 的含量或 LC3-II/LC3-I 的值与自噬泡的数量呈正相关^[20]。最终,成熟的自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体,此时,多功能蛋白 p62 可将泛素化底物连接到自噬小体中,使泛素化的底物降解,同时自身也被降解^[21]。而降解过程形成的小分子物质又可为细胞代谢提供营养和原料。这个阶段,p62 蛋白的升高,提示细胞自噬活性受到抑制^[22]。

三、巨自噬与细胞泡沫化

1. 概述:在 AS 发展过程中,过量的游离胆固醇对 VSMC 和 M ϕ 来说是有毒的,为了维持自身的正常生理功能,二者会启动复杂的反馈机制来减少胆固醇的摄入,当胆固醇代谢失衡后,胆固醇酯便在 VSMC 和 M ϕ 中积聚形成 FC。现有证据表明,FC 中的脂滴主要由胆固醇酯构成,自噬激活有利于脂滴降解为胆固醇并促进其逆向转运,减少脂质在 FC 中的聚积,从而抑制 FC 的形成,延缓 AS 进展^[23]。因此,自噬对维持 VSMC 和 M ϕ 脂质代谢平衡显得尤为重要。

2. 巨自噬与巨噬细胞泡沫化:M ϕ 是一种基本的免疫吞噬细胞,在 AS 斑块中大量存在,参与了 AS 发生、发展的全过程,M ϕ 源性 FC 的出现被认为是 AS 早期的关键信号。Yang 等^[24]指出,自噬可减轻斑块内 M ϕ 浸润和泡沫化程度,在高脂饲料喂养的载脂蛋白 E 基因缺失(ApoE^{-/-})小鼠中,抑制能诱导自噬的调节因子 SIRT1 后,ApoE^{-/-}小鼠 AS 病变部位斑块面积增大,FC 增多。此外,在 ox-LDL 诱导的 M ϕ 源性 FC 模型中,通过敲除 SIRT1 引起自噬缺陷,M ϕ 中 p62 的表达升高,同时 Beclin1 和 LC3-II/LC3-I 的值均降低,M ϕ 泡沫化增强,而过表达 SIRT1 后上述情况出现逆转,表明自噬能保护 M ϕ 免受脂质侵害。然而,该研究主要使用体外研究的方法,具有一定局限性,面对复杂的体内微环境,SIRT1 是否控制 ApoE^{-/-}小鼠的自噬过程还需要进一步验证。Wang 等^[25]同样认为 M ϕ 自噬可减少 FC 形成,抑制 AS 发展,敲除基因 SIRT6 后,M ϕ 中 p62 的表达升高,LC3-II 表达降低,自噬受损,M ϕ 源性 FC 形成增多,加剧了 AS 斑块的不稳定性,而过表达 SIRT6 显著增加了 M ϕ 的自噬通量,FC 形成减少的同时,还抑制了血管细胞黏附分子-1(VCAM-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)和 P-选择素的表达,使 M ϕ 和 FC 的浸润均减少,斑块稳定性增加。另有研究发现,通过激活 SIRT1 介导的自噬,可促进 M ϕ 向 M2 型转化,减少 FC 的形成并减轻 AS^[26]。上述研究表明,上调自噬对 M ϕ 泡沫化具有保护作用,但所选靶基因均过于单一,仍有许多靶点尚待探索。

3. 巨自噬与血管平滑肌细胞泡沫化:与 M ϕ 源性 FC 比较,VSMC 源性 FC 形成后会稳定存在于 AS 斑块中无法脱离,因此,VSMC 源性 FC 的形成和发展可能与斑块稳定性关系更大。当 VSMC 内脂质代谢失衡时,自噬会被激活。Li 等^[27]研究证实,自噬激活可减少 VSMC 内脂质堆积,抑制其泡沫化,在原代培养

的小鼠胸主动脉 VSMC 中,通过 ox-LDL 诱导泡沫化模型,敲除自噬相关基因 Atg7,自噬受到抑制,VSMC 内脂滴堆积增加并伴随胆固醇水平升高,当激活 PPAR γ 介导的自噬途径后,VSMC 中 Beclin1 的表达和 LC3-II/LC3-I 的值均显著增加,VSMC 泡沫化程度减弱。此外,Li 等^[28]的另一项研究再次证实了自噬对 VSMC 泡沫化的保护作用,在 ApoE^{-/-}小鼠中,特异性敲除 VSMC 中 SCAP(一种胆固醇传感器)后,小鼠斑块中自噬相关蛋白 p62 表达降低,LC3 表达升高,小鼠斑块面积减小,此外,在 SCAP 敲除的 VSMC 中,自噬体数量增加,p62 表达水平降低,自噬被激活,VSMC 中的脂质积累减少,其泡沫化程度降低。在近年来的一项研究中也得出了与上述同样的结论,在敲除自噬必需基因 Atg5 后,自噬缺失,VSMC 内胆固醇外排受阻,脂质沉积增加,促进了 VSMC 源性 FC 的形成^[29]。以上研究说明,自噬在调节 VSMC 源性 FC 形成中起着难以替代的作用,但这些研究应用的主要是体内模型,对于体外模型仍有待于深入研究。

四、以巨自噬调控细胞泡沫化为靶点的 AS 防治策略探索

AS 是一种与脂质代谢紊乱相关的慢性炎症性疾病,其特征是脂质的异常积累和 FC 的大量沉积。作为 AS 的主要病理成分之一,FC 的蓄积会加剧斑块的不稳定性,因此,抑制 FC 的形成可以有效预防 AS 和急性心血管事件的发生。大量研究表明,自噬通过调节脂质代谢参与了 FC 的形成,自噬的激活可以减少细胞内脂质的积累并促进胆固醇流出,从而减缓 AS 的发展。Zheng 等^[30]研究发现,阿托伐他汀通过 AMPK/mTOR 途径促进脂肪自噬来抑制 FC 的形成。于红红等^[31]研究证实,黄连解毒汤含药血清可以通过 Akt/mTOR 通路激活自噬抑制 M ϕ 源性 FC 形成,以起到抗 AS 作用。Ma 等^[32]研究表明,毛蕊异黄素(calycosin)通过上调 KLF2-MLKL 介导的自噬来抑制 ApoE^{-/-}小鼠 AS 斑块中的细胞泡沫化,增强了斑块稳定性。另有研究发现,天麻素可通过激活 AMPK-FoxO1-TFEB 信号轴诱导溶酶体生物发生和细胞自噬,从而增强细胞内的胆固醇外流,减少了脂质的积聚并防止了 FC 的形成^[33]。此外,丁畅等^[34]在体外 AS 模型中研究发现,荷叶碱可抑制 PI $_3$ K/Akt/mTOR 信号通路激活自噬来减少 FC 的形成并改善 AS。值得一提的是降糖药二甲双胍也可以通过激活自噬对 CVDS 起到保护作用。近年来 Wu 等在小鼠 AS 模型中研究二甲双胍,发现了其通过激活 KLF2 介导的自

噬抑制细胞泡沫化来抗 AS 的新机制。由此可见,有较多研究支持自噬通过调控细胞泡沫化改善 AS 病变,并且对药物的研究并不局限于传统的抗 AS 药物。

五、展 望

M ϕ 和 VSMC 是构成 AS 病灶中的两大主要细胞,在推动 AS 病程发展过程中起着至关重要的作用。此外,AS 病变标志物 FC,来源于脂质代谢失衡的 M ϕ 和 VSMC,FC 的大量形成和堆叠坏死是推动 AS 斑块朝不稳定方向发展的罪魁祸首。作为细胞维持正常生理功能的途径,自噬在调控 FC 内脂质运输,维持胆固醇稳态方面作用显著。因而,从细胞自噬调控 M ϕ 和 VSMC 泡沫化的角度来探索 AS 的防治无疑是一个更有前景的方向。尽管在过去的几年中,AS 与自噬的报道逐渐增多,但我们对这一领域仍然知之甚少,还有许多问题有待于阐明。值得注意的是,自噬的激活并不总是有利于 AS 的治疗。自噬的过度激活会导致 FC 自噬性死亡,促进 AS 发展。考虑到自噬的双重效应,未来需要进一步权衡自噬对 AS 的抑制和促进作用,根据 AS 发生、发展和病理变化的情况来精准把控干预自噬的时间点、自噬激活的强度和持续时间,确保对自噬的调控总是朝着对 AS 病情有利的方向发展。对于治疗药物而言,目前已经报道了许多自噬诱导剂对 AS 的有利作用,但这些药物大都对多种细胞自噬都有调控功能,缺乏特异性。开发出安全性更高、靶向性更强的药物仍然是未来药物研发的目标。另外,目前对于自噬的研究还主要集中在 PI $_3$ K/Akt/mTOR 这条经典通路上,其他通路的研究还有待于拓展。总之,通过干预自噬调控 M ϕ 和 VSMC 泡沫化来防治 AS 及以自噬为着力点的药物开发将是未来很长一段时间的研究热点之一。

参考文献

- 1 Chang AY, Skirbekk VF, Tyrovolas S, *et al.* Measuring population ageing: an analysis of the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet Public Health*, 2019, 4(3): e159-e167
- 2 Poznyak AV, Wu WK, Melnichenko AA, *et al.* Signaling pathways and key genes involved in regulation of foam cell formation in atherosclerosis[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 584-594
- 3 Nogiec A, Bzowska M, Demczuk A, *et al.* Phenotype and response to PAMPs of human monocyte-derived foam cells obtained by long-term culture in the presence of oxLDLs[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 1592-1610
- 4 Zheng S, Du Y, Ye Q, *et al.* Atorvastatin enhances foam cell lipophagy and promotes cholesterol efflux through the AMPK/mTOR pathway[J]. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 2020, 77(4): 508-518

- 5 De Munck DG, De Meyer GR, Martinet W. Autophagy as an emerging therapeutic target for age - related vascular pathologies[J]. Expert Opin Ther Targets, 2020, 24(2): 131 - 145
- 6 Ma C, Xia R, Yang S, *et al.* Formononetin attenuates atherosclerosis via regulating interaction between KLF4 and SRA in apoE(- / -) mice[J]. Theranostics, 2020, 10(3): 1090 - 1106
- 7 Barrett TJ. Macrophages in atherosclerosis regression[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2020, 40(1): 20 - 33
- 8 Cao H, Jia Q, Yan L, *et al.* Quercetin suppresses the progression of atherosclerosis by regulating MST1 - mediated autophagy in ox - LDL - induced RAW264. 7 macrophage foam cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(23): 6093 - 6109
- 9 Tong Y, Cai L, Yang S, *et al.* The research progress of vascular macrophages and atherosclerosis [J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 7308736
- 10 Ishikawa M, Toyomura J, Yagi T, *et al.* Role of growth hormone signaling pathways in the development of atherosclerosis [J]. Growth Horm IGF Res, 2020, 53 - 54: 101334
- 11 Chappell J, Harman JL, Narasimhan VM, *et al.* Extensive proliferation of a subset of differentiated, yet plastic, medial vascular smooth muscle cells contributes to neointimal formation in mouse injury and atherosclerosis models[J]. Circulation Research, 2016, 119(12): 1313 - 1323
- 12 Basatemur GL, Jorgensen HF, Clarke MCH, *et al.* Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis[J]. Nat Rev Cardiol, 2019, 16(12): 727 - 744
- 13 Shen C, Wang T, Jiang J, *et al.* Bergaptol from blossoms of Citrus aurantium L. var. amara Engl inhibits LPS - induced inflammatory responses and ox - LDL - induced lipid deposition[J]. Food Funct, 2020, 11(6): 4915 - 4926
- 14 Graef M. Recent advances in the understanding of autophagosome biogenesis[J]. F1000Res, 2020, 9: 212
- 15 Bu F, Yang M, Guo X, *et al.* Multiple Functions of ATG8 family proteins in plant autophagy[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 466 - 478
- 16 Huang Y, Tao W, Yang S, *et al.* Autophagy: novel insights into therapeutic target of electroacupuncture against cerebral ischemia/ reperfusion injury [J]. Neural Regeneration Research, 2019, 14(6): 954 - 961
- 17 Bilanges B, Posor Y, Vanhaesebroeck B. PI₃K isoforms in cell signalling and vesicle trafficking[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(9): 515 - 534
- 18 Sasaki Y, Ikeda Y, Iwabayashi M, *et al.* The impact of autophagy on cardiovascular senescence and diseases[J]. Int Heart J, 2017, 58(5): 666 - 673
- 19 Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin - like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein modifications: beyond the usual suspects' review series [J]. EMBO Reports, 2008, 9(9): 859 - 864
- 20 Meng Y, Lou X, Yang L, *et al.* Role of the autophagy - related marker LC3 expression in hepatocellular carcinoma: a Meta - analysis [J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2020, 146(5): 1103 - 1113
- 21 Sengupta A, Mukherjee S, Ghosh S, *et al.* Partial impairment of late - stage autophagic flux in murine splenocytes leads to sqstm1/p62 mediated nrf2 - keap1 antioxidant pathway activation and induced proteasome - mediated degradation in malaria[J]. Microb Pathog, 2020, 147: 104289
- 22 Peng H, Yang J, Li G, *et al.* Ubiquitylation of p62/sequestosome1 activates its autophagy receptor function and controls selective autophagy upon ubiquitin stress[J]. Cell Research, 2017, 27(5): 657 - 674
- 23 Ma Y, Huang Z, Zhou Z, *et al.* A novel antioxidant Mito - Tempol inhibits ox - LDL - induced foam cell formation through restoration of autophagy flux[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 129: 463 - 472
- 24 Yang X, Wei J, He Y, *et al.* SIRT1 inhibition promotes atherosclerosis through impaired autophagy [J]. Oncotarget, 2017, 8(31): 51447 - 51461
- 25 Wang T, Sun C, Hu L, *et al.* Sirt6 stabilizes atherosclerosis plaques by promoting macrophage autophagy and reducing contact with endothelial cells[J]. Biochem Cell Biol, 2020, 98(2): 120 - 129
- 26 Luo Y, Lu S, Gao Y, *et al.* Araloside C attenuates atherosclerosis by modulating macrophage polarization via Sirt1 - mediated autophagy [J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(2): 1704 - 1724
- 27 Li B, Liao S, Yin Y, *et al.* Telmisartan - induced PPARgamma activity attenuates lipid accumulation in VSMCs via induction of autophagy[J]. Mol Biol Rep, 2015, 42(1): 179 - 186
- 28 Li D, Chen A, Lan T, *et al.* SCAP knockdown in vascular smooth muscle cells alleviates atherosclerosis plaque formation via up - regulating autophagy in ApoE(- / -) mice[J]. FASEB J, 2019, 33(3): 3437 - 3450
- 29 Pi S, Mao L, Chen J, *et al.* The P2RY12 receptor promotes VSMC - derived foam cell formation by inhibiting autophagy in advanced atherosclerosis[J]. Autophagy, 2021, 17(4): 980 - 1000
- 30 Zheng S, Du Y, Ye Q, *et al.* Atorvastatin enhances foam cell lipophagy and promotes cholesterol efflux through the AMP - activated protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 77(4): 508 - 518
- 31 于红红, 俞琦, 许滔, 等. 黄连解毒汤含药血清对 ox - LDL 诱导的 RAW264. 7 源性泡沫细胞模型自噬及炎症反应的影响[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 3828 - 3832
- 32 Ma C, Wu H, Yang G, *et al.* Calycosin ameliorates atherosclerosis by enhancing autophagy via regulating the interaction between KLF2 and MLKL in apolipoprotein E gene - deleted mice[J]. Br J Pharmacol, 2022, 179(2): 252 - 269
- 33 Tao J, Yang P, Xie L, *et al.* Gastrodin induces lysosomal biogenesis and autophagy to prevent the formation of foam cells via AMPK - FoxO1 - TFEB signalling axis[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(12): 5769 - 5781
- 34 丁畅, 银萍, 赵奇, 等. 荷叶碱通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路促进自噬减少巨噬细胞泡沫化的机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2020, 36(7): 1230 - 1236

(收稿日期: 2022 - 01 - 11)

(修回日期: 2022 - 01 - 28)