

特约综述

NADPH 氧化酶介导的氧化还原信号转导在高同型半胱氨酸血症中的作用及分子机制

李国华 魏欣冰 张岫美 易凡*

(山东大学医学院药理学研究所, 济南 250012)

摘要 同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含硫氨基酸, 是甲硫氨酸代谢的中间产物。目前大量的临床试验及流行病学研究证实, 高同型半胱氨酸血症(血浆中同型半胱氨酸浓度大于 15 $\mu\text{mol/L}$)是一些硬化性疾病的一个独立危险因素, 其中包括动脉粥样硬化、冠心病、阿尔茨海默氏病、糖尿病、终末期肾病及其相关的心血管并发症等。由 NADPH 氧化酶介导的氧化应激被认为是高同型半胱氨酸血症重要的病理生理机制之一。本文将在国内外相关研究的基础上, 结合我们课题组在研究高同型半胱氨酸血症所致肾小球损伤中的研究成果, 对 NADPH 氧化酶在高同型半胱氨酸血症中的调控机制及生理意义做一简要综述。

关键词 高同型半胱氨酸血症; NADPH 氧化酶; 氧化应激; 硬化性疾病

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含硫氨基酸, 是甲硫氨酸代谢的中间产物。健康人血浆中同型半胱氨酸水平为 5~15 $\mu\text{mol/L}$, 含量大于 15 $\mu\text{mol/L}$ 时被称为高同型半胱氨酸血症(hyperhomocysteinemia, hHcy)。早期研究认为 hHcy 是致动脉粥样硬化和相关的心血管疾病的危险因素, 目前大量的临床试验及流行病学研究渐渐证实, hHcy 同样也是一些硬化性疾病(sclerotic diseases)的一个独立危险因素, 其中包括阿尔茨海默氏病(Alzheimer diseases)、糖尿病(diabetes)、终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)及其相关的心血管并发症^[1-8]。氧化应激(oxidative stress)被认为是 hHcy 重要的病理生理机制之一。大量的研究表明高浓度的 Hcy 可以引起活性氧(reactive oxygen species, ROS)的大量生成, 发生氧化应激, 并通过相关氧化还原信号通路最终影响细胞的结构和功能^[9]。其中, NADPH 氧化酶产生的 ROS 被认为是在生理条件下重要来源之一。Hcy 与 NADPH 氧化酶介导的氧化还原信号转导已成为相关研究领域的一个热点^[10]。在本篇综述中, 将对 NADPH 氧化酶介导的氧化还原信号转导在 hHcy 中的分子机制和致病机制作一简要综述。

酸。在体内 Hcy 代谢途径主要有 2 种方式: (1) 甲基化形成甲硫氨酸: Hcy 在甲硫氨酸合成酶作用下, 同时维生素 B₁₂ 作为辅助因子, 接受 N5 甲基四氢叶酸提供的甲基, 重新合成甲硫氨酸; (2) 分解代谢缩合形成胱硫醚: Hcy 在胱硫醚- β -合成酶催化作用下, 以维生素 B₆ 为辅助因子, 与丝氨酸缩合成胱硫醚。胱硫醚又在 γ -胱硫醚酶作用下进一步裂解为半胱氨酸, 最后分解形成丙酮酸、硫酸和水(Hcy 代谢路径见图 1)。血浆中 Hcy 以结合形式或游离形式存在, 其中 Hcy 约 70%~90% 与蛋白结合存在, 其余为游离的形式。通常所说的血浆 Hcy 水平是指总的 Hcy 含量。正常血浆中 Hcy 浓度为 5~15 $\mu\text{mol/L}$, 高于此范围便称为 hHcy, 15~30 $\mu\text{mol/L}$ 为轻度 hHcy, 30~100 $\mu\text{mol/L}$ 为中度 hHcy, 大于 100 $\mu\text{mol/L}$ 为重度 hHcy^[11]。自从首先发现 hHcy 和动脉粥样硬化及血栓的密切联系后, 现已证实它与包括心血管病、神经系统疾病、糖尿病、肾病及妊娠在内的多种疾病有关, 现在 hHcy 已被认为是一个独立的致病因子。其中, 影响体内 Hcy 浓度的因素主要有以下几个方面: (1) 遗传因素: 这包括在 Hcy 代谢过程中几种关键酶基因突变或其活性受损所致, 如亚甲基四氢叶酸还原酶(MTHFR)

1 同型半胱氨酸和高同型半胱氨酸血症

Hcy 是甲硫氨酸脱甲基形成的一种含硫氨基

* 通讯作者。Tel: 0531-88382616; Fax: 0531-88382616; E-mail: fanyi@sdu.edu.cn

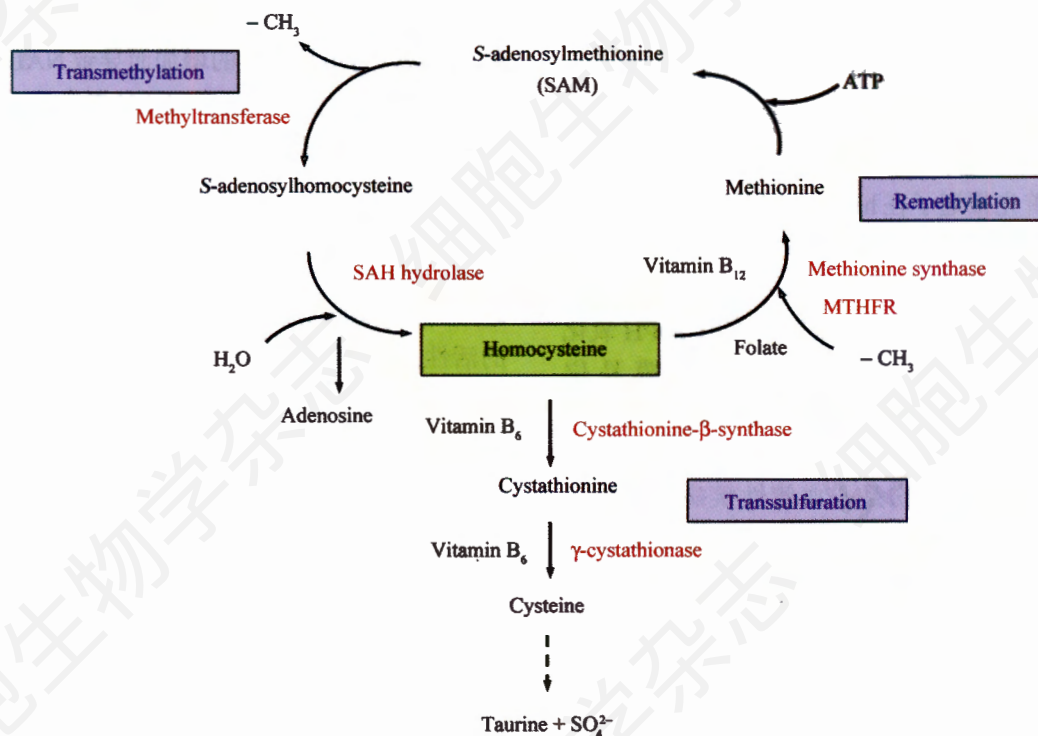


Fig.1 Homocysteine metabolism

Homocysteine (Hcy) is metabolized by two alternative pathways, including its remethylation and transsulfuration. The remethylation pathway regenerates methionine by methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) using Hcys as a substrate and folate and vitamin B₁₂ as cofactors. Another pathway responsible for the Hcys metabolism is its transsulfuration which is catalyzed by two sequentially acting enzymes, namely cystathionine-β-synthase and γ-cystathionase.

的基因或参与甲基化的合成酶及胱硫醚-β-合成酶基因缺陷等。(2)营养因素: 叶酸、维生素 B₆、维生素 B₁₂ 等维生素的缺乏, 可导致 Hcy 升高。另外, 肾功能损伤和随着老年化, 也会引起 Hcy 浓度升高^[11]。

2 活性氧和NADPH氧化酶

ROS 是一类氧衍生的分子, 包括超氧阴离子 (superoxide, O₂⁻)、过氧化氢 (hydrogen peroxide, H₂O₂)、羟自由基 (hydroxyl radical) 及各种脂质过氧化反应的产物。线粒体偶联的酶、细胞色素 P450、黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase) 及 NADPH 氧化酶 (NADPH oxidase, NOX) 都能产生 ROS。ROS 参与细胞内许多信号转导, 进而调控细胞的生长、分裂、分化、迁移、凋亡及衰老等生理活动, 并证实和许多疾病的发生发展有密切的关系^[12]。虽然在不同的组织和细胞中多种酶可以产生 ROS 引发氧化应激, 但越来越多的研究表明在生理条件下 NADPH 氧化酶是产生 ROS 最主要的来源^[12]。NADPH 氧化酶分布在各个组织和细胞中, 包括吞噬细胞、平滑肌细胞、

内皮细胞、上皮细胞、纤维细胞和神经细胞等。不断地研究表明, NADPH 氧化酶除了参与宿主防御, 更重要的是作为信使参与细胞结构和功能的调节。现已证明通过不同组织细胞内 NADPH 氧化酶的激活来产生大量的 O₂⁻ 是导致细胞功能损伤的重要诱发机制^[13,14]。NADPH 氧化酶首先发现在吞噬细胞中, 其催化亚基 gp91^{phox} (NOX2) 和调节亚基 p22^{phox} 在细胞膜上形成异二聚体 (又称为黄素细胞色素 b 558), 同时受到一些主要位于胞浆分子 (p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} 以及 Rac 蛋白) 的调节。之后, 又相继在非吞噬细胞型中发现了 6 种在结构与功能上都与吞噬细胞 gp91^{phox} (NOX2) 的同源蛋白 NOX1、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1 和 DUOX2, 所以统称做 NOX 家族。当这些位于胞膜或胞浆的分子集聚在胞膜上形成一个大的复合体并位于一个载体平台上时, 其酶被激活^[15,16]。在这里, 结合我们研究小组的一些研究结果, 将对 Hcy 激活 NADPH 氧化酶和 NADPH 氧化酶介导的氧化还原信号通路在 hHcy 中的作用机制做一综述。

3 同型半胱氨酸调控 NADPH 氧化酶活性的分子机制及生理作用

不同的组织和细胞中, Hcy 调控 NADPH 氧化酶活性的分子机制及生理作用不同。在心血管系统中, Becker 等^[17]首先报道了在 hHcy 大鼠动物模型的心肌组织中, NADPH 氧化酶亚基 p22^{phox} 表达升高, 同时胞浆上的亚基如 p47^{phox}, p67^{phox} 以及 Rac 的表达不变但在胞膜上含量升高, 证实 Hcy 对调控 NADPH 氧化酶亚基表达和胞浆亚基蛋白向细胞膜易位 (translocation) 的作用。有报道认为, Hcy 对血管内皮细胞损伤被认为与 NADPH 氧化酶介导的氧化应激有关^[18]。内皮细胞损伤是心血管性疾病的关键环节。Hcy 调控 NADPH 氧化酶活性而引起 ROS 水平升高的直接作用是使 NO 舒血管作用丧失, 导致内皮功能障碍。在血管内皮细胞中, 发现高浓度的 Hcy 可以刺激 NADPH 氧化酶的活化和 p22^{phox} 表达的升高^[17]。Tyagi 等^[19]在微血管内皮细胞中证实, Hcy 是通过激活蛋白酶激活受体 4 (protease-activated receptor 4) 而引起 NADPH 氧化酶的表达和活性升高的。同时, Hcy 对 NADPH 氧化酶的调控也参与了 Hcy 在心血管疾病中的免疫调节作用^[20,21]。Hcy 可以诱导单核细胞和 T 细胞分泌趋化因子和细胞因子, 还可以直接刺激 B 细胞增殖及 IgG 分泌。已有研究证实 NADPH 氧化酶参与了这些过程的调控。有报道指出 Hcy 通过增加 NADPH 氧化酶的活性导致氧化还原因子 -1 (redox factor-1, Ref-1) 表达和易位, 从而诱导细胞内核转录因子 κ B (NF- κ B) 的激活^[22]。活化的 NF- κ B 可促进单核细胞分化而来的巨噬细胞表达单核细胞趋化因子 -1 (MCP-1), 介导粥样硬化斑块内的炎症反应^[23,24]。在中性粒细胞中, Hcy 可以增强 N-甲酰-甲硫氨酸-亮氨酸-苯丙氨酸 (formyl methionyl-leucyl-phenyl alanine, fMLP) 诱导 NADPH 氧化酶的活性。通过激活 NADPH 氧化酶来促进 ROS 的产生^[25]。fMLP 受体是一种 G 蛋白耦合性受体 (G protein coupled receptors), 参与磷脂酶 C 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 通路活性的调节。

在肾脏系统中, hHcy 能够导引起肾小球硬化和损伤^[1,5,26]。我们研究小组首次证实了在肾小球系膜细胞中, Hcy 刺激体内神经酰胺 (ceramide) 合成, 继而通过鸟嘌呤核苷酸交换因子 (guanine nucleotide exchange factor) Vav2 的活性来活化 Rac 蛋白^[27,28], Rac 通过 GTP 获能后与 NADPH 氧化酶的质膜亚单位结合并招募其他胞质亚单位, 从而激活 NADPH 氧化酶

生成过量的 ROS, 并且证实 Hcy 在肾脏中是由于引起 Rac 的活化而不是表达的增加而导致 NADPH 氧化酶的激活^[29]。在进一步就 NADPH 氧化酶介导的氧化还原信号转导在 hHcy 所致肾小球损伤中的分子机制研究中, 我们发现, Hcy 调控 NADPH 氧化酶活性引起的 ROS 水平升高促进金属蛋白酶组织抑制剂 -1 (tissue inhibitor of metalloproteinase 1, TIMP-1) 的表达, 下调金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 的活性, 减少细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 降解, 导致肾小球胶原累积膨胀, 引起硬化坏死^[30]。特别是, 在 Hcy 导致的肾小球损伤中, 肾小球内皮层可能是 Hcy 首先引起肾小球损伤的目标。近期的研究表明 Hcy 诱导的内皮细胞的损伤导致肾小球毛细血管的通透性提高, 引起血液中诸如白蛋白等成分滤出肾小球毛细血管, 进而不可逆转地导致肾小球系膜细胞的损伤, 最终导致肾小球的损伤或硬化。在对 hHcy 导致肾小球内皮细胞损伤的最新研究中, 发现脂筏 - 氧化还原信号转导平台的形成参与了 Hcy 对 NADPH 氧化酶活性的调控。近年来, 关于脂筏 (lipid raft) 的研究正成为一个热点。脂筏是细胞膜上富含鞘脂 (sphingolipid) 和胆固醇 (cholesterol) 的微区段^[31]。在内外源因素的刺激下, 脂筏中的鞘脂能在酸性鞘脂酶 (acid sphingomyelinase, ASM) 的作用下发生水解, 释放出亲水性的磷酸胆碱 (phosphorycholine) 基团, 生成的疏水性基团 - 神经酰胺具有自发集成的特性, 能将细胞膜上众多的小脂筏簇聚成更大的膜区段 (microdomain), 这又叫神经酰胺富含区域 (ceramide-enriched domain), 为跨膜信号转导所涉及的众多分子的相互作用提供一个很好的信号转导平台 (signaling platform)^[32-34], 便于活性酶复合体的形成, 从而易化 (facilitate) 或放大 (amplify) 众多跨膜信号的转导, 这其中包括 G 蛋白耦联的信号转导, 氧化还原信号转导等^[35]。我们的前期研究发现 Hcy 刺激体内神经酰胺的合成。这为肾小球内皮细胞在 Hcy 作用下发生脂筏的簇聚, 进而形成信号转导的平台提供了重要的基础。我们最新研究成果表明, 在 Hcy 的刺激下, 肾小球内皮细胞膜上的小脂筏在神经酰胺的作用下可发生簇聚, 形成平台, 与 ROS 生成有关的 NADPH 氧化酶复合体相关的分子如 gp91^{phox}、p47^{phox}、p22^{phox}、p67^{phox}、Rac 等及其调节分子汇聚到脂筏平台, 形成有活性的 NADPH 全酶活性复合体, 进而导致 NADPH 酶的激活, 最终产生大量的超氧阴离子和过氧化氢, 发生氧化应激, 通过调节微管网络 (microtubule network) 相

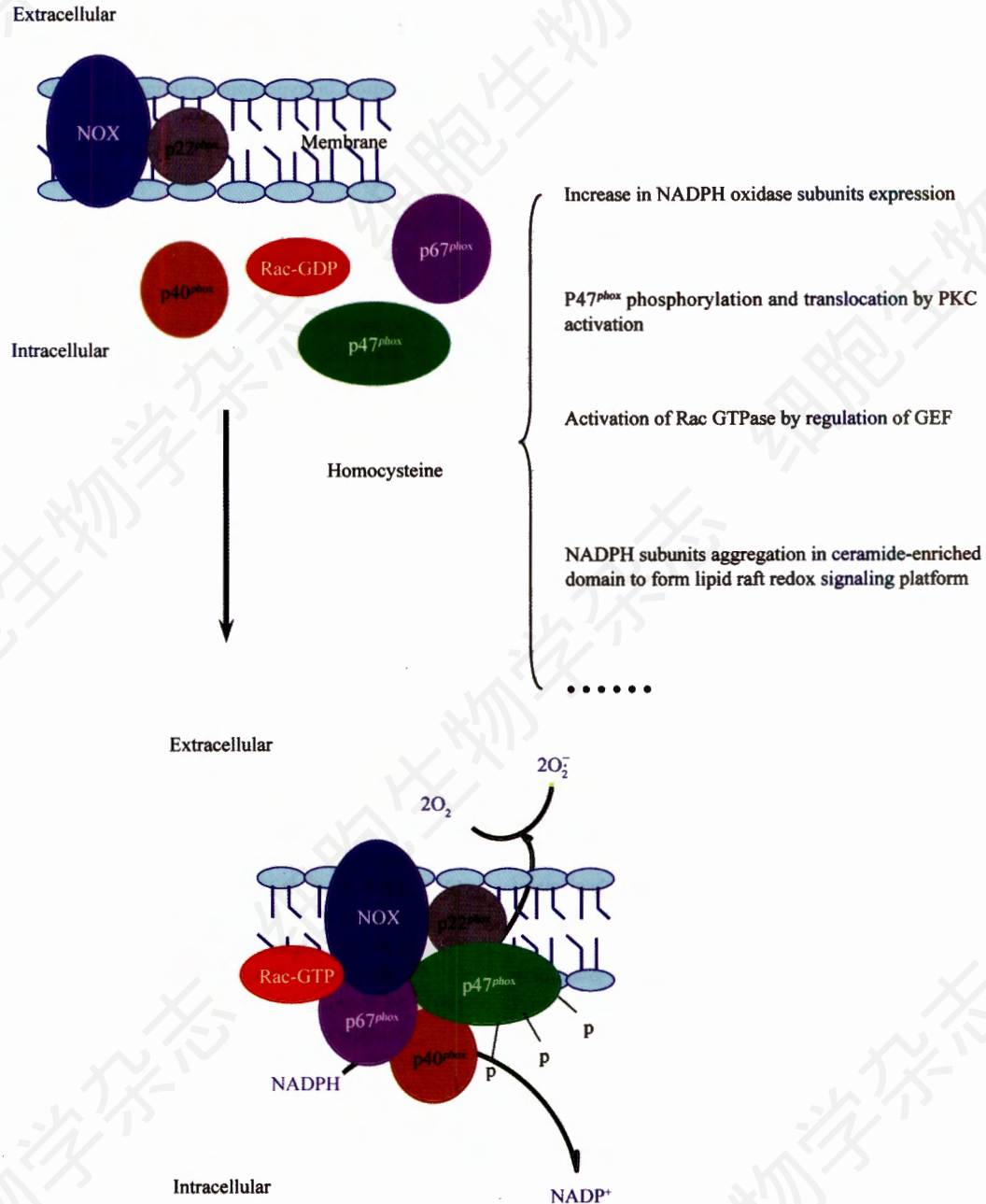


Fig.2 Summarized mechanisms of homocysteine-induced NADPH oxidase activity

关蛋白的表达和微管稳定性,影响细胞骨架结构,提高肾小球内皮细胞的通透性,最终引起肾小球损伤或硬化^[36]。这为hHcy的致病机制提供了一个全新的概念和思路。相关的Hcy调控NADPH氧化酶活性的分子机制见图2。

4 小结与展望

总之, hHcy 作为一些硬化性疾病的一个独立危险因素已经逐渐得到大家的共识, 其致病机制虽有待

进一步研究和探讨, 但由NADPH氧化酶介导的氧化应激在hHcy中的致病机制已引起人们的关注。本文就是在此基础上, 结合我们课题组在研究hHcy所致肾小球损伤中的相关研究成果, 对NADPH氧化酶在hHcy中的调控机制及生理意义做一简要综述。如果能从NADPH氧化酶介导的氧化应激的角度进一步研究在hHcy中各环节信号转导分子的调节因素及其相互之间的作用机制, 鉴定出关键的转导分子, 设计相关药物靶点, 这对于治疗和预防hHcy所引起的相

关疾病将具有重要的理论指导意义。

参考文献(References)

- [1] Gupta A, Robinson K. Hyperhomocysteinemia and end stage renal disease, *J Nephrol*, 1997, 10(2): 77-84
- [2] Irizarry MC. Biomarkers of Alzheimer disease in plasma, *NeuroRx*, 2004, 1(2): 226-234
- [3] Lee HB, Yu MR, Yang Y, *et al.* Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy, *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(8 Suppl 3): S241-245
- [4] Nasir K, Tsai M, Rosen BD, *et al.* Elevated homocysteine is associated with reduced regional left ventricular function: the multi-ethnic study of Atherosclerosis, *Circulation*, 2007, 115(2): 180-187
- [5] Perna AF, Ingrosso D, Satta E, *et al.* Homocysteine metabolism in renal failure, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2004, 7(1): 53-57
- [6] Refsum H, Ueland PM, Nygard O, *et al.* Homocysteine and cardiovascular disease, *Annu Rev Med*, 1998, 49: 31-62
- [7] van Guldener C, Stehouwer CD. Diabetes mellitus and hyperhomocysteinemia, *Semin Vasc Med*, 2002, 2(1): 87-95
- [8] Rasouli ML, Nasir K, Blumenthal RS, *et al.* Plasma homocysteine predicts progression of atherosclerosis, *Atherosclerosis*, 2005, 181(1): 159-165
- [9] Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, *et al.* Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(6): H2649-2656
- [10] Zou CG, Banerjee R. Homocysteine and redox signaling, *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(5-6): 547-559.
- [11] Perla-Kajan J, Twardowski T, Jakubowski H. Mechanisms of homocysteine toxicity in humans, *Amino Acids*, 2007, 32(4): 561-572
- [12] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 245-313
- [13] Gill PS, Wilcox CS. NADPH oxidases in the kidney, *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9-10): 1597-1607
- [14] Wang G, Anrather J, Huang J, *et al.* NADPH oxidase contributes to angiotensin II signaling in the nucleus tractus solitarius, *J Neurosci*, 2004, 24(24): 5516-5524
- [15] Hordijk PL. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins, *Circ Res*, 2006, 98(4): 453-462
- [16] Takeya R, Sumimoto H. Regulation of novel superoxide-producing NAD(P)H oxidases, *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(9-10): 1523-32
- [17] Becker JS, Adler A, Schneeberger A, *et al.* Hyperhomocysteinemia, a cardiac metabolic disease: role of nitric oxide and the p22^{phox} subunit of NADPH oxidase, *Circulation*, 2005, 111(16): 2112-2118
- [18] Edirimanne VE, Woo CW, Siow YL, *et al.* Homocysteine stimulates NADPH oxidase-mediated superoxide production leading to endothelial dysfunction in rats, *Can J Physiol Pharmacol*, 2007, 85(12): 1236-1247
- [19] Tyagi N, Moshal KS, Sen U, *et al.* Ciglitazone ameliorates homocysteine-mediated mitochondrial translocation and matrix metalloproteinase-9 activation in endothelial cells by inducing peroxisome proliferator activated receptor- γ activity, *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand, France)*, 2006, 52(5): 21-27
- [20] Papatheodorou L, Weiss N. Vascular oxidant stress and inflammation in hyperhomocysteinemia, *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(11): 1941-1958
- [21] Alvarez-Maqueda M, El Bekay R, Monteseirin J, *et al.* Homocysteine enhances superoxide anion release and NADPH oxidase assembly by human neutrophils. Effects on MAPK activation and neutrophil migration, *Atherosclerosis*, 2004, 172(2): 229-238
- [22] Dai J, Li W, Chang L, *et al.* Role of redox factor-1 in hyperhomocysteinemia-accelerated atherosclerosis, *Free Radic Biol Med*, 2006, 41(10):1566-1577
- [23] Au-Yeung KK, Woo CW, Sung FL, *et al.* Hyperhomocysteinemia activates nuclear factor-kappaB in endothelial cells via oxidative stress, *Circ Res*, 2004, 94(1): 28-36
- [24] Au-Yeung KK, Yip JC, Siow YL, O K. Folic acid inhibits homocysteine-induced superoxide anion production and nuclear factor kappa B activation in macrophages, *Can J Physiol Pharmacol*, 2006, 84(1): 141-147
- [25] Kitaoka N, Liu G, Masuoka N, *et al.* Effect of sulfur amino acids on stimulus-induced superoxide generation and translocation of p47^{phox} and p67^{phox} to cell membrane in human neutrophils and the scavenging of free radical, *Clin Chim Acta*, 2005, 353(1-2): 109-116
- [26] Yi F, Li PL. Mechanisms of homocysteine-induced glomerular injury and sclerosis, *Am J Nephrol*, 2008, 28(2):254-264
- [27] Yi F, Xia M, Li N, *et al.* Contribution of guanine nucleotide exchange factor Vav2 to hyperhomocysteinemic glomerulosclerosis in rats, *Hypertension*, 2009, 53(1): 90-96
- [28] Yi F, Chen QZ, Jin S, *et al.* Mechanism of homocysteine-induced Rac1/NADPH oxidase activation in mesangial cells: Role of guanine exchange factor Vav2, *Cell Physiol Biochem*, 2007, 20(6): 909-918
- [29] Yi F, Zhang AY, Janscha JL, *et al.* Homocysteine activates NADH/NADPH oxidase through ceramide-stimulated Rac GTPase activity in rat mesangial cells, *Kidney Int*, 2004, 66(5): 1977-1987
- [30] Yang ZZ, Zou AP. Homocysteine enhances TIMP-1 expression and cell proliferation associated with NADH oxidase in rat mesangial cells, *Kidney Int*, 2003, 63(3): 1012-1020
- [31] Gulbins E, Dreschers S, Wilker B, *et al.* Ceramide, membrane rafts and infections, *J Mol Med*, 2004, 82(6): 357-363
- [32] Jin S, Zhang Y, Yi F, *et al.* Critical role of lipid raft redox signaling platforms in endostatin-induced coronary endothelial dysfunction, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 28(3): 485-490
- [33] Li PL, Zhang Y, Yi F. Lipid raft redox signaling platforms in endothelial dysfunction, *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(9): 1457-1470
- [34] Zhang AY, Yi F, Jin S, *et al.* Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells, *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(7): 817-828
- [35] Zhang AY, Yi F, Zhang G, *et al.* Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells, *Hypertension*, 2006, 47(1): 74-80
- [36] Yi F, Jin S, Zhang F, *et al.* Formation of lipid raft redox signaling

platforms in glomerular endothelial cells: an early event of homocysteine-induced glomerular injury, *J Cell Mol Med*, 2009

Mar 6, [Epub ahead of print] DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00743.x

NADPH Oxidase-Mediated Redox Signaling in Hyperhomocysteinemia

Guo-Hua Li, Xin-Bing Wei, Xiu-Mei Zhang, Fan Yi*

(Department of Pharmacology, Shandong University School of Medicine, Jinan 250012, China)

Abstract Homocysteine is a thiol-containing amino acid and an intermediate product of methionine metabolism. Numerous epidemiological and clinical studies have indicated that hyperhomocysteinemia (plasma homocysteine level is above 15 $\mu\text{mol/L}$) is a risk factor for many sclerotic diseases such as atherosclerosis, cardiovascular diseases, Alzheimer diseases, diabetes, end stage renal disease (ESRD) and so on. NADPH oxidase-mediated oxidative stress is considered as one of important mechanisms in the development of hyperhomocysteinemia-induced various diseases. In this review, based on recent studies by our group exploring the mechanisms of glomerular injury in hyperhomocysteinemia and by others, we summarized recent findings that reveal the contribution of homocysteine as a pathogenic factor to the development of various diseases and discussed the related mechanisms on the regulation of NADPH oxidase activity and its physiological role in hyperhomocysteinemia.

Key words hyperhomocysteinemia; NADPH oxidase; oxidative stress; sclerotic diseases

*Corresponding author. Tel: 86-531-88382616; Fax: 86-531-88382616; E-mail: fanyi@sdu.edu.cn