

# NADPH 氧化酶介导的氧化应激与心血管疾病内皮祖细胞功能障碍

李廷波, 马琦琳, 彭 军\*

(中南大学药学院药理学系, 湖南长沙 410078)

**专家简介:** 彭军, 男, 留美博士后, 博士生导师, 中南大学“升华学者计划”特聘教授。中南大学药理学系副主任, 兼任《中国动脉硬化杂志》、美国 *Austin J Pharmacol & Thera* 等杂志编委、国际动脉硬化学会中国分会理事、湖南省药学会理事等职。主要从事心脑血管疾病发生机制及药物防治研究。已发表 SCI 论文 70 余篇; 主持和参与“973”计划、国家自然科学基金、美国心脏学会博士后基金等项目; 获得全国优秀博士学位论文奖、湖南省青年科技奖、中华医学科技奖等奖励。

**关键词:** 内皮祖细胞; NADPH 氧化酶; 氧化应激; 内皮祖细胞功能障碍

**中图分类号:** R969 **文献标识码:** A



彭军 教授

内皮祖细胞(EPCs)是成熟血管内皮细胞的前体细胞,属于干细胞群体,不仅存在于骨髓,也存在于外周血。EPCs 具有游走、增殖并能分化为成熟血管内皮细胞能力,在维持内皮完整与内皮再生以及新生血管形成方面具有重要作用<sup>[1-2]</sup>。EPCs 不仅参与生理性血管新生,也参与各种病理状态下(如心肌缺血、高血压、高血脂和高血糖等)的伤口愈合和组织再生。然而在这些疾病情况下,EPCs 功能往往受损,导致机体维持内皮完整和血管稳态的能力下降<sup>[3]</sup>。EPCs 的鉴定是基于其细胞表面标志物和分化为相应细胞所具有的特定功能。EPCs 通常被认为可以分化为三种细胞群,分别是能形成血管的成熟内皮细胞,骨髓多功能成年干细胞和骨髓单核细胞。

EPCs 功能障碍与许多心血管疾病的发生发展密切相关,如高血压、冠心病和中风等。然而引起 EPCs 功能障碍的机制目前尚未阐明。最近有文献报道,NOX 介导的氧化应激在多种心血管疾病 EPCs 功能障碍中起重要作用,而抑制 NOX 可以改善 EPCs 的功能<sup>[4]</sup>。

## 1 NOX 介导的氧化应激和 EPCs 功能障碍

氧化应激是指机体内活性氧(ROS)生成过多或/和抗氧化能力降低,导致 ROS 在机体内大量蓄积而引起氧化损伤的过程。ROS 对机体的利弊取决于其含量、作用时间、来源以及产生的部位。适当的 ROS 对维持机体正常的生理功能必不可少,然而过量 ROS 则会对细胞组织产生损害作用。低水平 ROS(如  $O_2^-$  和  $H_2O_2$ ) 对正常细胞的生长、迁移、分化、衰老和凋亡起到重要作用。过量的 ROS 则可通过多种机制改变细胞的正常功能,如直接攻击细胞膜和细胞内各种大分子物质(如核酸、蛋白质),导致细胞坏死或激活氧化还原信号途径促进细胞凋亡、衰老、增殖、迁移等,参与多种疾病(如动脉粥样硬化、心衰、糖尿病等)的病理过程<sup>[5-6]</sup>。

现已证明,氧化应激可导致 EPCs 功能障碍。在多种病理状况下,氧化应激水平上升不仅使 EPCs 数量减少,也造成 EPCs 功能障碍。在体外,高浓度  $H_2O_2$  能诱导 EPCs 的凋亡,减少 EPCs 数量;在大鼠心肌缺血模型中,ROS 上升的水平与 EPCs 数量降低密切相关;在临床研究中,ROS 水平增加伴随着外周血 EPCs 数量减少和功能下降,如 EPCs 动员能力、迁移能力和形成血管内皮能力下降<sup>[7-8]</sup>。

促氧化酶体系是机体 ROS 的重要来源,包括

收稿日期:2014-12-21;修回日期:2015-2-2

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81370250)和湖南省自然科学基金重点项目(No. 13JJ2008)。

\* 通讯作者, E-mail: junpeng@csu.edu.cn.

NADPH 氧化酶、黄嘌呤氧化酶、细胞色素酶 P450、一氧化氮合酶等,其中 NOX 来源的 ROS 最引人注目。NOX 是心血管系统  $O_2^-$  的主要来源( $NADPH + 2O_2 \xrightarrow{NOX} NADPH^+ + H^+ + O_2^-$ )<sup>[9-10]</sup>。NOX 家族包括 7 个成员,被命名为 NOX1 - NOX5、DUOX - 1 和 DUOX - 2。其中 NOX1、NOX2、NOX4 主要表达在心血管系统,NOX3 在内耳高表达。DUOX - 1、DUOX - 2 主要表达在甲状腺内皮细胞,而 NOX5 则不存在于啮齿动物中。NOX 复合体由胞质亚单位(NOX1、NOX2 和 NOX4)、p22phox、p47phox、p67phox 和小 GTP 酶 Rac1 组成。正常条件下,NOX 可维持生理水平的  $O_2^-$  和  $H_2O_2$ 。病理状况下,NOX 能被迅速激活产生大量 ROS,介导氧化应激。

已有文献报道 NOX 介导的氧化应激是促进 EPCs 功能障碍的重要因素。我们实验室发现,在 Ang II 诱导 EPCs 衰老的细胞模型中,降钙素基因相关肽(CGRP)可以通过下调 NOX2 的表达和 ROS 的生成抑制 EPCs 衰老<sup>[11]</sup>;在同型半胱氨酸诱导的 EPCs 凋亡模型中,阿托伐他汀可以通过 p38MAPK 途径抑制 NOX4 表达和 ROS 生成而促进 EPCs 功能恢复;与年轻小鼠相比,老年小鼠 EPCs 的功能(如迁移、分化等)明显下降,这一现象在 NOX2 基因敲除的老年鼠中得到明显改善<sup>[12]</sup>。这些报道均支持 NOX 来源的 ROS 在促进 EPCs 功能障碍中发挥重要作用。

## 2 NOX 介导的氧化应激与高血压 EPCs 功能障碍

内皮功能障碍与高血压形成密切相关。高血压内皮功能不全涉及多种机制,EPCs 功能障碍和数量减少被认为是其中重要机制之一。在自发性高血压大鼠和原发性高血压患者中,我们实验室发现外周血中衰老 EPCs 数量明显增加,促进了内皮功能不全和高血压的形成<sup>[13]</sup>。最近,Suzuki R 等人报道,与正常对照比较,原发性高血压患者外周血 EPCs 数量明显减少,其数量减少量与高血压严重程度密切相关。通过降压治疗不仅能控制血压还可以恢复 EPCs 功能。这些研究说明有功能障碍的 EPCs 可能促进高血压的发生发展,也可能促进了原发性高血压患者中心血管并发症的发生<sup>[14]</sup>。

大量研究表明氧化应激参与了高血压的形成。例如,自发性高血压大鼠 ROS 生成增加,过表达超氧化物歧化酶 SOD 可以降低血压。作为心血管系统中

ROS 主要来源,NOX 在高血压发生发展中起重要作用。在高血压动物模型中,NOX 表达上调,给予 NOX 抑制剂 apocynin 可以降低血压,减少血管重构。如前所述,功能障碍的 EPCs 能促进高血压内皮功能紊乱,其中 NOX 介导的氧化应激发挥了重要作用。脱氧皮质酮诱导的高血压大鼠模型中,EPCs 数量减少且功能减弱,伴随 NOX 活性提高和 NOX 亚基 gp91(phox)、p22(phox) 和 Rac1 表达增加,而抑制 NOX 能明显增加 EPCs 数量和改善 EPCs 功能<sup>[15]</sup>;在脑卒中易感的自发性高血压大鼠中,EPCs 中 gp91(phox)、p22(phox) 和 p47(phox) 的 mRNA 表达增加,同时伴有 EPCs 数量减少,集落形成减少,这些现象可被 Ang II 受体抑制剂氯沙坦逆转<sup>[16]</sup>。

NOX 可以通过多种机制损伤 EPCs。血压升高时通常伴随 NOX 活性增加,NOX 源性的 ROS 可以诱导 EPCs 坏死或凋亡。NOX 抑制剂能降低 Bax/Bcl-2 比例,降低 EPCs 凋亡率。NOX 源性的 ROS 在加速 EPCs 衰老时也发挥重要作用。在自发性高血压大鼠或原发性高血压患者中外周血 EPCs 衰老率增加,抑制 NOX 能增加端粒酶活性,降低衰老相关蛋白 P53 水平<sup>[15]</sup>。

## 3 NOX 介导的氧化应激与高脂血症中 EPCs(或内皮细胞)功能障碍

ROS 参与高脂血症血管内皮损伤和内皮功能紊乱。高脂血症患者中血浆 ROS 水平显著增加,其中 NOX 是血管 ROS 的主要来源;在高脂血症大鼠模型中,血管收缩和舒张功能下降,伴随 NOX 表达上调和 ROS 水平上升;在高胆固醇诱导的小鼠动脉粥样硬化模型中,Kinkade 等人发现动脉粥样斑块中 ROS 主要来源于 NOX。给予 NOX 抑制剂 apocynin 后在降低主动脉血管中超氧化物水平的同时也能减少动脉粥样斑块数量和面积<sup>[17]</sup>。

事实上,NOX 介导的氧化应激不仅引起了内皮细胞损伤,还可损害 EPCs。高脂血症小鼠模型中,NOX 表达上调,ROS 生成增加,EPCs 功能受损。在 Nox2<sup>-/-</sup> 小鼠中,高脂血症诱导 ROS 生成减少,EPCs 和内皮功能得到改善;给予伊伐布雷丁治疗高脂血症小鼠,发现小鼠主动脉壁中 NOX 活性、超氧化物和脂过氧化物都明显减少,伴随内皮细胞和 EPCs 功能明显改善。与伊伐布雷丁比较,给予苯肼吡嗪治疗虽能明显降低小鼠血压,但并未明显降低 NOX

活性,也未明显改善内皮细胞和 EPCs 功能<sup>[18-19]</sup>。这些结果均支持 NOX 在高脂血症血管内皮功能紊乱的发生中起重要作用。

#### 4 NOX 介导的氧化应激与缺血性相关疾病 EPCs 功能障碍

氧化应激是心肌缺血或脑卒中引起心肌细胞或神经细胞死亡的重要机制之一。最近研究发现,缺血 30 分钟/再灌 24 小时后,与野生型比较,NOX1 或 NOX2 基因敲除小鼠心肌梗死面积显著减少,而 NOX4 基因敲除小鼠心肌梗死面积未明显变化,提示由 NOX1 和 NOX2 产生的 ROS 在心肌缺血损伤起到重要作用<sup>[20]</sup>。然而在脑缺血/再灌动物模型中,NOX2 和 NOX4 来源的 ROS 在脑缺血损伤中发挥主要作用。一旦发生缺血,促血管生成和血管再生都是在缺血环境下保护心肌细胞或神经细胞的重要机制<sup>[21-22]</sup>。在血管生成过程中,EPCs 能通过产生各种促血管生成因子和生长因子而促进前体内皮细胞增殖和迁移。缺血时,外周血和骨髓中 EPCs 能被动员并归巢到缺血组织,从而参与缺血组织血管形成<sup>[23]</sup>。

NOX 来源的 ROS 对 EPCs 来说是一把双刃剑。低水平 ROS 能作为信号分子促进细胞增殖、迁移、分化和维持血管完整。然而过多 ROS 与血管内皮功能紊乱,EPCs 功能障碍和血管形成受损密切相关。在后肢缺血的小鼠模型中,NOX2 表达和 ROS 生成在缺血组织明显增加。NOX2 基因敲除小鼠血流恢复更快,缺血肌肉中毛细血管生成更多,EPCs 功能改善更明显,提示在缺血时 NOX2 介导的氧化应激促进了 EPCs 功能障碍形成<sup>[24]</sup>。然而,在相同的模型中,NOX2 基因敲除小鼠 ROS 生成减少,同时外周血中 EPCs 数量也减少,提示 NOX2 来源的 ROS 对维持和动员 EPCs 参与缺血组织血管再生起到重要作用<sup>[6]</sup>。对于这两种看似矛盾的现象,我们推测可能与 ROS 水平高低有关。在前面提到的后肢缺血小鼠模型中,小鼠缺血前后都经过香烟烟雾处理,而后者没有。因此,前者处于应激状态,即使 NOX2 敲除,仍能维持高水平的 ROS,而后者在 NOX2 敲除后,ROS 的基础水平下降,影响了 EPCs 的动员。

到目前为止,已有少数文献报道脑缺血时 NOX 介导的氧化应激对 EPCs 功能的影响。在大鼠脑缺血损伤模型中,过表达血管紧张素转换酶 II 能明显降低 NOX2 和 NOX4 的表达,减少 ROS 产生同时伴

有 EPCs 迁移功能改善,血管形成增加,这提示 NOX 介导的氧化应激加剧了脑缺血时 EPCs 功能损伤<sup>[25]</sup>。给予 Ang II 受体阻断剂坎沙坦和氯沙坦后能促进大鼠脑缺血模型 EPCs 功能恢复。自发性高血压脑卒中中易感大鼠,在抑制 NOX 活性后,减少 ROS 生成后也能改善 EPCs 的功能<sup>[16-26]</sup>。

#### 5 结 语

EPCs 在生理和病理条件下对维持内皮完整和血管稳态(血管形成)起到重要作用。功能异常的 EPCs 与各种心血管疾病发生发展密切相关。到目前为止,NOX 介导的氧化应激促 EPCs 功能障碍的作用及其与心血管疾病的关系已达成共识(见图 1),NOX 抑制剂也显示具有改善 EPCs 功能的作用。然而,仍有许多问题有待解决。例如,为何不同 NOX 亚型对 EPCs 功能影响不同?在生理和病理条件下,NOX 基因表达是如何被调节的?解决这些问题,将为寻找改善内皮细胞功能和阻止心血管疾病发生发展的药物提供理论依据。

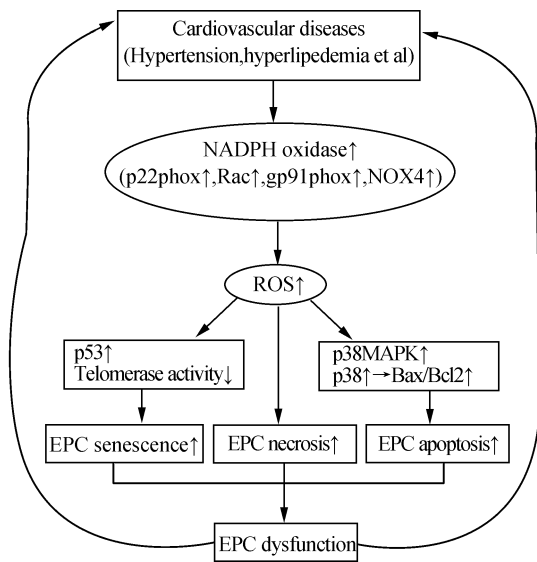


图 1 NADPH 氧化酶与心血管疾病内皮祖细胞功能障碍  
心血管疾病(如高血压、高脂血症等)时,NADPH 氧化酶激活,包括其单位 p22phox、Rac、gp91phox、NOX4 等表达上调,导致活性氧(ROS)生成增加,进而激活 p53、p38MAPK 等信号分子,促进内皮祖细胞衰老、凋亡、坏死等,造成内皮祖细胞功能障碍,而内皮祖细胞功能下降又会进一步加重心血管疾病的发生发展

#### 参考文献:

[1] George AL, Bangalore-Prakash P, Rajoria S, et al. Endothe-

- lial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration [J]. *J Hematol Oncol* 2011;4;24.
- [2] Lin CP, Lin FY, Huang PH, et al. Endothelial progenitor cell dysfunction in cardiovascular diseases; role of reactive oxygen species and inflammation [J]. *Biomed Res Int*, 2013,2013;845037.
- [3] Goligorsky MS. Endothelial progenitor cells: from senescence to rejuvenation [J]. *Semin Nephrol*, 2014, 34 (4) : 365-373.
- [4] van den Oever IA, Raterman HG, Nurmohamed MT, et al. Endothelial dysfunction, inflammation, and apoptosis in diabetes mellitus [J]. *Mediators Inflamm*, 2010,2010;792393.
- [5] Gough DR, Cotter TG. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule [J]. *Cell Death Dis*, 2011,2(10):e213.
- [6] Bordt EA1, Polster BM2. NADPH oxidase- and mitochondria-derived reactive oxygen species in proinflammatory microglial activation; a bipartisan affair [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014,76;34-46.
- [7] Wang F, Wang YQ, Cao Q, et al. Hydrogen peroxide induced impairment of endothelial progenitor cell viability is mediated through a FoxO3a dependant mechanism [J]. *Microvasc Res*, 2013,90;48-54.
- [8] Yao EH, Yu Y, Fukuda N. Oxidative stress on progenitor and stem cells in cardiovascular diseases [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2006,7(2) :101-108.
- [9] Lassegue B, San Martin A, Griendling KK. Biochemistry, physiology, and Pathophysiology of NADPH oxidases in the cardiovascular system [J]. *Circ Res*, 2012,110(10):1364-1390.
- [10] Kawahara T, Lambeth JD. Molecular evolution of Phox-related regulatory subunits for NADPH oxidase enzymes [J]. *BMC Evol Biol*, 2007,7;178.
- [11] Zhou Z, Hu CP, Wang CJ, et al. Calcitonin gene-related peptide inhibits angiotensin II-induced endothelial progenitor cells senescence through up-regulation of klotho expression [J]. *Atherosclerosis*, 2010,213(1) :92-101.
- [12] Turgeon J, Haddad P, Dussault S, et al. Protection against vascular aging in Nox2-deficient mice: Impact on endothelial progenitor cells and reparative neovascularization [J]. *Atherosclerosis*, 2012,223(1) :122-129.
- [13] Zhou Z, Peng J, Wang CJ, et al. Accelerated senescence of endothelial progenitor cells in hypertension is related to the reduction of calcitonin gene-related peptide [J]. *J Hypertens*, 2010,28(5) :931-939.
- [14] Suzuki R, Fukuda N, Katakawa M, et al. Effects of an angiotensin II receptor blocker on the impaired function of endothelial progenitor cells in patients with essential hypertension [J]. *Am J Hypertens*, 2014,27(5) :695-701.
- [15] Chen DD, Dong YG, Yuan H, et al. Endothelin 1 activation of endothelin A receptor/NADPH oxidase pathway and diminished antioxidants critically contribute to endothelial progenitor cell reduction and dysfunction in salt-sensitive hypertension [J]. *Hypertension*, 2012,59(5) :1037-1043.
- [16] Yao EH, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Losartan improves the impaired function of endothelial progenitor cells in hypertension via an antioxidant effect [J]. *Hypertens Res*, 2007,30(11) :1119-1128.
- [17] Kinkade K, Streeter J, Miller FJ. Inhibition of NADPH oxidase by apocynin attenuates progression of atherosclerosis. *Int J Mol Sci*, 2013,14(8) :17017-17028.
- [18] Haddad P, Dussault S, Groleau J, et al. Nox2-derived reactive oxygen species contribute to hypercholesterolemia-induced inhibition of neovascularization; effects on endothelial progenitor cells and mature endothelial cells [J]. *Atherosclerosis*, 2011,217(2) :340-349.
- [19] Custodis F, Baumhake M, Schlimmer N, et al. Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Circulation*, 2008,117(18) :2377-2387.
- [20] Braunersreuther V, Montecucco F, Asrih M, et al. Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013,64 :99-107.
- [21] Li DW, Liu ZQ, Wei J, et al. Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2012,30(5) :1000-1006.
- [22] Kamei N, Kwon SM, Kawamoto A, et al. Contribution of bone marrow-derived endothelial progenitor cells to neovascularization and astrogliosis following spinal cord injury [J]. *J Neurosci Res*, 2012,90(12) :2281-2292.
- [23] Cubbon RM1, Kahn MB, Wheatcroft SB. Effects of insulin resistance on endothelial progenitor cells and vascular repair [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2009,117(5) :173-90.
- [24] Haddad P, Dussault S, Groleau J, et al. Nox2-containing NADPH oxidase deficiency confers protection from hindlimb ischemia in conditions of increased oxidative stress [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009,29(10) :1522-1528.
- [25] Chen J, Xiao X, Chen S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 priming enhances the function of endothelial progenitor cells and their therapeutic efficacy [J]. *Hypertension*, 2013,61 :681-689.
- [26] Yu Y, Fukuda N, Yao EH, et al. Effects of an ARB on endothelial progenitor cell function and cardiovascular oxidation in hypertension [J]. *Am J Hypertens*, 2008,21(1) :72-77.