

巨噬细胞凋亡与糖尿病动脉粥样硬化

孟庆冬 陶红

【摘要】 在动脉粥样硬化性病变的进展过程中,一个关键的步骤就是易损斑块的形成。而巨噬细胞凋亡可促进斑块的进展,并与易损斑块形成密切相关。动脉粥样硬化性血管疾病是糖尿病主要并发症之一,因此总结与糖尿病相关的脂代谢紊乱、胰岛素抵抗、脂肪因子等巨噬细胞凋亡影响因素,并初步探讨其介导斑块内巨噬细胞凋亡的信号转导途径,对于防治糖尿病患者动脉粥样硬化具有重要意义。

【关键词】 巨噬细胞凋亡;糖尿病;动脉粥样硬化

Macrophage apoptosis and diabetic atherosclerosis Meng Qingdong, Tao Hong. Department of Endocrinology and Metabolism, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China
Corresponding author: Tao Hong, Email: vivientao@126.com

【Abstract】 During the progress of atherosclerotic lesions, the formation of the vulnerable plaque is a critical step. Macrophage apoptosis can promote the progress of plaque, and is closely related to vulnerable plaque formation. Since atherosclerotic vascular disease is a major complication of diabetes mellitus, the factors associated with macrophage apoptosis, such as dyslipidemia, insulin resistance and adipokines etc, which are related to diabetes mellitus are summarized, and the signaling pathways that mediate macrophage apoptosis in the atherosclerotic lesions are also discussed. Deep understanding of the mechanism is important for the prevention and treatment of atherosclerosis in patients with diabetes mellitus.

【Key words】 Macrophage apoptosis; Diabetes mellitus; Atherosclerosis

(Int J Endocrinol Metab, 2014, 34: 340-343)

动脉粥样硬化(AS)是一种由动脉壁脂质沉积所引发的由巨噬细胞主导的慢性炎性反应为主的疾病^[1]。巨噬细胞凋亡发生在 AS 的各个阶段。在病变早期,由于清除凋亡细胞能力正常,巨噬细胞凋亡不仅减少斑块细胞数量,而且减少细胞外胶原降解,从而抑制 AS 的进展;在病变晚期,在 AS 危险因素(如修饰的低密度脂蛋白-胆固醇、总胆固醇等)作用下,巨噬细胞凋亡增加,且缺乏对凋亡巨噬细胞有效的吞噬清除,从而引起继发性细胞坏死和炎性反应,促进斑块脂质核心的形成及扩大;而且巨噬细胞凋亡后释放出的蛋白酶等可损伤纤维帽,最终导致不稳定斑块(即易损斑块)的形成^[2]。易损斑块是造成急性血管阻塞性疾病的最根本的病理基础。易损斑块破裂促发急性血栓形成,最终导致急性心肌梗死、脑卒中等临床事件的发生^[3]。鉴于糖尿病与 AS

的密切关系,现将糖尿病相关巨噬细胞凋亡的影响因素作一简要综述。

1 糖尿病时脂代谢紊乱与巨噬细胞凋亡

1.1 胆固醇代谢 过量的游离胆固醇(未酯化胆固醇)在粥样硬化病变巨噬细胞内的聚集,可导致巨噬细胞凋亡和粥样硬化病变的进展。游离胆固醇诱导巨噬细胞凋亡可由 Fas 途径及线粒体途径介导。其中 Fas 信号途径是游离胆固醇诱导巨噬细胞凋亡的关键途径。巨噬细胞内游离胆固醇超负荷,通过转录后机制,促进胞内储存的 Fas 配体转移至细胞膜,增加细胞表面 Fas 配体的表达, Fas 配体和 Fas 结合^[4]。Fas 通过胞内段的 DD 募集胞质中的 Fas 相关死亡结构域,活化 caspase-8,激活下游效应者 caspase-3、caspase-6、caspase-7,引起细胞凋亡^[5]。另外,巨噬细胞游离胆固醇超负荷时,导致线粒体功能障碍、促凋亡蛋白 Bax 释放增加^[6]。巨噬细胞在氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)负荷时,引起线粒体氧化损伤。两者均可使细胞色素 C 从线粒体释放,活化 caspase-9,通过线粒体途径介导巨噬细胞凋亡。目前越来越多的研究证明,内质网应激(ERS)

未折叠蛋白反应 (UPR) 和其诱发的细胞凋亡参与 AS 的发生和发展。破坏这种内环境稳态后可引起 ERS 反应,即 UPR。此反应由 3 种内质网跨膜感应蛋白介导,即肌醇需求激酶-1、RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶 (PERK) 和激活转录因子 6 (ATF6)^[7]。当严重或长时间的 ERS 损伤内质网的功能,或这些反应不足以恢复内质网稳态时,UPR 信号将引起细胞凋亡,去除因蛋白质折叠错误及细胞功能失常的应激反应细胞,从而保护生物体。ERS 诱发的凋亡有 3 种途径: C/EBP 同源蛋白 (CHOP)/GADD153 基因的激活转录、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 通路的激活和内质网特有的 caspase-12 的激活^[8]。Tabas^[3] 研究表明,ERS 诱导的巨噬细胞凋亡与易损斑块的形成密切相关。ERS 是 AS 病变处巨噬细胞凋亡的主要途径。其中 CHOP 通路是介导游离胆固醇诱发的巨噬细胞 ERS,引起巨噬细胞凋亡的重要通路。Tsukano 等^[2] 发现蓄积于内质网内的游离胆固醇通过 CHOP-Bax 途径诱导 ERS 相关的巨噬细胞凋亡。

1.2 甘油三酯代谢 脂肪甘油三酯脂肪酶 (ATGL) 基因在人体大多数组织中均有表达,而以白色和棕色脂肪组织中 mRNA 水平和酶的活性最高^[9]。通过观察 ATGL^{-/-} 小鼠发现,ATGL 在脂肪分解过程中起关键作用。心肌细胞甘油三酯动员障碍引起的大量甘油三酯积累将导致心力衰竭和 ATGL^{-/-} 小鼠过早死亡。由于游离脂肪酸无法被利用,ATGL^{-/-} 小鼠开始更多地利用碳水化合物作为能量来源,导致糖耐量和胰岛素敏感性升高。未酯化的胆固醇在晚期 AS 病变中积累,是一个强有力的巨噬细胞凋亡诱导剂。应用未酯化胆固醇干预体外培养的巨噬细胞,可通过线粒体凋亡通路,诱导巨噬细胞程序性死亡。而类似结果可在 ATGL 缺失和甘油三酯积累的巨噬细胞中观察到,而且伴随着典型凋亡标记物的增加,如细胞膜磷脂丝氨酸外部化、caspase-3 和多聚-(腺苷二磷酸-核糖)聚合酶裂解片段 (PARP)^[6]。线粒体碎片出现早于细胞死亡,表明在 ATGL^{-/-} 巨噬细胞中线粒体凋亡通路被触发。然而,Saraswathi 等^[10] 却发现甘油三酯积累对巨噬细胞有保护作用。内质网是诱导细胞凋亡的一个重要细胞器,在细胞内 Ca²⁺ 存储方面也起重要作用。内质网与胞液之间 Ca²⁺ 浓度的平衡是细胞生存所必需的。ATGL^{-/-} 巨噬细胞中内质网 Ca²⁺ 耗竭以及胞质内 Ca²⁺ 水平升高提示有 ERS 发生和 UPR 的诱导。Ca²⁺ 和神经酰胺信号之间的相互作用,可能导

致 ATGL^{-/-} 巨噬细胞 C16:0 神经酰胺浓度增加。抑制 C16:0 神经酰胺合成可保护 ATGL^{-/-} 巨噬细胞,使其免于线粒体功能障碍和细胞凋亡,但是却无法中止 ERS^[11]。这些结果一方面提示 ERS 本身并没有触发细胞凋亡,另一方面表明 C16:0 神经酰胺在触发 ATGL^{-/-} 巨噬细胞线粒体凋亡过程中起重要作用。

2 糖尿病时胰岛素抵抗与巨噬细胞凋亡

研究发现,糖尿病患者与非糖尿病者相比,其进展性 AS 病变处的斑块核心明显增大^[12]。而且,在对糖尿病 AS 斑块的观察中,发现其斑块核心的增大与巨噬细胞凋亡增多有关。进一步研究发现,从糖尿病患者及动物模型 (ob/ob 鼠) 中分离出的巨噬细胞,胰岛素受体表达减少、酪氨酸激酶活性下降,磷脂酰肌醇 3 激酶和丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (AKT) 的胰岛素刺激信号减少。巨噬细胞在细胞水平呈现“胰岛素抵抗”的特点^[13]。在糖尿病 AS 病变处,由于巨噬细胞发生胰岛素抵抗,ERS 诱导的细胞凋亡增加,促使斑块核心增大。胰岛素抵抗的巨噬细胞凋亡增加的机制至少包括以下 3 点: (1) 阻断 MAPK/细胞外信号调节激酶 (ERK) 激酶 (MEK)-ERK-浆/内质网钙 ATP 酶 (SERCA) 通路。巨噬细胞发生 ERS 时,可激活 MEK-ERK-SERCA 途径,通过该途径可以降低细胞内钙水平、补充内质网管腔内钙的储存,减少 ERS 所致细胞凋亡,从而保护巨噬细胞。在胰岛素抵抗的巨噬细胞中,由于 MEK-ERK-SERCA 通路受到阻断,抑制了 SERCA,不但使细胞质内钙离子增加,诱导钙离子介导的细胞凋亡通路,而且因内质网管腔内钙减少,可进一步激活 UPR/CHOP 诱导的细胞凋亡^[14]。 (2) 胰岛素抵抗的巨噬细胞清道夫受体 A (SRA) 和 CD36 的表达增加。胰岛素信号减少使 UPR 放大,导致 SRA 转录后上调^[15]。CD36 表达的增加与磷脂酰肌醇 3 激酶活性减少有关^[16]。在晚期病灶内,当 ERS 诱导巨噬细胞凋亡时,SRA 和 CD36 可以作为“二次打击”的 PRR,放大凋亡途径^[3]。 (3) 抑制核因子- κ B 介导的细胞生存信号途径。在发生 ERS 的巨噬细胞中,核因子- κ B 作为细胞生存因子,可激活细胞生存信号途径。在胰岛素抵抗的巨噬细胞中,当发生 ERS 时 AKT 的磷酸化被抑制,细胞核内叉头转录因子 (FoxO) 1 水平升高^[17]。FoxO 可诱导核因子- κ B 抑制蛋白 (I κ B) ϵ 的表达,抑制核因子- κ B,从而使巨噬细胞凋亡增加^[18]。

3 糖尿病时脂肪因子对巨噬细胞凋亡的影响

3.1 内脂素 近年来发现内脂素是 AS 新的预测

指标。Chen 等^[19]研究发现,内脂素是 2 型糖尿病的独立相关因素,并且在人不稳定颈动脉和冠状动脉粥样斑块中,巨噬细胞表达内脂素增加。Dahl 等^[20]研究结果也表明内脂素在 AS 斑块中表达增加,主要位于富含巨噬细胞的脂质核心区。研究发现,内脂素促进巨噬细胞凋亡,其作用呈剂量依赖。而且 2-羟基萘甲基磷酸三乙酸甲基酯几乎完全阻断内脂素对巨噬细胞凋亡的促进作用,提示内脂素对细胞凋亡的影响主要是通过酪氨酸激酶信号系统介导,但最终的效应与胰岛素相反,其机制有待进一步研究^[21]。

3.2 脂联素 Lee 和 Kwak^[22]发现在胰岛素抵抗和糖尿病动物模型中,血清脂联素水平显著降低。而且血清脂联素独立于传统心血管危险因素(如性别、年龄、腰围、吸烟史、血脂、血压等)与 AS 显著相关。有证据显示,高水平脂联素可显著抑制血管炎性反应和 AS 进展^[23]。脂联素可抑制巨噬细胞 A 型清道夫受体的表达,使脂质吸收明显减少,从而阻止泡沫细胞的形成^[24]。另外,Takeuchi 等^[25]指出脂联素受体 1 的表达与 AS 斑块的稳定性密切相关,其机制可能与抑制巨噬细胞活动有关。但仍缺乏直接证据证明脂联素对巨噬细胞凋亡的保护作用。

3.3 趋化素(chemerin) 在肥胖的 2 型糖尿病血 chemerin 水平比正常人升高,而且在用二甲双胍和吡格列酮治疗后明显下降,同时胰岛素抵抗得到明显改善,且血 chemerin 水平与稳态模型评估-胰岛素抵抗指数呈正相关,提示 chemerin 水平升高是胰岛素抵抗的结果^[26]。Spiroglou 等^[27]研究认为血管旁脂肪组织(PVAT)局部 chemerin 水平与 AS 的关系较循环 chemerin 水平更为密切,PVAT 分泌的 chemerin 可能由外向内通过旁分泌或滋养血管分泌方式参与 AS 的发生、发展。Chemerin 可显著增加巨噬细胞摄取胆固醇,而巨噬细胞中胆固醇过度积聚形成泡沫细胞导致粥样硬化斑块形成^[28]。

4 其他糖尿病的影响因子对巨噬细胞凋亡的影响

4.1 磷脂转运蛋白(PLTP) PLTP 是由多种细胞分泌的多功能蛋白。最近有研究表明,糖尿病患者血清 PLTP 活性显著提高,原因可能是糖尿病增强了血清 PLTP 活性和 PLTP 基因变异^[29]。而一项弗莱明翰心脏研究表明,高血浆 PLTP 活性是心血管疾病的重要危险因素^[30]。Samyn 等^[31]证实在 PLIP 转基因小鼠,巨噬细胞胆固醇流出和逆向胆固醇转运明显下降,提示系统性 PLTP 过表达可能降低巨

噬细胞逆向转运胆固醇的效率,进而促进 AS 的形成。胆固醇负荷对巨噬细胞 PLTP mRNA 有强烈的诱导效应;在 AS 斑块的炎性反应环境中,活化的巨噬细胞分泌大量的 PLTP。国内有研究发现,PLTP 可以增加 AS 斑块的易损性,其机制之一是提高斑块中的炎性反应和巨噬细胞的凋亡;进一步研究还发现 PLTP 可通过上调受体相互作用蛋白 3、氧化应激以及 Janus 激酶 2-信号转导和转录激活因子 1/3 信号通路促进巨噬细胞凋亡^[32]。另外,Wehinger 等^[33]提到,PLTP 促进富含甘油三酯的脂蛋白脂解后所诱导的人 THP-1 源性巨噬细胞的凋亡,且呈剂量依赖的关系;在向巨噬细胞转染 PLTP 后,细胞中 caspase-3 和 PARP 的水平明显升高,细胞凋亡增加。

4.2 Th17 Th17 细胞主要通过产生 IL-17A 发挥作用,同时还能够分泌 IL-21、IL-22、TNF- α 和 IL-26 等炎性因子及 CCL20。近来研究显示,糖尿病患者 Th17 与 Th1 细胞的表达显著增强^[34]。经研究证实 Th17 细胞及产生的效应分子 IL-17A,在 AS 发展中发挥了非常重要的作用^[35]。在人和小鼠 AS 斑块局部 Th17 细胞和 IL-17A 的表达升高^[36]。IL-17A 与 IL-17RA 结合后激活巨噬细胞核因子- κ B 和 MAPK (ERK、p38、JNK) 信号通路,并通过核因子- κ B 和 ERK、p38 通路上调脂质伴侣 aP2 的表达,aP2 进一步激活 ERS。长期的 ERS 会导致 CHOP 表达明显升高进而促进 IL-17A 诱导的巨噬细胞凋亡,加速 AS 的发生和发展^[37]。Erbil 等^[38]研究显示 IL-17A 抗体干预能够显著减少斑块局部的凋亡细胞,从而证实 IL-17A 能够加速 AS 的进展。

以上从糖尿病脂代谢紊乱、胰岛素抵抗、糖尿病相关脂肪因子等方面论述了 AS 斑块内巨噬细胞凋亡的影响因素,发现一些脂肪因子对巨噬细胞凋亡的研究仍处于初级阶段,仍然有待进一步实验证实。但是鉴于巨噬细胞凋亡在 AS 发生、发展中的重要作用,对其深入研究必将为糖尿病患者 AS 的防治开辟新的途径。

参 考 文 献

- [1] Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis[J]. Nat Immunol, 2011, 12(3): 204-212.
- [2] Tsukano H, Gotoh T, Endo M, et al. The endoplasmic reticulum stress-C/EBP homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(10): 1925-1932.
- [3] Tabas I. Macrophage apoptosis in atherosclerosis: consequences

- on plaque progression and the role of endoplasmic reticulum stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(9): 2333-2339.
- [4] Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links ER stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(10): 2925-2941.
- [5] Gucciardi ME, Gores GJ. Life and death by death receptors [J]. *FASEB J*, 2009, 23(6): 1625-1637.
- [6] Aflaki E, Radovic B, Chandak PG, et al. Triacylglycerol accumulation activates the mitochondrial apoptosis pathway in macrophages[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(9): 7418-7428.
- [7] Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis[J]. *Circ Res*, 2010, 107(7): 839-850.
- [8] Minamino T, Kitakaze M. ER stress in cardiovascular disease [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48(6): 1105-1110.
- [9] Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores [J]. *J Lipid Res*, 2009, 50(1): 3-21.
- [10] Saraswathi V, Hasty AH. Inhibition of long-chain acyl coenzyme A synthetases during fatty acid loading induces lipotoxicity in macrophages [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(11): 1937-1943.
- [11] Aflaki E, Doddapattar P, Radovic B, et al. C16 ceramide is crucial for triacylglycerol-induced apoptosis in macrophages [J]. *Cell Death Dis*, 2012, 3: e280.
- [12] Yonetsu T, Kato K, Uemura S, et al. Features of coronary plaque in patients with metabolic syndrome and diabetes mellitus assessed by 3-vessel optical coherence tomography[J]. *Circ Cardiovasc Imaging*, 2013, 6(5): 665-673.
- [13] Hartman ME, O'Connor JC, Godbout JP, et al. Insulin receptor substrate-2-dependent interleukin-4 signaling in macrophages is impaired in two models of type 2 diabetes mellitus[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(27): 28045-28050.
- [14] Tabas I, Tall A, Accili D. The impact of macrophage insulin resistance on advanced atherosclerotic plaque progression[J]. *Circ Res*, 2010, 106(1): 58-67.
- [15] Han S, Liang CP, Devries-Seimon T, et al. Macrophage insulin receptor deficiency increases ER stress-induced apoptosis and necrotic core formation in advanced atherosclerotic lesions[J]. *Cell Metab*, 2006, 3(4): 257-266.
- [16] Rios FJ, Koga MM, Ferracini M, et al. Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e36632.
- [17] Senokuchi T, Liang CP, Seimon TA, et al. Forkhead transcription factors (FoxOs) promote apoptosis of insulin-resistant macrophages during cholesterol-induced endoplasmic reticulum stress [J]. *Diabetes*, 2008, 57(11): 2967-2976.
- [18] Su D, Coudriet GM, Hyun KD, et al. FoxO1 links insulin resistance to proinflammatory cytokine IL-1 β production in macrophages[J]. *Diabetes*, 2009, 58(11): 2624-2633.
- [19] Chen MP, Chung FM, Chang DM, et al. Elevated plasma level of visfatin/pre-B cell colony-enhancing factor in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(1): 295-299.
- [20] Dahl TB, Yndestad A, Skjelland M, et al. Increased expression of visfatin in macrophages of human unstable carotid and coronary atherosclerosis: possible role in inflammation and plaque destabilization[J]. *Circulation*, 2007, 115(8): 972-980.
- [21] 张高峰, 许澎, 乔祺. 内脂素对巨噬细胞凋亡的影响及其机制研究[J]. *中国临床医学*, 2011(05): 617-620.
- [22] Lee S, Kwak HB. Role of adiponectin in metabolic and cardiovascular disease[J]. *J Exerc Rehabil*, 2014, 10(2): 54-59.
- [23] van Stijn CM, Kim J, Barish GD, et al. Adiponectin Expression Protects against Angiotensin II-Mediated Inflammation and Accelerated Atherosclerosis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86404.
- [24] Mouquet F, Cuilleret F, Susen S, et al. Metabolic syndrome and collateral vessel formation in patients with documented occluded coronary arteries: association with hyperglycaemia, insulin-resistance, adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1[J]. *Eur Heart J*, 2009, 30(7): 840-849.
- [25] Takeuchi S, Wada K, Uozumi Y, et al. Adiponectin receptor 1 expression is associated with carotid plaque stability[J]. *Neurol India*, 2013, 61(3): 249-253.
- [26] Yu S, Zhang Y, Li MZ, et al. Chemerin and apelin are positively correlated with inflammation in obese type 2 diabetic patients [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(19): 3440-3444.
- [27] Spiroglou SG, Kostopoulos CG, Varakis JN, et al. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2010, 17(2): 115-130.
- [28] Goralski KB, McCarthy TC, Hanniman EA, et al. Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(38): 28175-28188.
- [29] Dullaart RP, Vergeer M, de Vries R, et al. Type 2 diabetes mellitus interacts with obesity and common variations in PLTP to affect plasma phospholipid transfer protein activity [J]. *J Intern Med*, 2012, 271(5): 490-498.
- [30] Robins SJ, Lyass A, Brocra RW, et al. Plasma lipid transfer proteins and cardiovascular disease. The Framingham Heart Study [J]. *Atherosclerosis*, 2013, 228(1): 230-236.
- [31] Samyn H, Moerland M, van Gent T, et al. Elevation of systemic PLTP, but not macrophage-PLTP, impairs macrophage reverse cholesterol transport in transgenic mice [J]. *Atherosclerosis*, 2009, 204(2): 429-434.
- [32] 张科. 磷脂转运蛋白对动脉粥样硬化斑块发展和稳定性作用的实验研究[D]. 山东大学, 2012.
- [33] Wehinger A, Tancevski I, Schgoer W, et al. Phospholipid transfer protein augments apoptosis in THP-1-derived macrophages induced by lipolyzed hypertriglyceridemic plasma[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(4): 908-915.
- [34] Mahmoud F, Al-Ozairi E. Inflammatory cytokines and the risk of cardiovascular complications in type 2 diabetes[J]. *Dis Markers*, 2013, 35(4): 235-241.
- [35] Butcher M, Galkina E. Current views on the functions of interleukin-17A-producing cells in atherosclerosis[J]. *Thromb Haemost*, 2011, 106(5): 787-795.
- [36] Erbel C, Dengler TJ, Wangler S, et al. Expression of IL-17A in human atherosclerotic lesions is associated with increased inflammation and plaque vulnerability[J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(1): 125-134.
- [37] 高琦. Th17 细胞及效应分子 IL-17A 在动脉粥样硬化发生过程中的作用及机制研究[D]. 山东大学, 2012.
- [38] Erbel C, Chen L, Bea F, et al. Inhibition of IL-17A attenuates atherosclerotic lesion development in apoE-deficient mice[J]. *J Immunol*, 2009, 183(12): 8167-8175.