

· 综述 ·

Nrf2/ARE 通路与糖尿病相关动脉粥样硬化

缪莹 万沁

【摘要】 氧化应激和炎症反应是糖尿病致动脉粥样硬化的两个主要危险因素, Nrf2/ARE 通路是体内调控氧化应激的关键通路。激活 Nrf2/ARE 通路可保护血管内皮细胞、血管平滑肌细胞及胰岛 β 细胞免受氧化损伤, 并可增加胰岛素分泌, 改善胰岛素抵抗。Nrf2/ARE 通路对糖尿病动脉粥样硬化的防治具有重要意义。

【关键词】 Nrf2/ARE 信号通路; 糖尿病; 动脉粥样硬化; 氧化应激

Nrf2/ARE signal pathway and diabetes associated atherosclerosis Miao Ying, Wan Qin. Department of Endocrinology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China
Corresponding author: Wan Qin, Email: Wanqin3@163.com

【Abstract】 Oxidative stress and inflammation play essential roles in the initiation and progression of diabetes associated atherosclerosis. Nrf2/ARE signal pathway is the key pathway in the regulation of cellular oxidative stress response. The activation of Nrf2/ARE pathway can protect vascular endothelial cells, vascular smooth muscle cells and islet β cells from oxidative stress injury, as well as improve insulin resistance by increasing insulin secretion. Nrf2/ARE pathway plays an important role in the prevent and treatment of diabetes associated atherosclerosis.

【Key words】 Nrf2/ARE signal pathway; Diabetes mellitus; Atherosclerosis; Oxidative stress

糖尿病是一组由各种病因引起的以慢性高血糖为特征的代谢性疾病, 由胰岛素分泌和(或)作用缺陷所引起。糖尿病大血管病变是其主要的致残、致死原因, 其中以动脉粥样硬化(AS)最常见。在引起 AS 的众多因素中, 氧化应激和炎症反应是导致糖尿病 AS 的两个重要发病机制。正常生理状态下, 体内活性氧簇的生成与消除处于一个动态平衡, 而糖尿病患者体内活性氧簇生成明显增多, 从而导致血管内皮损伤、 β 细胞功能障碍、胰岛素抵抗(IR)、炎症反应等, 进一步导致 AS 的发生。降低机体内的氧化应激水平, 保护血管内皮细胞免受氧化损伤, 改善胰岛素抵抗及抑制炎症反应等对糖尿病相关 AS 的防治具有重要意义。转录因子 NF-E2 相关因子 2 (Nrf2) 是体内调控氧化应激的重要转录因子, 当机体暴露在亲电子化合物和活性氧簇环境中, Nrf2 入核与抗氧化反应元件(ARE)结合发挥抗氧化应激作用。Nrf2/ARE 通路作为迄今为止发现的最为重要的内源性抗氧化应激通路, 与糖尿病 AS 的发生、

发展密切相关。以下就 Nrf2 的结构与功能及 Nrf2/ARE 通路与糖尿病 AS 发生的关系作一综述。

1 Nrf2 的基本结构及功能

Nrf2 是体内调控氧化应激的重要转录因子。Nrf2 含有 589 个氨基酸, 属于 CNC 家族的碱性亮氨酸拉链转录因子, 含有 Neh 1~6 共 6 个区。其中 Neh1 区的亮氨酸拉链结构 bZIP 可与小 Maf 蛋白结合形成异源二聚体, 进而与 ARE 结合。Neh2 区是 Nrf2 与其负调控因子 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap1) 结合的区域, 生理状态下, Keap1 将 Nrf2 锁定在胞质内并介导其泛素化以维持胞内 Nrf2 的稳态^[1-2]。Neh4 区和 Neh5 区与共激活因子 cAMP 反应元件结合蛋白结合后辅助 Nrf2 靶基因转录激活^[3]。Neh6 区是氧化还原非敏感区, 在氧化应激状态下与 Nrf2 的降解相关。

当机体暴露在亲电子化合物或活性氧簇环境中, Nrf2 与 Keap1 解离并转移入核与 ARE 结合, 启动下游抗氧化蛋白 HO-1、II 相解毒酶等的转录, 介导抗氧化作用及 II 相解毒作用。Nrf2/ARE 通路被证实在抗肿瘤、抗凋亡、抗炎性反应、抗 AS、神经保护等方面发挥重要作用^[4]。

2 Nrf2/ARE 通路与糖尿病 AS 的关系

糖尿病与 AS 关系密切, 表现为糖尿病患者出

现 AS 的时间早、程度重和预后差。糖尿病 AS 随着病情的进展可能发生心肌梗死、脑卒中等。其发生机制不十分清楚,目前有脂质浸润学说、内皮损伤学说、炎性反应学说、氧化应激学说等。其中氧化应激和炎性反应是两个关键环节。

Nrf2/ARE 通路是最重要的内源性抗氧化应激通路,可以通过对抗由氧化应激所致的血管内皮损伤、IR、晚期糖基化终末产物(AGE)生成、炎性反应等,在抗糖尿病 AS 的过程中具有非常重要的作用。

2.1 Nrf2/ARE 通路的抗氧化应激作用 氧化应激贯穿于 AS 从脂质条纹形成到粥样斑块形成、破裂的整个过程。Nrf2 的激活可以通过直接上调抗氧化酶等多种途径对抗氧化应激损伤。

Jayachandran 等^[5]将雄性叙利亚仓鼠随机分为 4 组:对照组、香叶醇喂养组(100 mg/kg bw po)、促 AS 饮食组(标准颗粒饮食 + 10% 椰子油 + 0.25% 胆固醇 + 0.25% 胆酸)、促 AS 饮食 + 香叶醇喂养组,喂养 12 周后将各组动物的肝脏、心脏及主动脉进行抗氧化分析,测定脂质过氧化作用标志物,并检测其组织学变化。结果发现,促 AS 饮食组与对照组相比,血脂、内皮功能标志物(一氧化氮)明显改变,而促 AS 饮食 + 香叶醇喂养组与对照组比较以上指标无明显差别;另外促 AS 饮食组与对照组相比,抗氧化酶的活性降低,脂质过氧化作用标志物增加、组织内 Nrf2 表达减少,并伴有明显的组织学改变,而促 AS 饮食 + 香叶醇喂养组 Nrf2 表达明显上调,且上述表现明显被抑制。说明香叶醇可以通过激活 Nrf2 改善氧化应激,预防 AS。

2.2 Nrf2/ARE 通路对血管内皮细胞的作用 高血糖所致氧化应激引起的内皮损伤被认为是糖尿病 AS 发生的始动因素^[6]。其主要通过以下几个方面实现:(1)损伤内皮依赖的血管扩张,内皮细胞损伤或暴露于 O_2^- 和 H_2O_2 能够诱导细胞凋亡。(2)活性氧簇诱导内皮细胞黏附分子表达。(3) H_2O_2 能够诱导内皮细胞增殖和迁移。

Donovan 等^[7]报道,当用 siRNA 抑制冠状动脉内皮细胞 Nrf2 表达或使 Keap1 过表达阻断 Nrf2 信号通路后,用血管内皮生长因子和胰岛素样生长因子-1 刺激诱导血管生成时, Nrf2 的缺失会使细胞增殖及黏附受损、细胞迁移和形成毛细血管样结构的能力下降,表明 Nrf2 是血管生成过程中正常内皮细胞的必需构件。Lee 等^[8]使用不同浓度的抗氧化剂丹酚酸 B 培养人脐静脉内皮细胞(HUVECs),然后

加入肿瘤坏死因子(TNF)- α 介导炎性反应,证实丹酚酸 B 能介导 Nrf2 的核转移及 HO-1 的表达增加,且 HO-1 的表达对丹酚酸 B 呈浓度依赖性;使用丹酚酸 B 培养 HUVECs 后,不管是否存在 TNF- α 均能抑制 HUVECs 内活性氧簇的生成;并能抑制核因子- κ B 的核转移,从而抑制炎性反应。使用 siRNA 抑制 Nrf2 或 HO-1 的表达后上述作用受到抑制。说明 Nrf2 的激活可以通过对抗氧化损伤及炎性反应发挥对血管内皮细胞的保护作用。

2.3 Nrf2/ARE 通路对血管平滑肌细胞(VMSCs)的保护作用 氧化应激和慢性炎性反应可以刺激 VMSCs 的增殖与迁移,促进平滑肌源性泡沫细胞形成并迁移至血管内膜,参与慢性炎性反应,促进 AS 形成。有研究者在体外培养 VMSCs,发现使用丹酚酸 B(抗氧化剂)后, Nrf2 被激活并介导 HO-1 的表达增加,且细胞内血小板源性生长因子刺激引起的活性氧簇生成以及 VMSCs 的增殖和迁移减少,而这些作用在使用 siRNA 抑制 Nrf2 或 HO-1 的表达后受到抑制^[8]。

Qin 等^[9]研究显示,山楂酸可使 VMSCs HO-1 表达上调,其机制是呈剂量和时间依赖方式激活蛋白激酶 B(Akt)及其下游的 Nrf2 的表达,当抑制 Akt 活化或用 siRNA 抑制 Nrf2 表达后 HO-1 的表达受抑制,说明山楂酸通过激活 Akt/Nrf2 途径引起 HO-1 的表达上调;研究同时发现山楂酸通过 Akt/Nrf2/HO-1 途径可以保护 VMSCs 免受 H_2O_2 引起的细胞凋亡,而用 siRNA 抑制 Nrf2 表达或用 MTT 抑制 HO-1 表达后,上述细胞保护作用消失,说明 Nrf2 的激活可保护 VMSCs 免受氧化应激损伤。

2.4 Nrf2 抑制氧化型低密度脂蛋白(oxLDL)诱导泡沫细胞形成 在 AS 形成的机制中,巨噬细胞吞噬 oxLDL 转变为泡沫细胞,泡沫细胞形成最早的 AS 脂质条纹,而细胞型脂肪酸结合蛋白是 oxLDL 介导泡沫细胞形成的关键,多不饱和脂肪酸氧化衍生物 2,4-癸二烯醛通过激活 Akt 和细胞外信号调节激酶信号转导途径,持续增强 Nrf2 的磷酸化核转移,通过上调细胞型脂肪酸结合蛋白的 mRNA 和蛋白质表达,对抗人巨噬细胞内多不饱和脂肪酸的氧化及其产物生成,表明 Nrf2 的激活可以通过抑制 oxLDL 生成进而抑制泡沫细胞形成^[10]。

2.5 Nrf2/ARE 通路保护胰岛 β 细胞改善 IR IR 是 AS 的独立危险因素^[11]。糖尿病患者持续的高血糖状态会产生过多的活性氧簇,诱发 IR。Nrf2/ARE

通路的激活可以减少活性氧簇的产生,减少由氧化应激介导的胰岛 β 细胞凋亡,改善 IR。

有研究显示,高糖诱导的小鼠胰岛 NIT-1 β 细胞合成与分泌胰岛素的能力下降^[12]。这与活性氧簇的生成影响胰岛 β 细胞功能有关,Nrf2 能够通过抗氧化应激发挥对 β 细胞的保护作用,Nrf2 激动剂叔丁基对苯二酚可使 Nrf2 入核增加,减少高糖引起的活性氧簇生成,改善胰岛 β 细胞氧化应激,同时恢复胰岛素分泌与合成功能;鸭胆子苦醇 (Brusatol 120 nmol/L) 处理 NIT-1 β 细胞后,细胞 Nrf2 蛋白的表达水平下降明显,NIT-1 β 细胞的胰岛素分泌与合成能力与高糖组相比损伤更加严重。提示 Nrf2 入核表达可以抵抗高糖诱导的胰岛 β 细胞氧化损伤,改善细胞合成与分泌胰岛素的功能。

2.6 Nrf2/ARE 通路的激活拮抗晚期糖基化终末产物 (AGE) AGE 属蛋白质、脂质及核酸通过非酶糖基化作用形成的一组化合物^[13]。高血糖时 AGE 生成增多,AGE 可以通过促进活性氧簇生成、核因子- κ B 活化、血管炎性反应等促进 AS。而 Nrf2 的激活可以对抗 AGE 所致损伤。

Huang 等^[14] 研究发现,用 AGE-BSA 培养肾小球系膜细胞 (GMCs) 90 d 后,AGE 以浓度和时间依赖方式增加 GMCs 纤连蛋白和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 的表达,而增加抗氧化物组蛋白去乙酰化酶的表达可以通过激活 Nrf2/ARE 信号通路明显减少 AGE 引起的纤连蛋白和 TGF- β_1 表达;动物实验显示,白藜芦醇能上调 Nrf2 的表达,同时抑制纤连蛋白和 TGF- β_1 在糖尿病大鼠肾脏的表达,并改善糖尿病大鼠肾功能;表明 Nrf2/ARE 通路的激活能对抗高血糖所致 AGE 引起的损伤。

2.7 Nrf2/ARE 通路的抗炎性反应作用 炎症反应是 AS 形成的重要机制之一,而 Nrf2/ARE 通路的激活可以通过对抗高血糖所致氧化应激,抑制炎症反应。

Lee 等^[15] 研究发现,DMA (Dimerumic acid) 显著抑制了 S100b (能激活单核细胞的 AGE 受体信号) 诱导 THP-1 单核细胞产生活性氧簇的能力,抑制氧化应激介导生成的炎症因子如 TNF- α 和 IL- β ,同时发现 DMA 可抑制核因子- κ B 入核,而在应用 siRNA 抑制 Nrf2 表达 72 h 后发现,DMA 抑制 TNF- α 和 IL- β 生成的作用明显弱化,说明 DMA 可以通过激活 Nrf2 的表达,抑制炎症因子生成,从而抑制炎症反应。

3 Nrf2 在抗糖尿病 AS 中的应用进展

由于 Nrf2/ARE 通路在抗氧化应激、抗肿瘤、抗 AS、神经保护等多领域中的重要作用,以 Nrf2 为靶点的药物研发在各领域展开了广泛的探索,目前在抗肿瘤、神经保护等领域已有相对较深入的研究,而在抗糖尿病 AS 领域,尚处在动物实验研究水平。

郑晓英^[16] 研究发现,白藜芦醇可一定程度的降低糖尿病大鼠空腹血糖及血清甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白-胆固醇水平,并改善 IR;显著降低血清白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6 水平,改善体循环炎性状态;显著降低 2 型糖尿病大鼠血清血管性血友病因子水平,改善血管通透性,抑制血管壁泡沫细胞和胆固醇结晶的形成,具有血管保护作用。Tan 等^[17] 研究证实,使用 Nrf2 受体激动剂甲基巴多索隆后,能通过降低氧化应激和炎症介质如 TNF- α 、细胞间黏附分子-1 等的表达,减少糖尿病鼠主动脉弓、胸主动脉及腹主动脉 AS 的发生。谢利平等^[18] 报道,硫化氢缓释剂 GYY4137 可通过影响 Nrf2 信号通路,引起下游抗氧化蛋白水平升高,从而有效清除氧自由基、减轻氧化应激水平、下调相关促炎因子,改善高糖及 oxLDL 所诱导的巨噬细胞及内皮细胞功能改变,抑制高糖及 oxLDL 诱导的泡沫细胞形成来延缓小鼠糖尿病 AS 的进程。

综上所述,糖尿病高血糖状态引起氧化应激进一步导致血管内皮损伤、IR、AGE 生成增多、炎症反应等,是 AS 发生、发展的重要因素。Nrf2 是体内调控氧化应激的关键因子,激活 Nrf2/ARE 通路可以通过直接上调 HO-1 等对抗氧化应激,减少活性氧簇的生成并抑制炎症反应,进而保护血管内皮细胞免受氧化损伤、减弱血管平滑肌细胞增殖及迁移、减少 oxLDL 引起的泡沫细胞生成,减少 AGE 的生成,增加胰岛素分泌并改善 IR,从而延缓 AS 的进展。Nrf2 激动剂在离体细胞及动物实验中已有一定的研究,其中白藜芦醇、甲基巴多索隆、硫化氢缓释剂已被证明有血管保护作用或抗 AS 作用,目前临床上尚未见使用 Nrf2 激动剂抗 AS,随着对 Nrf2/ARE 通路与糖尿病相关 AS 关系研究的深入,有理由相信在不久的将来会有以 Nrf2/ARE 通路为靶点的新药被开发出来用于对抗糖尿病 AS。

参 考 文 献

[1] Gao B, Doan A, Hybertson BM. The clinical potential of influ-

- encing Nrf2 signaling in degenerative and immunological disorders [J]. Clin Pharmacol, 2014, 6: 19-34. DOI: 10.2147/CPAA.S35078.
- [2] Ma L, Liu X, Zhao Y, et al. Ginkgolide B reduces LOX-1 expression by inhibiting Akt phosphorylation and increasing Sirt1 expression in oxidized LDL-stimulated human umbilical vein endothelial cells [J]. PLoS One, 2013, 8 (9): e74769. DOI: 10.1371/journal.pone.0074769.
- [3] Sato K, Yama K, Murao Y, et al. Epalrestat increases intracellular glutathione levels in Schwann cells through transcription regulation [J]. Redox Biol, 2013, 2: 15-21. DOI: 10.1016/j.redox.2013.11.003.
- [4] 潘晓菲, 谭初兵, 时丽丽, 等. Nrf2/ARE 信号通路及其相关药物研究进展 [J]. 药物评价研究, 2013, 36 (1): 54-58. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.01.014.
- [5] Jayachandran M, Chandrasekaran B, Namasivayam N. Geraniol attenuates oxidative stress by Nrf2 activation in diet-induced experimental atherosclerosis [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2015, 26 (4): 335-346. DOI: 10.1515/jbcp-2014-0057.
- [6] 吴彧, 孙琳, 黄彦生, 等. 氧化应激与炎症在动脉粥样硬化发生发展中的作用及相关治疗药物研究 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, (21): 127-129. DOI: 10.3969/j.issn.1673-5110.2014.21.086.
- [7] Donovan EL, McCord JM, Reuland DJ, et al. Phytochemical activation of Nrf2 protects human coronary artery endothelial cells against an oxidative challenge [J]. Oxid Med Cell Longev, 2012, 2012: 132931. DOI: 10.1155/2012/132931.
- [8] Lee HJ, Seo M, Lee EJ. Salvianolic acid B inhibits atherogenesis of vascular cells through induction of Nrf2-dependent heme oxygenase-1 [J]. Curr Med Chem, 2014, 21 (26): 3095-3106.
- [9] Qin X, Qiu C, Zhao L. Maslinic acid protects vascular smooth muscle cells from oxidative stress through Akt/Nrf2/HO-1 pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2014, 390 (1-2): 61-67. DOI: 10.1007/s11010-013-1956-4.
- [10] Lázaro I, Ferré R, Masana L, et al. Akt and ERK/Nrf2 activation by PUFA oxidation-derived aldehydes upregulates FABP4 expression in human macrophages [J]. Atherosclerosis, 2013, 230 (2): 216-222. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2013.07.043.
- [11] 沈燕, 黎红华. 胰岛素抵抗导致动脉粥样硬化的机制研究 [J]. 神经损伤与功能重建, 2012, 7 (5): 377-379. DOI: 10.3870/sjsscj.2012.05.018.
- [12] 宁梦丽, 丁文军, 张芳. Nrf2 抵抗胰岛 β 细胞氧化损伤的作用机制 [J]. 中国科学院大学学报, 2015, 32 (3): 301-308. DOI: 10.7523/j.issn.2095-6134.2015.03.003.
- [13] Hegab Z, Gibbons S, Neyses L, et al. Role of advanced glycation end products in cardiovascular disease [J]. World J Cardiol, 2012, 4 (4): 90-102. DOI: 10.4330/wjc.v4.i4.90.
- [14] Huang K, Huang J, Xie X, et al. Sirt1 resists advanced glycation end products-induced expressions of fibronectin and TGF- β 1 by activating the Nrf2/ARE pathway in glomerular mesangial cells [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 65: 528-540. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.029.
- [15] Lee BH, Hsu WH, Hsu YW, et al. Dimeric acid attenuates receptor for advanced glycation endproducts signal to inhibit inflammation and diabetes mediated by Nrf2 activation and promotes methylglyoxal metabolism into d-lactic acid [J]. Free Radic Biol Med, 2013, 60: 7-16. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.01.030.
- [16] 郑晓英. 白藜芦醇对 2 型糖尿病血管病变的保护作用及机制 [D]. 重庆医科大学, 2014.
- [17] Tan SM, Sharma A, Stefanovic N, et al. Derivative of bardoxolone methyl, dh404, in an inverse dose-dependent manner lessens diabetes-associated atherosclerosis and improves diabetic kidney disease [J]. Diabetes, 2014, 63 (9): 3091-3103. DOI: 10.2337/db13-1743.
- [18] 谢利平, 顾月, 孟国梁, 等. 硫化氢对糖尿病动脉粥样硬化的作用及机制研究 [C]. 第十二届全国脂质与脂蛋白学术会议论文汇编, 杭州, 2014, 164.

(收稿日期: 2016-05-19)

· 消息 ·

《国际内分泌代谢杂志》编辑部网络采编办公系统开通运行
及微信公众号开通通知

各位作者您好! 为提高稿件处理和办公效率,《国际内分泌代谢杂志》编辑部已从 2015 年 2 月开始使用网络采编办公系统。作者投稿采用新的网络平台 (<http://endocrine.paperopen.com>), 不再使用纸质投稿, 特此公告, 望作者们予以支持与配合。请不要轻信虚假投稿网站及广告, 在使用网络投稿系统中如您有任何疑问、意见和建议, 请您致电 022-83336730, 022-83336731 或者发邮件到 nfmfc@126.com。

本刊微信号: 国际内分泌代谢杂志。所有作者可通过用户名及密码在手机上查询稿件的处理状态, 检索相关文章。

本刊编辑部