



DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.03.013

<http://www.gjbl.net/gjblx/fileup/PDF/201303246.pdf>

## NADPH氧化酶与脑缺血/再灌注损伤

张朝弘 综述 刘丹彦 审校

(重庆医科大学附属第一医院麻醉科, 重庆 400016)

**[摘要]** 氧化应激是发生脑缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤的重要机制。近来研究发现, 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶产生的活性氧对脑I/R后的氧化应激起到重要的作用。一些方法(如常压高氧、缺血后处理)和一些药物(如罗布麻宁、替米沙坦、枞木酸、加兰他敏、雷公藤红素等)可以NADPH氧化酶为靶点治疗脑I/R损伤。

**[关键词]** NADPH氧化酶; 活性氧; 脑缺血/再灌注损伤

## NADPH oxidase and cerebral ischemia/reperfusion injury

ZHANG Zhaohong, LIU Danyan

*(Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)*

**Abstract** Oxidative stress is an important mechanism for cerebral ischemia/reperfusion(I/R) injury. Recently, studies indicate that reactive oxygen species (ROS) from nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase play a very important role in oxidative stress following cerebral ischemia/reperfusion. There are some strategies (such as normobaric hyperoxia, ischemic postconditioning) and some medicines (such as apocynin, telmisartan, betulinic acid, galantamine, celastrol) can reduce cerebral ischemia/reperfusion injury through targeting NADPH oxidase.

**Key words** NADPH oxidase; reactive oxygen species; cerebral ischemia/reperfusion injury

活性氧(reactive oxygen species, ROS)引起的氧化应激是缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤发生的一种重要的机制。而还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶是ROS产

生的主要来源, 在大脑神经元、血管内皮细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞中均可发现NADPH氧化酶<sup>[1]</sup>。以前大多使用自由基清除剂或天然抗氧化剂(如维生素C, E)来抗氧化损伤, 可是发现结果并不够理想。现在越来越多地关注产生ROS的来源

收稿日期 (Date of reception): 2012-07-24

作者简介 (Biography): 张朝弘, 硕士研究生, 主要从事围术期脑保护的研究。

通信作者 (Corresponding author): 刘丹彦, Email: liudanyan418@qq.com

基金项目 (Foundation items): 卫生部国家临床重点专科建设项目 [财社 (2011)170]; 重庆市医学重点学科建设项目 [渝卫科教 (2007)2]。

This work was supported by the Clinical Key Subject Construction Project of Ministry of Health of China [(2011)170] and the Chongqing Medical Key Discipline Construction Project, P.R.China [(2007)2].

(如NADPH氧化酶), 发现敲除NADPH氧化酶的基因<sup>[2]</sup>或使用NADPH氧化酶的抑制剂<sup>[3]</sup>可以大大减少氧化损伤, 表明NADPH氧化酶在脑保护方面具有重要意义。

## 1 NADPH 氧化酶的结构

NADPH氧化酶首先发现于中性粒细胞和巨噬细胞, 是由 gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>和Rac六种亚基组成的复合体<sup>[4]</sup>。gp91<sup>phox</sup>和p22<sup>phox</sup>亚基位于质膜上, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>和Rac亚基位于胞浆内。gp91<sup>phox</sup>是其主要的功能亚基即催化亚基, p22<sup>phox</sup>的C末端有一富含脯氨酸的尾巴。吞噬细胞中的NADPH氧化酶通常是静止的, 当受到某些胞外因素的刺激时, 胞浆中的p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>和Rac通过p22<sup>phox</sup>上富含脯氨酸的尾巴与之结合形成酶复合体, 这种结合能够使gp91<sup>phox</sup>活化, 从而发挥生物学作用。

## 2 NADPH 氧化酶家族

NADPH氧化酶(NADPH oxidase, NOX)催化亚基gp91<sup>phox</sup>/NOX2及其同源物统称为NOX家族蛋白。NOX家族蛋白包括NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, DUOX2<sup>[4]</sup>。这些同源物是由其位于质膜上的催化亚基命名的。在大脑内皮细胞、星形胶质细胞、小胶质细胞、神经元可发现NOX1, NOX2, NOX4的表达, 表明NOX1, NOX2, NOX4与大脑的氧化损伤有关<sup>[1, 5-6]</sup>。NOX2首先在吞噬细胞内发现, 因此常被称为吞噬细胞NADPH氧化酶。NOX2在非吞噬细胞内也有表达, 其中包括神经元, NOX2在海马神经元中主要位于膜的突触部位。NOX1主要表达于结肠, 血管平滑肌细胞及内皮细胞中也可见到。NOX4主要在成人和胎儿的肾组织表达, 亦在非吞噬型细胞中表达, 其中包括内皮细胞及血管平滑肌细胞。NOX3主要位于内耳, NOX5主要位于胚胎组织, DUOX1, 2主要在甲状腺组织中表达。

## 3 NOX 的激活

NOX2的活化可通过一些激酶如蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)等, 使p47<sup>phox</sup>磷酸化, 然后磷酸化的p47<sup>phox</sup>携带p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>和Rac转移至胞膜, p47<sup>phox</sup>与p22<sup>phox</sup>结合, p67<sup>phox</sup>和Rac使gp91<sup>phox</sup>

活化, 电子由NADPH氧化酶转移至O<sub>2</sub>, 产生超氧阴离子( $\cdot\text{O}_2^-$ )。NOX1由胞膜亚基NOX1, p22<sup>phox</sup>和胞浆亚基NOXO1, NOXA1, Rac组成, 其激活机制同NOX2相似。与NOX1和NOX2不同, NOX4由胞膜亚基NOX4和p22<sup>phox</sup>组成, 其激活不需要胞浆亚基, 而且NOX4产生过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)而不是 $\cdot\text{O}_2^-$ <sup>[7]</sup>。

## 4 脑 I/R 损伤机制与 NADPH 氧化酶的关系

### 4.1 氧化应激

在脑I/R损伤中, 可以通过NADPH氧化酶的表达与活化产生大量的ROS<sup>[3, 8-9]</sup>。生物体内产生的ROS主要是超氧阴离子( $\cdot\text{O}_2^-$ )与羟自由基( $\cdot\text{OH}$ )及其活性衍生物如过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、脂质过氧化物等。过量的ROS可导致脂质、蛋白质和核酸的过氧化损伤。ROS能通过激活各种转录因子, 如核转录因子激活蛋白-1(nuclear transcription factor activator protein-1, AP-1)[通过丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activation protein kinase, MAPK)尤其是细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)1/2、c-Jun氨基末端激酶(jun N-terminal kinase, JNK)途径]、核因子 $\kappa\text{B}$ (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ , NF- $\kappa\text{B}$ )等, 引起一系列的反应<sup>[10]</sup>。

### 4.2 硝化应激

NADPH氧化酶产生的 $\cdot\text{O}_2^-$ 与一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)产生的NO结合, 产生强氧化活性的过氧亚硝酸盐(ONOO<sup>-</sup>)。ONOO<sup>-</sup>能使蛋白质酪氨酸硝化产生3-硝基酪氨酸<sup>[5, 11]</sup>而损伤蛋白质的结构与功能。此过程还可使NO大量减少而使血管内皮细胞功能受损。ONOO<sup>-</sup>进一步生成羟自由基和二氧化氮自由基, 导致氧化损伤。

### 4.3 血-脑脊液屏障破坏

在脑I/R损伤后, 可以通过NADPH氧化酶活化和ROS产生增加, 导致血-脑脊液结构破坏、通透性增加。Kahles等<sup>[1]</sup>发现在局灶性脑I/R损伤后, 野生型小鼠NOX1表达增加、血-脑脊液通透性及脑水肿增加, 而NOX1基因敲除小鼠的血-脑脊液通透性及脑水肿程度大大减轻。Liu等<sup>[2]</sup>发现在小鼠局灶性脑I/R损伤后, gp91<sup>phox</sup>表达、基质金属蛋白酶-9表达、血-脑脊液通透性增加, 紧密连接蛋白表达减少, gp91<sup>phox</sup>基因敲除小鼠的上述改变被抑制。

#### 4.4 炎症反应

在I/R后可以发生氧化应激与炎症反应,二者相互影响、相互作用。Chen等<sup>[8]</sup>发现在野生型小鼠局灶性脑I/R损伤后, NADPH氧化酶活化、ROS产生增加, 可导致小胶质细胞活化、产生炎症介质如(IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 增加), 但在gp91<sup>phox</sup>基因敲除小鼠或使用了NADPH氧化酶抑制剂罗布麻宁后可以抑制小胶质细胞活化、炎症介质产生, 并可以减轻IL-1 $\beta$ 对小鼠的脑损伤。Pang等<sup>[12]</sup>发现人神经母细胞瘤(human neuroblastoma cell line, SK-N-SH)神经干细胞暴露于IL-1 $\beta$ 后可以导致NADPH氧化酶活化和ROS产生增加, 进一步引起环氧合酶2(cyclooxygenase 2, COX-2)、前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE2)表达增加, 使用NADPH氧化酶抑制剂二亚苯碘鎓后可以抑制上述改变。

#### 4.5 突触后密度改变

突触后密度(postsynaptic density, PSD)是位于中枢神经系统兴奋性突触后膜下的特异性的细胞骨架结构, 由多种蛋白质成分组成。Murotomi等<sup>[13]</sup>发现在大鼠局灶性脑I/R后, NADPH氧化酶的表达增加, 羧基化的PSD蛋白增加, PSD相关蛋白——神经连接蛋白、N-钙黏蛋白和SAP102减少, 这种改变可使突触功能受损甚至导致细胞死亡, 脑梗死体积增加, 使用NADPH氧化酶抑制剂罗布麻宁后可以抑制上述指标的改变, 可保护PSD的结构与突触的功能。

#### 4.6 细胞凋亡

研究表明在脑I/R损伤后, NADPH氧化酶活化和ROS产生增加, 进一步引起半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cysteine aspartic acid protease 3, caspase-3)增加、Bcl-2/Bax(B-cell lymphoma 2/Bcl-2 associated X protein)比值降低、细胞凋亡率增加, 使用了NADPH氧化酶抑制剂罗布麻宁后可以抑制上述改变, 说明NADPH氧化酶与细胞凋亡的发生有关<sup>[14-15]</sup>。抑制NADPH氧化酶可以减少脑I/R损伤导致的细胞凋亡, 起到脑保护作用<sup>[16-17]</sup>。

### 5 以NADPH氧化酶为靶点治疗脑I/R损伤

#### 5.1 非药物治疗

##### 5.1.1 常压高氧

常压高氧(normobaric hyperoxia, NBO)(95%

O<sub>2</sub>与5% CO<sub>2</sub>)与常氧(21% O<sub>2</sub>)相比, 可以扩大缺血性卒中的治疗时间窗, 减少并发症。Tang等<sup>[9]</sup>在大鼠局灶性脑I/R模型中, 在缺血期给予NBO, 发现NBO可以增加组织氧分压、减少ROS产生, 其作用机制与减少gp91<sup>phox</sup>的表达及NADPH氧化酶的活性有关。Liu等<sup>[2]</sup>在小鼠局灶性脑I/R模型中, 发现: 野生型小鼠的血-脑脊液通透性增加, gp91<sup>phox</sup>及基质金属蛋白酶-9表达增加, 紧密连接蛋白水平下降, 而在缺血期给予NBO及gp91<sup>phox</sup>基因敲除的小鼠, 血-脑脊液通透性降低, gp91<sup>phox</sup>及基质金属蛋白酶-9表达减少, 紧密连接蛋白水平上升, 其作用机制与减少gp91<sup>phox</sup>的表达及降低NADPH氧化酶的活性有关。

##### 5.1.2 缺血后处理

缺血后处理, 即在缺血后、永久性再灌注之前, 实行几个简短的I/R循环, 以达到减轻I/R损伤的作用。Shen等<sup>[3]</sup>在小鼠全脑I/R模型中实施缺血后处理, 即在缺血后、永久性再灌注之前, 实行15 s再灌注/15 s缺血循环3个, 发现缺血后处理可以增加小鼠存活率及神经元存活率, 减少神经功能缺陷及·O<sub>2</sub>·的产生, 其作用机制与减少gp91<sup>phox</sup>及p47<sup>phox</sup>的表达、抑制p47<sup>phox</sup>向胞膜转移、抑制Rac1活化有关。

#### 5.2 药物治疗

##### 5.2.1 罗布麻宁

罗布麻宁, 又叫做夹竹桃麻素、香茱兰乙酮, 是存在于传统中医中的一种天然化合物。在一些实验中都证明了罗布麻宁具有减少ROS产生、NADPH氧化酶活性、细胞凋亡率、大脑梗死体积、神经功能缺陷的作用<sup>[3,13-14,18-19]</sup>。罗布麻宁通过阻止p47<sup>phox</sup>与NOX2组装而抑制NADPH氧化酶活化, 但罗布麻宁的这种作用需要髓过氧化物酶的存在<sup>[20]</sup>。罗布麻宁还因为其较窄的治疗剂量范围而使其使用受到限制, 因为高剂量的罗布麻宁可能具有促氧化作用<sup>[21]</sup>。Connell等<sup>[22]</sup>在大鼠局灶性脑I/R模型中, 使用低剂量的罗布麻宁联合硫辛酸预处理, 发现单独使用低剂量的罗布麻宁或硫辛酸不能减少脑梗死体积, 而联合应用可以显著减少脑梗死体积, 说明罗布麻宁与硫辛酸联合使用能以较少的剂量达到较高的脑保护作用。

##### 5.2.2 替米沙坦

替米沙坦是血管紧张素II受体1(angiotensin II Type 1 receptor, AT1)拮抗剂, 可拮抗血管紧

张素 II 对AT<sub>1</sub>受体的刺激作用, 常用于治疗高血压、心力衰竭。Pang等<sup>[12]</sup>利用人SK-N-SH神经干细胞培养, 使其暴露于IL-1 $\beta$ 中, 研究替米沙坦对IL-1 $\beta$ 导致的神经干细胞损伤的保护作用及其可能的机制, 发现IL-1 $\beta$ 可引起COX-2, PGE<sub>2</sub>, ROS表达增加; 替米沙坦可使COX-2, PGE<sub>2</sub>, ROS表达减少, 其作用机制与NADPH氧化酶的活性有关。IL-1 $\beta$ 通过NADPH氧化酶的活化, 使COX-2, PGE<sub>2</sub>, ROS表达增加; 替米沙坦通过抑制NADPH氧化酶的活化, 使COX-2, PGE<sub>2</sub>, ROS表达减少。替米沙坦可减少IL-1 $\beta$ 引起的神经元炎症, 具有脑保护作用。

### 5.2.3 桦木酸

桦木酸存在于桦属植物白桦的树皮中, 具有抗肿瘤、抗艾滋病病毒、抗炎和体外抗疟疾等多种生物活性。Lu等<sup>[11]</sup>在小鼠局灶性大脑I/R模型中通过桦木酸预先给药, 发现桦木酸可以减少大脑I/R后的脑梗死体积、神经功能缺陷, 其作用机制与减少NOX2的表达有关。

### 5.2.4 加兰他敏

加兰他敏为治疗阿尔兹海默病(老年痴呆症)的首选药。Egea等<sup>[23]</sup>利用大鼠海马切片培育, 实施氧-糖剥夺(oxygen and glucose deprivation, OGD)/再充氧, 发现加兰他敏可以减少细胞死亡及ROS的产生, 其作用机制与抑制NADPH氧化酶活化有关。

### 5.2.5 雷公藤红素

雷公藤红素是一个具有多种生物活性的天然产物, 来源于中药雷公藤的根皮, 具有抗肿瘤、抗炎、抗神经退行性疾病等作用。Jaquet等<sup>[24]</sup>利用体外细胞培养发现雷公藤红素可以抑制NOX1和NOX2活化, 减少ROS产生, 其作用机制与抑制p47<sup>phox</sup>或NOXO1与p22<sup>phox</sup>结合有关。

## 6 结 语

NADPH氧化酶可以通过引起氧化应激、硝化应激、血-脑脊液破坏、炎症反应、细胞凋亡等在脑I/R损伤中发挥重要的作用, 可以通过一些方法或药物抑制NADPH氧化酶的活化、表达, 从而减轻脑I/R损伤。因此, NADPH氧化酶成为治疗缺血性卒中的新靶点。虽然一些研究证明某些方法或药物可以抑制NADPH氧化酶的活化、表达, 但是其具体机制并不完全清楚, 而且某些药物对NADPH氧化酶的抑制作用特异性及选择性不高, 并不适合于临床。进一步研究NADPH氧化酶的

调控机制和特异性及选择性更高的NADPH氧化酶抑制剂, 在治疗缺血性卒中方面具有非常重要的意义。

## 参考文献

1. Kahles T, Kohnen A, Heumueller S, et al. NADPH oxidase Nox1 contributes to ischemic injury in experimental stroke in mice[J]. *Neurobiol Dis*, 2010, 40(1): 185-192.
2. Liu W, Chen Q, Liu J, et al. Normobaric hyperoxia protects the blood brain barrier through inhibiting Nox2 containing NADPH oxidase in ischemic stroke[J]. *Med Gas Res*, 2011, 1(1): 22.
3. Shen J, Bai XY, Qin Y, et al. Interrupted reperfusion reduces the activation of NADPH oxidase after cerebral I/R injury[J]. *Free Radical Bio Med*, 2011, 50(12): 1780-1786.
4. Krause KH, Lambeth D, Krönke M. NOX enzymes as drug targets[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(14): 2279-2282.
5. De Silva TM, Brait VH, Drummond GR, et al. Nox2 oxidase activity accounts for the oxidative stress and vasomotor dysfunction in mouse cerebral arteries following ischemic stroke[J]. *PloS One*, 2011, 6(12): e28393.
6. Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, et al. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration[J]. *PloS Biol*, 2010, 8(9): e1000479.
7. Kahles T, Brandes R. NADPH oxidases as therapeutic targets in ischemic stroke[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(14): 2345-2363.
8. Chen H, Kim GS, Okami N, et al. NADPH oxidase is involved in post-ischemic brain inflammation[J]. *Neurobiol Dis*, 2011, 42(3): 341-348.
9. Tang X, Liu KJ, Ramu J, et al. Inhibition of gp91phox contributes towards normobaric hyperoxia afforded neuroprotection in focal cerebral ischemia[J]. *Brain Res*, 2010, 1348: 174-180.
10. Schramm A, Matusik P, Osmenda G, et al. Targeting NADPH oxidases in vascular pharmacology[J]. *Vasc Pharmacol*, 2012, 56(5/6): 216-231.
11. Lu Q, Xia N, Xu H, et al. Betulinic acid protects against cerebral ischemia-reperfusion injury in mice by reducing oxidative and nitrosative stress[J]. *Nitric Oxide*, 2011, 24(3): 132-138.
12. Pang T, Wang J, Benicky J, et al. Telmisartan directly ameliorates the neuronal inflammatory response to IL-1beta partly through the JNK/c-Jun and NADPH oxidase pathways[J]. *J Neuroinflamm*, 2012, 9(1): 102.
13. Murotomi K, Takagi N, Takeo S, et al. NADPH oxidase-mediated oxidative damage to proteins in the postsynaptic density after transient cerebral ischemia and reperfusion[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2011, 46(3): 681-688.

14. Genovese T, Mazzon E, Paterniti I, et al. Modulation of NADPH oxidase activation in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Brain Res, 2011, 1372(2): 92-102.
15. Hur J, Lee P, Kim MJ, et al. Ischemia-activated microglia induces neuronal injury via activation of gp91phox NADPH oxidase[J]. Biochem Bioph Res Co, 2010, 391(3): 1526-1530.
16. Chen H, Yoshioka H, Kim G, et al. Oxidative stress in ischemic brain damage: mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection[J]. Antioxid Redox Sign, 2011, 14(8): 1505.
17. Yoshioka H, Niizuma K, Katsu M, et al. NADPH oxidase mediates striatal neuronal injury after transient global cerebral ischemia[J]. J Cerebr Blood F Met, 2010, 31(3): 868-880.
18. Pamenter ME, Ali SS, Tang Q, et al. An in vitro ischemic penumbral mimic perfusate increases NADPH oxidase-mediated superoxide production in cultured hippocampal neurons[J]. Brain Res, 2012, 1452(2): 165-172.
19. Zhang R, Ran Hh, Ma J, et al. NAD(P)H oxidase inhibiting with apocynin improved vascular reactivity in tail-suspended hindlimb unweighting rat[J]. J Physiol Biochem, 2012, 68(1): 99-105.
20. Stefanska J, Pawliczak R. Apocynin: molecular aptitudes[J]. Mediat Inflamm, 2008, 2008: 106507.
21. Castor LRG, Ximenes VF. Pro-oxidant activity of apocynin radical[J]. Free Radical Bio Med, 2010, 48(12): 1636-1643.
22. Connell BJ, Saleh TM. Co-administration of apocynin with lipoic acid enhances neuroprotection in a rat model of ischemia/reperfusion[J]. Neurosci Lett, 2012, 507(1): 43-46.
23. Egea J, Martín-de-Saavedra MD, Parada E, et al. Galantamine elicits neuroprotection by inhibiting iNOS, NADPH oxidase and ROS in hippocampal slices stressed with anoxia/reoxygenation[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(2): 1082-1090.
24. Jaquet V, Marcoux J, Forest E, et al. NADPH oxidase (NOX) isoforms are inhibited by celastrol with a dual mode of action[J]. Brit J Pharmacol, 2011, 164(2b): 507-520.

( 本文编辑 傅希文 )

**本文引用:** 张朝弘, 刘丹彦. NADPH 氧化酶与脑缺血 / 再灌注损伤 [J]. 国际病理科学与临床杂志, 2013, 33(3): 246-250. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.03.013

**Cite this article as:** ZHANG Zhaohong, LIU Danyan. NADPH oxidase and cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. International Journal of Pathology and Clinical Medicine, 2013, 33(3): 246-250. DOI:10.3969/j.issn.1673-2588.2013.03.013