

[30] Yusuf S, Sleight P, Pogue J, et al. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med*, 2000, 342(3): 145-153.

[31] Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A 3rd, et al. High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack. *N*

Engl J Med, 2006, 355(6): 549-559.

[32] Ringleb PA, Bhatt DL, Hirsch AT, et al. Benefit of clopidogrel over aspirin is amplified in patients with a history of ischemic events. *Stroke*, 2004, 35(2): 528-532.

[33] Rordorf G, Koroshetz WJ, Ezzeddine MA, et al. A pilot study of drug-induced hypertension for treatment of acute stroke. *Neurology*, 2001, 56(9): 1210-1213.

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 p22phox 亚基与出血性脑卒中

李洪涛 综述 赵迎春 审校

南京医科大学附属上海松江中心医院神经内科,上海市 201600

摘要:近年来研究发现活性氧(ROS)所导致的氧化应激反应与出血性脑卒中的发生和发展有密切相关性。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶作为机体内皮细胞以及血管平滑肌细胞中活性氧最为重要的来源,在出血性脑卒中中扮演了重要角色。p22phox 亚基是 NADPH 氧化酶的一个重要亚基,在传递电子及产生超氧阴离子方面起重要作用。

关键词:烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶;p22phox 亚基;活性氧;脑卒中;脑出血

出血性脑卒中是遗传和环境等多种因素共同作用所致的极其复杂的疾病,遗传因素在出血性脑卒中发病中发挥了重要作用^[1],而环境因素中高血压、高血脂、糖尿病和冠心病等也是其发病的危险因素,这些高危因素或多或少亦与遗传有关。近几年,随着分子生物学技术的发展,许多学者对其遗传学进行了大量的研究,发现了许多与之相关的基因位点和多态性,其中包括烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶 p22phox 亚基多态性。因此,识别和克隆脑血管病的易感基因将有助于脑血管病的早期诊断、临床分型、个体化治疗及预后判断。

1 NADPH 氧化酶及其 p22phox 亚基概述

NADPH 氧化酶最早在吞噬细胞中发现,所以被称为吞噬细胞氧化酶(phagocyte oxidase, phox)。它由多个亚基组成,包括 2 个跨膜亚基(p22phox 和 gp91phox)和多个胞浆内亚基(p47phox、p67phox 和 p40phox)以及 2 个 G 蛋白(rac 和 rap1A)^[2]。近年研究发现,在机体内皮细胞以及血管平滑肌细胞中

也存在 NADPH 氧化酶,除了不表达 p40phox 外,结构上和吞噬细胞 NADPH 氧化酶相似。细胞处于静止期时,p40phox、p47phox 和 p67phox 亚基以复合体的形式位于胞浆中;p22phox 和 gp91phox 位于细胞膜上,两者相互结合形成一个复杂二聚体,即细胞色素 b558。此时酶并没有活性,当受到刺激被激活后,p47phox 发生磷酸化并带动整个胞液复合体向细胞膜迁移,与细胞膜上的细胞色素 b558 结合,形成有活性的 NADPH 氧化酶复合体。该酶被激活后,整个电子转运均在细胞色素内完成,正因为胞质子通过与 p22phox 单位结合而使细胞色素 b558 起着将电子 NADH/NADPH 运输到氧原子运输体的作用,所以 p22phox 亚单位在氧化酶的正常功能及产生 O₂⁻中起着重要作用,由此产生的 O₂⁻使得 NO 过度消耗生成亚硝酸盐、硝酸盐、过亚硝酸盐,导致内皮依赖的血管舒张、抗血栓、抑制细胞生长等生物效率降低。而且活性氧(reactive oxygen species, ROS)刺激内皮细胞释放血管细胞黏附分子(vascularcell adhesion molecule-1, VCAM-1)、单核细胞趋化因子(mon-

基金项目:上海市卫生局科研课题资助项目(2010098)

收稿日期:2011-06-10;修回日期:2011-09-13

作者简介:李洪涛(1986-),男,南京医科大学研究生,主要从事脑血管病的研究。

通讯作者:赵迎春(1965-),男,教授,主任医师,硕士。主要从事脑血管病、帕金森病研究。

ocyte chemoattractant protein, MCP-1) 等细胞因子,使单核细胞向血管壁聚集,形成泡沫细胞,反过来泡沫细胞又可以释放 O_2 和 H_2O_2 。另外,中等量的 ROS 产物可作为细胞内的第二信使,通过激活血管平滑肌细胞与生长相关的信号传导系统引起血管平滑肌细胞的增生;并通过调节平滑肌基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的活性,参与血管重塑及引起斑块破裂^[3-5],因此它与血管性疾病的发生有密切关系。

p22phox 亚单位由基因座 CYBA 编码^[6],位于染色体 16q24,有大约 600 bp 的开放阅读框,由 6 个外显子所编码。其翻译产物是长度为 195 个氨基酸的片段。p22phox 基因多态性共有 10 种,而研究较多的是 C242T 和 A640G 两种多态性。Inoue 等^[7]用 PCR 对 p22phox 基因 C242T 多态性位点进行了扩增并对扩增片段进行研究发现核苷酸 242 位点 C→T 的变异能被限制性内切酶 Rsa I 特异性识别并切割,证实 C242T 多态性可致第 72 位组氨酸被酪氨酸取代,影响到 NADPH 氧化酶的活性,从而影响血管壁自由基的代谢,成为心脑血管病的危险因素之一。日本学者的研究也表明 C242T 多态性是缺血性脑血管病的危险因素^[8],并与 TIA 及颈动脉粥样硬化有关^[9, 10]。而 A640G 多态性位于 3' 非翻译区, Gardemann 等^[11]对 2205 名白人男性冠心病患者的研究表明 A640G 的 G 等位基因频率在对照组明显高于病例组,AA 基因型更常见于冠心病组,在高危年轻个体中这种关系更为明显,表明 A640G 多态性与冠心病相关。

2 p22phox 亚基与出血性脑卒中

2.1 p22phox 亚基与出血性脑卒中危险因素之间的关系

José 等^[12]通过比较 70 例高血压患者与 70 名健康对照者的吞噬细胞 p22phox 基因的表达及 NADPH 氧化酶所形成的氧自由基来推断其多态性与高血压的关系。在高血压患者中通过对-930 位点 GG 型、AA 型、AG 型三种组型的比较发现,GG 型的患者能产生更多的吞噬细胞 p22Phox mRNA 以及更多的蛋白合成,从而增强 NADPH 氧化酶的活性,而在对照组中未发现差别,这提示 p22phox-930 位点为 GG 型的高血压患者更易导致 NADPH 氧化酶发生氧化应激反应。Moreno 等^[13]对-675A/T 多态性(位于 CYBA 基因启动子区域-675 位点)与高血压关系的研究中发现 TT 型的基因表达在高血压患者中出现的

频率更高。此外,-675 位点为 TT 型的高血压患者相比其他两种基因型的患者,血压检测值更高,颈动脉血管壁也较厚。

由此可见 p22phox 亚基与出血性脑卒中的主要危险因素之一高血压有着密切的联系^[14],而 p22phox 亚基与出血性脑卒中的另一个危险因素动脉瘤的形成却存在争议。Tamura 等^[15]制备了雌二醇缺乏的高血压雌鼠模型,该模型的特点是脑动脉瘤的发生率比对照组鼠明显增高,同时还测得实验组鼠血管壁内皮细胞中一氧化氮合酶含量下降,而脑动脉瘤中的血管紧张素 II 和 NADPH 氧化酶 p22phox 亚基却得到大量的表达,这说明 NADPH 氧化酶 p22phox 亚基与大脑动脉瘤的形成有密切关系。但 Krex 等^[16]收集高加索地区 113 名颅内动脉瘤患者和 53 名正常对照组病人,采用限制性片段长度多态性分析法研究 p22phox 基因的多态性,结果发现该基因的多态性与脑动脉瘤的发生没有关联。

2.2 p22phox 亚基与脑出血及蛛网膜下腔出血

Wakisaka 等^[17]通过对超氧化物歧化酶(SOD)转基因以及 SOD 基因敲除的高血压小鼠研究发现,活性氧与高血压引起的自发性脑出血有着密切的联系。Tang 等^[18]和 Muhammad 等^[19]认为 NADPH 氧化酶产生的氧化应激参与了脑出血的发生并促进了脑损伤,但他们的研究并没有检测 p22phox 亚基与脑出血的关系。迄今,尚未见 p22phox 亚基及其多态性与脑出血、蛛网膜下腔出血的关系的研究报道。

2.3 p22phox 亚基与蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛的关系

蛛网膜下腔出血(SAH)后脑血管痉挛并非是简单的血管收缩,而是源于血管平滑肌细胞和内皮细胞超微结构及功能的变化。Dong 等^[20]对 SAH 后脑血管痉挛小鼠模型应用 NADPH 氧化酶抑制剂二亚苯基碘(diphenylene iodonium, DPI)后发现脑血管痉挛症状得到明显改善,说明 NADPH 氧化酶可能是导致 SAH 后脑血管痉挛的主要物质之一。同时对实验小鼠研究发现 NADPH 氧化酶亚基 p47phox 在小鼠模型第二次注入自体血液后得到大量表达,但 p22phox 的表达却没有明显增加,说明 p22phox 与 SAH 后脑血管痉挛无关。Shin 等^[21]也报道 SAH 后脑血管痉挛与 p22phox 亚基无关。

尽管 NADPH 氧化酶 p22phox 亚基与出血性脑卒中的危险因素密切相关,但目前尚没有直接的研究资料显示 p22phox 亚基及其多态性对出血性脑卒中

的发生是否有影响。p22phox 亚基多态性与冠心病、缺血性脑卒中的关系虽然有临床试验研究支持,但由于种族差异、技术条件及样本量大小所限,得到了不同甚至相反的结果^[22-27]。此外 p22phox 基因多态性在出血性脑卒中发病中的确切作用机制目前尚不清楚。

3 小结

NADPH 氧化酶所造成的氧化应激,可引起单核细胞或巨噬细胞的迁移及黏附、炎症基因的表达、细胞外基质的重构及斑块破裂、脂质过氧化反应、抗氧化防御系统上调、内皮细胞功能障碍等一系列变化^[28,29]。p22phox 亚基是 NADPH 氧化酶的一个重要亚基,在传递电子及产生超氧阴离子方面起重要作用。因此,加强对 p22phox 亚基及其多态性的研究,以阐明其正常功能及在脑血管疾病中的作用,了解其与出血性脑卒中发生的内在联系,对出血性脑卒中的早期检测及预防及预后判断有一定的意义。

参 考 文 献

[1] Catto AJ. Genetic aspect of the hemostatic system in cerebrovascular disease. *Neurology*, 2001, 57(5 Suppl 2): S24-30.

[2] Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, 2000, 86(5): 494-501.

[3] 高菊华,高小平. 细胞外基质、基质金属蛋白酶和颈动脉粥样斑块. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(4): 323-325.

[4] 王静云. 基质金属蛋白酶-9 在缺血性脑损伤和脑缺血耐受中的表达. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(5): 457-461.

[5] Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, et al. Pathophysiological Roles of NADPH Oxidase/Nox Family Proteins in the Vascular System-Review and Perspective. *Circ J*, 2011, 75(8): 1791-1800.

[6] Moreno Maria U, Zalba Guillermo. CYBA gene variants as biomarkers for coronary artery disease. *Drug New Perspect*, 2010, 23(5): 316-324.

[7] Inoue N, Kawashima S, Kanazawa K, et al. Polymorphism of the NADH/NADPH oxidase p22 phox gene in patients with coronary artery disease. *Circulation*, 1998, 97(2): 135-137.

[8] Ito D, Murata M, Watanabe K, et al. C242T polymorphism of NADPH oxidase p22 PHOX gene and ischemic cerebrovascular disease in the Japanese population. *Stroke*, 2000, 31(4): 936-939.

[9] 宋玉强,邹宏丽,张晨. NAD(P)H 氧化酶 p22phox 亚基 C242T 基因多态性与短暂性脑缺血发作关系的研究. *中华神经医学杂志*, 2008, 7(12): 1217-1219.

[10] 张晨,宋玉强,张晓兰,等. NAD(P)H 氧化酶 p22phox 亚基 C242T 基因多态性与颈动脉粥样硬化. *中华神经科杂志*, 2008, 41(1): 25-28.

[11] Gardemann A, Mages P, Katz N, et al. The p22 phox A640G gene polymorphism but not the C242T gene variation is associated with coronary heart disease in younger individuals. *Atherosclerosis*, 1999, 145(2): 315-323.

[12] San José G, Moreno MU, Oliván S, et al. Functional effect of the p22phox-930A/G polymorphism on p22phox expression and NADPH oxidase activity in hypertension. *Hypertension*, 2004, 44(2): 163-169.

[13] Moreno MU, San José G, Fortuño A, et al. A novel CYBA variant, the-675A/T polymorphism, is associated with essential hypertension. *J Hypertens*, 2007, 25(8): 1620-1626.

[14] Cifuentes ME, Pagano PJ. Targeting reactive oxygen species in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15(2): 179-186.

[15] Tamura T, Jamous MA, Kitazato KT. Endothelial damage due to impaired nitric oxide bioavailability triggers cerebral aneurysm formation in female rats. *J Hypertens*, 2009, 27(6): 1284-1292.

[16] Krex D, Ziegler A, König IR, et al. Polymorphisms of the NADPH oxidase P22PHOX gene in a Caucasian population with intracranial aneurysms. *Cerebrovasc Dis*, 2003, 16(4): 363-368.

[17] Wakisaka Y, Chu Y, Miller JD, et al. Critical role for copper/zinc-superoxide dismutase in preventing spontaneous intracerebral hemorrhage during acute and chronic hypertension in mice. *Stroke*, 2010, 41(4): 790-797.

[18] Tang J, Liu J, Zhou C, et al. Role of NADPH oxidase in the brain injury of intracerebral hemorrhage. *J Neurochem*, 2005, 94(5): 1342-1350.

[19] Muhammad T, Zia MT, Csiszar A, et al. Oxidative-Nitrosative Stress in a Rabbit Pup Model of Germinal Matrix Hemorrhage: Role of NAD(P)H Oxidase. *Stroke*, 2009, 40(6): 2191-2198.

[20] Dong Eun Kim, Young Suk Suh, Mi-Sook Lee, et al. Vascular NAD(P)H Oxidase Triggers Delayed Cerebral Vasospasm After Subarachnoid Hemorrhage in Rats. *Stroke*, 2002, 33(11): 2687-2691.

[21] Shin HK, Lee JH, Kim KY, et al. Impairment of autoregulatory vasodilation by NAD(P)H oxidase-dependent superoxide generation during acute stage of subarachnoid hemorrhage in rat pial artery. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2002, 22(7): 869-877.

- [22] Kuroda J, Kitazono T, Ago T. NAD(P)H oxidase p22phox C242T polymorphism and ischemic stroke in Japan: the Fukuoka Stroke Registry and the Hisayama study. *Eur J Neurol*, 2007, 14(10): 1091-1097.
- [23] Cai H, Duarte N, Wilcken DE, et al. NADPH oxidase p22phox C242T polymorphism and coronary artery disease in the Australian population. *Eur J Clin Invest*, 1999, 29(9): 744-748.
- [24] Cahilly C, Ballantyne CM, Lim DS, et al. A variant of p22 (phox), involved in generation of reactive oxygen species in the vessel wall is associated with progression of coronary atherosclerosis. *Circ Res*, 2000, 86(4): 391-395.
- [25] Kalinina N, Agrotis A, Tararak E, et al. Cytochrome b558-dependent NAD(P)H oxidase-phox units in smooth muscle and macrophages of atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002, 22(12): 2037-2043.
- [26] Gastejon AM, Bracero J, Hoffmann IS, et al. NAD(P)H oxidase p22phox gene C242T polymorphism, nitric oxide production, salt sensitivity and cardiovascular risk factors in Hispanics. *J Hum Hypertens*, 2006, 20(10): 772-779.
- [27] Nakano T, Matsunaga S, Nagata A, et al. NAD(P)H oxidase p22phox Gene C242T polymorphism and lipoprotein oxidation. *Clin Chim Acta*, 2003, 335(1-2): 101-107.
- [28] Drummond Grant R, Selemidis Stavros, Griendling Kathy K, et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nature Rev drug disc*, 2011, 10(6): 453-471.
- [29] 赵建功, 顾东风. p22phox 基因多态性与冠心病的关系研究进展. *中国医学科学院学报*, 2002, 24(1): 105-109.

蛛网膜下腔出血后脑基底动脉平滑肌细胞离子通道的变化

符永健¹ 综述 施贤清¹, 王迪芬² 审校

1. 贵州省人民医院重症医学科, 贵州省贵阳市 550002

2. 贵阳医学院附属医院重症医学科, 贵州省贵阳市 550004

摘要: 脑血管痉挛(CVS)是蛛网膜下腔出血(SAH)的并发症之一,常导致患者不良预后。离子通道的异常变化与SAH后CVS有着密切的关系。研究表明,SAH后钾离子通道功能失调,进而引起脑血管平滑肌细胞膜电位去极化及引起钙离子通道开放概率增加,使钙离子内流增加,造成CVS。但离子通道与SAH后CVS的确切关系至今仍没有完全阐明,特别是关于SAH后基底动脉平滑肌细胞内离子通道相关因素在CVS中的作用更是鲜有报导。故本文主要就SAH后基底动脉平滑肌细胞内离子通道相关因素在CVS中的作用进行综述。

关键词: 蛛网膜下腔出血; 脑血管痉挛; 发病机制; 离子通道

蛛网膜下腔出血(subarachnoid hemorrhage, SAH)已经给个人和社会带来了巨大影响,其30 d死亡率约50%,而且大多数幸存者留有不同程度的残疾^[1]。SAH后CVS的发病率高达30%~90%,是导致患者高伤残率和高病死率的主要原因之一^[2]。许多学者对SAH后脑血管痉挛(cerebral vasospasm, CVS)的发生机制进行大量研究,认为是诸多因素相互作用所致,但至今没完全明确。NO、内皮素、氧合血红蛋白^[3]、免疫炎症反应、离子通道及离子浓

度^[4,6]的改变等在发病机制中均有重要作用。离子通道是细胞膜上一种特殊整合蛋白,在脂质双分子层膜上构成高度选择性的亲水性孔道,允许适当大小和电荷离子以被动转运的方式通过。离子通道具有四大主要生理功能:①形成细胞生物电现象的基础;②介导兴奋-收缩耦联和兴奋分泌耦联;③参与细胞跨膜信号转导工程;④维持细胞正常形态和功能完整^[7]。

1 钾离子通道(potassium channels)与CVS的关系

基金项目:贵州省科学技术基金项目(黔科合J字[2010]2155号)

收稿日期:2011-06-17;修回日期:2011-09-16

作者简介:符永健(1980-),男,住院医师,硕士在读,主要从事药物脑保护的研究。

通讯作者:施贤清(1974-),男,副主任医师,博士,硕士生导师,主要从事药物脑保护的研究。