

# NADPH 氧化酶在神经退行性疾病中的作用

齐倩倩<sup>1</sup> 综述 吕佩源<sup>1 2</sup> 审校

1. 河北医科大学研究生学院 河北省石家庄市 050017

2. 河北省人民医院神经内科 河北省石家庄市 050051

**摘要:** 神经退行性疾病与中枢神经系统内的氧化应激、异常蛋白聚集及炎症反应相关。尽管确切的发病机制目前还不清楚,但研究发现 NADPH 氧化酶(NOX)在神经退行性疾病的发病过程起了重要的作用,可能成为一个新的药物治疗靶点。因此,本文对 NOX 进行了概述,并探讨了它与神经退行性疾病之间的关系。

**关键词:** NADPH 氧化酶;神经退行性疾病;氧化应激;ROS

神经退行性疾病是一种以神经元退行性病变为特征的慢性进行性不可逆的神经系统疾病,主要包括帕金森病(Parkinson's disease, PD)、阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)、亨廷顿舞蹈病(Huntington disease, HD)和肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)。其特征是异常蛋白聚集物的积累,这些异常的蛋白聚集物可以导致中枢神经系统内的炎症反应和氧化应激<sup>[1]</sup>。大脑组织富含大量的磷脂和多链不饱和脂肪酸,这些组织都易受活性氧自由基 ROS(reactive oxygen species, ROS)的损伤<sup>[2]</sup>。因此,大脑对氧化应激很敏感。目前,已经不再简单地将氧化应激认为是 ROS 产生和清除的失衡,很有可能是参与 ROS 产生的酶功能障碍。最近,NADPH 氧化酶(NADPH oxidase, NOX)来源的 ROS 在神经退行性疾病发病过程中的作用引起了人们的重视<sup>[3]</sup>。

## 1 NOX 概述

NOX 家族可以产生 ROS,包括七个成员: NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5、DUOX1 和 DUOX2。NOX 家族具有相似的核心结构,但不同亚型有不同的激活机制: NOX1、NOX2 和 NOX3 需要与胞浆成分结合(p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>、NOXO1、NOXA1); NOX4 具有组成型活性,不需要胞浆亚基; NOX5、DUOX1 和 DUOX2 含有 N-末端 EF 手域,则由胞内增加钙离子或者直接磷酸化而激活<sup>[4]</sup>。最近研究表明含有 4/5 SH3 结构域的酪氨酸激酶底物(Tks4/5)与蛋白质二硫键异构酶(PDI)也可

以和 NOX1-4 相结合<sup>[5]</sup>,NOX 能促进电子从 NADPH 转移至 O<sub>2</sub> 并导致氧自由基产生,而 Duox1、Duox2 和 NOX4 主要产生 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。这些不同的产物可能提示 NOX1、NOX2 与 NOX4 在功能方面存在差异<sup>[6]</sup>。

NOX 在机体组织内分布比较广泛,并在特定的组织或细胞中高度表达,比如 NOX1 主要分布于结肠,NOX2 主要分布于吞噬细胞,NOX3 主要分布于内耳,NOX4 主要分布于肾脏,NOX5 主要分布于睾丸和淋巴组织,DUOX1 和 DUOX2 主要分布于甲状腺。但在不同组织的高度表达并不能说明 NOX 亚型与其功能的相关性<sup>[4]</sup>。NOX5 在小鼠和大鼠中不表达,且有关 DUOX1 和 DUOX2 的研究也很少,因此,本文主要探讨 NOX1、NOX2、NOX4 在神经变性疾病中的作用,尤其是 NOX2。

## 2 NOX 在中枢神经系统中的分布及细胞定位

在不同种属的中枢神经系统内,NOX 的表达部位也不相同<sup>[3]</sup>(见表 1),主要亚型为 NOX1、NOX2 和 NOX4,分布于神经元、小胶质细胞及星形胶质细胞,而少突胶质细胞内目前还没有研究证实存在 NOX。神经元内存在 NOX1、NOX2、NOX3 和 NOX4 的表达<sup>[3]</sup>,且这种表达是在病理状态下被诱导的。一些研究认为,NOX1 在多巴胺能神经元表达<sup>[7]</sup>,NOX2 在老年小鼠海马的 CA1 区表达<sup>[8]</sup>,NOX2 亚基 p47<sup>phox</sup> 在社会孤立型大鼠海马神经元<sup>[9]</sup>和锥体神经元表达<sup>[10]</sup>,NOX4 在卒中后表达于背根神经节(DRG)神经元<sup>[11]</sup>和基底神经节和皮质神经

基金项目:河北省自然科学基金(H2013307046);河北省重大医学科研课题项目(zd2013005)

收稿日期:2015-05-25;修回日期:2015-08-06

作者简介:齐倩倩(1989-),女,在读硕士生,主要从事认知障碍相关研究。

通讯作者:吕佩源(1962-),男,医学博士,博士生导师,主任医师,教授,主要从事神经内科临床及血管性认知障碍研究工作。E-mail: peiyuanlu@163.com。

元<sup>[12]</sup>。在星形胶质细胞中,主要亚型是 NOX4、NOX1 和 NOX2 也被提及。NOX2 在静息状态时表达非常低,但人类和小鼠的小胶质细胞在激活状态下表达明显增多。除了 NOX2,也有研究表明在小胶质细胞中存在 NOX1 和 NOX4 的表达<sup>[4]</sup>。

表 1 NOX 在中枢神经系统的表达

NOX 亚型	中枢神经系统可能表达部位	种属
NOX1	成年的整个大脑	小鼠
	皮质	大鼠
	小脑	大鼠
	颞叶、下丘脑	大鼠
	背根神经节	小鼠、大鼠
NOX2	室旁核	大鼠
	成年整个大脑	小鼠
	胼胝体	人
	脊髓	人
	海马	人、小鼠、大鼠
	皮质	小鼠、大鼠
	脑干	小鼠
	杏仁核	小鼠
	纹状体	小鼠、大鼠
	丘脑	小鼠
	小脑	小鼠、大鼠
	背内侧核	大鼠
	下丘脑后核	大鼠
	下丘脑室旁核	大鼠
	蓝斑	大鼠
	延髓	人类
	背根神经节	小鼠、大鼠
NOX4	成年整个大脑	人、小鼠
	皮质	小鼠
	海马	小鼠
	小脑	小鼠

### 3 NOX 在神经退行性疾病氧化应激方面的作用

神经退行性疾病通常与氧化应激相关。氧化应激表明了 ROS 水平和抗氧化防御能力的失衡,这种失衡可能由于 ROS 产生增多或者在抗氧化剂水平不足。NOX 的主要功能是产生 ROS<sup>[3]</sup>,研究显示神经退行性疾病的发病机制涉及到了 NOX 诱导产生的 ROS。ROS 可以引起蛋白质、脂质、DNA 的不可逆氧化修饰,产生氧化应激标记物(羰基的蛋白质,脂质过氧化物)。脂质过氧化可以引起细胞膜流动性的变化,增加了膜的通透性,降低了胞膜的活性,导致神经元损伤;此外,损伤的 DNA 可以直接使细胞内抗氧化酶失活,激活促炎症核因子,进而导致神经元坏死或凋亡<sup>[13]</sup>。除了直接损伤神经元,NOX 来源的 ROS 还可能通过细胞非自发机

制发挥作用,即在其他细胞激活 NOX 导致神经元变性。尤其是小胶质细胞中的 NOX2 导致 ROS 的产生,可以维持小胶质细胞的激活状态,最终引起神经元的损伤。最近研究显示 NOX1 和 NOX4 在小胶质细胞内也起到了一定的作用<sup>[4]</sup>。

## 4 NOX 与神经退行性疾病

### 4.1 NOX 与 AD

AD 的病理学特征是蛋白的错误折叠和 A $\beta$ (来源于淀粉样前体蛋白 APP)与高度磷酸化的 tau 蛋白分别在老年斑和神经纤维缠结的聚集<sup>[14]</sup>。神经元氧化应激是 AD 病人观察到的一个常见的特征,尤其在小胶质细胞激活状态下<sup>[3]</sup>。在一些体内外的研究中,证实了 AD 发病机制涉及到了 NOX 的激活。

与健康对照组相比,NOX 在 AD 病人中表达且被激活后,NOX2 相关亚基(p47<sup>phox</sup>、p67<sup>phox</sup>)转移到细胞膜<sup>[15]</sup>,并发现轻度认知障碍 AD 病人的额叶和颞叶部位 NOX2 活性增强<sup>[16]</sup>。研究发现,在 AD 病人中,只有 NOX2 调节的胞浆亚基(p47<sup>phox</sup>、p40<sup>phox</sup>和 p67<sup>phox</sup>)表达增加,而膜相关蛋白(p22<sup>phox</sup>)仍然不变<sup>[16]</sup>。大约 40% 的 AD 病人存在脑淀粉样血管病(cerebral amyloid angiopathy, CAA),在这种病人中,A $\beta$ 在皮质的毛细血管内聚集<sup>[4]</sup>。此外,在早期 AD 病人中发现 NOX1 和 NOX3 的 mRNA 表达增加,提示可能其他 NOX 亚型也参与了 AD 病理过程<sup>[14]</sup>。一项 APP-PS1 基因插入小鼠的研究显示:年龄依赖的认知缺陷与 NOX4 和 p47<sup>phox</sup>(NOX2 的亚基)表达增多相关<sup>[17]</sup>。Choi 等<sup>[18]</sup>也观察到 NOX2 在小胶质细胞激活中的关键性作用。向脑血管内注入 LPS 或者 A $\beta$ <sub>1-42</sub> 低聚物后,小胶质细胞内炎症标志物含量显著增多,并且在 p47<sup>phox</sup>-缺陷、NOX2-缺陷和夹竹桃治疗的小鼠中,可以使上述增加减少。另一项研究在小鼠内单一注射 LPS,发现 NOX2 依赖的小胶质细胞激活和脑部氧化应激。且注射一次 LPS 后,它的影响可以持续将近 20 个月,几乎是一个小鼠的一生<sup>[19]</sup>。提示 NOX 抑制剂可以在疾病发展的过程中起作用,因此可以成为 AD 治疗的靶点。

### 4.2 NOX 与 PD

PD 的主要特征是多巴胺能神经元的变性,尤其在黑质。其病理学表现为由  $\alpha$ -突触核蛋白( $\alpha$ -synuclein,  $\alpha$ -Syn)聚集形成的路易小体(Lewy body, LB)的聚集。 $\alpha$ -Syn 的错误折叠和沉积可能是 PD

的启动性致病事件,而进行性变性则是由于胶质细胞激活。氧化损伤可能促进了这些机制<sup>[14]</sup>。越来越多的证据提示了 NOX 在 PD 中的作用。多项研究表明 NOX2 参与了小胶质细胞依赖的 DA 神经元的毒性作用<sup>[14]</sup>。

大部分关于 NOX 在 PD 发病机制中的作用都是来自体外研究。与野生型对照组相比,NOX2 缺陷小鼠给予 MPTP 后,多巴胺能神经元变性的程度下降了 20%,提示 NOX2 在此过程中起到了一定的作用<sup>[20]</sup>。相似地,给 NOX2 缺陷的小鼠黑质注射 LPS 后,多巴胺能神经元的死亡数目下降<sup>[21]</sup>。因此,NOX2 激活可能在小胶质细胞介导的 PD 多巴胺能神经元缺失的过程中起了一定的作用。有研究提示 NOX1 在 DA 神经元和 PD 发病中有一定的作用。编码特定 NOX1 的 shRNA 的腺病毒颗粒显著地降低了 DA 神经元内  $\alpha$ -突触核蛋白的表达,也显著降低了 PD 特征性病变,如百草枯诱导的 PD 模型中  $\alpha$ -突触核蛋白聚集和泛素  $\alpha$ -突触核蛋白的表达水平<sup>[22,23]</sup>。表达 NOX1 和 Rac1 亚基的 shRNAs 的腺病毒载体可以预防 DA 神经元的死亡<sup>[24]</sup>。总之,两种 NOX 亚型在 PD 中起到了重要的作用。可能 NOX2 在小胶质细胞内表达,通过小胶质细胞增生参与了炎症级联反应;而 NOX1 在 DA 神经元表达,是 DA 神经元自发病理变化的调节剂。

#### 4.3 NOX 与 HD

HD 是一种基因来源的常染色体显性遗传的神经退行性疾病<sup>[25]</sup>。致病基因产生 polyQ 蛋白,这种蛋白聚集并对神经元具有毒性作用。氧化应激作用的增强是本病已知的特征。之前在纹状体内注射喹啉酸的 PD 模型和体外过度表达 polyQ 蛋白的 PC12 细胞模型的研究中,观察到了氧化作用的增强,而这种增强作用来自 NOX<sup>[4]</sup>。直到最近 Valencia 等<sup>[26]</sup>在 HD<sup>140Q/140Q</sup> mice 中,才对 NOX2 的作用进行了研究。他们用不同的实验分组来阐释 NOX2 在 HD 的作用。在人死后的皮质匀浆内加入 NADPH 后,细胞色素酶 C 显著减少。且在初级皮质神经元中,NOX2 染色和 ROS 产生的增加呈现出了一致性,这种一致性在与 NOX2 缺陷小鼠繁殖后的 HD<sup>140Q/140Q</sup> 小鼠内消失了。此外,研究还评估了 NOX2 在小胶质细胞内的表达情况,尽管通过免疫印迹的方法在 NOX2 缺陷的突触体内没有检测到此种抗体,但是在 HD<sup>140Q/140Q</sup> 小鼠的孤立突触体中 NOX2 染色却非常丰富。目前对于 NOX2 在 HD 氧

化应激中的作用,还存在争议,需要更多的研究来更好的理解 NOX 在 HD 中的作用。

#### 4.4 NOX 与 ALS

ALS 是累及运动神经元的进行性神经退行性疾病。尽管其病因不明,但研究表明神经炎症、氧化应激和小胶质细胞激活是 ALS 疾病进程中关键性的因素<sup>[4]</sup>。研究发现 NOX2 在 ALS 进展中起到了作用。在散发型 ALS 病人的脊髓中,NOX2 在信使和蛋白水平的表达都增加<sup>[4]</sup>。研究发现,在 ALS 小鼠和病人中,NOX2 和亚基都显著上调且与小胶质细胞标志物共定位<sup>[27]</sup>。另一项研究中,用表达人类 SOD1<sup>G93A</sup> 的转基因小鼠与 NOX1 或者 NOX2 缺陷小鼠进行繁殖后,可以分别增加寿命 33 d 和 97 d<sup>[28]</sup>。一项应用抗氧化剂/NOX 抑制剂-夹竹桃的药理学研究表明,ALS 小鼠的存活率明显增高<sup>[29]</sup>。然而其他研究却没有得到这个结果<sup>[30]</sup>。最近研究还证实蛋白二硫化物异构酶(PDI)是一种 NOX2 在小胶质细胞内激活的调节剂,在 SOD1<sup>G93A</sup> 小鼠的脊髓中它的表达增加<sup>[31]</sup>。除了 NOX2,NOX1 可能在 ALS 发病机制中也起了作用。有研究发现,NOX1 缺陷的小鼠明显提高了 SOD1 变异小鼠的生存期。总之,NOX 激活在病因上参与了 ALS 的进展。然而,需要更多的研究来证明这一观点。

#### 5 结语

神经退行性疾病给家庭、社会带来了沉重的负担,但目前缺乏有效的治疗方法。越来越多的体内、体外研究都提示 NOX 在神经退行性疾病起了重要作用。NOX 不仅可以直接阻止 ROS 的产生,还在中枢神经系统内调节小胶质细胞和/或星形胶质细胞激活。因此,以 NOX 为靶点可能成为治疗神经退行性疾病药物研究的新方向。

#### 参 考 文 献

- [1] Rasool M, Malik A, Qureshi MS, et al. Recent updates in the treatment of neurodegenerative disorders using natural compounds. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014: 979730.
- [2] 齐倩倩,吕佩源.核转录相关因子 2-抗氧化反应元件信号通路在认知障碍相关疾病中的作用.国际神经病学神经外科学杂志,2015,42(2):173-177.
- [3] Sorce S, Krause KH. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(10): 2481-2504.
- [4] Nayernia Z, Jaquet V, Krause KH. New insights on NOX en-

- zymes in the central nervous system. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20( 17): 2815-2837.
- [5] Maraldi T. Natural compounds as modulators of NADPH oxidases. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 271602.
- [6] Kahles T, Brandes RP. Which NADPH oxidase isoform is relevant for ischemic stroke? The case for NOX2. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 18( 12): 1400-1417.
- [7] Choi DH, Cristovao AC, Guhathakurta S, et al. NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16( 10): 1033-1045.
- [8] Dugan LL, Ali SS, Shekhtman G, et al. IL-6 mediated degeneration of forebrain GABAergic interneurons and cognitive impairment in aged mice through activation of neuronal NADPH oxidase. *PLoS One*, 2009, 4( 5): e5518.
- [9] Brennan AM, Suh SW, Won SJ, et al. NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci*, 2009, 12( 7): 857-863.
- [10] Schiavone S, Jaquet V, Sorce S, et al. NADPH oxidase elevations in pyramidal neurons drive psychosocial stress-induced neuropathology. *Transl Psychiatry*, 2012, 2: e111.
- [11] Kallenborn-Gerhardt W, Schroder K, Del TD, et al. NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 2012, 32( 30): 10136-10145.
- [12] Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, et al. Post-stroke inhibition of induced NADPH oxidase type 4 prevents oxidative stress and neurodegeneration. *PLoS Biol*, 2010, 8( 9).
- [13] Angeloni C, Prata C, Dalla SFV, et al. Traumatic brain injury and NADPH oxidase: a deep relationship. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 370312.
- [14] Sorce S, Krause KH, Jaquet V. Targeting NOX enzymes in the central nervous system: therapeutic opportunities. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69( 14): 2387-2407.
- [15] Shimohama S, Tanino H, Kawakami N, et al. Activation of NADPH oxidase in Alzheimer's disease brains. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 273( 1): 5-9.
- [16] Ansari MA, Scheff SW. NADPH-oxidase activation and cognition in Alzheimer disease progression. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51( 1): 171-178.
- [17] Bruce-Keller AJ, Gupta S, Knight AG, et al. Cognitive impairment in humanized APPxPS1 mice is linked to Abeta (1-42) and NOX activation. *Neurobiol Dis*, 2011, 44( 3): 317-326.
- [18] Choi SH, Aid S, Kim HW, et al. Inhibition of NADPH oxidase promotes alternative and anti-inflammatory microglial activation during neuroinflammation. *J Neurochem*, 2012, 120( 2): 292-301.
- [19] Qin L, Liu Y, Hong JS, et al. NADPH oxidase and aging drive microglial activation, oxidative stress, and dopaminergic neurodegeneration following systemic LPS administration. *Glia*, 2013, 61( 6): 855-868.
- [20] Zhang W, Wang T, Qin L, et al. Neuroprotective effect of dextromethorphan in the MPTP Parkinson's disease model: role of NADPH oxidase. *FASEB J*, 2004, 18( 3): 589-591.
- [21] Qin L, Liu Y, Wang T, et al. NADPH oxidase mediates lipopolysaccharide-induced neurotoxicity and proinflammatory gene expression in activated microglia. *J Biol Chem*, 2004, 279( 2): 1415-1421.
- [22] Cristovao AC, Choi DH, Baltazar G, et al. The role of NADPH oxidase 1-derived reactive oxygen species in paraquat-mediated dopaminergic cell death. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11( 9): 2105-2118.
- [23] Cristovao AC, Guhathakurta S, Bok E, et al. NADPH oxidase 1 mediates alpha-synucleinopathy in Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2012, 32( 42): 14465-14477.
- [24] Choi DH, Cristovao AC, Guhathakurta S, et al. NADPH oxidase 1-mediated oxidative stress leads to dopamine neuron death in Parkinson's disease. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16( 10): 1033-1045.
- [25] Gan L, Johnson JA. Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1842( 8): 1208-1218.
- [26] Valencia A, Sapp E, Kimm JS, et al. Elevated NADPH oxidase activity contributes to oxidative stress and cell death in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 2013, 22( 6): 1112-1131.
- [27] Wu DC, Re DB, Nagai M, et al. The inflammatory NADPH oxidase enzyme modulates motor neuron degeneration in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103( 32): 12132-12137.
- [28] Marden JJ, Harraz MM, Williams AJ, et al. Redox modifier genes in amyotrophic lateral sclerosis in mice. *J Clin Invest*, 2007, 117( 10): 2913-2919.
- [29] Harraz MM, Marden JJ, Zhou W, et al. SOD1 mutations disrupt redox-sensitive Rac regulation of NADPH oxidase in a familial ALS model. *J Clin Invest*, 2008, 118( 2): 659-670.
- [30] Trumbull KA, McAllister D, Gandelman MM, et al. Diapocynin and apocynin administration fails to significantly extend survival in G93A SOD1 ALS mice. *Neurobiol Dis*, 2012, 45( 1): 137-144.
- [31] Jaronen M, Vehvilainen P, Malm T, et al. Protein disulfide isomerase in ALS mouse glia links protein misfolding with NADPH oxidase-catalyzed superoxide production. *Hum Mol Genet*, 2013, 22( 4): 646-655.