

· 综述 ·

## 烟碱致动脉粥样硬化的 N 胆碱受体信号通路

刘佃花, 张恩晖, 刘冲, 范博士, 蔡国君 (第二军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** 动脉粥样硬化是一种血管炎症性疾病。烟碱(尼古丁)是香烟的主要成分之一,是许多心血管疾病(如动脉粥样硬化)的致病危险因素。最近的研究表明,烟碱可与细胞表面的烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)高度结合并加速动脉粥样硬化的发展,nAChR在血管的各类细胞中都有不同量的表达。因此,本综述总结nAChR及配体在烟碱致动脉粥样硬化的发病机制中的作用,以及基于nAChR的信号通路在相关细胞(如血管平滑肌细胞、内皮细胞、血小板及免疫细胞)中对动脉粥样硬化的作用,同时讨论这些通路是如何影响斑块的稳定和发展的。最后将讨论nAChR作为治疗动脉粥样硬化分子靶点的可能性。

**[关键词]** N胆碱受体;动脉粥样硬化;信号分子;烟碱

**[中图分类号]** Q7,R364.1\*5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)02-0081-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.02.001

## Signaling pathway of acetylcholine receptors in atherosclerosis induced by nicotinic

LIU Dianhua, ZHANG Enhui, LIU Chong, FAN Boshi, CAI Guojun (Department of Pharmacology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** Atherosclerosis is an inflammatory disease in the vessel wall. Nicotine, a major component of cigarette smoke, is an independent risk factor for cardiovascular diseases including atherosclerosis. Recent studies have shown that nicotine (the addictive component of cigarettes) binds to high affinity cell-surface receptors and accelerates the atherogenic process. These receptors were called nicotinic acetylcholine receptors (nAChR) and expressed ubiquitously in almost all cells existing in the blood vessels. Therefore, the pro-atherogenic effects of nAChR pathway ligands were summarized which would enhance the understanding of the role of nicotine and nAChR in the pathophysiology of atherosclerosis. The signaling pathways underlying nAChR subunits in cells were described that play an important role in atherosclerosis, *i. e.* VSMCs, endothelial cells, platelets and immune cells. How these pathways converge on the growth and survival of atheromatous plaques were also discussed. Finally, the feasibility of nAChR ligands as therapeutic targets for atherosclerosis was summarized.

**[Key words]** nicotinic acetylcholine receptors; atherosclerosis; signaling; nicotinic

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是以血管内膜瘤、粥样化或纤维斑块形成为病变特征的动脉疾病。动脉粥样硬化的形成过程包括内膜的损伤、血管平滑肌细胞的迁移及动脉粥样斑块的形成<sup>[1]</sup>。烟碱(尼古丁)是香烟的一种主要成分,并且为一种选择性的胆碱能激动剂,能直接促进血管平滑肌细胞的迁移和新生血管形成。流行病学显示,吸烟可以促进AS的发生,烟碱可与细胞表面的烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)高度结合并加速动脉粥样硬化的发展。本文综述nAChR在烟碱促动脉粥样硬化发病中的作用,并探讨涉及的信号通路。最后,将总结nAChR作为AS治疗靶点的可行性。

### 1 AS发病机制及流行病学研究

AS起始于血管内皮细胞的损伤,并伴随氧化性低密度脂蛋白(Ox-LDL)在血管内的积聚,这会引发单核细胞向内膜迁移,巨噬细胞无限制地吞噬过多的Ox-LDL后就会变成泡沫细胞。随着泡沫细胞的增多,动脉粥样硬化粥样斑块的最初形式——脂质条纹出现了。另一方面,被激活的内皮细胞和单核-巨噬细胞均可分泌多种细胞因子、黏附因子、趋化因子等,这些因子进一步激活平滑肌细胞使之合成细胞外基质,引起平滑肌细胞的迁移和增殖。这种过程反复进行,最终形成动脉粥样硬化斑块<sup>[2]</sup>。

流行病学显示,吸烟对于动脉粥样硬化、中风以及心肌梗死的发展有重要影响。香烟中的烟碱可以促进动脉粥样硬化<sup>[3]</sup>。最近的研究显示,烟碱可以与nAChR高度结合,进而影响心血管系统相关的多种细胞,如平滑肌细胞、内皮细胞、免疫细胞等的功能(表1)。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81273503)。

**[作者简介]** 刘佃花,女,硕士研究生。Tel:(021)81871281, E-mail: yiqijinbu@163.com。

**[通讯作者]** 蔡国君。Tel:(021)81871282, E-mail: 13386277625@163.com。

表1 nAChR 各亚单位在血管组织中的表达<sup>[4]</sup>

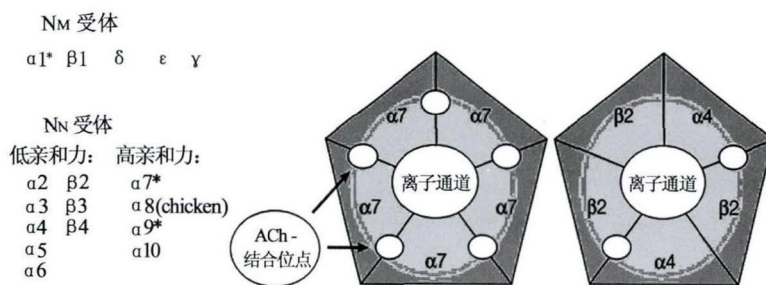
| 细胞种类      | nAChR 各亚单位的表达  | 参考文献 |
|-----------|--|------|
| 人源血管平滑肌细胞 | $\alpha 2, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 10$        | [20] |
| 人源主动脉内皮细胞 | $\alpha 3, \alpha 5, \alpha 7, \alpha 10, \beta 2, \beta 3, \beta 4$ | [5]  |
| 人源血小板     | $\alpha 7$   | [9]  |
| 人源单核白细胞   | $\alpha 7, \beta 2$  | [19] |
| 人源巨噬细胞    | $\alpha 1, \alpha 7, \alpha 10$                                      | [7]  |
| B-淋巴细胞    | $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5, \alpha 7$                             | [7]  |
| T-淋巴细胞    | $\alpha 3, \alpha 4, \alpha 7, \beta 2, \beta 4$                     | [7]  |

## 2 nAChR 简介

能与 ACh 结合的受体,称为乙酰胆碱受体。其又分为毒蕈碱型乙酰胆碱受体(M 胆碱受体)和烟碱型乙酰胆碱受体(nAChR)。nAChR 根据其分布部位不同可分为神经肌肉接头 N 受体、神经节 N 受

体和中枢 N 受体。

N 受体属于配体门控离子通道型受体,不同部位 N 受体的分子结构十分相似,由亚基  $\alpha 1 \sim 10, \beta 1 \sim 4, \gamma, \delta$  以及  $\epsilon$  组成(图 1)<sup>[6]</sup>。每个 N 受体由两个  $\alpha$  亚基和  $\beta, \gamma, \delta$  亚基组成五聚体,以形成中间带孔跨膜细胞膜通道,即 N 受体离子通道。当 ACh 与受体上的作用位点结合后,可使离子通道开放,从而调节  $\text{Na}^+, \text{K}^+, \text{Ca}^{2+}$  离子流动。带电荷的氨基酸在中心区域排列并选择性地使离子通过通道。人巨噬细胞上 N 受体第一次被证实存在是应用了可以与 N 受体特定部位的结合 FITC 标记的  $\alpha$ -银环蛇毒素。nAChR 在血管中的表达见表 1, nAChR 各亚基是由 Western 印迹, RT-PCR 以及 ELISA 所分析确定<sup>[6]</sup>。

图1 人源 N 胆碱受体亚单位<sup>[8]</sup>

## 3 nAChR 研究的来源——烟碱的致动脉粥样硬化作用

**3.1 体外实验** 内皮细胞损伤,血管平滑肌细胞增殖与迁移在动脉粥样硬化斑块的形成,以及冠状血管成形术后的再狭窄中起重要作用。许多研究显示,nAChR 的配体如烟碱,对各个过程都有作用。Santanam 等的研究表明,与对照组相比,100 nmol/L 的烟碱可使原代血管平滑肌细胞的迁移增加 2 倍。胞外基质蛋白(如纤维蛋白)可以加强这种迁移。另外,烟碱可以阻止由于饥饿导致的血管平滑肌细胞的凋亡。总之,这些研究表明,烟碱可以通过两种途径增加血管平滑肌细胞的生长和迁移:增强血管平滑肌细胞的迁移同时抑制凋亡<sup>[7]</sup>。

**3.2 体内实验** Strohschneider 等首次在动物模型上证明烟碱会导致动脉粥样硬化<sup>[8]</sup>,他们观察到注射烟碱和胆固醇可增加兔主动脉中斑块的面积。Santanam 的实验室最近研究了烟碱对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠模型斑块发展的影响。对雌性 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠进行高脂饮食,对照组正常饮水,实验组饮水中含有 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的烟碱。12 周后,实验组的斑块面积是对照组的近 2.6 倍,该研究表明,烟碱可能在动脉粥样硬化早期有致

动脉粥样硬化作用。

血管新生(angiogenesis)是指原有微血管内皮细胞经过生芽、迁移、增殖与基质重塑等过程产生新血管的过程。血管斑块中新生血管是指毛细血管在动脉粥样硬化斑块中由动脉外膜延展向内膜形成的网络结构。在动脉粥样硬化的早期,烟碱可增加动脉粥样硬化的斑块面积。Heeschen 等<sup>[9]</sup>的前期研究表明:在 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠模型中,烟碱对于早期斑块的新生血管形成有作用。首先,对 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠进行 20 周的高脂饲养,造成动脉粥样硬化模型。然后随机分为两组,对照组正常饮水,实验组在饮用水中加入烟碱,实验周期 20 周。结果表明:与对照组相比,烟碱组的斑块面积及斑块中新生血管数均明显增加。Lau 等<sup>[10]</sup>的研究也表明:在低密度脂蛋白敲除 LDLR<sup>-/-</sup> 鼠中应用烟碱的实验中,实验组比对照组的主动脉斑块面积增加 2 倍,这与在 ApoE<sup>-/-</sup> 模型中的结果相近。

GWAS 相关研究证实,在欧洲家族 15 号染色体(15q24/15q25.1)的长臂中,nAChR 基因群存在差异,这些差异可能与外周血管疾病及肺癌的发生有一定关联。更有趣的是,在这区间的基因是与烟碱成瘾性相关的  $\alpha 3$ -nAChR,  $\alpha 5$ -nAChR 以及  $\beta 4$ -

nAChR<sup>[11]</sup>。流行病学证据揭示了心血管疾病与吸烟之间有一定的关联性,那么上述研究提供了烟草中的烟碱和心血管疾病有关的基因证据。

烟碱可以与 nAChR 高度结合,因而在心血管系统的多种细胞上发挥直接作用。因此,nAChR 亚基的信号通路在相关细胞(如血管平滑肌细胞、内皮细胞、血小板及免疫细胞)中对动脉粥样硬化的作用受到研究者的关注。

#### 4 nAChR 的致 AS 信号通路

血管平滑肌细胞在烟碱导致的心血管疾病中起重要作用<sup>[12]</sup>。为了研究烟碱对平滑肌细胞产生何种不良影响,将平滑肌细胞分为对照组、烟碱组、烟碱加  $\alpha$ -银环蛇毒素组、烟碱加 PDTC 组( $\alpha$ -银环蛇毒素为  $\alpha 7$ -nAChR 受体拮抗剂,PDTC 为 NF- $\kappa$ B 抑制剂),再检测各组平滑肌细胞信号通路 NF- $\kappa$ B 的激活及细胞黏附分子的表达。结果显示烟碱可导致平滑肌细胞中 IKK 及 I $\kappa$ B 的磷酸化、促进 NF- $\kappa$ B 向核内的转位、上调 4 种平滑肌细胞的骨架蛋白,即  $\beta$ -肌动蛋白、 $\gamma$ -肌动蛋白、原肌动蛋白 4 和 F-肌动蛋白帽蛋白( $\beta$ -actin,  $\gamma$ -actin, tropomyosin 4 and F-actin capping protein)及增强其细胞迁移能力;用  $\alpha 7$  受体阻断剂或 NF- $\kappa$ B 抑制剂可以阻断这些效果。概括而言,即烟碱可以通过平滑肌细胞上的  $\alpha 7$ -nAChR 受体使 NF- $\kappa$ B 信号通路活化,进而使平滑肌细胞骨架蛋白上调并增强其细胞迁移能力。也有报道还存在其他信号通路,像 MAPK、ERK 等。

应用 RPPM 反相蛋白芯片(reverse phase protein microarrays)研究内皮细胞中 nAChR 所介导的通路<sup>[13]</sup>,RPPM 可以同时测量多个信号蛋白分子的磷酸化状态。Wu 等<sup>[14]</sup>在实验中选取了与增殖迁移相关的有代表性的磷酸化蛋白进行研究,用  $\alpha 7$ nAChR 和  $\alpha 9$ nAChR 的干扰 RNA 转染人表皮微血管内皮细胞 72 h,饥饿过夜后用烟碱( $10^{-10}$  mol/L)处理,在烟碱处理后的不同时间点收集细胞上清液,将细胞上清用 RPPM 进行分析,结果显示:与增殖相关的蛋白中,Raf-1, MEK, MAPK,ERK 有明显磷酸化。

与存活相关的蛋白中,Akt 及 BAD 有磷酸化,课题组对这两种蛋白的磷酸化动力学研究结果显示:Akt 在 1 min 内就可被明显激活,在 30 min 达到最大;BAD 的磷酸化在 60 min 时达到最大,BAD 是 Bcl2 超家族中的一员,它的磷酸化可以减低其抗凋亡的活性。因此,BAD 的磷酸化是在 Akt 之后,这些结果显示烟碱导致的 BAD 的活化是通过 Akt 进行调节,具体如图 2 所示<sup>[14]</sup>。

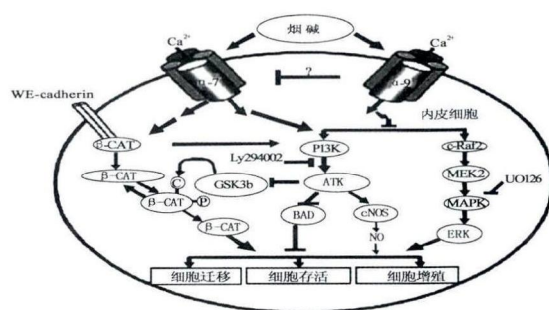


图 2 烟碱介导的信号通路示意图<sup>[14]</sup>

烟碱导致的信号通路中蛋白的活化可以被  $\alpha 7$ nAChR 的干扰 RNA 所抑制,然而, $\alpha 9$ nAChR 的干扰 RNA 可以增加这些基本蛋白的磷酸化。这些蛋白的磷酸化都应用 Western 印迹进行了验证。Wu 等也进一步研究了烟碱导致 NO 产生的机制:内皮细胞产生的 NO 在血管新生中有重要的作用<sup>[14]</sup>,并有文献报道 Akt 的磷酸化可以调节 NO 合成酶的活性,研究显示烟碱能增加 eNOS 的磷酸化,应用 PI3K 抑制剂 LY294002 (50 mmol/L)可以显著降低 NO 的产生。

总之,烟碱导致内皮细胞迁移和增殖的作用主要是激活  $\alpha 7$ nAChR 介导的激酶及转录因子,这些机制对吸烟导致的动脉粥样硬化中病理性的血管新生提供了潜在的治疗靶点。

烟碱通过激活  $\alpha 7$ nAChR,开放离子通道调节  $Ca^{2+}$  的流动。从而激活两条主要的信号通路(PI3/Akt 及 MAPK 通路),导致内皮细胞的增殖迁移,MAPK 及 Akt 的激活能增加 NO 的合成,NO 具有促进内皮细胞迁移增殖的作用。烟碱可以引起 VE-cadherin/ $\beta$ -catenin(VE-钙黏蛋白/ $\beta$ -连环蛋白)复合物的解离及  $\beta$ -catenin 的核转位。与之相反,烟碱与  $\alpha 9$ nAChR 结合后可以抑制这些信号通路。

#### 5 nAChR 作为治疗动脉粥样硬化的潜在靶点

许多研究显示,nAChR 在动脉粥样硬化的发展过程中发挥着重要的作用,包括血管平滑肌细胞的增殖、迁移、斑块中血管新生、单核细胞的黏附、巨噬细胞对 LDL 的摄取。因此,可以推测干扰 nAChR 的功能可以降低斑块的生长以及新生血管的形成。Kanda 等<sup>[15]</sup>研究表明 nAChR 拮抗剂-六烃季铵能在细胞水平抑制烟碱引起的大鼠血管平滑肌细胞的迁移,以及血管内皮生长因子的分泌。最近研究显示,nAChR 类似物作为主动脉疾病诊断标志物的可能性。Bucerius 等<sup>[16]</sup>已经阐明了用放射性同位素标记 nAChR 配体,然后用 PET 成像来观察主动脉、主动脉弓和降主动脉成像的可能性<sup>[17]</sup>。这使基于影

像学观察动脉粥样硬化患者中斑块的面积成为可能。N受体在脑和肌肉的调节中具有重要作用,因此,需要考虑 nAChR 配体对于中枢神经系统和外周神经系统的副作用。然而,目前为止,尚未见到文献报道在动物模型中 nAChR 类似物的毒副作用。

最近的研究表明,  $\alpha 1$ -nAChR 可能会成为防治动脉粥样硬化的一个有价值的分子靶点<sup>[18]</sup>。对高脂饮食处理后的 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠注射含  $\alpha 1$ -nAChR 干扰 RNA 的质粒,可以降低  $\alpha 1$ -nAChR 的表达水平,从而显著降低动脉粥样硬化斑块的面积,影响斑块中巨噬细胞的数量以及斑块中的新生血管形成。这些发现论证了对  $\alpha 1$ -nAChR 进行处理可能会成为动脉粥样硬化的一种潜在治疗策略。

Li 等<sup>[19]</sup>证明  $\alpha 7$ -nAChR 拮抗剂 MLA 能抑制大鼠血管平滑肌细胞的趋向性和迁移性。烟碱有促进大鼠血管平滑肌细胞的促进有丝分裂和抗凋亡作用,  $\alpha 7$ -nAChR 拮抗剂  $\alpha$ -银环蛇毒素 ( $\alpha$ -BT) 可以抑制这种作用。斑块新生血管的形成对斑块的增长和稳定具有重要的作用。用受体拮抗剂 ( $\alpha$ -BT, MLA)、小干扰 RNA 等生物方法干扰  $\alpha 7$ -nAChR 的功能可以减弱缺血损伤模型中血管新生<sup>[20]</sup>。因此,  $\alpha 7$ -nAChR 抑制剂可能对减轻动脉粥样硬化斑块血管新生起作用。然而,也有与此相争议的报道,如激活  $\alpha 7$ -nAChR 可以抑制炎症以及降低巨噬细胞对 LDL 和胆固醇的吞噬。

## 6 结语

烟碱是香烟的一种主要成分,流行病学显示其可促进 AS 的发生。研究表明烟碱可以与细胞表面的 nAChR 高度结合并发挥作用。nAChR 是一种配体门控离子通道型受体,在炎症、促进血管平滑肌细胞的迁移和新生血管形成等方面具有作用。因此, nAChR 可成为动脉粥样硬化新的干预靶点,为动脉粥样硬化的治疗带来新的前景。

## 【参考文献】

- [1] Stylianou IM, Bauer RC, Reilly MP, *et al.* Genetic basis of atherosclerosis: Insights from mice and humans[J]. *Circ Res*, 2012, 110(2): 337-355.
- [2] Doyle B, Caplice N. Plaque neovascularization and antiangiogenic therapy for atherosclerosis[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(21): 2073-2080.
- [3] Unverdorben M, von Holt K, Winkelmann BR. Smoking and atherosclerotic cardiovascular disease: Part II: role of cigarette smoking in cardiovascular disease development [J]. *Biomark Med*, 2009, 3(5): 617-653.
- [4] Santanam N, Thornhill BA, Lau JK, *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor signaling in atherogenesis [J]. *Atherosclerosis*,

2012; 225: 264-273.

- [5] Egleton RD, Brown KC, Dasgupta P. Angiogenic activity of nicotinic acetylcholine receptors: implications in tobacco-related vascular diseases[J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 121(2): 205-223.
- [6] Ulloa L. The vagus nerve and the nicotine anti-inflammatory pathway[J]. *Nat Rev*, 2005, 4: 673-684.
- [7] Cucina A, Fuso A, Coluccia P, *et al.* Nicotine inhibits apoptosis and stimulates proliferation in aortic smooth muscle cells through a functional nicotinic acetylcholine receptor [J]. *J Surg Res*, 2008, 150(2): 227-235.
- [8] Strohschneider T, Oberhoff M, Hanke H, *et al.* Effect of chronic nicotine delivery on the proliferation rate of endothelial and smooth muscle cells in experimentally induced vascular wall plaques[J]. *Clin Invest*, 1994, 72(11): 908-912.
- [9] Heesch C, Jang JJ, Weis M, *et al.* Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis[J]. *Nat Med*, 2001, 7(7): 833-839.
- [10] Lau PP, Li L, Merched AJ, Zhang AL, *et al.* Nicotine induces proinflammatory responses in macrophages and the aorta leading to acceleration of atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor<sup>-/-</sup> mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(1): 143-149.
- [11] Thorgeirsson TE, Geller F, Sulem P, *et al.* A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease[J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 638-642.
- [12] Wang Z, Wu W, *et al.* NF- $\kappa$ B pathway mediates vascular smooth muscle response to nicotine[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 45(2): 375-383.
- [13] Chan SM, Ermann J, Su L, *et al.* Protein microarrays for multiplex analysis of signal transduction pathways [J]. *Nat Med*, 2004, 10(12): 1390-1396.
- [14] Wu JC, Chruscinski A, De Jesus Perez VA, *et al.* Cholinergic modulation of angiogenesis: role of the 7 nicotinic acetylcholine receptor[J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108(2): 433-446.
- [15] Kanda Y, Watanabe Y. Nicotine-induced vascular endothelial growth factor release via the egr1 pathway in rat vascular smooth muscle cells[J]. *Life Sci*, 2007, 80(15): 1409-1414.
- [16] Buceri J, Manka C, Schmaljohann J, *et al.* Feasibility of [<sup>18</sup>F]-2-fluoro-A85380-PET imaging of human vascular nicotinic acetylcholine receptors *in vivo* [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2012, 5(5): 528-536.
- [17] Cooke JP. Imaging vascular nicotine receptors: a new window onto vascular disease[J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2012, 5(5): 537-539.
- [18] Zhang G, Marshall AL, Thomas AL, *et al.* In vivo knockdown of nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  diminishes aortic atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2011, 215(1): 34-42.
- [19] Li S, Zhao T, Xin H, *et al.* Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit mediates migration of vascular smooth muscle cells toward nicotine[J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 94(3): 334-338.
- [20] Cooke JP, Ghebremariam YT. Endothelial nicotinic acetylcholine receptors and angiogenesis[J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2008, 18(7): 247-253.

【收稿日期】 2013-07-28 【修回日期】 2013-10-14  
【本文编辑】 李睿旻