

NADPH 氧化酶 NOX 家族的组织分布及生理功能

冷丽丽 综述 唐圣松 审校

(南华大学药物药理研究所,湖南衡阳 421001)

[摘要] NADPH 氧化酶特异存在于吞噬细胞质膜,能生成用于清除病原微生物的活性氧(reactive oxygen species, ROS)。最近发现吞噬细胞 NADPH 氧化酶的 6 个同源物即 NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, DUOX2。NADPH 氧化酶催化亚基 gp91phox/NOX2 及其同源物统称为 NOX 家族蛋白。这些酶能通过质膜传递电子产生活性氧(ROS)。NOX 家族不同成员的激活机制及分布是不同的。NOX 激活多条信号转导通路,调节细胞的生长、增殖、分化等,NOX 缺陷会导致免疫抑制,如 DUOX2 突变可以导致甲状腺功能减低症。

[关键词] NADPH 氧化酶; 活性氧; 疾病

[中图分类号] Q554 [文献标识码] A [文章编号] 1673-2588(2008)01-0019-05

Tissue distribution and physiological function of NOX family NADPH oxidases

LENG Li-li, TANG Sheng-song

(Institute of Pharmacy and Pharmacology, Nanhua University, Hengyang Hunan 421001, China)

[Abstract] NADPH oxidase, specially located in plasma membrane of phagocytes, can generate reactive oxygen species (ROS) to participate in host defense by killing or damaging invading microbes. Over the last years, six homologs of the cytochrome subunit of the phagocyte NADPH oxidase were found: NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, and DUOX2. Together with the phagocyte NADPH oxidase itself (NOX2/gp91phox), the homologs are now referred to as the NOX family of NADPH oxidases. These enzymes share the capacity to transport electrons across the plasma membrane and to generate ROS. Activation mechanisms and tissue distribution of the different members of the family are markedly different. NOX deficiency may lead to immunosuppression, DUOX2 mutations result in congenital hypothyroidism.

[Key words] NADPH oxidase; reactive oxygen species (ROS); disease

[Int J Pathol Clin Med, 2008,28(1):0019-05]

NOX(NADPH oxidase)首先发现于中性粒细胞和巨噬细胞,在炎症反应时这两种细胞发生“氧化爆发”产生大量 ROS 而构成机体抵抗病原体的第一防线。ROS 不再是有氧代谢的副产物,而是具有信号转导、免疫功能、激素生物合成功能的活性产物。NOX 和 DUOX(dual oxidase)是公认的能够调节 ROS 产生的特殊功能酶,与吞噬细胞中 NADPH 氧化酶所制造的 ROS 不同,NOX 和 DUOX 所产生的 ROS 不主要起细胞防御功能,而是作为第二信使,参

与细胞分化、增殖、凋亡的调节。NADPH 氧化酶位于吞噬细胞质膜上,带有细胞色素 C 和 FAD 基团。该氧化酶是由 gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox 和 Rac 六种亚基组成的复合体。gp91phox 和 p22phox 亚基位于质膜上,当与胞浆中的另外几种亚基结合时可形成有活性的 NADPH 氧化酶复合体。gp91phox 是其主要的功能亚基, p22phox 的 C 末端有一富含脯氨酸的尾巴,可能用来结合 NADPH 氧化酶的胞质激活因子,从而发挥

胞内调节作用。吞噬细胞中的 NADPH 氧化酶通常是静止的,当受到胞外信息,如激素、细胞因子甚至细菌等一些物质的刺激时,胞浆中的 p47phox, p67phox, p40phox 和 Rac 通过 p22phox 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 gp91phox 的构像发生变化,并通过诱导电子的跨膜转动激活该酶,从而发挥生物学作用^[1-2]。

1 NOX 的基本结构

在不同种类的细胞中发现了一系列 NADPH 氧化酶催化亚基即 gp91phox 的同源物,分别称其为 NOX1, NOX2 (gp91phox), NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, DUOX2, 后来被命名为 NOX 的蛋白家族。NOX 分子大致可以分为 N 端的疏水跨膜区和 C 端的黄素蛋白结合区两个大的结构域。黄素蛋白结合区与许多 FAD 结合蛋白包括细胞色素 P450 还原酶有微弱的同源性。NOX 家族的分子量介于 564 至 737, 它们均有 6 个跨膜片段,一些保守的区段可能与 NADPH, FAD 的结合有关。NOX5 的 N 末端有钙结合区,能使 NOX5 直接对钙离子起反应。gp91phox, NOX3 和 NOX4 的跨膜 α -螺旋靠近 N 端的最末端,该序列附近有蛋白水解位点,故认为这一段极有可能是信号肽序列。NOX5 没有末端这段信号肽,在胞质侧的 N 末端序列含有脯氨酸丰富区。NOX5 的这一脯氨酸丰富区可能相当于 NADPH 酶复合体中的 p22phox,可以与胞内能识别该区的调节蛋白相互作用,从而调节自身的活性^[3]。DUOX1 蛋白和 DUOX2 蛋白均由 3 部分组成。第 1 部分位于胞外的 N 端,与 I 跨膜片段相连,该部分的氨基酸序列显示了 DUOX 蛋白的特异性,猪和人 DUOX 的 N 端分别有 6 个和 5 个糖基化位点^[4]。第 2 部分位于 I, II 跨膜片段之间,有 2 个 EF 手结构,是钙离子 (Ca^{2+}) 的结合位点。C 端位于胞内,与 II 到 VII 6 个跨膜片段相连,有 4 个 NADPH 结合区,1 个 FAD 结合区。由于 DUOX 蛋白的 C 端氨基酸序列呈现 NOX 家族的特性,故将其归为 NOX 家族的成员。当位于胞内的 DUOX 蛋白处于去糖基化或低糖基化状态时,不具有氧化酶活性;当受到刺激性因子作用后,发生糖基化反应并结合在质膜顶部,才具有活性。

2 NOX 的组织细胞分布及表达

2.1 NOX1 NOX1 基因位于 X 染色体上。NOX1 至少有 3 种剪切变构体 (splice variants), 即 NOX1 α (外显子 1~13)、NOX1 β (外显子 1~10, 12, 13)、NOX1 γ (外显子 1~5, 14)。选择性的剪接掉 NOX1 外显子 11, 则不能编码蛋白产生超氧化物^[5-6]。NOX1 主要表达在结肠^[7], 血管平滑肌中也可见到,在子宫及前列腺破骨细胞、视网膜的外细胞中也有微弱的表达^[8]。NOX1 在胃黏膜的表达存在种属性,在人的胃细胞中不表达,而在豚鼠的胃黏膜和胃小凹细胞中表达。很多肿瘤或者转化细胞系中,都可以检测到 NOX1 的表达^[9]。

2.2 NOX2 NOX2 首先在中性粒细胞和吞噬细胞内发现,因此常被称为吞噬细胞 NADPH 氧化酶。NOX2 在 B 淋巴细胞、内皮细胞和神经细胞中也有少量表达^[10]。在调查各个器官 NOX 家族亚基 mRNA 的组织分布时发现 NOX2 是分布最广泛的,如胸腺、小肠、脾、胰腺、卵巢、胎盘、前列腺中均有分布。NOX2 分布的广泛性也可能是由于它们都含有表达 NOX2 的外周血细胞而造成的。然而,越来越多的信号转导和蛋白表达方面的证据显示,NOX2 在非吞噬细胞内也有表达,主要包括神经元、心肌细胞、骨骼肌细胞、肝细胞、上皮细胞和造血系统的细胞^[11]。

在吞噬细胞内,NOX2 既存在于细胞内,也存在于胞膜。在静息状态的中性粒细胞内,NOX2 主要定位在细胞内,当吞噬细胞受到刺激时,同吞噬小体或细胞膜发生融合,NOX2 易位到细胞的表面。这种融合在 NOX2 杀微生物的活性中起关键作用。除了这种融合之外,细胞内产生的 ROS 也能通过信号转导通路激活 NOX2。除了吞噬细胞以外,其他细胞分布主要是依赖其细胞类型的特异性。在平滑肌细胞中,NOX2 同其核周围的细胞骨架紧密结合。NOX2 在海马神经元中主要位于膜的突触部位^[12],使它在记忆功能中起重要作用。

2.3 NOX3 NOX3 中 56% 的氨基酸同 NOX2 存在序列同源性。人类的 NOX3 基因位于 6 号染色体上。序列对比和亲水性图分析结果显示 NOX3 的总体结构同 NOX1 和 NOX2 有高度的相似性,并证明

NOX3 是位于内耳的一种 NADPH 氧化酶。通过遗传学研究揭示头部倾斜的老鼠突变体潜在 NOX3 基因突变^[13];因为头部倾斜的老鼠存在前庭功能障碍,NOX3 在内耳的作用也就被确定了。通过 PCR 和原位杂交分析,发现 NOX3 在内耳高表达,包括耳蜗和前庭的感觉上皮及螺旋神经节^[14]。NOX3 在其他一些组织中低表达,如胎儿的脾、肾、颅骨和脑。

2.4 NOX4 最初 NOX4 作为 NADPH 氧化酶主要在成人和胎儿的肾组织表达,NOX4 同 NOX2 的氨基酸序列有 39% 的同源性。NOX4 主要在成年肾表达,可能作为一种敏感性氧感受器,此外,NOX4 mRNA 亦在非吞噬型细胞(内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞)中表达,而在单核细胞中表达很低。在血管细胞中,内皮细胞主要表达 NOX4,而血管平滑肌细胞主要表达 NOX4 和 NOX1。Wingler 等^[15]发现将 $1 \mu\text{mol/L}$ Ang II 与大鼠血管平滑肌细胞孵育 4 h, NOX1 mRNA 和 NOX4 mRNA 水平分别升高 4 倍和 6 倍。

免疫组织化学研究表明在人肾皮质远端小管的上皮细胞检测到 NOX4 的表达。p22phox mRNA 在肾内大量表达,p22phox 蛋白定位在远端肾小管细胞,提示 p22phox 与 NOX4 之间存在联系。进一步研究发现^[16-17],p22phox 能与异位表达的 NOX4 形成复合物,增加 NOX4 的稳定性。尽管 NOX4 产生的量很少,但是它能增加 p22phox 的表达,促进依赖 NOX4 的 ROS 产生;相反,RNAi 介导的敲除内源性 p22phox 转录物导致 NOX4 活性降低。这些研究表明 NOX4 同 p22phox 形成复合物产生超氧化物氧化酶。p47phox 和 p67phox 共表达在依赖 NOX4 产生 ROS 方面没有任何作用。另外,Rac 也不能调节 NOX4 的活性。异位表达的 NOX4 细胞,通过 RNAi 使 Rac1 不表达,但并不影响肾小球膜细胞由 Ang II 诱导的 NOX4 产生 ROS,不管是有活性还是无活性的 Rac1 对 NOX4 的活性均无影响^[16]。

2.5 NOX5 NOX5 在所有胚胎组织中均有表达,在卵巢、胎盘、胰腺中微弱表达。NOX5 除了含有 NOX1~4 的基本催化部分外,还有编码氨基末端结构域,包含 4 个 EF 手结构是钙离子结合位点。在 NOX5 转染的细胞中发现通过 NOX5 钙依赖性产生

ROS。钙结合能改变 EF 手构象,促使其结合催化域,从而激活从 NADPH 到氧的电子传递来形成超氧化物^[18]。在 NOX5 的全长结构中没有与 p22phox 形成功能性复合体的结构,因此缺乏 p22phox 也不影响 NOX5 的活性,免疫共沉淀也没有检测到 NOX5 和 p22phox 的复合体。最近研究发现卟啉醇肉豆蔻酸乙酸酯(phorbol myristate acetate, PMA)激发 T494 磷酸化和 NOX5 的 S498,能增加酶对钙的敏感度,从而激活酶^[19]。

2.6 DUOX (dual oxidases) DUOX1 和 DUOX2 基因定位于人类第 15 号染色体的长臂上。人的 DUOX1 和 DUOX2 蛋白有 83% 的序列相似。DUOX1 和 DUOX2 主要在甲状腺组织表达,但在某些甲状腺外组织如唾液腺、支气管、肺、前列腺等也有低水平表达,最近还发现 DUOX2 蛋白在整个消化道均有表达^[20]。DUOX 的 NADPH 氧化酶部分是跨膜片段和 2 个 EF 手结构。EF 手结构的存在表明钙是直接调节这些酶的,与早期发现的钙离子载体刺激甲状腺细胞产生 H_2O_2 是相符的。在个别的哺乳动物细胞中异源性 DUOX 表达,并不能改变 ROS 的释放,说明 DUOX 的激活需要不同的组织特异性氧化酶成分参与。在甲状腺滤泡中,DUOX 蛋白存在于甲状腺细胞质膜顶部的滤泡腔,能提供甲状腺过氧化物酶介导的碘化作用和甲状腺球蛋白酪氨酸残基交联所需要的 H_2O_2 。DUOX2 突变可导致先天性甲状腺功能减退。DUOX1 在甲状腺组织中的作用还不清楚^[21]。最近提出 DUOX 酶在非甲状腺组织中的宿主防御中起重要作用。在外甲状腺组织中表达的 DUOX 蛋白可能参与 H_2O_2 介导的上皮细胞宿主防御系统。

3 NOX 激活与信号转导

NOX 家族可以诱导 ROS 的产生。目前研究最多的是丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)和酪氨酸蛋白激酶。研究显示用 H_2O_2 处理细胞,能导致细胞磷酸化和 p38MAPK 激活。大量的证据表明通过 NADPH 氧化酶能激活 MAPK 通路。ROS 引起的细胞氧化还原状态的改变可激活由 MAPK 家族不同成员参与的信号转导通路,它可能是通过激活上游的 ERK1/2 激酶信号通

路,也可能是通过 ROS 间接地抑制磷酸化的活性。NADPH 氧化酶抑制剂和过氧化氢酶的过表达可阻断 Ang II 参与 p38MAPK 磷酸化。实验发现^[22],氧化剂可引发细胞氧化应激,产生 ROS,启动酪氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase,TPK)活性。ROS 能够降低磷酸酶活性,提高蛋白酪氨酸磷酸化,从而影响信号转导。TPKs 能控制很多信号转导蛋白磷酸化状态,因此能够调节细胞增殖、分化、生长、代谢和生存。与这种生物化学机制相符合的 NOX 的衍生物 ROS 已经被证明在几种不同的细胞类型中调整蛋白质酪氨酸磷酸化。

大量的研究证明 NOX 能够引起细胞的死亡。ROS 可以通过间接损伤 DNA、类脂和蛋白,或是直接通过 ROS 介导激活信号通路来诱导细胞凋亡。ROS 能够激活前期凋亡信号通路 MAPK,如 SAPK/JNK, ERK1/2 和 p38。MAPK 通路的激活主要是依赖 ROS 抑制酪氨酸磷酸酶^[23]。高浓度的 ROS、超氧化物能抑制 caspases,导致细胞从凋亡转变为坏死。然而在另一些情况下,NOX 衍生物 ROS 能够抑制细胞的凋亡。ROS 作为一种抗凋亡信号能激活 NF- κ B, Akt/ASK1 途径。超氧化物是 Fas 介导的细胞死亡的抑制剂。NOX 的激活一般是与细胞的凋亡相联系的,但在特定的条件下也可能起抗凋亡的作用。

4 NOX 与疾病的关系

研究发现^[24],在硬化病的发病过程中,7-酮胆甾醇可能通过激活 IRE1/JNK/AP-1 信号通路,促进 NOX4 的表达,使得 ROS 生成增多,从而引起平滑肌细胞凋亡。NOX 在肿瘤细胞及其相同组织来源的正常组织中表达不同,提示 NOX 的异常表达和调节可能与肿瘤发生和肿瘤细胞 ROS 增加有关。NOX1 在两种大肠癌细胞 Caco-2, T-84 及转化细胞 HEK293 中表达增加。前列腺癌组织标本中 NOX1 蛋白含量较正常前列腺组织明显增加。研究表明^[25],氧化的低密度脂蛋白能够激活人冠状动脉内皮细胞中的 NOX4 而促进 ROS 的生成。活化的 NADPH 氧化酶生成的过多的 ROS 又能够氧化低密度脂蛋白,而氧化的低密度脂蛋白又能促进 NADPH 氧化酶的活化,进而形成恶性循环,促进动脉粥样硬化的形成。

5 展望

NOX 家族是 NADPH 氧化酶的同源物,存在于不同的非吞噬细胞质膜上,组织表达有一定的特异性。它们正常时即保持一定的活性,制造一定量的 ROS,感受到胞外信息的刺激时能够迅速催化生成更高浓度 ROS。NOX 所产生的 ROS 作为信号分子调节细胞行为,如细胞的增殖、分化、凋亡,而 NOX 的异常表达和激活诱导肿瘤发生,并与其他疾病,如高血压、动脉粥样硬化以及老年痴呆症的发生发展有关。尽管目前众多学者对 NADPH 氧化酶在疾病中的作用做了大量研究,但对吞噬型细胞和非吞噬型细胞 NADPH 氧化酶结构和功能的异同、酶的亚单位结构及其相互作用、酶的活性调控机制和有效的特异性抑制剂还有待研究。新的特异性 NADPH 氧化酶抑制剂可能为各种疾病的治疗带来新的希望。

参 考 文 献

- [1] Babior BM. The respiratory burst oxidase [J]. *Curr Opin Hematol*, 1995, 2(1): 55-60.
- [2] Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, et al. Novel homologs of gp91phox [J]. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25(10): 459-461.
- [3] Cheng GJ, Cao ZH, Xu XX, et al. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of NOX3, NOX4, and NOX5 [J]. *Gene*, 2001, 269: 131-140.
- [4] Morand S, Agnandji D, Noel-Hudson M, et al. Targeting of the dual oxidase 2 N-terminal region to the plasma membrane [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(29): 30244-30251.
- [5] Geiszt M, Lekstrom K, Leto TL. Analysis of mRNA transcripts from the NAD(P)H oxidase 1 (Nox1) gene. Evidence against production of the NADPH oxidase homolog-1 short (NOH-1S) transcript variant [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(49): 51661-51668.
- [6] Harper RW, Xu C, Soucek K, et al. A reappraisal of the genomic organization of human Nox1 and its splice variants [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2005, 435(2): 323-330.
- [7] Szanto I, Rubbia-Brandt L, Kiss P, et al. Expression of NOX1, a superoxide-generating NADPH oxidase, in colon cancer and inflammatory bowel disease [J]. *J Pathol*, 2005, 207(2): 164-176.
- [8] Ago T, Kitazono T, Kuroda J, et al. NAD(P)H oxidases in rat basilar arterial endothelial cells [J]. *Stroke*, 2005, 36(5): 1040-1046.
- [9] Cui XL, Brockman D, Campos B, et al. Expression of NADPH oxidase isoform 1 (Nox1) in human placenta: involvement in pre-eclampsia [J]. *Placenta*, 2006, 27(4-5): 422-431.
- [10] Sumimoto H, Miyano K, Takeya R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases [J]. *Biochem Bio-*

- phys Res Commun,2005,338(1):677-686.
- [11] Piccoli C, Ria R, Scrima R, et al. Characterization of mitochondrial and extra-mitochondrial oxygen consuming reactions in human hematopoietic stem cells. Novel evidence of the occurrence of NAD(P)H oxidase activity [J]. J Biol Chem, 2005, 280 (28): 26467-26476.
- [12] Tejada-Simon MV, Serrano F, Villasana LE, et al. Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus [J]. Mol Cell Neurosci, 2005, 29(1):97-106.
- [13] Paffenholz R, Bergstrom RA, Pasutto F et al. Vestibular defects in head-tilt mice result from mutations in Nox3, encoding an NADPH oxidase[J]. Genes Dev, 2004, 18(5):486-491.
- [14] Banfi B, Malgrange B, Knisz J, et al. NOX3: a superoxide-generating NADPH oxidase of the inner ear [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (44):46065-46072.
- [15] Kirstin W, Sandra W, Reinhold K, et al. Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms NOX1 and NOX4 by the renin-angiotensin system in vitro and vivo [J]. Free Rad Biol Med, 2001, 31 (11):1456-1464.
- [16] Ambasta RK, Kumar P, Griendling KK, et al. Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (44):45935-45941.
- [17] Martyn KD, Frederick LM, Vonloehneysen K, et al. Functional analysis of Nox4 reveals unique H₂O₂ production [J]. Cell Signal, 2006, 18(1):69-82.
- [18] Banfi B, Tirone F, Durussel I, et al. Mechanism of Ca²⁺ activation of the NADPH oxidase 5 (NOX5) [J]. J Biol Chem, 2004, 279 (18):18583-18591.
- [19] Jagnandan D, Church JE, Banfi B, et al. Novel mechanism of activation of NADPH oxidase 5 (NOX5): calcium-sensitization via phosphorylation [J]. J Biol Chem, 2006, 282(19):6494-6507.
- [20] El Hassani R, Benfares N, Caillou B, et al. Dual oxidase 2 is expressed all along the digestive tract [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 288(5):G933-G942.
- [21] Lambeth JD, Kawahara T, Diebold B. Regulation of Nox and Duox enzymatic activity and expression [J]. Free Radical Biol Med, 2007, 43(3):319-331.
- [22] Goldstein BJ, Mahadev K, Wu X. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets [J]. Diabetes, 2005, 54(2):311-321.
- [23] Kamata H, Honda S, Maeda S, et al. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases [J]. Cell, 2005, 120(5):649-661.
- [24] Pedruzzi E, Guichard C, Olliv V, et al. NAD(P)H oxidase NOX-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(24):10703-10717.
- [25] Thum T, Borlak J. Mechanistic role of cytochrome P450 monooxygenases in oxidized low-density lipoprotein induced vascular injury: therapy through LOX-1 receptor antagonism [J]. Circ Res, 2004, 94(1):e1-13.