

生物大分子结构与功能

The ubiquitin ligase

张作鹏

2013203010020

The ubiquitin ligase

Introduction

Ubiquitination is a complex multistage system , mainly includes ubiquitin-activating enzyme E1, ubiquitin-carrier enzyme E2 and ubiquitin-ligase E3. In the human genome, only one gene encoding E1, less than 60 genes encoding E2s, and more than 400 genes encoding E3s. During most of ubiquitination, the substrate recognition and ubiquitin linkage is achieved by specific E3 which thought to be the key enzyme in the process of ubiquitination . Although there is a great variety of ubiquitin ligases, all of them contain some conservative structure domains to interact with ubiquitin-carrier enzyme E2. According to the diversity of the interacting domains, ubiquitin ligases can be divided into three categories: HECT, RING-FINGER and U-BOX. Here we take some typical E3 ligases as examples to simply describe the structure, function and regulation of ubiquitin ligase.

The structure of ubiquitin ligase

All three categories of their unique and conservative domain of E3 ligases play a role in combination with E2s (directly or indirectly), indicates the E2s preference of E3s. Excepting HECT, RING and U – box, E3s also contain different domains to identify their specific

substrates. Such as the binding domain of P53 on Mdm2 determines the recognition of P53[1], the BIR domain of XIAP determines the recognition of caspases[2].

There are about 50 HECT E3s in the human genome, HECT E3s are monomer enzymes and only a few has been identified their biochemical function. this kind of proteins are named because they contain a E3 ligase E6-AP HECT similar domain. HECT domain contains about 350 amino acids. In substrate-ubiquitin ligation catalysis, HECT E3s firstly combine to ubiquitinated E2s through the HECT domain, formed the covalently thioester bond between the HECT domain and ubiquitin, then catalyze the ubiquitination on substrate.[3]

Another kind of E3s are known as the RING-FINGER E3s, the biggest family in ubiquitin-ligases, up to now 270 genes are found coding RING-FINGER proteins. RING-FINGER domain were first found in the protein code by the really interesting new gene 1 in 1990s. like other domain rich in cysteine, RING-FINGER domain combined with zinc ions through its conservative cysteine and histidine, but it is not the same with zinc finger or other similar structures as the two zinc ions combined are staggered rows. In general, RING-FINGER E3s can be divided into two categories: monomer and polymer. no matter which kind the RING-FINGER E3 is, the basic scheme is employ ubiquitinated E2s through the RING-FINGER domain. E3 is not directly connect to ubiquitin,

but to make E2 more close to substrate, E2 directly catalyzes ubiquitin connect to the lys residues of substrate.[4]

The last category of E3s is U - box E3s, this kind of E3s contain conformation similar to the RING finger domain, but no amino acids impact with the zinc ions. The same as the RING finger E3s, this kind of E3s do not form covalent bond with ubiquitin, E2s directly catalyze ubiquitin to the substrate.[5]

The function of ubiquitin ligase

ubiquitination is one of the most important protein post-translation modifications in consideration of its function and related signaling pathway. Ubiquitin ligase plays a key role in this process, wherein E3 mediated K48 polyubiquitin chain mediated proteasome degradation pathway is most important.

The first discovered member of HECT E3s family is E6-AP. Human papilloma virus (HPV) E6 protein can express a E6 protein to combine the central part of E6-AP, its amino terminal tied closely with the E6-AP HECT domain, that makes the HECT domain be able to bond tumor suppressor protein p53. Thus, HPV E6 protein hijacks E6 - AP, induces P53 ubiquitin modification, and subsequent proteasome degradation.[6]

Anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is multi-subunit RING - finger ubiquitin ligase which has a larger molecular weight. APC/C (cDc20) mediates the ubiquitination of cyclin A in the prometaphase of cell

division and the degradation of cyclin B and securin in the metaphase to make the smooth completion of mitosis. After the mitosis, cdc20 degraded by means depend on the APC/C, and replaced by another related proteins Cdh1. In the S phase cells, APC/C (Cdh1) depolymerized through the phosphorylation of Cdh1 and rca1 / emi1 combination, APC/C will reassemble with cdc20 into activated E3.[7]

U - box E3s family has a ubiquitin ligase called CHIP, it is an crucial part of quality control system of protein. CHIP can combines the carboxyl end of Hsp70, Hsc70 and Hsp90 through its TPR domain and nearby charge enrichment region to identify abnormal state of polypeptide for the degradation through ubiquitin modification with the help of molecular chaperone.[8]

The regulation of Ubiquitin ligase

All physiological processes are affected by the signal stimulation inside and outside the cells to carry through complex control, and the regulation of ubiquitination mainly aimed at ubiquitin ligase E3. Including The regulation of E3 and E2 interaction, the post-translation modification of E2, the combination of E3 and the ligands. The regulation of the E3s and substrates combination, predominantly in post-translation modification of the substrates. Finally, the modification of ubiquitin ligase itself can also directly affect the ubiquitin ligase activity.

for instance, the tumor suppressor P53 is one of the typical

representative through ubiquitin proteasome pathway degradation. As MDM2 is the most important E3 ligase regulate the stability of P53, its own transcription has also been regulated by P53. The Stability of MDM2 is regulated by its auto-ubiquitination, its E3 ligase activity and ability to combine with substrate P53 is regulated by its phosphorylation induced by the external cause. Such as AKT phosphorylate MDM2 to increase the activity of ubiquitin ligase on P53, inhibiting auto-ubiquitination of itself at the same time, enhance the stability of MDM2. The ARF can combine MDM2 and restrain the ubiquitin ligase activity on P53, thus increasing the P53 accumulation in cell. When DNA damaged, P53 occur phosphorylation on its N-terminal amino acid residues, the phosphorylation of this region lower its affinity with MDM2, which restrained the ubiquitination and degradation of P53.[9]

Discussion

A growing number of ubiquitin ligase has been identified, and constantly updated research means deepen our understanding of the mechanism of ubiquitin ligase functions at the molecular level, but still there are many unanswered questions.

The first is if there is a specific selection mechanism when ubiquitin ligase connecting ubiquitin on the Lys of substrates. Although many E3 enzymes did not exhibit strong specificity on the Lys of substrates, when there are multiple lys can be connected by ubiquitin, some E3s select

only one of them for catalysis.[10]

In addition, polyubiquitin chains are necessary for the substrate degradation. Which mechanism has Ubiquitin ligase to choose to process the substrate - ubiquitin connection or ubiquitin - ubiquitin connection, the answer to this question needs more evidence.

Many evidences indicate that the catalytic activity of RING finger E3s is extremely high, even able to catalyze its auto-ubiquitination rely on the RING-finger domain. This feature has been used to identify whether a RING-finger protein is an E3 ligase in vitro, but the physiological significance is not clear.

Focused on the problem of regulation of substrate ubiquitination by E3 ubiquitin, we believe that will be a future research focus over a period of time.

References:

- [1]. Haupt, Y., et al., Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 1997. 387(6630): p. 296-9.
- [2]. Galban, S. and C.S. Duckett, XIAP as a ubiquitin ligase in cellular signaling. *Cell Death Differ*, 2010. 17(1): p. 54-60.
- [3]. Huibregtse, J.M., et al., A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. 92(11): p. 5249.
- [4]. Lorick, K.L., RING fingers and relatives: determinators of protein fate.
- [5]. Hatakeyama, S., et al., U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. *J Biol Chem*, 2001. 276(35): p. 33111-20.
- [6]. Huibregtse, J.M., M. Scheffner and P.M. Howley, A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J*, 1991. 10(13): p. 4129-35.
- [7]. JW, H., The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more.
- [8]. Murata, S., et al., CHIP is a chaperone-dependent E3 ligase that ubiquitylates unfolded protein. *EMBO Rep*, 2001. 2(12): p. 1133-8.
- [9]. Feng, J., et al., Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*, 2004. 279(34): p. 35510-7.

[10]. Buschmann, T., et al., SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. Cell, 2000. 101(7): p. 753-62.

CDK5 在胰腺 β 细胞中的作用

陈红敏 2013203010019 生化与分子生物学 基础医学院 武汉大学

摘要:

细胞周期素依赖性激酶 5 (CDK5) 通常作为治疗神经性疾病的靶点, 因为 CDK5 在神经元迁移、神经轴突生长、突触传递及大脑皮层分层构造等大脑发育的进程中有重要作用。CDK5 是广泛分布在各个组织中, 其活化需要激活因子, 而激活因子具有组织特异性, 最近研究表明胰腺 β 细胞中有表达 CDK5 的激活因子, 这就引起了 CDK5 在胰腺 β 细胞中的作用的研究, 尤其是 2 型糖尿病 (T2DM) 中胰腺 β 细胞中的作用。本文就目前的研究情况做一综述。

关键词: CDK5 β 细胞 T2DM

1、引言

CDK5 蛋白由 292 个氨基酸残基组成, 相对分子质量为 33KD, 是一个脯氨酸介导的丝氨酸苏氨酸激酶, 是 CDKs 中的一员; 但是与其他成员不同的是 CDK5 并没有调控细胞周期的作用。

大多数 CDK5 以单体的形式存在细胞中, 没有激酶活性, 只有与激活因子 p35 或 p39 结合才有激酶活性。CDK5 在多种组织中都有表达, 而 p35 主要分布于大脑皮层, p39 主要分布于小脑, 因此 CDK5 激酶在神经系统才被激活。p35 的半衰期只有 20-30 分钟, 在应激刺激下 p35 被蛋白酶裂解成 p25。p25 具有完全的激活 CDK5 的功能, 且半衰期是 p35 的 5-10 倍! 由于 p25 没有膜锚定信号基序, 导致 p25-CDK5 复合物定位发生变化, 无限制地磷酸化其底物, CDK5 激酶被过度活化, 引发病变^[1]。

p35 和 p39 在细胞中定位与膜组份中, 这要取决于在其氨基末端的细胞锚定结构中的豆蔻酰化信号基序, 通过豆蔻酰化调控 p35 和 p39 在细胞中的分布。p35 分布在细胞周边区域, 失去豆蔻酰化信号基序后 (p25), 这种分布特征就会消失。CDK5 的亚细胞定位取决于 p35 和 p39 的定位。

CDK5 与细胞外信号途径和细胞骨架及膜系统相互联系, 调节神经元迁移、

轴突生长、神经递质释放有关，此外，CDK5 还参与细胞骨架形成、轴突导向、膜转运、突触功能、多巴胺信号转导和药物成瘾等多种神经功能调控。p35、p25 和 p39 分布上的特异性决定了 CDK5 只在神经元中被激活。

CDK5 曾被认为只有在神经元中有较高的激酶活性，后来陆续发现在非神经组织中发现 p35 和 p39 有一定的表达^[2]。有研究表明在胰腺的 β 细胞也有表达 p35 和 p39^[16-20-21]。最近又发现了新的 CDK5 调节因子细胞周期素 I (Cyclin I)，与细胞周期素分子有一定的同源性，但并不参与细胞周期调控。主要表达与终末分化细胞如神经元、肾小球足细胞、心肌细胞，具体作用机制尚不明确^[3]。

2、CDK5 在胰腺 β 细胞中的作用

胰腺 β 细胞是胰岛中分泌胰岛素的细胞。T2DM 的主要表征是 β 细胞的功能障碍和 β 细胞的凋亡加剧^[4]。CDK5 在胰腺 β 细胞中的作用主要分为两个部分，一部分是 CDK5 对 β 细胞的功能的影响，另一部分是 CDK5 对 β 细胞存活的影响。

2.1、CDK5 对 β 细胞功能的作用

β 细胞的主要功能就是分泌胰岛素，CDK5 对 β 细胞功能的调控就主要表现在对胰岛素的表达及分泌的调控。

胰岛素在 β 细胞中被储存在分泌颗粒中，在促分泌素的作用下，以胞外分泌的形式释放到细胞外。胞外分泌的作用机制与所有细胞中的膜泡运输的核心膜融合机制一样^[5-7]。运输小泡上的 SNAREs(v-SNAREs) 与靶膜上的 SNAREs(t-SNAREs) 作用促进膜的融合，是该机制的核心组分。此外，Munc18-1 是 sec1/Munc18 蛋白家族的一员，是胞外分泌的一个关键调控子^[8-10]。研究表明 Munc18-1 负调控分泌^[10]Munc18-1 的一个作用是结合突触融合蛋白 (syntaxin1)，使其处于关闭状态，阻碍 syntaxin1 参与 trans-SNARE 的组成^[11]。Munc18-1 是 CDK5 的磷酸化底物，磷酸化的 Munc18-1 促进胰岛素的分泌^[12]。

胰岛素分泌的调控与血糖稳态密切相关， β 细胞的活性由一些刺激因子决定^[13]，其中 EGF 是胰岛素的一个强刺激因子，来调控血糖水平^[14]。EGF 通过激活磷脂酶 D2 (PLD2) 促进胰岛素的分泌^[14]。胰岛素的分泌主要是伴随着胞内 Ca^{2+} 的上调而增加的，这个过程由一些细胞信号蛋白调控，PLD2 就是其中一种。PLD2 是质膜上囊泡胞外分泌的关键因子^[15] EGF 磷酸化并激活 CDK5，激活的

CDK5 磷酸化 PLD2 第 134 位丝氨酸，PLD2 被活化，使胰岛素的分泌上调^[16]。

在细胞中囊泡的运输依赖于皮层的肌动蛋白骨架，越来越多的证据证明肌动蛋白在调控神经分泌颗粒包括胰岛素颗粒的胞外分泌中有双重作用^[17]。分泌颗粒与肌动蛋白骨架的结合需要 β 2-syntrophin锚定颗粒的参与。细胞中有 β 2-syntrophin蛋白的自身抗原ICA512颗粒蛋白，ICA512位于分泌颗粒的膜上^[18]。ICA512与 β 2-syntrophin的PDZ结构域结合，从而使分泌颗粒连接到肌动蛋白微丝上^[19]。CDK5磷酸化 β 2-syntrophin蛋白的S75位点，能抑制它与ICA512的结合，增加分泌颗粒的运动性，从而促进胰岛素的分泌^[20]。

以上研究的结果是 CDK5 的活化可以促进胰岛素的分泌，但是另外还有些研究的结果是相反的，CDK5 被抑制后才促进胰岛素的分泌，也就是说 CDK5 抑制胰岛素的分泌。结果如下文所示。

在高糖而非低糖作用下，CDK5 活性的抑制增强了胰岛素的分泌。CDK5 对胰岛素的调控作用与 p35 有关，p35 敲除的小鼠在高血糖下表现出胰岛素分泌的增加。在高糖下，CDK5 的抑制可以增强胞内 Ca^{2+} 通道的开放以及促进 Ca^{2+} 通过 L-型电压门控 Ca^{2+} 通道(L-VDCC)。CDK5 磷酸化 L-VDCC 的 783 位丝氨酸，抑制了与 SNARE 蛋白的结合，随后 L-VDCC 的活性降低，胞内 Ca^{2+} 的浓度降低，胰岛素分泌减少^[21]。

艾塞那肽-4 (Ex4) 是一个与类胰高血糖素素多肽 1 (GLP-1) 高度相似的多肽，可以诱导胰岛素分泌。CDK5 的抑制剂 Roscovitine,可以增强 Ex4 诱导的胰岛素的分泌。Ex4 和 Roscovitine 共同长期处理明显地提高 HbA1c。^[22]

高糖刺激下 p35 裂解成 p25，p25 与 CDK5 结合使 CDK5 过度活化，过度激活的 CDK5 可以抑制胰岛素的分泌，同时还会引起胰岛 β 细胞的凋亡^[23]。

除此之外，有研究还提到 CDK5 可以影响胰岛素基因的转录。在胞外高糖作用下， β 细胞中 p35 的表达上升，同时 CDK5/p35 复合体的活性增高。活化的 p35/CDK5 的复合体可以刺激胰岛素启动子的活化^[24]。胰岛素启动子的转录因子之一的 PDX-1，在胞质和胞核内都有分布，CDK5 作用下降低了核内的 PDX-1，同时胞质中的 PDX-1 增加，说明 CDK5 调控 PDX-1 由胞质向胞核的转移。CDK5 抑制了 PDX-1 进入胞核，无法作用与胰岛素启动子，导致胰岛素基因表达的下降，胰岛 β 细胞功能受损^[25]。

2.2、CDK5 对 β 细胞存活的作用

T2DM 中胰腺 β 细胞除了功能障碍外，还表现出凋亡的增加。CDK5 在神经细胞中就有跟凋亡相关的作用，在胰腺 β 细胞中或许也有类似的作用。研究结果如下文所诉。

黏着斑激酶 (FAK) 是一个调控促存活通路的激酶，其中包括 ERK1/2 和磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K)/Akt 通路^[26]。FakSer732 是 CDK5 的磷酸化位点。CDK5 磷酸化 Fak,磷酸化的 Fak 导致 P-Akt 增加。P-Akt 促进转录因子 cAMP-应答元件的结合蛋白 (CREB) 的磷酸化，p-CREB 调控 IRS2 基因表达，也就是调控 β 细胞存活；除了促进 β 细胞存活外，pFak 还抑制凋亡的加剧，综合起来就是 CDK5 通过活化 Fak-Akt 通路抑制了 β 细胞的凋亡，同时促进了 β 细胞的存活^[27]。

与此相反的是，有研究表明过表达的 p35 可以引起胰腺 β 细胞的凋亡。高糖刺激下， β 细胞内的 p35 表达增加，CDK5 的活性升高，同时发现胰岛素的分泌下调。过表达 p35 的细胞在高糖刺激 4h 后，诱导产生了 p25,p25 与 CDK5 结合引起 CDK5 的过度激活，胰岛素的分泌被抑制， β 细胞开始发生凋亡^[28]。

3、讨论

本文主要就 β 细胞功能和存活两个方面进行了综述，还有好多没提到的发现，比如 CDK5 对 PPAR- γ 的作用。纵观整篇文章，其实 CDK5 在 β 细胞中的作用机制，研究的还不是很透彻，还有很多地方没有弄清楚，而且表现出完全相反的结论。究竟 CDK5 促进胰岛素分泌还是抑制，是促进凋亡还是抑制，这些还没有一个共识，这还需要大量的研究来证实。此外，CDK5 在神经系统参与了发育过程的调控，那么在 β 细胞中有没有类似的作用，还没有报道过。CDK5 跟 T2DM 的关系还要进一步的研究，或许将来 CDK5 就是一个新的治疗靶点。

参考文献

- 1、Tarricone C , Dhavan R , Peng J , et al. A. Structure and regulation of the CDK5-p25 (nck5a) complex. *Mol Cell* , 2001 ,8:657~669.
- 2、Rosales JL, Lee KY. Extraneuronal roles of cyclin-dependent kinase 5. *Bioessays* 2006, 28(10): 1023-34.
- 3、Brinkkoetter PT, Pippin JW, Shankland SJ. Cyclin I-Cdk5 governs survival in post-mitotic cells. *Cell Cycle* 2010, 9(9): 1729-31.

- 4、 Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 2003;52:102–110.
- 5、 Sołlner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., and Rothman, J. E. (1993) *Cell* 75, 409–418.
- 6、 Sołlner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and Rothman, J. E. (1993) *Nature* 362, 318–324.
- 7、 Rothman, J. E. (1994) *Nature* 372, 55–63.
- 8、 Rizo, J., and Südhof, T. C. (2002) *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 641–653.
- 9、 Gallwitz, D., and Jahn, R. (2003) *Trends Biochem. Sci.* 28, 113–116.
- 10、 Toonen, R. F., and Verhage, M. (2003) *Trends Cell Biol.* 13, 177–186.
- 11、 Misura, K. M., Scheller, R. H., and Weis, W. I. (2000) *Nature* 404, 355–362
- 12、 Lilja L, Johansson JU, Gromada J, et al. Cyclin-dependent kinase 5 associated with p39 promotes Munc18-1 phosphorylation and Ca(2+)-dependent exocytosis. *J Biol Chem* 2004;279:29534–29541.
- 13、 .C. Henquin, M.A. Ravier, M. Nenquin, J.C. Jonas, P. Gilon, *Eur. J. Clin. Investig.* 33:(2003) 742.
- 14、 H.Y. Lee, K. Yea, J. Kim, B.D. Lee, Y.C. Chae, H.S. Kim, D.W. Lee, S.H. Kim, J.H. Cho, C.J. Jin, D.S. Koh, K.S. Park, P.G. Suh, S.H. Ryu, *J. Cell. Mol. Med.* 5 (2007) 5.
- 15、 M.A. Frohman, T.C. Sung, A.J. Morris, *Biochim. Biophys. Acta* 1439 (1999) 175.
- 16、 Hye Young Lee, Hyuntae Jung, Il Ho Jang, Pann-Ghill Suh, Sung Ho Ryu, Cdk5 phosphorylates PLD2 to mediate EGF-dependent insulin secretion. *Cellular Signalling*, 20(2008):1787-1794.
- 17、 Lang T, Wacker I, Wunderlich I, Rohrbach A, Giese G, et al. Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells. *Biophys J* 2000,78: 2863–2877.
- 18、 Solimena M, Dirx R, Jr., Hermel JM, Pleasic-Williams S, Shapiro JA, et al. ICA 512, an autoantigen of type I diabetes, is an intrinsic membrane protein of neurosecretory granules. *Embo J* 1996,15: 2102–2114.

- 19、Solimena M, Gerdes HH . Secretory granules: and the last shall be first. *Trends Cell Biol* 2003,13: 399–402.
- 20、Sandra Schubert, Klaus-Peter Knoch, Joke Ouwendijk, Shabaz Mohammed, et al. β 2-syntrophin is a Cdk5 Substrate That Restrains the Motility of Insulin Secretory Granules. *PLoS ONE* 2010, 5(9):e12929.
- 21、Fan-Yan Wei, Kazuaki N, Toshio O, Yasunori S, et al. Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion. *Nature medicine*. 2005,11(10):1104-1108
- 22、Kitani K, Oguma S, Nishiki T, et al. A Cdk5 inhibitor enhances the induction of insulin secretion by exendin-4 both in vitro and in vivo. *J Physiol Sci* 2007;57:235–239.
- 23、Ya-li Zheng, Congyu Li, Ya-Fang Hu, Li Cao, et al. Cdk5 inhibitory Peptide (CIP) inhibits Cdk5/p25 Activity Induced by High Glucose in Pancreatic Beta Cells and Recovers Insulin Secretion from p25 Damage. *PLoS ONE*. 2013,8(9):e63332.
- 24、Mariano U, Daniel M, Kemp, and Joel F H. Glucose-Induced Expression of the Cyclin-dependent protein kinase 5 Activator p35 involved in Alzheimer's disease regulates insulin gene transcription in Pancreatic β -cells. *Endocrinology* 2004,145(6):3023-3031.
- 25、Mariano U, J. Michael R, Joel F. Habener. Inhibition of Cyclin-dependent kinase 5 Activity protects pancreatic beta cells from Glucotoxicity. *J. Biol. Chem.* 2006,281:28858-28864.
- 26、Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:516–523
- 27、Marie D, Tatyana G, Safia C, Chang-jiang Huang, and Peter C B. Cyclin-dependent kinase 5 promotes pancreatic beta-Cell survival via Fak-Akt signaling pathways. *Diabetes*. 2011.60:1186-1197.
- 28、Ya-Li Zheng, Ya-Fang Hu, Niranjana A, Philip G, et al. Overexpression of p35 in MIN6 pancreatic beta cells induces a stressed neuron-like apoptosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 2010, 299:101-107.

动脉粥样硬化发病机制与治疗研究进展

2013203010017 刘良臣 生物化学与分子生物学

[摘要]动脉粥样硬化 (atherosclerosis , AS) 是西方发达国家的主要死亡原因 , 近些年来该病在我国逐渐增多,是一组动脉硬化的血管病中常见的、最重要的一种。AS 是一种慢性疾病 , 内皮损伤可启动该过程 , 内皮功能改变 , 含载脂蛋白 (apo) B 的脂蛋白在血管壁内堆积 , 产生慢性炎症过程 , 有巨噬细胞、T 细胞和平滑肌细胞参与。为心肌梗死和脑梗死的主要原因。本文将从 AS 的发病机理、相关学说、病理特征和治疗的最新进展等方面进行阐述。

[关键词] 动脉粥样硬化 发病机理 病理特征 药物治疗

1.动脉粥样硬化病因学研究概述

动脉粥样硬化是全身性的一种疾病,累及到多种器官:如发生脑动脉粥样硬化,出现慢性脑供血不足、脑梗死;发生冠状动脉硬化,出现心绞痛、心肌梗死或心脏性猝死;发生肾脏动脉硬化,出现肾功能不全、肾衰竭;发生大动脉硬化,出现夹层动脉瘤;发生肢体动脉硬化,出现动脉硬化性闭塞症和间歇跛行,可见动脉粥样硬化对人类健康的危害相当严重。现代细胞和分子生物学技术显示动脉粥样硬化病变具有巨噬细胞游移、平滑肌细胞增生;大量胶原纤维、弹力纤维和蛋白多糖等结缔组织基质形成;细胞内外脂质聚集的特点。由于在动脉内膜集聚的脂质外观呈黄色粥样,故称为动脉粥样硬化。

2.病因学历史回顾

1961年, William Kannel 在 Framingham 研究中首次提出危险因素的概念, 以描述与动脉粥样硬化发生有关的因素。危险因素概念的提出及危险因素的评估为降低动脉粥样硬化发病率做出了很大贡献。但是, 动脉粥样硬化危险因素谱在逐渐变化, 新的危险因素与日俱增, 仍需要进一步研究。

2.1 血脂异常

流行病学研究证明, 高脂血症是动脉粥样硬化的主要危险因素, 能引起血浆脂蛋白异常, 继而引发动脉管壁病变^[1]。血脂异常是指血浆脂质状态异常。常见的血脂异常包括总胆固醇、LDL 胆固醇、Lp (a) 和甘油三酯水平升高; 高密度脂蛋白胆固醇水平降低; 小而密的 LDL 颗粒占优势。上述异常可单独存在, 也可联合合并存在。

2.1.1 乳糜微粒 (CM) CM 颗粒较大, 约 80~500nm, 密度低, 从消化道吸收的甘油三酯等酯类, 在小肠粘膜上皮细胞内合成 CM, 通过淋巴进入血液。由于 CM 颗粒大, 不能进入动脉壁内, 一般不致 AS, 但易诱发胰腺炎。

2.1.2 极低密度脂蛋白 (VLDL) VLDL 颗粒较 CM 小, 约 30~80nm, 密度较 CM 高, 主要在肝合成, 其次是小肠。主要功能是将内源性甘油三酯运送至肝外组织。其次, VLDL 是 LDL 的主要前体物质。极低密度脂蛋白代谢产生的中密度脂蛋白具有致动脉粥样硬化作用。

2.1.3 低密度脂蛋白 (LDL) LDL 主要是由极低密度脂蛋白转化而来。次要途径是肝合成后直接分泌到血液中。主要功能是把胆固醇运输到全身各处细胞, 运输到肝脏合成胆酸。LDL 水平过高能致动脉粥样硬

化。强化降低 LDL 胆固醇可降低心血管死亡率和患病率，延缓动脉粥样硬化斑块进展。

2.1.4 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 天然 LDL 核心的脂肪酸中含有大量不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFAs) 约占 LDL 总脂肪酸含量的 35%~70%，所以容易发生氧化。

2.1.5 高密度脂蛋白 (HDL) HDL 主要是将肝外组织细胞中的胆固醇转运出来，然后被肝分解代谢，即胆固醇逆转运。血浆中的游离胆固醇在 HDL 中转化为胆固醇酯，可阻止游离胆固醇在动脉壁和其他组织积聚。HDL 抗 As 作用的一个重要的机制就是 HDL 参与胆固醇逆向转运，将周围细胞(包括动脉壁细胞)内过剩胆固醇移出并转运至肝脏进行转化、清除。此外，HDL 还具有抗脂质氧化、抑制血小板聚集和粘附分子的表达、影响细胞的增殖、保护内皮和促进血管扩张等作用。HDL 发挥这些作用涉及到与特异的受体结合，激活细胞内信号转导途径^[2]。

HDL 水平每升高 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，冠脉疾病的危险就可能降低 6%。低 HDL 水平与心血管疾病的相关性在老人和女性群体中表现更显著^[3]。

2.1.6 脂蛋白 (a) [Lp (a)] 其成分与 LDL 相似，是一种变异 LDL，蛋白部分由 ApoB-100 和特异性抗原 ApoA 组成，两者以二硫键共价相连。Lp (a) 在血浆中浓度与动脉粥样硬化的发病率呈正相关。遗传高度影响 Lp (a) 的水平，CHD 阳性家族史，Lp (a) 水平升高的患者，应该积极降低其危险因素并进行积极的调脂治疗。

2.1.7 载脂蛋白 (apolipoprotein, Apo) 其主要功能有：①构成并稳定脂蛋白的结构②修饰并影响和脂蛋白有关的酶的代谢和活性③是与

脂代谢相关酶的激活因子④作为脂蛋白受体的配体，参与脂蛋白的代谢过程。

2.1.8 胆固醇 血浆胆固醇含量增高是引起动脉粥样硬化的主要因素，动脉粥样硬化斑块中含有大量胆固醇，是胆固醇在血管壁中堆积的结果，由此引起一系列心血管疾病。

2.1.9 甘油三酯 甘油三酯来源过多或分解代谢障碍或两者兼有均可引起高甘油三酯血症。高甘油三酯血症是动脉粥样硬化的独立危险因素。

2.2 吸烟

大量证据显示，燃烧的烟草产生的气体和焦油微粒毒素引起血管内皮功能紊乱炎症反应氧化应激反应脂质代谢紊乱基质金属蛋白酶活性改变以及血栓形成，从而导致动脉粥样硬化的形成。

2.3 高血压

高血压引发动脉粥样硬化具体机制尚不明确，可能有下列因素：
①高血压时血流对血管壁的机械性压力和冲击作用较强；②血压能直接影响动脉内膜结缔组织代谢；③高血压可引起内皮损伤和功能障碍，使内膜对脂质的通透性增加；④与高血压发病有关的肾素、儿茶酚胺和血管紧张素等也可以改变动脉壁代谢，导致血管内皮损伤，从而造成脂蛋白渗入内膜增多、血小板和单核细胞粘附、中膜平滑肌细胞迁入内膜等变化，促进动脉粥样硬化发生和发展。

2.4 糖尿病和高胰岛素血症

糖尿病(1型和2型)是冠心病、卒中和周围动脉疾病独立而强大的危险因素,80%的糖尿病病人死于动脉粥样硬化,糖尿病作为冠心病

的等危症已经过临床大规模研究的证实^[4,5]。高糖状态下载脂蛋白 B 和 LDL 的磷脂成分都受到糖基化,导致 LDL 清除障碍并易被氧化修饰^[6,7]。高胰岛素血症和胰岛素抵抗引起动脉粥样硬化的可能机制包括: ①血脂紊乱,主要表现为 LDL-C 升高, HDL-C 降低和 TG 升高; ②可以引起血管舒张功能不良,钠水潴留以及交感神经兴奋,导致血压升高; ③高胰岛素血症刺激血管平滑肌细胞增殖迁移,进而促进动脉粥样硬化发生; ④可能导致血管内皮细胞功能障碍等。

2.5 遗传因素

家族性高胆固醇血症、家族性脂蛋白脂酶缺乏症等患者动脉粥样硬化的发病率明显高于对照组。多种基因可能对脂质的摄取、代谢和排泄产生影响。

2.6 其他因素

其他因素包括年龄与性别、肥胖、缺乏体力劳动、微量元素铬、锰等摄入不足,而铅、镉的摄入量增加;性情急躁,进取心和竞争性强的 A 型性格者;存在低氧、抗原-抗体复合物、维生素 C 缺乏;动脉壁内酶的活性降低等能增加血管通透性的因素。李玉华等^[8]对维生素 E、维生素 C、 β 胡萝卜素、普罗布考及微量元素硒这五种抗氧化剂对抗 Cu^{2+} 氧化修饰 LDL 的作用进行对比,发现维生素 E 和硒是抑制 LDL 氧化修饰的优选抗氧化剂,两者联合使用有叠加效应,能更有效地防治 As。

3. 动脉粥样硬化生成的假说

动脉粥样硬化是严重危害人类健康的常见疾病。目前 AS 的发病

机制尚不完全清楚，主要有以下几个学说。

3.1 脂质浸润学说

该学说由 Virchow 于 1963 年提出，经过几代科学家的研究，目前高脂血症已被世界医学界认为是导致动脉粥样硬化和心脑血管等各种疾病的最主要的原因。尽管该学说得到很多研究支持和多数学者认同，但该学说不能圆满的解释动脉粥样硬化病变部位和分布特点。

3.2 内皮细胞损伤学说

该学说由 Ross 于 1973 年提出，最初的提法是：因机械、LDL 或其他损伤内皮的因素使内皮细胞分离或剥脱，导致该处血小板和单核/巨噬细胞粘附，血小板释放的因子促使中膜平滑肌（SMC）迁移至内膜，并在内膜增殖之后 SMC 和巨噬细胞荷脂形成泡沫细胞，SMC 合成胶原纤维等基质，进而形成斑块。近些年的不断研究，该理论不断得到修改。Ross 提出各种致动脉粥样硬化的损伤因素，引起的反应有单核/巨噬细胞浸润、细胞和结缔组织增生，这一反应的本质是炎症反应，在反应的开始是抗损伤的适当保护性反应，但若损伤持续不减轻，就刺激出现了过度的炎症反应，最终形成过度增生的病灶，因此保持适度的反应很重要^[9]。血管内皮功能异常是动脉粥样硬化的早期病理改变，粥样硬化斑块的形成是动脉对内膜损伤做出的反应。

3.3 炎症反应学说

动脉硬化是慢性炎症性疾病。该学说的理论依据：①动脉粥样硬化是脂质沉积于动脉壁的过程。此过程由炎症反应介导。②此炎症反应的特征是：在粥样斑块中可见单核细胞-巨噬细胞、活化 T 细胞。

体液免疫与细胞免疫应答均能调控炎症及动脉粥样硬化。

3.4 氧化应激学说

氧化应激与动脉粥样硬化发生、发展的关系是目前动脉粥样硬化研究领域的热点，但确切机制尚不明确。氧化应激时生成的活性氧自由基（reactive oxygen species, ROS），对构成生物体的脂类可产生氧化作用，且 ROS 作为第二信使，在细胞信号传导过程中也产生一定作用，从多角度、多方位促进动脉粥样硬化形成和发展。氧化应激导致 ox-LDL 水平升高。目前研究表明 NADPH 氧化酶是血管内生成 ROS 的最主要酶体，该酶参与了 AS 的发生发展过程。Peter Libby^[10]针对氧化应激的问题明确提出：AS 的发生与巨噬细胞对原型 LDL 的摄取无明显相关性，而与氧化修饰后的低密度脂蛋白，即氧化型低密度脂蛋白（ox-LDL）的摄取呈明显正相关，由此拉开了脂质氧化学说的序幕。Young 等^[11]证明 ox-LDL 能上调单核细胞、巨噬细胞清道夫受体，能被巨噬细胞迅速摄取，且无负反馈调节。张红胜等^[12]发现，抑制 NAD(P)H 氧化酶、清除 ROS 正是中药活血化瘀方剂-复方丹参方治疗 AS 的机制之一。

3.5 斑块破裂学说

现已有研究证实，冠状动脉粥样硬化疾病致死的主要原因为急性心肌梗死，而 90%急性心肌梗死是斑块破裂所致，导致斑块破裂最主要因素是基质金属蛋白酶（MMPs）的作用。MMP-9 是由中性粒细胞、巨噬细胞和平滑肌细胞分泌，在粥样斑块易损区过度表达的一种 MMP，对血管壁的基底膜和细胞外成分具有清除作用，使纤维帽崩溃影响斑

块的稳定性。所以,MMP-9 不仅能促进 AS 的发展^[13],并且是 AS 斑块不稳定的主要因素^[14]。斑块破裂的危险性是它使斑块核心区的促血栓物质如磷脂、组织因子、血小板和血小板黏附基质暴露于血液。破裂好发生于纤维帽薄弱处和部分受损处,在这些地方含有丰富的激活的免疫细胞,它们产生很多炎症分子和蛋白水解酶,这些酶能减弱纤维帽和激活核心区细胞,使稳定的斑块转变成脆弱的、不稳定的、易破裂的结构,由此诱导血栓形成和引发急性冠状动脉综合征。

3.6 血栓形成学说

许多原因可使动脉粥样硬化斑块产生裂隙或完全破裂,导致凝血因子如胶原蛋白、von Willebrand 因子等暴露于血流中,引起血小板黏附、激活和聚集。使凝血酶积蓄达到有效浓度,使纤维蛋白原转变成纤维蛋白,最后形成血栓。Yamashita 等^[15]发现,在 apo E -/-和 LDLR -/-小鼠体内,由食物引起的血栓形成能促进 AS 的进展。Wickline 等^[16]则报道了纳米技术的抗血栓疗效以及对 AS 病理进程的抑制作用。

4.动脉粥样硬化的病理特征

正常动脉壁由内膜、中膜和外膜三层构成。动脉粥样硬化时相继出现脂质点和条纹、粥样和纤维样斑块、复合病变 3 类变化。

4.1 脂纹

脂纹的形成多先有高脂血症,高脂血症或其他有害因子可造成内皮损伤,使其表面糖萼变薄,内皮细胞间隙增宽。大量泡沫细胞聚集即形成脂纹,内皮隆起及变形。

4.2 纤维斑块

肉眼观纤维斑块（fibrous plaque）为隆起于内膜表面的灰黄色斑块。随着斑块表层的胶原纤维不断增加及玻璃样变，脂质被埋于深层，斑块乃逐渐变为瓷白色。镜下见斑块表面为一层纤维帽，乃由多量SMC及大量细胞外基质组成。

4.3 粥样斑块

粥样斑块（atheromatous plaque）亦称粥瘤（atheroma）。肉眼观为明显隆起于内膜表面的灰黄色斑块。切片表层的纤维帽为瓷白色，深部为多量黄色粥样物质，由脂质和坏死崩解物质混合而成。

4.4 复合病变

复合病变包括斑块内出血、斑块破裂、血栓形成、钙化及动脉瘤形成等。

5 动脉粥样硬化治疗新进展

5.1 动脉粥样硬化药物治疗新进展

5.1.1 抗血小板和抗凝治疗

近年来，有关冠心病抗凝、抗血小板的临床研究取得了很大的发展，尤其是氯吡格雷在冠心病高危人群和血运重建后的应用，得到了循证医学的有力支持。

5.1.2 他汀类药物

近年的研究结果显示，他汀类药物不仅是一类良好的调脂药物，而且具有抑制和逆转动脉粥样硬化的作用，有利于修复破裂或溃疡的动脉粥样硬化斑块，有利于斑块的稳定和降低斑块部位的血栓形成。阿托伐他汀是常用的他汀类调脂药物，可通过降低胆固醇以及低密度

脂蛋白胆固醇水平降低冠心病以及卒中的发病率^[17]。但近年来许多证据表明,这种防治作用不依赖于降脂效应,而源于他汀类药物的抗炎效果^[18],其有效阻止和逆转 AS 病变的机制尚未明确。

5.1.3 肾素-血管紧张素-醛固酮系统阻断药 (RAAS) 和 β 受体阻断药

5.1.4 抗氧化治疗

近期资料认为,有规律的在食物中摄入抗氧化物质,可以阻止动脉粥样硬化的发展, ox-LDL 的减少可以作为抗氧化作用的标志物。

5.1.5 抗炎治疗

抗炎药物包括阿司匹林、氯吡格雷、低分子肝素等可以阻止血管炎症的发生和发展。

6. 结论与展望

早期诊断、早期治疗 AS 对防止或延缓 CAS 的发展、减少心血管事件的发生尤为重要。治疗动脉粥样硬化是一项艰巨的任务,随着治疗技术的不断完善,人民生活质量的提高,寿命逐渐延长,相信动脉粥样治疗的前景将会更加辉煌。

7. 参考文献

[1]张 震, 惠汝太. 高密度脂蛋白(HDL)和甘油三酯作为治疗的靶点 [J]. 中国分子心脏病学杂志, 2003, 3(5): 296-304

[2]von Eckardstein A, Hersberger M, Rohrer L. Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2005; 8 (2): 147-152

[3]Peter P. High-density lipoprotein as a therapeutic target: clinical

- evidence and treatment strategies [J]. *Am J Cardiol.* 2005.96:50-58
- [4] Egede LE. Diabetes, major depression, and functional disability among U.S. adults [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(2):421-428
- [5] Howard BV, Best LG, Galloway JM, Howard WJ, Jones K, Lee ET, et al. Coronary heart disease risk equivalence in diabetes depends on concomitant risk factors [J]. *Diabetes Care*, 2006, 29(2):391-397
- [6] Lopez LR, Hurley BL, Simpson DF, Matsuura E. Oxidized low-density lipoprotein {beta}2-glycoprotein I complexes and autoantibodies in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2005, 1051:97-103
- [7] Veiraiah A. Hyperglycemia, lipoprotein glycation, and vascular disease [J]. *Angiology*, 2005, 56(4):431-487
- [8] 李玉华, 徐仓宝, 张亚萍, 王亚文, 林元喜. 硒、维生素 E 等抑制低密度脂蛋白氧化修饰作用的比较研究. *西安医科大学学报*, 2001, 22(2):97-99
- [9] Ross R. Atherosclerosis—an inflammation disease. *New Engl J Med*, 1999, 340(2):115-126
- [10] Libby P, Ganz P. Restenosis revisited—new targets, new therapies. *N Engl J Med*, 1997, 337(6):418-419
- [11] Young IS, Mc Eneaney J. Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*, 2001, 29(Pt2):358-362
- [12] Zhang HS, Wang SQ. Notoginsenoside R1 inhibits TNF- α -induced fibronectin production in smooth muscle cells via the ROS/ERK pathway

[J]. Free Radica Biol Med,2006,40(9):1664-1674

[13]Peterson JT,Li H,Dillon L,et al. Evolution of matrix metalloprotease and tissue inhibitor expression during heart failure progression in the infarcted rat. J. Cardiovasc Res, 2000, 46(2):307~3158

[14]Zhang B,Ye S,Herrmann SM,et al. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. Circulation,1999,99(14):1788~1794

[15]Yamashita T, Oda E,Sano T,et al. Varying the ratio of dietary n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid alters the tendency to thrombosis and progress of atherosclerosis in apoE^{-/-}LDLR^{-/-} double knockout mouse [J]. Thromb Res, 2005, 116(5):393-401

[16]Wickline SA, Neubauer AM, Winter P, et al. Applications of nanotechnology to atherosclerosis thrombosis and vascular biology [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol.2006, 26(3):435-441

[17] Serruys PW,de Feyter P,Macaya C,et al. Fluvastatin for prevention of cardiac events following successful first percutaneous coronary intervention:a randomized controlled trial. JAMA 2002;287:3215 ~ 352212

[18]Rosenson RS,Tangney CC. Anti-atherothrombotic properties of statins. JAMA 1998;279:1643~1650

蛋白质泛素化研究综述

张小叶 2013203010018 基础医学院

摘要: 泛素化是一种重要的蛋白质翻译后修饰,包括经典通路和非经典通路。经典通路是指泛素介导的蛋白质降解通路,非经典通路则是指其参与 DNA 损伤修复,介导炎症信号转导,调控蛋白质转运,促进蛋白质合成等。通过对泛素化通路,尤其是非经典通路的研究,可以加深对泛素的认识与了解。

1.1 泛素

泛素 (Ubiquitin, Ub) 是一种由 76 个氨基酸构成,分子质量为 8.45ku,广泛存在于真核细胞中的多肽^[1]。经过一系列酶的催化可与蛋白质共价结合,泛素以多聚泛素链或单泛素链与底物共价结合,即对蛋白质底物进行泛素化修饰。泛素化属于蛋白质翻译后修饰,参与调节几乎所有的细胞内过程。泛素通过这种方式,促进蛋白质的降解或合成,调节蛋白质功能,改变蛋白转运,调控着细胞内的大量过程,帮助实现细胞内的许多生理功能。

1.2 E1-泛素激活酶

泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1) 是催化泛素与蛋白质底物结合所需的第一个酶,能水解 ATP,通过其活性位点位置的半胱氨酸残基在泛素的羧基末端形成高能硫酯键而激活泛素^[2]。E1 在细胞中的存在比较丰富,是细胞生存所必需的,在进化中很保守。

1.3 E2-泛素耦联酶

泛素耦联酶 (ubiquitin-carrier protein or ubiquitin-conjugating enzyme, E2) 是泛素与蛋白质底物结合所需的第二个酶,催化泛素和底物蛋白之间形成异肽键^[2]。细胞内有多种 E2,根据结构上的差异,可分为 I、II、III、IV 组,不同的 E2 功能相差很大^[3]。真核生物 E2 在蛋白质的一级结构上很保守,它们都含有约 160 个氨基酸组成的高度保守的所谓 UBC 结构域,在这一区域内含有其活性所必需的半胱氨酸残基,这个残基在泛素-E2 酶硫酯键形成过程中起作用^[2-3]。

1.4 E3-泛素连接酶

泛素连接酶 (ubiquitin-protein ligase, E3) 是泛素与蛋白质底物结合所需的第三个酶,在

决定泛素介导底物蛋白降解的选择性上具有重要意义,能直接与底物或通过辅助蛋白与底物相互作用^[2]。细胞内至少有几百种 E3 酶,其中哺乳动物细胞内主要由三类组成:即含 HECT (homologous to E6-AP C-terminal) 结构域的 E3、含环指结构 (RING finger) 的 E3 和 U-box 结构域的 E3。

1.5 蛋白去泛素化酶与去泛素化作用

去泛素化作用是泛素化过程的逆转。在真核细胞内已发现多种蛋白去泛素化酶 (deubiquitinating enzyme, DUB), 它们能够水解泛素和蛋白底物之间的硫酯键^[4]。去泛素化酶属于泛素蛋白酶大家族,在许多生命活动中起着关键作用。在真核细胞中, DUBs 在生成游离的泛素以及某些核糖体蛋白中发挥重要的作用,如增强许多关键调控蛋白的稳定性^[20]、参与信号转导及生命活动并与某些疾病的发生相关等^[4]。其重要性还体现在:一种蛋白在被确定将被蛋白酶体或溶酶体/液泡降解前,可以通过去泛素化避免被不必要地或错误地降解。DUBs 功能失调可导致多种疾病,包括遗传性肿瘤和神经退行性疾病等^[4]。DUBs 可分为两大类,半胱氨酸水解酶家族和含特异性 JAMM (JAB1/MPN/Mov34 metalloenzyme) 结构域的金属蛋白酶家族。针对不同家族的 DUBs 催化中心结构进行分析,发现他们的二级结构少有相似之处,暗示不同的 DUBs 对特定底物具有特定功能。

1.6 蛋白酶体

蛋白酶体约 2000kD 大小,是一种具有多种蛋白水解酶活性、主要依赖于泛素并由几十个亚基组成的巨大复合蛋白酶,广泛分布于真核生物的胞核和胞质,负责着细胞内绝大多数蛋白质的降解,调控几乎所有的细胞活动^[5]。蛋白酶体的四级结构将蛋白质水解活性位点封闭在一个桶形的空腔中,仅通过狭窄的门控通道与外界相连,从而有效阻止正常折叠的蛋白进入降解腔^[9]。

26S 蛋白酶体由 20S 核心复合物(Core Particle, CP)和 19S 调节复合物(Regulatory Particle, RP, 也称 PA700)组成。20S 核心复合物约 700kD 大小,由 4 个同轴的,7 个亚基组成的七聚体环垒叠形成中空桶状结构。位于桶状结构外侧的两个环称 α 环,由 α 亚基组成,作为降解腔的屏障,能够防止细胞内非降解蛋白质误入降解腔;位于桶状结构内侧的两个环称 β 环,由 β 亚基组成具有苏氨酸蛋白酶活性位点。20S 核心复合物可以以游离形式存在,因而比 26S 复合物更加稳定且更容易分离。19S 调节复合物是 20S 核心复合物的最主要激活物,在降解过程中负责底物识别,降解底物去折叠,释放游离的泛素分子即去泛素化,打开 α 环上的降

解腔通道并将去折叠底物送入降解腔。19S 调节复合物至少由 17 个不同亚基组成，从结构上可分为两类，与 20S 蛋白酶体 α 环相连的基底复合物，以及位于基底复合物顶端由九个亚基组成的盖复合物。

1.7 蛋白质泛素化

泛素化过程是泛素与蛋白质底物结合的化学过程，是一个复杂的，并接受高度调控的过程，由三个级联反应组成，需要三类酶参与催化，分别为 E1、E2、E3。在 ATP 的参与下，E1 的半胱氨酸残基与泛素 C 末端的甘氨酸形成硫酯键，接着连接在 E1 的泛素被转移到 E2 活化的半胱氨酸位点上，最后在 E3 的催化下，泛素 C 末端与底物的某个位点的赖氨酸结合^[7]。

与其他蛋白质修饰方式一样，蛋白质泛素化修饰也存在着不同的类型。根据与蛋白质结合的泛素数量，泛素化分为单泛素化和多聚泛素化。单泛素化，是指单个泛素与底物共价结合，而多聚泛素化过程中，多个泛素组成多聚泛素链与蛋白组成复合物。多聚泛素链是由泛素的 C 末端的甘氨酸与相邻泛素的赖氨酸连接组成的，由于泛素存在 Lys-6, Lys-11, Lys-27, Lys-29, Lys-33, Lys-48 和 Lys-63 这 7 个赖氨酸位点，故理论上多聚泛素链应存在七种不同的连接方式^[10]。多聚泛素链的连接方式与其功能密切相关，细胞内丰度最高的多聚泛素链连接形式是 K48 连接，即泛素的 C 末端的甘氨酸与相邻泛素的 48 位的赖氨酸相连接，这一连接形式存在于泛素蛋白质降解通路。泛素的蛋白质水解通路发现最早，因而也被称为经典通路。除此之外，蛋白质泛素化还可介导非蛋白质降解途径，包括参与细胞内 DNA 修复^[11]，炎症反应应答^[12]，蛋白质转运^[13] 甚至蛋白质的合成^[14] 等。

2. 泛素-蛋白酶体介导的蛋白质降解途径

真核细胞中，通过胞吞或者胞饮作用进入细胞的细胞外蛋白质和细胞内蛋白质分别由两条不同的途径介导降解：凝血因子、免疫球蛋白、载体蛋白、激素等胞外蛋白被细胞摄入并形成内体，然后与溶酶体融合后被降解，这种蛋白质降解是非特异性的，不同蛋白质的降解速率基本保持不变；而绝大多数胞内蛋白都是通过泛素-蛋白酶体介导的蛋白质降解途径完成降解的，具有特异性、高效性以及不可逆性，并受多种调节机制严格调控^[17]。由泛素-蛋白酶体介导下降解的蛋白质的半衰期可以很长，也可以很短^[7]。目前研究发现，许多参与细胞周期、细胞程序性死亡以及感染等重要信号途径的调节蛋白，如 I κ B、抑癌蛋白 p53、促凋亡蛋白 Bax 和上皮生长因子受体 ErbB3 等^[8]。细胞内新合成但具有缺陷或者折叠错误地蛋

白质也会被蛋白酶体迅速降解，以防其在细胞内积累。

在泛素介导的蛋白质降解途径中，通过 E1、E2、E3 三种酶催化并泛素化后，靶蛋白通常会被 K48 泛素链标记，26S 蛋白酶体的 19S 调节复合体可通过 K48 泛素链识别被标记的靶蛋白，与目的蛋白结合并将其展平。之后，26S 蛋白酶体的 20S 复合体将蛋白水解为多肽，泛素 C 末端水解酶(Ub C-terminal hydrolases)可以通过水解释放 Ub 以供再一次循环利用^[2,7]。

泛素-蛋白酶体介导的蛋白质水解通路是一条高效的蛋白降解途径，能选择性降解细胞内蛋白，精确调控细胞内蛋白降解，这对于维持细胞的生理功能有重要作用，包括如细胞周期调控、转录调控和凋亡等。抗原分子泛素化后被 26S 蛋白酶体降解成多肽，被组织相容性复合体 (MHC) I 类分子提呈到细胞表面，并被细胞毒性 T 细胞 (CTL) 识别，因而还具有抗原呈递的生物学功能。

3. 泛素介导的非蛋白质降解途径

作为一种重要的翻译后修饰，泛素不仅可以介导蛋白质的降解，还直接影响蛋白质的活性和定位，参与调控转录因子活性、逆转录病毒的出芽、受体的内吞作用和溶酶体运输、胰岛素水平和 TGF- β 通路等，甚至病毒还可通过“劫持”泛素 E3 酶逃脱机体自身免疫系统。泛素化修饰调控的细胞活动主要包括细胞内 DNA 修复，炎症反应应答，蛋白质转运，甚至蛋白质的合成等。这些通路功能与泛素的蛋白质降解通路截然不同，又被称为非经典通路。

3.1 泛素 DNA 损伤耐受通路

在细胞中，DNA 会频繁地受到来自体内和体外的 DNA 损伤物质的作用，如体内代谢产生的氧自由基，环境中存在的物理、化学和生物污染物等。DNA 损伤在生命体中十分常见，会导致突变、细胞凋亡、组织死亡等严重后果。因此，机体存在一系列应对 DNA 损伤的修复机制。除了核苷酸切除修复和碱基切除修复外，细胞将会启动损伤跨越合成 (translesion synthesis, TLS) 修复，清除遗留损伤以防止正常的转录和复制受阻^[15]。泛素 DNA 损伤耐受通路就存在于这一过程当中：参与 TLS 过程的 DNA 聚合酶必须和 PCNA (proliferating cell nuclear antigen, PCNA, 细胞核增殖抗原) 结合才能发挥其作用，而 PCNA 也是该过程中泛素化的底物^[19]。

3.2 泛素 NF- κ B 激活通路

核因子 kappa 增强子结合蛋白 (nuclear factor kappa enhancer binding protein, NF-

κ B) 是细胞中重要的转录因子, 控制着细胞的免疫应答、炎性反应和凋亡等过程。泛素化调控着NF- κ B 活化过程当中的许多步骤——NF- κ B 的抑制子核因子kappaB 抑制子 (inhibitor of nuclear factor kappa B, I κ B)的降解, I κ B 激酶(IKK) 的活化等^[16], 在先天免疫和获得性免疫中都起重要作用^[21]。经典的泛素-蛋白酶通路和非经典的泛素通路都参与了NF- κ B 的活化过程。

3.3 泛素核糖体蛋白质合成通路

泛素核糖体蛋白质合成通路的作用看似与常见的泛素-蛋白酶体介导的蛋白质降解通路截然相反, 实际上仍然体现了泛素结合蛋白质并调控蛋白功能的作用。L28是这条通路中的泛素化底物, 其结构高度保守, 是酵母核糖体亚基的组成部分。80S核糖体中的L28可被泛素化共价结合K63泛素链, 高度泛素化后核糖体的蛋白质翻译活性增强。人体中的L28同源体也具有相同的特性。泛素K63 连接酶(ubiK63R) 突变体中, 核糖体不但缺乏翻译能力而且对翻译抑制剂高度敏感, 证实K63多聚泛素链对于激活核糖体的蛋白质翻译能力至关重要。L28的泛素化程度受到细胞周期的控制, 当细胞进入G1期时, L28的泛素化会受到抑制处于一个较低的水平, 而S期开始之后L28泛素化便会再度活跃起来^[14]。

2.4 泛素蛋白质转运通路

蛋白质泛素化是细胞实现信号跨膜传导和蛋白质跨膜运输的重要手段之一。泛素对蛋白转运的调节体现在两个方面: 直接调节蛋白转运的强度, 以及作为标志物引导跨膜蛋白在细胞膜内外的运动。细胞内吞途径中泛素对膜蛋白调节作用最为典型——泛素作为信号引导膜蛋白质进入小囊泡, 这是许多信号受体下调的重要步骤^[13]。比如, G蛋白耦联受体的胞质尾区被泛素修饰之后, 细胞内摄受体的强度增加, 泛素引导受体进入囊泡, 最终受体被传送至类溶酶体空泡内降解^[18]。

4 应用

泛素相关通路是调节细胞内蛋白水平活性与功能的重要机制, 涉及许多重要的生理过程和疾病及肿瘤的发病机制。对泛素在这些途径中作用的研究, 将有助于对机体相关的生理机制和疾病的认识, 将有助于新的治疗方法和新的药物作用靶点的发现^[20]。许多研究表明, 抑制26S蛋白酶体的活性, 可以选择性抑制肿瘤细胞的增殖, 甚至促进肿瘤细胞凋亡, 杀死细胞, 克服抗药性, 增强肿瘤细胞对放化疗的敏感性^[21]。Bortezomib作为26S蛋白酶体的可逆性抑制剂, 用于治疗多发性骨髓瘤并通过美国FDA认证就是一个成功的例子。相信随着研究

的深入, 我们还可以利用E3 酶对底物蛋白的识别的特异性, 阻断特定的E3 酶, 限制底物蛋白的泛素化, 实现对某些生理过程的调控, 从而达到相应的治疗目的。

参考文献:

1. Jennissen HP. Ubiquitin and the enigma of intracellular protein degradation. *Eur J Biochem*, 1995, 231(1): 1 - 30.
2. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem*, 2001, 70: 503-533.
3. Ye YH, Rape M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(11): 755 - 764.
4. Neutzner M, Neutzner A. Enzymes of ubiquitination and deubiquitination. *Essays Biochem*, 2012, 52(1): 37-50.
5. Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(3): 192-201.
6. Weissman AM. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2(3): 169-178.
7. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 2003, 426: 895-899.
8. Karin M, Ben-Neriah Y. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol*, 2000; 18 : 621-663.
9. Larsen CN, Finley D. Protein translocation in the proteasome and other proteases. *Cell*, 1997; 91(4): 431-434.
10. Pickart CM, Fushman D. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*, 2004, 8(6): 610-616.
11. Ulrich HD. Degradation or maintenance: actions of the ubiquitin system on eukaryotic chromatin. *Eukaryot Cell*, 2002, 1(1): 1210.
12. Sun L, Chen ZJ. The novel functions of ubiquitination in signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 2004, 16(2): 119-126.
13. d'Azzo A, Bongiovanni A, Nastasi T. E3 ubiquitin ligases as regulators of membrane protein trafficking and degradation. *Traffic*, 2005, 6(6): 429-441.
14. Spence J, Gali RR, Dittmar G, et al. Cell cycle-regulated modification of the ribosome by a variant multiubiquitin chain. *Cell*, 2002, 102(1): 67-76.
15. Burgers PM, Koonin EV, Bruford E, et al. Eukaryotic DNA polymerases: proposal for a revised nomenclature. *J Biol Chem*, 2001, 276(47): 43487-43490.
16. Chen ZJ. Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat Cell Biol*, 2005, 7(8): 758-765.
17. Glickman MH, Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 2002, 82(2): 373-428.
18. Tanowitz M, Von Zastrow M. Ubiquitin-independent trafficking of G protein coupled receptors to lysosomes. *J Biol Chem*, 2002, 277(52): 50219-50222.
19. Haracska L, Unk I, Johnson RE, et al. Stimulation of DNA synthesis activity of human DNA polymerase κ by PCNA. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(3): 784-791.
20. Lill JR, Wertz IE. Toward understanding ubiquitin-modifying enzymes: from pharmacological targeting to proteomics. *Trends Pharmacol Sci*, 2014, 35(4): 187-207.
21. Rodríguez JA. Interplay between nuclear transport and ubiquitin/SUMO modifications in the

甲硫氨酸亚砷还原酶 A 的研究进展

马俐 2013203010022

生物化学与分子生物学系

摘要: 氧化应激作为机体最基本的保护机制之一,是多种代谢和信号通路的启动者和调节者。然而,近年来越来越多的研究表明体内活性氧 (ROS) 产生过多或消除过少造成的高水平的氧化应激能直接或间接氧化或损伤 DNA、蛋白质、脂质,从而诱发基因突变、蛋白变性、脂质过氧化,造成器官损伤和功能衰退,是肿瘤、心脑血管疾病、神经退行性疾病、衰老等重要疾病的主要危险因子之一。[1-5]

含硫氨基酸,例如半胱氨酸 (Cys)、甲硫氨酸 (Met) 特别容易被氧化。许多例子表明 Cys 和 Met 氧化的可逆性是控制蛋白功能的复杂机制的一部分。游离氨基酸中的 Cys 和 Met 如果被氧化,会使它们的代谢过程发生改变。而其在蛋白质结合的状态下被氧化是一种常见的翻译后修饰,通常会改变蛋白质的功能。[6]众所周知,甲硫氨酸亚砷还原酶 (Msrs) 可以将甲硫氨酸亚砷 (Met-SO) 还原为 Met,从而保护 Met 不被氧化, Met 作为必需氨基酸的一种,也是翻译过程中的起始氨基酸, Met 的正常氧化还原状态对维持正常的生命活动具有重要意义。

一. 简介

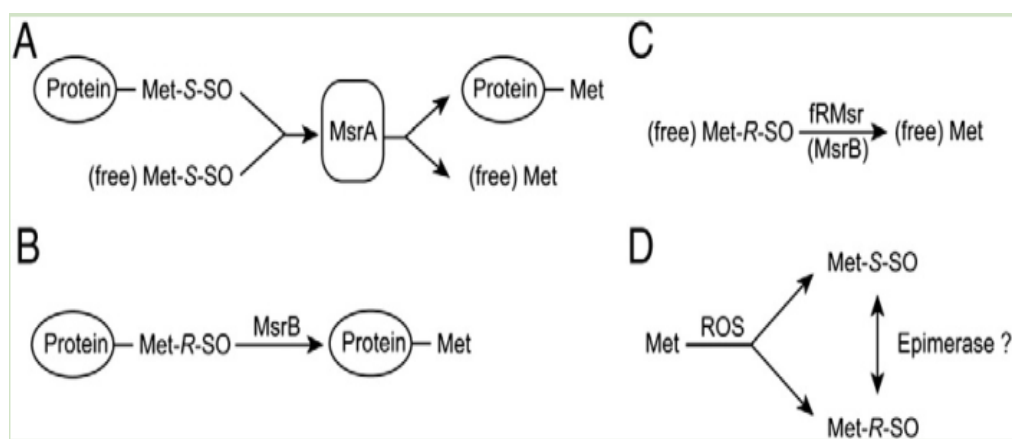
甲硫氨酸亚砷还原酶 (Msr) 系统通过参与以 Met 为中心的氧化还原循环和逆转 ROS 引起的蛋白损伤来清除 ROS, [7-10] “Msr 能还原蛋白质中的 MetSO 残基”的发现在 Met 的研究中具有里程碑的意义,这预示着 Msr 有可能参与调控细胞内功能蛋白的活性,介导机体生命信号的传输。Met 被氧化为 MetSO, MetSO

分为 R 和 S 两种构型，MetSO 在体内既可以游离形式存在也可与其他蛋白结合后存在，因此根据还原底物的不同空间构型和存在形式，将 Msrs 系统分为 MsrA、MsrB 和 fRMsr 三型。[11]

(1) MsrA 既可以还原游离的 MetSO 也可以还原蛋白质中的 MetSO，也能还原被不同基团修饰的 MetSO。[11, 12] MsrA 根据 N 端序列不同可分为 MsrA1、MsrA2、MsrA3 三种亚型，MsrA1 主要定位于细胞内的线粒体和细胞质中，细胞质中的 MsrA1 可能由线粒体的 MsrA1 分泌而来；[14] MsrA2 存在于一些不明的囊泡中，在一部分细胞的胞质中也有发现；MsrA3 则在细胞核和胞质中发挥作用。[14]

(2) MsrB 能特异性地还原蛋白质中的 MetSO，对游离型的 MetSO 还原效率要低 1000 倍。[16] MsrB 主要存在于细菌，酵母和哺乳动物中。哺乳动物的 MsrB 可以分为三类：MsrB1、MsrB2、MsrB3。MsrB1 催化活性最强，主要存在于细胞质和细胞核中；MsrB2 是一类以半胱氨酸为活性中心的还原酶，主要存在于线粒体中，其活性有酸碱依赖性，当 PH=9 时，该酶活性最强，说明半胱氨酸的去质子化是还原反应的重要步骤；[16] MsrB3 是发现的一类 MsrB 蛋白。

(3) fRMsr 是 2007 年才被发现的 Msr 新成员。fRMsr 只能特异性地还原游离的 MetSO，对蛋白质中的 MetSO 残基不发挥还原活性。基因组的比较揭示，fRMsr 只在单细胞生物中存在，41.5% 的细菌，6% 的古细菌和 44.4% 的原核生物含有 fRMsr 蛋白，在动物、植物等多细胞生物中 fRMsr 缺失，说明 fRMsr 是一种比较原始的蛋白，在生物进化过程中自然选择的结果。fRMsr 蛋白的是迄今为止发现的第一个具有酶活性的 GAF 结构域蛋白，而 GAF 家族成员能与 DNA 序列和信号级联放大蛋白特异性结合，提示 fRMsr 不仅有蛋白酶活性还可能在信号传导中也发挥作用。[17]



二. MsrA 的底物

研究发现，MsrA 的底物基本上都含有 Met 残基，且 Met 大多位于或者靠近于蛋白的活性中心。根据功能不同主要分为调节型的底物、清除型底物和损伤后被修饰的底物三大类：

(1) 调节型的底物：

细胞信号转导是重要的生物学机制和细胞调控的关键组成部分。组成信号通路的蛋白质，可以是活化的，也可以是失活状态的。这些蛋白质的活性状态往往是由它的构象和它与反应位点的亲和力决定的。细胞信号的修饰一般是共价键合和可逆的，例如 Tyr 和 Ser 的磷酸化/去磷酸化、Cys 的氧化还原调节。Met 残基的氧化还原的特点可以促进信号通路。Msrs 通常被作为一种修复酶。

这类型的底物包括：

- A. α -抗胰蛋白酶
- B. 钙调蛋白
- C. 高密度脂蛋白 (apoA I、apoA II)
- D. KB- α 抑制剂
- E. K⁺通道 (电压门控钾通道、钙激活钾通道)
- F. 血栓调节蛋白
- G. 组织型纤溶酶原激活剂 (t-PG) 等。[18]

(2) 清除型底物

在生理条件下，清除型底物被氧化后并不会使之生物学活性发生很大的改变，这些含 Met 蛋白被认为有抗氧化的作用。因此，通过 Met 循环氧化和经由的 Msr 系统还原，这些底物被认为是内源性的抗氧化剂清除剂。从理论上说，Met 残基可以有效地清除氧化剂 从这个角度来说，Met 在蛋白活化位点中扮演一个“盾牌”的角色。用其他氨基酸替换 Met 后证实了以上观点。

这类型的底物包括：

- A. 凝血级联/纤溶 [α 2-巨球蛋白、丝氨酸蛋白酶抑制剂 (α 2-抗纤溶酶原、抗凝血酶 III)]
- B. 细胞因子 (IFN- α 2b、IFN- γ 、干细胞因子)
- C. 酶 (谷氨酰胺合成酶、15-脂加氧酶)
- D. 热休克蛋白 (Hsps)
- E. 激素 (生长激素、绒毛膜生长激素)
- F. 粘液蛋白酶抑制剂

(3) 损伤后被修饰的底物 [18]

有一些底物，当它们的 Met 残基被氧化后会发生结构和功能的改变、生物活性的丧失、也可能抗蛋白降解。这些底物通常与损伤状态下的特殊疾病有关。证据表明，MetO 可能有助于这一状态的形成，MetO 在蛋白中的作用仅仅基于他们对氧化应激的敏感性。Msr 系统在保持这些底物蛋白的还原状态中发挥重要作用，包括修复含氧化的 Met 残基的蛋白，防止蛋白被不可逆的修饰并发生结构改变。在某些情况下，Met 被氧化可以作为一个调节机制或者是活性氧清除剂。然而支持蛋白质的这些作用或实际的功能的证据仍然未知。

此类底物包括：

- A. 酶类 (抗炎素-2、糜蛋白酶、过氧化氢酶、位点特异性重组酶、HIV-2、溶菌酶、胃蛋白酶、葡萄糖磷酸变位酶、核糖核酸酶 A、色氨酸酶等)
- B. 血红素蛋白 (血红蛋白、细胞色素 C、细胞色素 C 氧化酶、)
- C. 激素类 (促肾上腺皮质激素 ATCH、蛙皮素、降钙素 CT、缩胆囊素、胰高血糖素、黄体生成素 LH、甲状旁腺素 PTH、催乳素、血管活性肠肽)
- D. 与神经退行性疾病相关的蛋白
- E. 丝氨酸蛋白酶抑制剂 Serpins [维生素 K 依赖的凝血 VII 因子、卵抑制素、纤溶酶原激活抑制剂-1 (PAI-1、分泌性白细胞蛋白酶抑制剂)]
- F. 蛇毒毒素 (β -蛇环毒素、心脏毒素 VII、细胞毒素-3、锯鳞血抑肽)
- G. 其他杂蛋白底物 (肌动蛋白 Actin、Ffh、纤维连接蛋白、补体、脑啡肽、神经肽 Y 等) [18]

三. MsrA 与疾病

敲除 *msrA* 基因的小鼠表现出与神经退行性疾病相似的症状,其神经元多巴胺水平及其信号通路发生与老化相关的改变。基因 *msrA* 敲除的中年小鼠, *beta*-淀粉样沉积、*tau* 蛋白磷酸化在海马区显著增加; *synaptophysin* 表达减少; 来自 *msrA* 基因敲除小鼠的脑片对过氧化氢更加敏感,也更易出现白内障[19]。在晶状体细胞 *MsrA* 的表达,可增加细胞对氧化应力的抵抗,提高细胞活力[20]。心肌细胞高表达 *MsrA*,可减少缺氧 / 再灌注诱发的细胞死亡[21]。高表达 *MsrA* 也可改善帕金森氏病类似的年龄依赖性攀爬反应的衰退[22]

MsrA 抑制呼吸链复合体 I 抑制剂 rotenone 或突变型同型核蛋白 (α -synuclein) 所引发的多巴胺神经元的死亡及蛋白缠结,但是对蛋白水解小体抑制剂 MG132 所引发的这些反应没有影响。与小分子抗氧化剂 *N*-乙酰半胱氨酸和维生素 E 相比, *MsrA* 主要通过修复甲硫氨酸亚砷而不是通过淬灭活性氧而发挥作用; *MsrA* 可有效降低重组 *alpha*-synuclein 蛋白中氧化 Met 的含量; 说明增强 *MsrA* 活性是治疗帕金森氏病的一个可行方案[23] 在人成纤维细胞 WI-38 SV40 过表达 *MsrA* 可增加 *Msr* 酶活,增强细胞对过氧化氢的抵抗力,降低活性氧水平,并降低过氧化氢诱导凋亡关键蛋白 p21 的表达,降低过氧化氢处理导致的蛋白质氧化损伤。[24] *MsrA* 在对数生长期的野油菜黄单孢菌印度麻致病变种 (*Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*) 中表达量低,但是在静息细胞表达量高;通过对 *msrA* 突变株、*msrA* 高表达株和野生型黄单孢菌的比较,发现 *MsrA* 在静止期黄单孢菌细胞中可保护细胞免受氧化应力而导致的死亡[25]

沉默 *msrA* 基因增加视网膜色素上皮 (RPE) 细胞对过氧化氢所引发细胞死亡的易感性,也导致 caspase 3 活性的增加。[26] 沉默大肠杆菌 *msrA* 基因可抑制细菌在含过氧化氢的固体培养基中的生长,转染 *msrA* 基因后生长抑制被逆转[27]。在含过氧化氢的培养基中,与野生型相比, *msrA* 基因突变株生长延迟 2~5 小时,甲硫氨酸氧化增加 2~7 倍[28]。在果蝇神经系统超表达 *msrA* 基因可显著增加果蝇寿命;超表达 *MsrA* 果蝇对百草枯 (paraquat) 诱导的氧化应激抵抗力增加,各种体征 (包括生殖能力) 出现老化的时间延迟,说明 *msrA* 是果蝇甚至其他生物决定其寿命长短的重要因素。基因 *msrA* 敲除小鼠各种组织中蛋白羧基含量增加,小鼠寿命缩短 10%,而且在 6 月龄时出现脚尖走路表型,但是在野生型小鼠没有这种表型。在 PC12 细胞,腺病毒所介导的 *bmsrA* 基因超表达后,缺氧 / 复氧所产生的活性氧降低;抑制了缺氧 / 复氧所引发的线粒体内膜电位去极化和细胞死亡,说明 *msrA* 可成为心脏和大脑缺血性疾病的治疗靶点。酵母中高表达 *msrA*,可使酵母寿命延长 26%,而将 *msrA* 敲除使其缩短 25%。[29]

白癜风是一种常见的、以皮损处色素脱失为特点的慢性疾病,其发病机制尚不完全清楚。以往的研究发现其与遗传、自身免疫等有关,近年来氧化应激成为白癜风研究领域的一大热点。正常情况下,皮肤 ROS 的产生与清除处于动态平衡之中,而白癜风中这一平衡被打破。已证实多个外源性因素及多条内源性通路的紊乱导致了 ROS 的持续异常产生。在进展期白癜风患者表皮可检测到浓度范围为 10^{-3} M 的 H_2O_2 蓄积,远远高于生理浓度 10^{-7} M - 10^{-6} M。ROS 的作用靶之一是蛋白质中的氨基酸残基。其中含活性硫侧链的甲硫氨酸对氧化损伤尤为敏感,被氧化为甲硫氨酸硫氧化物。而甲硫氨酸硫氧化物还原酶 (Methionine sulfoxide reductases, MSR) 能逆转这一过程,参与甲硫氨酸的再生。大量表达 MSR 可保护处于氧化应激状态下的多种细胞,提示其对白癜风具有预防、治疗潜能。[30]

在全球范围内,胃癌发病率在男性恶性肿瘤中居于第二位,在女性恶性肿瘤

中居第四位。目前胃癌的确切病因和发病机制尚不十分明确。人 MsrA 基因定位在人染色体 8p22~p23 区带。研究表明,在乳腺癌、肺癌、肝癌、胃癌、大肠癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞中存在高频率的 8p 杂合性丢失,丢失主要发生在两个区,即 8p22~p23.2 和 8p12~p21。据此推测 MsrA 可能具有抑癌作用。MsrA 在胃癌的表达以及两者之间的关系,尚未见报道。有人报道:在胃癌组织及正常胃组织中有 MsrA 表达,胃癌组织中,MsrA 的表达水平有下调。

也有研究表明在整体动物水平上,MsrA 缺失可致心脏收缩功能下降。在细胞水平上,MsrA 缺失可致心肌细胞肌节收缩功能下降、胞浆 Ca^{2+} 浓度出现异常、对氧化应激的敏感性增高。MsrA^{-/-}鼠心肌细胞线粒体蛋白氧化水平增高。Taurine 可通过抗氧化作用和调节心肌细胞肌节收缩功能和胞浆 Ca^{2+} 浓度对抗 MsrA 缺失引起的心脏损伤。Taurine 使 MsrA^{-/-}鼠心肌细胞收缩功能更接近于 WT 鼠、整体心脏功能指标与 WT 鼠无显著差异。同时 Taurine 具有抗心肌衰老和抗高频物理刺激的作用。心肌细胞线粒体是对氧化应激最敏感的细胞器,在氧化应激时首先受累。Taurine 能降低心肌细胞胞浆和线粒体蛋白氧化水平,达到抗氧化及对抗氧化应激产生损害从而保护心肌的目的。[32] 数据表明,与同龄野生对照组小鼠比较,8 月龄的 MsrA 基因敲除小鼠显示了其心脏机能障碍逐渐加重,且心脏的射血分数 (EF) 和缩短分数 (FS) 显著降低。[31]

四、结论和展望

近年来,有关甲硫氨酸亚砷还原酶的研究工作揭示,甲硫氨酸亚砷还原酶广泛存在于多种生物,分布于机体的各种组织和细胞,在胞浆、线粒体、胞核都有表达。有关甲硫氨酸亚砷还原酶的结构及催化机制,已逐渐明晰。甲硫氨酸亚砷还原酶在抗衰老和抗氧化中发挥作用,或可减缓神经退行性疾病的发生和发展。从目前的研究来看,蛋白质分子表面或结合界面的甲硫氨酸残基易被氧化。活性氧可通过直接氧化重要信号蛋白表面暴露的甲硫氨酸残基,导致信号蛋白分子的抑制或激活。而这种变化可在亚细胞局部,通过甲硫氨酸亚砷还原酶所催化的还原作用被逆转。是否完全逆转,决定了甲硫氨酸残基氧化所触发的细胞或生命过程是否可逆。当某种蛋白的甲硫氨酸残基被氧化后,因为局部甲硫氨酸亚砷还原酶活性不足,蛋白活性变化成为不可逆过程时,可重点突显该蛋白分子的细胞生理作用。这在一定程度上避免了繁琐的、可被潜在补偿的基因操作过程。亚细胞局限性活性氧的发生,甚至特定蛋白质分子局限性活性氧的发生,可望用于该亚细胞器或该蛋白生理活性的鉴定,将在今后的研究工作中受到更多的重视。调节甲硫氨酸亚砷还原酶基因的表达或蛋白活性,可望成为新的治疗学靶点。[31]

参考文献:

1. Iliopoulos M, Pateras IS, Evangelou K, Gorgoulis VG. The tumor suppressor gene Arf as a sensor of oxidative stress. *Curr Mol Med.* 2012;12:704-715
2. Oxidative stress in developmental brain disorders. *Adv Exp Med.* 2012;724:278-290
3. Yang H, Jin X, Kei Lam CW, Yan SK. Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49:1773-1782
4. Lee R, Margaritis M, Channon KM, Antoniades C. Evaluating oxidative

- stress in human cardiovascular disease: Methodological aspects and diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med Biol.* 2012;19:2504-2520
5. Rodrio R, Gongelez J, Paoletto F. The role of oxidative stress in the pathophysiology of hypertension. *Hypertens Res.* 2011;34:431-440
 6. Drazic A, Winter J. The physiological role of reversible methionine oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2014.
 7. Luo S, Levine RL. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J* 2009;23:464 - 72.
 8. Weissbach H, Resnick L, Brot N. Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta* 2005;1703:203 - 12.
 9. Grimaud R, Ezraty B, Mitchell JK, Lafitte D, Briand C, Derrick PJ, et al. Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase *J Biol Chem* 2001;276:48915 - 20.
 11. Rahman MA, Nelson H, Weissbach H, Brot N. Cloning, sequencing, and expression of the *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene. *J Biol Chem.* 1992;267:15549-15551.
 12. Lee BC, Gladyshev VN. The biological significance of methionine sulfoxide stereochemistry. *Free Radic Biol Med.* 2011;50:221-227.
 13. Moskovitz J, Poston JM, Berlett BS, Nosworthy NJ, Szecepanowski R, Stadtman ER. Identification and characterization of a putative active site for peptide methionine sulfoxide reductase and its substrate stereospecificity. *J Biol Chem.* 2000;275:14167-14172
 14. Soltys BJ, Gupta RS. Mitochondrial-matrix proteins at unexpected locations: Are they exported? *Trends Biochem Sci.* 1999;24:174-177.
 15. Lee JW, Gordiyenko NV, Marchetti M. Gene structure, localization and role in oxidative stress of methionine sulfoxide reductase a (mrs) in the monkey retina. *Exp Eye Res.* 2006;82:816-827.
 16. Grimaud R, Ezraty B, Mitchell JK, Lafitte D, Briand C. Repair of oxidized proteins. Identification of a new methionine sulfoxide reductase. *J Biol Chem.* 2001;276:48915-48920.
 17. Aachmann FL, Kwak GH, del Conte R, Kim HY, Gladyshev VN, Dikiy A. Structural and biochemical analysis of mammalian methionine sulfoxide reductase b2. *Proteins.* 2011; 79:3123-3131
 18. Lin Z, Johnson LC, Weissbach H, Brot N, Lively MO, Lowther WT. Free methionine- γ -sulfoxide reductase from *Escherichia coli* reveals a new gap domain function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:9597-9602.
 19. Oien DB, Moskovitz J. Substrates of the Methionine Sulfoxide Reductase System and Their Physiological Relevance. 2007; 80: 93-133.

20. Brennan LA, Lee W, Cowell T, Giblin F, Kantorow M. Deletion of mouse MsrA results in hyperbaric oxygen-induced cataract: MsrA repairs Mitochondrial cytochrome C. *Mol Vis*, 2009, 15: 985~999
21. Kantorow M, Hawse JR, Cowell TL, Benhamed S, Pizarro GO, Reddy VN, Hejtmancik JF. Methionine sulfoxide reductase A is important for lens cell viability
22. Prentice HM, Moench IA, Rickaway ZT, Dougherty CJ, Webster KA, Weissbach H. MsrA protects cardiac myocytes against hypoxia/reoxygenation induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 366: 775~778
23. Wassef R, Haenold R, Hansel A, Brot N, Heinemann SH, Hoshi T. Methionine sulfoxide reductase A and a dietary supplement S-methyl-L-cysteine prevent Parkinson's-like symptoms. *J Neurosci*, 2007, 27: 12808~12816
24. Liu F, Hindupur J, Nguyen JL, Ruf KJ, Zhu J, Schieler JL, Bonham CC, Wood KV, Davisson VJ, Rochet JC. Methionine sulfoxide reductase A protects dopaminergic cells from Parkinson's disease-related insults. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45: 242~255
25. Picot CR, Petropoulos I, Perichon M, Moreau M, Nizard C, Friguet B. Overexpression of MsrA protects WI-38 SV40 human fibroblasts against H2O2-mediated oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 2005, 39: 1332~1341
26. Vattanaviboon P, Seeanukun C, Whangsuk W, Utamapongchai S, Mongkolsuk S. Important role for methionine sulfoxide reductase in the oxidative stress response of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *J Bacteriol*, 2005, 187: 5831-5836
27. Sreekumar PG, Kannan R, Yaung J, Spee CK, Ryan SJ, Hinton DR. Protection from oxidative stress by methionine sulfoxide reductases in RPE cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334: 245~253
28. Moskovitz J, Rahman MA, Strassman J, Yancey SO, Kushner SR, Brot N, Weissbach H. *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: Regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J Bacteriol*, 1995, 177: 502~507
29. Moskovitz J, Berlett BS, Poston JM, Stadtman ER. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 9585-9589
30. <甲硫氨酸硫氧化物还原酶 A 对氧化应激状态下黑素细胞活性的影响-周舟. PDF>
31. <MsrA 缺失对心脏功能的影响及 Taurine 对心脏保护作用的机理-陈国. PDF>

骨关节炎的病理特征及与脂蛋白代谢的关系

谢光辉 生化 2013203010016

摘要

骨关节炎 (osteOArthritis, OA), 又名骨关节病、退行性关节病、老年性关节炎等, 是一种常见的风湿性疾病、慢性关节疾病, 在人中好发在负重较大的膝关节、髋关节、脊柱及手指关节等部位, 给人的正常生活带来极大的不便和痛苦, 严重降低了患者的生活质量。近些年来的大量研究表明, 骨关节炎发生发展的过程中涉及到体内很多物质的代谢改变, 如脂质代谢异常、各种相关酶的量与质的改变等, 提示我们骨关节炎可能是一种代谢性疾病, 这些研究有希望进一步在分子机制上对骨关节炎的发生发展作出详细阐明, 给骨关节炎的预防和治疗带来革命性的改变。

1. 骨关节炎的病理改变

1.1 骨关节的基本构造

骨关节是由相邻的若干骨之间借以结缔组织构成的囊相连。骨面相接触处有腔隙相隔, 腔隙内含有少量滑液, 关节可活动的幅度相差较大, 辅助结构也有所差异, 但每个关节基本都有关节面、关节囊、关节腔。有的关节还有韧带、关节盘和半月板等辅助结构。

1.2 骨关节炎的病理特征

骨关节炎的病理学改变包括两个方面: 一是炎症对关节的损害, 二是关节对损害的反应。虽然在外观上, 关节软骨的负重区域骨关节炎病理改变较为明显, 但骨关节炎不是软骨单一组织的病变, 而是整个器官、滑膜关节的病变。其病变常累及滑膜、关节囊、韧带、感觉神经末梢、关节周围肌肉、软骨下骨以及关节软骨。骨关节炎的病理学特点有以下几点: 1) 关节软骨软化、原纤维形成, 最终关节软骨丧失 (早期时软骨较正常增厚); 2) 裸露骨的骨质象牙化; 3) 骨赘形成; 4) 软骨下骨囊肿; 5) 滑膜炎; 6) 关节囊增厚; 7) 半月板退变; 8) 关节周围肌肉萎缩。

1.2.1 关节软骨的病理变化

早期的骨关节炎中, 关节软骨不薄, 反而较正常增厚^[1]。关节软骨的水分含量增加, 反映了关节软骨中的胶原网的损害, 由此可导致关节软骨肿胀, 同时伴

有蛋白多糖的合成增加。蛋白多糖是一种基质大分子，对维持关节软骨的弹性有重要作用，使关节软骨有抗压缩性能。基质中的蛋白多糖合成增加，显示软骨细胞的修复作用，同时也可以导致组织中总的蛋白多糖含量增加。有研究表明，骨关节炎软骨 I 型和 II 型胶原的分布，发现骨关节软骨基质中 II 型胶原和蛋白聚糖的破坏增强与软骨细胞对其合成增强同时存在。软骨修复的过程中，部分软骨细胞发生去分化而表达 I 型胶原。在骨关节炎持续很长时间的早期阶段，以关节软骨的肥大修复为特点。随着骨关节炎病变的发展，关节表面变薄，蛋白多糖含量下降，导致关节软骨的软化。关节软骨的完整性丧失，形成垂直的关节软骨的裂隙。随着关节的活动，原纤维化的关节软骨逐渐磨损，暴露了关节软骨下方的软骨下骨。尽管有些部位为纤维关节软骨所修复，但其弹性和抗压力等机械力学性能均较原来的透明关节软骨差。正常成人关节软骨的软骨细胞一般不能再进行细胞分裂、复制及克隆。所以，最终结果使剩余的关节软骨中所含有的软骨细胞数量减少。

1.2.2 关节滑膜的病理变化

骨关节炎软组织的改变中有一种不完全性的慢性滑膜炎，其病理改变包括内衬细胞的增生、淋巴细胞的浸润及血管周围的淋巴细胞聚集，在关节腔内还可以形成显著的绒毛，形如类风湿性关节炎。然而，与类风湿性关节炎相反，骨关节炎滑膜内衬细胞不侵蚀关节边缘的软骨，也很少在关节软骨表面出现血管翳浸润。从关节表面脱落的关节软骨碎片和坏死的骨质被滑膜包裹，随后被巨噬细胞和炎细胞浸润。在骨关节炎初期，关节软骨局部区域发生软化，其表面呈卵石花纹状纹理，继而发生软骨破裂；当破裂与软骨表面呈切线时，称为剥脱。当破裂垂直于表面并向下延伸至软骨下骨上方，便称为原纤维变性。随着关节的运动，原纤维变性的软骨被磨损，露出下面的骨皮质层。

1.2.3 关节滑液的病理变化

发生病变的关节有时伴发滑膜炎，可出现滑液量增多。该病滑液澄清透明，淡黄色，偶见浑浊和血性渗出，黏稠度可降低，但粘蛋白凝固性好，透明质酸浓度正常，蛋白可中度升高，LDH 升高。白细胞轻至中度升高，以淋巴细胞升高为主。此外，还可发现软骨和骨碎片。关节液中无机磷酸盐浓度增设，其浓度与本病的放射线表现严重程度相关。有研究发现，关节液中的炎性因子如胶原酶、前列腺素和白介素-1 等水平可升高。

2. 与骨关节炎有关的分子信号通路

2.1 Wnt/ β -连环蛋白信号通路

大量研究表明Wnt/ β -连环蛋白信号通路^[2]与骨关节炎的这些病理变化有着密切的联系,同时Wnt/ β -连环蛋白信号通路也是维持关节软骨稳定的关键因素。 β -连环蛋白(β -catenin)是经典Wnt信号通路的枢纽分子,它分布于细胞膜、细胞质和细胞核中^[3]。 β -连环蛋白是一条多肽链,氨基一端约长130个氨基酸,含有多个GSK-3 β 和酪氨酸蛋白激酶PTK的磷酸化位点,结合位点部分是形成细胞内稳定复合物的基础,而羧基端约含100个氨基酸,具有活化相应的Wnt靶基因转录的功能^[4]。经典Wnt/ β -连环蛋白信号通路成员除了启动因子Wnt蛋白和起枢纽作用的 β -连环蛋白外,其他组分是低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6、卷曲蛋白、轴蛋白、糖原合成酶激酶3、散乱蛋白(Dvl, Dsh)及LEF/TCF因子等

Wnt蛋白是Wnt/ β -连环蛋白信号通路的启动因子。当缺少Wnt蛋白启动因子刺激时, β -连环蛋白与Axin, APC, GSK3等形成复合体,此时 β -连环蛋白被CK1和GSK3磷酸化,细胞质中游离状态的 β -连环蛋白减少,从而细胞核中的Wnt靶基因转录被抑制^[5]。当存在Wnt蛋白启动因子信号传入细胞时,Wnt蛋白与卷曲蛋白Fz的胞外区结合,继而募集并活化散乱蛋白(Dvl, Dsh),引发轴蛋白、GSK3、APC及 β -连环蛋白复合体瓦解。复合体瓦解后, β -连环蛋白与CK和GSK3之间的磷酸化消失,因而 β -连环蛋白在细胞质中聚集增多,随后依靠浓度梯度变化,进入细胞核与T细胞因子/淋巴增强因子等转录因子结合,引起Wnt靶基因的表达,影响相关细胞的增值分化,调控细胞凋亡和代谢。

国内外学者在研究软骨发育、软骨遗传和关节疾病的模型时报道,Wnt/ β -连环蛋白信号通路与关节软骨发育、软骨细胞分化成熟及凋亡有重要联系^[6]。Wnt/ β -连环蛋白信号通路与骨关节炎相关关系的研究多集中于骨关节炎滑膜方面。Nakamura等^[7]采用实时PCR分析技术研究发现,在骨关节炎的滑膜组织中存在大量Wnt7b上调,进一步利用原位混合法和免疫组化法同样发现在膝关节骨关节炎样本中Wnt7b存在于关节软骨和滑膜中。Nicholas等^[8]在研究中发现骨关节炎关节软骨中也有大量的 β -连环蛋白和COX-2聚集,并且指出 β -连环蛋白的水平升高,可能促进了COX-2的表达,继而影响下游OPG/RANKL/RANK等信号通路。此外,在未受损伤的软骨中没有检测到Wnt-16和 β -连环蛋白的表达水平升高,但在同一关节内的中到重度骨关节炎损伤软骨中,Wnt-16和 β -

连环蛋白都显著升高，而且在退变的软骨细胞内亦可观察到 β 一连环蛋白增多。上述研究表明，在骨关节炎关节中，滑膜组织的Wnt 家族蛋白增多，可能通过信号通路，引起 β 一连环蛋白相应的改变，继而影响目的基因转录水平，引发下游某些因子变化，比如基质金属蛋白酶MMPs 增高，RANKL/OPG 比值上升，最终影响软骨细胞代谢。

2.2 Zinc-ZIP8-MTF1 轴

骨关节炎相关组织的损伤是由参与调控及响应软骨细胞内锌离子水平的一条分子信号通路所引起。一种叫做ZIP8的蛋白作为锌离子的转运子在细胞内部传递锌离子，从而引发一连串分子事件导致了小鼠软骨组织遭受破坏^[9]。当骨关节炎中软骨发生破坏时，骨与骨之间相互摩擦，会导致一系列的组织破坏等病理变化，这种组织破坏是由基质降解酶的蛋白所引起，它们由软骨细胞生成，是导致细胞外基质降解的重要酶。研究人员推论，软骨细胞中的锌离子水平有可能在骨关节炎中起作用。

研究人员检测了来自骨关节炎患者以及骨关节炎小鼠模型的软骨。发现ZIP8蛋白呈异常高水平，ZIP8嵌入在软骨细胞的质膜中，帮助细胞外的锌离子转运到这些细胞中。通过ZIP8锌离子涌入细胞激活了一种叫做MTF1的蛋白，MTF1转而提高了软骨细胞中的基质降解酶水平。通过小鼠遗传试验，研究人员证实这一Zinc-ZIP8-MTF1信号通路在造成骨关节炎相关软骨破坏中起关键作用。

ZIP8传导的 Zn^{2+} 内流上调了软骨细胞中的基质降解酶(MMP3、MMP9、MMP12、MMP13和ADAMTS5)的表达。在小鼠软骨组织中的ZIP8异常表达引起了OA软骨破坏。同时ZIP8 敲除会抑制外科手术OA的病理进程，并有 Zn^{2+} 内流、基质降解酶的伴随调节。进一步的研究揭示，在介导 Zn^{2+} \ZIP8源性分解代谢因子表达中，MTF1是一个重要的转录因子，并且对小鼠进行Mtf1基因修饰后改变了其的OA病理进程。从而进一步证实了ZIP8介导的 Zn^{2+} 内流通过加强MTF1转录活性来上调基质降解酶表达。

2.3 P38丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路

p38丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路属于丝裂原活化蛋白激酶家族中的应活化蛋白激酶，是细胞外信号引起细胞核内反应的通道之一，最近研究表明其在骨关节炎的发病中也起着重要的作用^[10]。骨关节炎时表达增加的基质金属蛋白酶，尤其是其中的基质金属蛋白酶13，是软骨II型胶原的主要降解酶，而研究表

明p38丝裂原活化蛋白激酶信号转导途径参与了这一过程^[11]。p38 丝裂原活化蛋白激酶只有在苏氨酸(Thr1 80)和酪氨酸(Tyr 182)双位点同时被磷酸化时才具有全部活性。这两个邻近的位点之间被一氨基酸分开，形成“Thr-Xaa-Tyr”三肽基结构。它是决定激酶活性的关键结构，其长度影响p38 丝裂原活化蛋白激酶底物特异性，并在控制其自主磷酸化上起重要作用^[12]。

关节软骨细胞表型主要与其产生的II型胶原和蛋白聚糖有关。近年来多数实验认为，多种细胞因子、细胞外基质可以通过细胞表面的整合素，而一氧化氮则是直接进入细胞质内，激活p38 来促进关节软骨II型胶原和蛋白聚糖的合成，也就是保持透明软骨的表型。而Robbins 等^[13]发现p38 的激活可以阻断COL2A1 mRNA的表达，从而阻断II型胶原的合成。X型胶原在骨关节病中可作为软骨细胞表型不可逆转的标志，是大量关节软骨细胞发生凋亡，最终导致关节软骨变薄，关节软骨下骨板变硬、增厚的主要原因。转化生长因子 β 、白细胞介素8 和生长相关性癌基因 α 通过激活p38 来诱导X型胶原的表达。软骨细胞凋亡可能是骨性关节炎形成的重要原因，p38 信号通路是关节软骨细胞凋亡的上游信号通路之一，一氧化氮、白细胞介素 1β 均可以通过p38 来诱导软骨细胞的凋亡。

基质金属蛋白酶是一系列破坏细胞外基质的蛋白水解酶，其中基质金属蛋白酶1和基质金属蛋白酶13通过降解蛋白聚糖和II型胶原，在软骨不可逆破坏中起关键的作用。骨关节炎的发病机制涉及基质金属蛋白酶，并且已经证实p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路在调控软骨细胞分泌基质金属蛋白酶中起作用。骨关节炎发病过程中产生的软骨基质碎片，如纤连蛋白和胶原蛋白会刺激软骨细胞分泌基质金属蛋白酶，这一过程需要p38 丝裂原活化蛋白激酶参与。研究表明，p38 被炎症因子激活后通过调节激活蛋白1 转录因子调节基质金属蛋白酶的表达，从而造成关节软骨损伤^[14]

3. 与骨关节炎有关的酶类及细胞因子

3.1 基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs)

在与骨关节炎有关的酶类中，最重要的当属基质金属蛋白酶MMPs，虽然OA的病因非常复杂，发病机制至今未阐明，但普遍认为，多种MMPs对关节软骨细胞外基质有降解作用，使关节软骨肿胀，抗外力作用下降，最终导致关节软骨进行性破坏。关节软骨细胞外基质主要成分为II型胶原，其次为蛋白聚糖。MMP-1、MMP-8、MMP-13、MMP-10、MMP-7等可使II型胶原变性裂解，继而被MMP-2和MMP-9进一步

降解。近年报告, OA滑膜和软骨细胞都有高表达的MMP-1和MMP-3, 而TIMP增加甚少, 呈现MMPs/TIMPs的失平衡, 从而导致软骨降解增加, 以及软骨破坏的严重程度与MMPs/TIMPs的失衡之比呈正相关。由于MMP-3对蛋白聚糖有高度的裂解活性, 因此, 它在OA发病中的作用尤为重要^[15]。基质溶解素在PH5.5的环境下能自发性活化, 并对TIMPs的抑制作用敏感性下降, 从而加强对蛋白聚糖的降解。MMP-7在人OA能作用于蛋白聚糖酶的裂解位点, 对蛋白聚糖进行降解, 它在膝OA关节软骨中有高表达。提示MMP-7和MMP-8可能在OA发病中起关键作用。

3.2与骨关节炎有关的细胞因子

3.2.1骨关节炎滑膜组织中缺氧诱导因子- α 、血管内皮生长因子的表达^[16]

HIF-1 α 、VEGF在骨关节滑膜组织中表达明显高于急性创伤性滑膜炎组, 它们在滑膜炎滑膜组织中表达具有相关性, 共同促进骨关节炎发病。在实验中, 取骨关节炎患者滑膜、急性半月板或交叉韧带损伤患者滑膜、正常人滑膜组织共60例, 应用免疫组织化学技术进行HIF-1 α 、VEGF染色, 分析它们在3组病例中的表达差异及相关关系。结果HIF-1 α 及VEGF在正常人滑膜中几乎未见阳性表达, 急性创伤性滑膜炎组表达率分别为60%、48%, 骨关节炎组表达率分别为86.7%、80%, 骨关节炎组表达较急性创伤性滑膜炎组为高, 差异具有显著性($P < 0.05$), HIF-1 α 与VEGF在急性创伤性滑膜炎、骨关节炎组均成正相关, 相关系数分别为0.666、0.678。

3.2.2 IL-1 β 和TIMP-1

近年来一些研究表明, 金属蛋白酶及其抑制剂和细胞因子在关节软骨降解中的作用, 在骨关节炎发病机制中尤为重要^[17]。在正常情况下, IL-1 β 、TIMP-1相对平衡对维持软骨细胞正常功能十分重要, 如果失去相对平衡则发生相应病理改变。骨关节炎患者关节滑膜组织中和正常关节滑膜组织中均存在IL-1 β 和TIMP-1, 但骨关节炎患者滑膜组织液中IL-1 β 和TIMP-1水平明显增高($P < 0.01$)。另外, 骨关节炎患者中关节液中此二者的水平也较正常者高。

现代生物学研究表明, 细胞因子, 生长因子, 免疫因素等都与骨关节炎的发病有关。在骨关节炎的软骨内存在TIMP的数量与金属蛋白分解酶活性之间不平衡, 与抑制素不足有关。IL-1 β 增加蛋白酶的合成, 如金属蛋白分解酶和胞浆素原激活剂。关节滑膜细胞分泌的细胞因子可部分解释骨关节炎的病理过程。滑液中的炎性成分, 如IL-1、淋巴刺激因子等均能刺激软骨基质中蛋白分解酶的活性增高。

IL-1还可调控软骨细胞的基因表达,使蛋白酶合成上升,其抑制物合成降低从而导致关节软骨崩解。在骨关节炎患者的软骨细胞、关节滑液及滑膜组织均能检出较高水平的IL-1 β ^[18]。已经有证据表明,IL-1 β 在软骨细胞的降解、退变过程中起到最重要的分解作用。IL-1 β 是一种有效的基质金属蛋白酶诱导剂,能促使基质金属蛋白酶产生,而基质金属蛋白酶对基质的溶解作用明显。TIMP为基质金属蛋白酶的特异性抑制因子,能抑制其生物活性的发挥。有研究发现滑膜关节腔内注射IL-1可引发蛋白多糖的降解和软骨细胞的破坏,可抑制软骨细胞合成具有透明软骨特性的蛋白聚糖和II型胶原,从而使软骨细胞变性,引起软骨缺损和软骨的生物力学改变。^[19]

3.2.3 HIF-1 α 和血管内皮生长因子VEGF

有研究表明,骨关节炎的HIF表达较急性关节炎组高,且表达强度更大,我们认为HIF在继发性骨关节炎的形成过程中可能参与了某种关键调节作用,它主要通过VEGF促进血管增生侵蚀关节软骨,这与Murata等^[20]的研究相一致,他们通过测量关节腔氧张力及VEGF表达。得出骨关节腔的氧张力较急性创伤性关节炎为低,在缺氧与机械应力的作用下,VEGF表达的量更高。我们认为急性创伤性病变后,关节腔的滑膜细胞大量增殖,滑液量增加,压迫滑膜毛细血管致其血流减慢,致关节腔为缺氧环境,促使HIF-1 α mRNA表达增高,从而导致VEGF等因子表达增高,导致关节软骨的破坏,促使骨关节炎的形成。

3.2.4 基质细胞衍生因子1(stromal cell-derived factor 1, SDF-1)

SDF-1又称趋化因子,是小分子细胞因子,属于趋化因子蛋白家族。SDF-1的受体是CXCR4。经免疫组织化学检测表明骨关节炎患者的关节软骨表层及深层皆有CXCR4存在。SDF-1若与软骨细胞表面的CXCR4受体结合,就能激活细胞外信号调节酶及相关激酶(p38 MAP kinase)的信号通路。实验通过加入滑膜组织中的SDF-1证实SDF-1可激活SDF-1/CXCR4信号通路,从而诱导软骨细胞释放MMP-3、MMP-9、MMP-13,这些因子皆能诱导关节软骨破坏及II型胶原降解。通过实验可以看出外源性SDF-1并没有明显使骨性关节炎患者产生新的SDF-1,也进一步证实了SDF-1是通过与软骨细胞表面的CXCR4受体结合而激活SDF-1/CXCR4信号通路,从而诱导软骨细胞释放MMP-3、MMP-9及MMP-13,这些因子皆能诱导关节软骨破坏。因此阻断SDF-1/CXCR4信号通路,减少MMPs释放,进而抑制II型胶原降解,有望对骨性关节炎进行靶向治疗。

4. 骨关节炎与脂质代谢

OA 是由于机械和生物性因素共同作用所导致的关节软骨细胞、细胞外基质、软骨下骨合成和降解动态失衡所致的全关节疾病。机械应力和生物性因素在OA的发生和发展过程中起重要的作用，而其他各种原因最终也都是通过影响这两个关键性因素而起作用。Blagojevic等^[21]在1个综合了36篇文献的Meta分析中发现所有的研究都显示肥胖及超重是膝关节OA的危险因素。肥胖所导致的关节软骨及软骨下骨负重增加，与各种原因导致的关节受力异常（如韧带断裂、半月板损伤等），直接改变了关节软骨所受的应力，最终导致了OA的发生，目前已被认为是OA发病的重要因素。实验中，通过切断内侧半月板及内侧副韧带，造成关节不稳及局部的受力异常，从而最终导致OA发生，该模型模拟了肥胖造成关节局部的受力异常导致OA。最近还有研究指出，肥胖除了关节应力改变导致OA的发生，还可能与脂肪代谢密切相关。最近有研究表明，OA患者血清的高密度脂蛋白与健康人相比明显下降，提示了脂蛋白代谢可能在OA致病机制中起了重要作用。

在OA的致病机制中，关节软骨下骨起了重要的作用，软骨下骨的基本功能为吸收应力、缓冲震荡和维持关节的形状。在OA病例中，软骨下骨常出现硬化、囊性化、无菌性坏死等改变。有研究表明，软骨下骨代谢改变可引发关节软骨破坏及进行性恶化。实验发现骨关节炎模型软骨下骨一系列与脂蛋白相关的基因表达改变，这些新发现的脂蛋白相关基因改变，除了低密度脂蛋白相关蛋白1(Lrp1)在术后1周下调，其他均上调（包括基因Apoc2、Apol3、Gpihbp1、Lpl、Tfpi、Vldlr）。然而，到术后2、4周，一系列基因（包括Apoa5、Apol3、Lrp1、Lrp5、Lrpap1、RGD1309808表达均下调。这些基因表达随骨关节炎疾病进程发展，呈现了一定的变化规律：在骨关节炎极早期阶段上调，较晚期下调。这个实验结果提示了软骨下脂蛋白相关基因表达改变可能导致软骨下骨内环境变化，进而影响与软骨下骨紧密相邻的软骨细胞代谢，最终引起骨关节炎的发生。载脂蛋白是血浆脂蛋白的重要组成部分，在脂蛋白的代谢中起到促进脂类的运输、调节酶活性以及引导血浆脂蛋白与细胞表面受体结合等重要作用。最近已有学者开始研究脂代谢与骨关节炎之间的联系。通过前瞻性研究中老年人群血总胆固醇、甘油三脂与骨髓损伤的关系，发现骨髓损伤与血总胆固醇、甘油三脂升高明显相关，提示了脂代谢异常可能是OA骨髓改变的重要因素，研究同时指出降血脂治疗可能是防治骨关节炎的一种方法。还有学者研究了骨标本的脂代谢改变对骨质改变

的作用, 例如Chaput 等^[22]利用老年骨质疏松症患者与健康对照组的股骨颈骨标本进行蛋白组学研究, 结果发现骨质疏松症患者骨质中载脂蛋白明显下降。同时, 本研究也指出入选老年患者可能同时合并了骨关节炎的可能, 揭示骨内脂蛋白代谢改变可能在骨关节炎致病机制中起了一定作用。

-
- ^[1] Adams ME, Brandt KD. Hypertrophic repair of the canine articular cartilage in osteoarthritis after anterior cruciate ligament transaction. *J Rheumatol*, 1991, 18:428-425
- ^[2] 李盛村, 鲍捷, 王国祥. Wnt/ β -连环蛋白信号通路在骨关节炎发生过程中的作用[J]. *中国组织工程研究*. 2012, 16(13):2407-2410.
- ^[3] 郑群, 徐立红. 经典Wnt信号通路中 β -连环蛋白的影响因素[J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(2): 183-190.
- ^[4] Marian GB, Michael G, Sudhir V, et al. Aneuploidy-Dependent Massive Deregulation of the Cellular Transcriptome and Apparent Divergence of the Wnt/ β -catenin Signaling Pathway in Human Rectal Carcinomas. *Cancer Res*. 2006;66:267-282.
- ^[5] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*. 2009;17(1):9-21.
- ^[6] Choi YH, Burdick MD, Strieter RM. Human circulating fibrocytes have the capacity to differentiate osteoblasts and chondrocytes. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42:662-671.
- ^[7] Nakamura Y, Nawata M, Wakitani S. Expression profiles and functional analyses of Wnt-related genes in human joint disorders. *Am J Pathol*. 2005;167(1):97-105.
- ^[8] Nicholas L, Joanne L, Robert LG, et al. Cost effectiveness of COX 2 selective inhibitors and traditional NSAIDs alone or in combination with a proton pump inhibitor for people with osteoarthritis. *BMJ*. 2009;339:b2538.
- ^[9] Jin-Hong Kim, Jimin Jeon, Minhee Shin, Yoonkyung Won, Minju Lee, Ji-Sun Kwak, Gyuseok Lee, Jinseol Rhee, Je-Hwang Ryu, Churl-Hong Chun, and Jang-Soo Chun. Regulation of the Catabolic Cascade in Osteoarthritis by the Zinc-ZIP8-MTF1 Axis. *Cell* 156, 730 - 743, February 13, 2014
- ^[10] Hashimoto S, Setareh M, Ochs RL, et al. Fas/Fas ligand expression and induction of apoptosis in chondrocytes. *Arthritis Rheum*. 1997;40(10):1749-1755.
- ^[11] Menqshol JA, Vincenti MP, Coon CI, et al. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun

N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB: differential regulation of collagenase 1 and collagenase3. *Arthritis Rheum.* 2000;43(4):801-811.

[12] Papadakis KA, Targan SR. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med.* 2000;51:289-98.

[13] Robbins JR, Thomas B, Tan L, et al. Immortalized human adult articular chondrocytes maintain cartilage-specific phenotype and responses to interleukin-1beta. *Arthritis Rheum.* 2000;43:2189-2201.

[14] Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, et al. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB:differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3. *Arthritis Rheum.* 2000;43(4):801-811.

[15] 张荣凯, 方航, 卢华定, 陈郁鲜, 宋炎成, 曾春, 赵庆, 蔡道章. MMP3 在早期骨关节炎模型软骨下骨的表达及其意义. [J]中国病理生理杂志. 2011, 27 (12); 2391-2395.

[16] 段鑫, 李奇, 林荔军, 刘成龙, 李志浩, 刘登均, 张飞. 骨关节炎滑膜组织中缺氧诱导因子-1 α 、血管内皮生长因子的表达. [J]南方医科大学学报. 2011; 31 (1).

[17] Tang X;Zhou Z;Shen B Serum levels of TNF- α , IL-1 β , COMP, and CTX-II in patients with Kashin-Beck disease in Sichuan, China.

[18] Bastiaansen-Jenniskens YM;Clockaerts S;Feijt C Infrapatellar fat pad of patients with endstage osteoarthritis inhibits catabolic mediators in cartilage.

[19] Clérigues V;Guillén MI;Gomar F Haem oxygenase-1 counteracts the effects of interleukin-1 β on inflammatory and senescence markers in cartilage-subchondral bone explants from osteoarthritic patients 2012(05).

[20] Murata M, Yudoh K Nakamura H, et al. Distinct signaling pathways are involved in hypoxia-and n, l-induced VEGF expression in human articular chondrocytes[J]. *J Orthop Res*, 2006, 24(7): 1544-54.

[21] Blagojevic M, Jinks C, Jeffery A, et al. Risk for onset of osteoarthritis of the knee in older adults:a systematic review and metaanalysis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2010, 18(1):24-33.

[22] Chaput CD, Dangott IJ, Rahm MD, et al. A proteomic study of protein variation between osteopenic and age-matched control bone tissue [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2012, 237(5):491-498.

MicroRNA 与造血调控及 其与肿瘤的关系

姓名：宋菲菲

专业：生化

学号：2013203010023

MicroRNA 与造血调控及其与肿瘤的关系

摘要:

造血与造血的调控是生命活动的重要部分。造血过程由众多生长因子和转录因子组成的复杂网络调控，它们自发的调控着细胞的增殖，凋亡以及造血干祖细胞的分化成熟。研究表明细胞内还有一类小分子RNA即microRNA，控制着基因表达网络的平衡，从而决定了细胞的命运，控制着造血过程和造血异常引发的恶性血液肿瘤。

本综述回顾了造血过程及调控的基本原理，microRNA的生物生成及如何参与造血调控，总结了最近研究中发现的一些与造血系统恶性肿瘤相关microRNA及其参与癌症从发生到转移的发病机理相关的路径的最新进展，并分析microRNA的异常表达的几个重要因素，提出了miRNAs作为一种新颖的癌症诊断、治疗及预后的工具，寻找与造血相关的miRNAs，进一步从分子水平上阐述造血发育这一复杂的过程，将会对我们了解造血相关疾病的发生发展，为造血恶性肿瘤的诊断和治疗提供理论支持。

关键词：microRNA；造血作用；造血系统恶性肿瘤；miRNA 诊断

1、造血过程及调控

造血与造血的调控是生命活动的重要部分，造血系统持续不断生成新的血细胞以替换那些衰老退变的细胞，以维持体内恒定的血细胞数量，从而保证生命活动中机体对各类血细胞的需要，所以造血作用是一种持续终生的生命过程。血细胞生成是造血干细胞经历连续增殖与分化的结果。在这个复杂的细胞活动中，造血细胞与间质细胞之间通过受体与配体的相互接触，以及细胞因子与造血细胞受体之间相互作用，并通过不同的信号转导通路启动或关闭一系列的基因从而实现

对造血细胞增殖、分化与凋亡的调控。

机体通过多能造血干细胞（HSCs）持续不断的细胞分化，形成至少 8 种结构和功能各异的成熟血液细胞成分。而这一过程受到了机体的精密调控，主要由两部分组成：其一，HSCs 的自我更新—造血干细胞是如何自我增殖的；其二，造血干/祖细胞是如何分化的一干祖细胞如何发挥分化潜能，并形成成熟的终末分化细胞，调控机制又是什么。

造血过程由众多生长因子和转录因子组成的复杂网络调控，它们自发的调控着细胞的增殖，凋亡以及造血干祖细胞的分化成熟。造血微环境中，存在着造血细胞和间质细胞，它们之间的相互作用构成了造血调控的重要内容。造血微环境主要包括基质细胞、细胞外基质分子（ECM）、细胞粘附分子（CAM）及各种正负调控因子等，造血微环境对于造血干细胞的增殖与自我更新，造血细胞的迁移与定位，各系祖细胞的发育、分化与成熟等均具有十分重要的调控作用。

此外，最新的研究表明，细胞内还存在一类长约 21~24nt 的小非编码 RNAs（ncRNA）可能通过转录后基因沉默或者翻译抑制、表观遗传修饰、染色质结构调整等过程控制着造血过程以及造血异常引发的恶性血液肿瘤^[1]。

2、MicroRNA 的生物发生与功能

MiRNA 是一种 21~25nt 大小的单链小分子 RNA，广泛存在于真核生物中，是一类非编码 RNA (non-coding) 分子，调控着生物体的生长、分化、发育等过程，与正常发育过程及癌症发生有着紧密联系。由 miRNA 介导的调控机制是一种古老而保守的调控模式，所以现在越来越多的研究者专注于此领域，试图从此开拓一条探索生命奥秘的新道路。

MiRNAs 的生物合成开始于蛋白质编码基因上或其之间的转录本^[2]。miRNA 基因位于基因间或基因的内含子中。其合成较为复杂，主要包括以下几个过程：RNA 聚合酶 II (Pol II) 完成 miRNA 前体的转录^[3]；然后经 RNaseIII-Drasha 剪切形成 pre-miRNA，然后通过依赖 Ran-GTP 的转运蛋白 Exportin-5 将 miRNA 的前体 pre-miRNA 由核内转移至胞质中。胞质中另一种 RNaseIII-Dicer 切割 pre-miRNA 形成成熟的 miRNA；miRNA 与胞质中的一些重要蛋白如 Argonaute 形成 RISC (RNA 沉默诱导复合体)，由 RISC 介导 miRNA 对靶基因 mRNA 的降解或翻译的抑制。MiRNA 发挥转录后调控的方式与其跟靶 mRNA 的互补程度相关：(1) miRNA

与靶 mRNA 互补程度高介导的是靶 mRNA 的降解；(2) 互补程度低则介导靶 mRNA 的翻译阻滞。

MiRNA 可能在细胞胚胎期和胚胎植入前起重要作用，调控细胞分化、增殖、凋亡及肿瘤的发生发展等过程^[4]。尽管目前对于 miRNA 调控生命过程的确切机制还不甚了解，但是已有的研究表明 miRNA 在细胞生长和凋亡、血细胞分化、同源异形盒基因调节、胰岛素分泌、大脑形态形成和胚胎后期发育以及相关肿瘤的形成及预后等过程中都发挥重要作用。例如，miR-181 控制哺乳动物造血干细胞分化为 B 细胞^[5]；miR-375 调节哺乳动物胰岛细胞发育和胰岛素分泌^[6]有关。

3、MicroRNA 与造血调控

MicroRNA 是通过 miRNA 介导的基因转录后沉默对靶基因的转录本进行特异性降解或阻止翻译的进行来实现其生物学功能的。已有的信息学软件预测每个 miRNA 都有众多的靶基因，所以有必要深入研究 miRNA 是通过何种途径作用于一个或多个基因的分子机制来实现造血调控的。例如，miR-142s、miR-223 的表达可促进 T 淋巴细胞的成熟^[7]。miR-221、miR-222 的表达水平与 kit 呈负相关^[8]；miR-221、miR-222 表达的降低可通过解除对 kit 的抑制而促进红系造血，miR-130、miR-10a 和 miR-181a 可调控巨核祖细胞的分化^[9,10]。

Diamantina Vasilatou 等人^[11]总结了近年来研究中发现的与正常造血过程相关 miRNA 的表达情况（如图 1）。

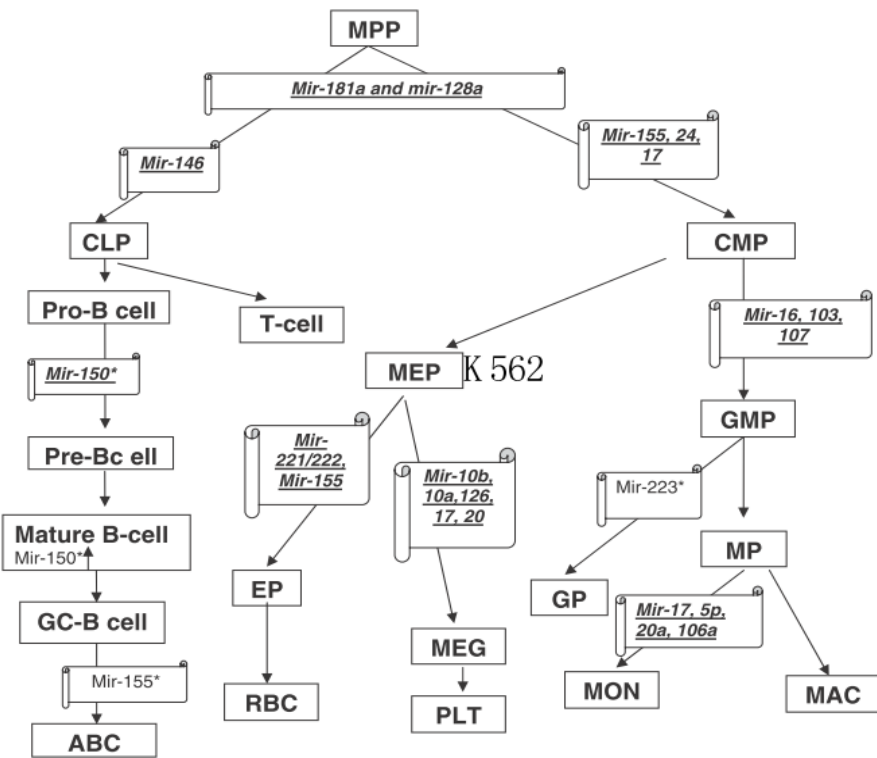


图 1 参与造血调控的 miRNA。

粗黑体:下调; 非粗黑: 上调; *: 在小鼠中的研究; MPP, 多能祖细胞; CLP, 普通淋巴祖细胞; GC-B cell, 次级淋巴中心 B 细胞; ABC, 激活类 B 细胞; CMP, 普通髓系祖细胞; MEP, 巨核、红系细胞祖细胞; GMP, 粒系、巨噬系祖细胞; DN, 双阴性; DP, 双阳性; EP, 红细胞前体; MEG, 巨核细胞前体细胞; RBC, 红细胞; PTLs, 血小板; MP, 单核巨噬系细胞前体; MON, 单核细胞; MAC, 巨噬细胞; GP, 粒细胞前体; MPm-单核细胞前体。

4、MicroRNA 与造血系统肿瘤

已有的生物信息学数据^[12]表明 miRNA 几乎参与体内所有基本的信号传导途径, 包括许多重要肿瘤相关基因的表达。研究表明, miRNA 表达失调与肿瘤发生密切相关, 在人类几乎所有的恶性肿瘤中都存在 miRNA 的不正常表达。例如, miR-15a/16 基因簇存在于染色体的 13q14 区域, 在慢性 B 淋巴细胞白血病中往往存在这一区域的缺失进而导致 miR-15a 和 miR-16 的表达下调^[13]。Fazi 等^[14]人报道了由原癌基因 AML1/ETO 介导的 miR-223 的表观遗传学沉默, 检测发现携带产生了 AML/ETO 融合基因的 AML 患者中 miR-233 的表达量也较低, 而 AML1/ETO 可以诱发 miR-223 的异染色质沉默, 但是 miR-233 却可以调节骨髓细胞的生成。Landais 等人^[15]的研究表明, 由 miR-106a, miR-18b, miR-20b, miR-19b-2, miR-92-2 和 miR-363 六个 miRNA 组成的 miR-106-363 簇在 46% 的 T 细胞白血病中高表达, 并可能起着原癌基因的作用。

近年，随着 miRNA 研究的深入，越来越多新的 miRNA 被研究者发现参与了调控淋巴细胞的分化成熟。2004 年陈^[16]等人发现了与造血相关的三种 miRNA: miR-181, miR-223, miR-142。其中 miR-142 在 B 淋巴系和髓系细胞中高表达，而 miR-181 在 B 淋巴系中有高水平的表达；miR-223 只在髓系细胞中表达，而在 T 淋巴和 B 淋巴细胞系以及红系中几乎检测不到表达。在未分化的骨髓干细胞中 miRNA-181 的表达能被检测到，但是如果这些细胞向 B 淋巴系分化，其表达就会上调，而向其他系分化则检测不到表达量的变化。这些信息都提示，这三种 miRNA 调控着造血过程，可能与造血干细胞的正常分化相关。Zhou B^[17]等人则发现 miR-150 在淋巴结和脾脏中 T 细胞和 B 细胞的分化过程中表达上调，在造血干细胞中上调 miR-150 表达之后进行骨髓移植发现该过程对 CD8⁺和 CD4⁺T 细胞、粒细胞及巨噬细胞的成熟没有太大的影响，但是 B 细胞的成熟却出现了阻滞。Xiao C^[18]等人则进一步研究发现 miR-150 调控着一种重要的转录因子 c-Myb 的表达，而 c-Myb 则控制着淋巴细胞的发育成熟的许多重要过程。此外，MiR-15a^[19]也有着与 miR-150 相似的功能，即通过调控着 c-Myb 的表达引导淋巴细胞的分化成熟。

造血系统的异常往往引发许多血液恶性肿瘤，其中慢性 B 淋巴系细胞白血病是成人中最常见的恶性血液肿瘤，而且与许多 miRNA 的异常表达相关。Van Den Berg 等^[20]研究发现 miR-155 在 Hodgkin 淋巴细胞系、初级 B 淋巴细胞以及弥漫性大细胞 B 淋巴瘤细胞(Diffuse Large B-cell Lymphoma, DLBCL)中都有高水平的表达。临床分离的几种 B 细胞淋巴瘤(包括 DLBCL)中，miR-155 的表达量与正常细胞相比有 10~30 倍的升高。此外，miR-143 和 miR-145 在大多数的 B 细胞恶性肿瘤中表达下调，进一步研究发现 miR-143 调控的靶基因是 MAPK 家族的一个新成员 ERK5。MiR-143 和 miR-145 可能会被用作区分恶性 B 细胞与正常细胞的生物标记^[21]。Rosa Visone 等的研究表明^[22]，基因座 13q31.3 的缺失与好几种淋巴瘤以及实体瘤的发生相关，而 miR-17-92 多顺反子正好位于这一区域。miR-17-92 基因簇被 c-myc 直接激活，而 c-myc 是一种在很多肿瘤细胞中都高表达的转录因子，能直接与基因的启动子区域相互作用。

5、MicroRNA 异常表达的原因

MicroRNA 异常表达的原因多变，总结起来主要包括：

(1) 染色体的畸变：对 227 个卵巢癌、乳腺癌及黑色素瘤的高分辨率芯片杂

交结果显示^[23]：miRNA 的表达与其基因的拷贝数相关，miRNA 在染色体上的定位不是一个随机事件，数据还显示携带了 miRNA 基因的染色体片段的丢失或插入往往出现在某些特异性的肿瘤中。

(2) 表观遗传学的改变：大约一半的 miRNA 基因上存在 CpG，其甲基化的程度可能与癌症的发生相关。例：用去甲基化试剂 5-AZA-CdR 处理人卵巢癌细胞系 OVCAR3，结果检测到有九种 miRNA 的表达水平上升。其中的三种 miR-21，miR-203 和 miR-205 在卵巢癌中也有高表达。这提示 miRNA 基因的甲基化状态可能与其在癌细胞中表达量的改变有关。

(3) 突变及单核苷酸多态性 (SNP)：发生在成熟的或前体 miRNA 或其基因旁的突变和单核苷酸多态性，可能会通过成熟前加工影响 miRNA 的正常表达。

(4) miRNA 生成机制的缺陷：有些癌细胞中正常表达 miRNA 的前体，但是却不能有效生成成熟的 miRNA 分子，提示由前体到成熟分子加工过程的缺陷。这可能与 RNase III Drosha 的缺失有关。在部分的非小细胞癌中 Dicer 核酸酶活性的缺失导致了 let7 表达的下调，并影响术后存活质量。Dicer 核酸酶基因敲出的小鼠因缺失了加工 miRNA 前体的能力，在发育的过程中死去^[24]。

6、MiRNA 的应用：

(1) miRNAs 作为癌症诊断及预后的工具

已有的有关 miRNA 在肿瘤中的表达数据显示 miRNA 是一种可用于诊断不同肿瘤及亚型的极有前途的分子标记，并且可能会用于临床上预测癌症的行为。通过检测急性淋巴细胞白血病患者的骨髓样本发现，其中的 miRNA 表达情况能精确的反应出癌症不同的发生机制。此外 miRNAs 还与细胞的分化阶段有关。用全反式维甲酸诱导 HL-60 向嗜中性粒细胞分化，而后对 miRNA 的表达谱检测结果表明 miRNAs 与细胞的分化阶段有关。

(2) miRNAs 作为治疗手段

miRNAs 作为治疗手段是通过重新调整过量表达的 miRNAs 或选择性的限制 miRNA 与靶标的作用来实现的。于是在 microRNA 表达异常的细胞中重建 miRNA 的正常表达水平可能成为一种新颖的疾病治疗手段，同时也还发现许多 microRNA 与耐药性有关^[25, 26]。现今已经发展出好几种体外运送 miRNA 的技术体系，一种特异性提高 miRNA 表达的方法是引入可以人工表达 miRNA 前体的 DNA 载体，

其机制在于 miRNA 对靶 mRNA 降解而非阻止翻译，最后介导的沉默。

7、结语

miRNA 控制着基因表达网络的平衡，从而决定了细胞的命运。在人类肿瘤中 miRNA 表达的失控严重的打乱了这种平衡，因而与癌症的发生和发展密切相关。已有研究报导的一些 miRNAs 影响基因的表达，影响与癌症从发生到转移的发病机理相关的路径，然而还需要更多的研究证实这些发现。在通过删除或过表达假定的肿瘤抑制子或致癌性的 miRNA 得到的小鼠模型，能帮助我们鉴定 miRNA 调控的癌症相关的通路。理论上，我们可以充分利用这种最新的知识用于癌症的诊断及预防，而临床的应用则会拓展我们对 miRNA 的理解，可能会是癌症研究与治疗的一次重大革命。

参考文献

- 1 Chang-Zheng Chen, Harvey F. Lodish. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Seminars in Immunology* 17 (2005) 155-165.
- 2 Rosa Visone and Carlo M. Croce. MiRNAs and Cancer. *The American Journal of Pathology*; 2009, 174, (4)4:1131-1138.
- 3 Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-4060.
- 4 Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431(7006):350—355.
- 5 Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNA modulate hematopoietic-specific microRNA lineage differentiation. *Science*, 2004, 303(5654):83-86.
- 6 Zhang H, Mishra A et al. Micro-RNA-375 inhibits lung surfactant secretion by altering cytoskeleton reorganization. *IUBMB Life*, 2010, 62(1):78-83.
- 7 Landais S, Landry S, Legault P, et al. Oncogenic potential of the miR-106-363 cluster and its implication in human T-cell leukemia. *Cancer Res*, 2007, 67(12): 5699-5707.
- 8 Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normol erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(50):18081-18086.
- 9 Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, et al. MicroRNA fingerprints during human

megakaryocytopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(13):5078–5083.

10 Guimaraes-sternberg C, Meerson, Shaked I, et al. MicroRNA modulation of megakaryoblast fate involves cholinergic signaling. *Leuk Res*, 2006, 30(5):583–595.

11 Diamantina Vasilatou, Sotirios Papageorgiou, et al. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. *European Journal of Haematology*, 2009, 1–16.

12 Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132: 4653–4662.

13 Calin GA, Dumitru CD, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:15524–15529.

14 Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, et al. Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell*, 2007, 12(5): 457–466.

16 Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303:83–6.

17 Zhou B, Wang S, Mayr C, Bartel DP, Lodish HF. miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:7080–5.

18 Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell* 2007;131:146–59.

19 Zhao H, Kalota A, Jin S, Gewirtz AM. The c-myc proto-oncogene and microRNA-15a comprise an active autoregulatory feedback loop in human hematopoietic cells. *Blood*, 2009;113:505–16.

20 Van den Berg, Johann Mols, Jiahuai Han. RISC-target interaction: Cleavage and translational suppression. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2008, 1179(11):668–677.

21 Akao Y, Nakagawa Y, Kitade Y, Kinoshita T, Naoe T. Downregulation of microRNAs-143 and -145 in B-cell malignancies. *Cancer Sci* 2007;98:1914–20.

22 Rosa Visone and Carlo M. Croce. MiRNAs and Cancer. *The American Journal of Pathology*, 2009, 174(4):1131–1138.

23 Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O' Brien Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G: MicroRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, 103:9136 - 9141.

24 Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ: Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* 2003, 35:215 - 217.

25 Petrocca F, Visone R, Onelli MR, Shah MH, Nicoloso MS, de Martino I, Iliopoulos D, Piloizzi E, Liu CG, Negrini M, Cavazzini L, Volinia S, Alder H, Ruco LP, Baldassarre G, Croce CM, Vecchione A: E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell* 2008, 13:272 - 286.

26 Garofalo M, Quintavalle C, Di Leva G, Zanca C, Romano G, Taccioli C, Liu CG, Croce CM, Condorelli G: MicroRNA signatures of TRAIL resistance in human non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2008, 27:3845 - 3855.

脂质筏与其在心血管疾病中的作用

许冰冰 2013203010021

[关键字]: 脂质筏; 磷脂; 胆固醇; 信号传导; 心血管疾病

[摘要]: 近年来, 广大学者对脂质筏做了大量的研究工作, 发表了一定数量的研究论文, 综述这些论文, 主要由三个方面: (1) 脂质筏的结构方面, 脂质筏是脂膜双层中特殊的脂质及蛋白质微区域, 主要由鞘脂、胆固醇及蛋白质组成。(2) 脂质筏功能方面: 信号传导、病原体入侵、蛋白质和脂质的胞吞和细胞内的运输等。(3) 脂质筏与疾病方面: 脂质筏功能紊乱与一些感染性疾病、肿瘤、心血管疾病、肌营养不良症及朊病毒病等有着密切的关系。总之, 脂质筏的相关研究有很多, 但离完全阐明脂质筏的结构及其在疾病中的明确作用的目标还有较大的路程。

自从 1972 年 Nicolson 提出膜流动镶嵌模型以来, 至今有很多关于膜结构的报道, 发现膜中有富含胆固醇及鞘脂的微区, 这个区曾有很多名称, 经过长期的争论, 直到 1988 年 Simon 才正式提出脂筏之称。2001 年, 在西班牙召开了欧洲研究探讨会, 会上对“微区、脂筏 (lipid raft) 及小窝”作了专题的讨论。下面简要介绍脂筏及其在心血管发病机制中的作用。

1 脂筏的结构

脂筏是指膜脂双层内含有脂质及蛋白质的微区, 微区内陷可形成囊泡, 近年发现脂筏不仅存在于质膜, 亦可在高尔基体膜上。脂质的双层有不同的脂筏: 外层的微区主要有鞘脂、胆固醇及 GPI-锚固蛋白, 因为鞘脂含有长链饱和脂肪酸, T_m 温度较高, 流动性差, 而且粘稠, 邻近磷脂区的脂肪酸多不饱和, T_m 温度较低, 所以出现分相; 膜内侧也有相似微区, 与外侧的脂质不完全相同, 主要是在此区有许多酰化的蛋白质, 特别是信号传导蛋白。虽然两层分别有脂筏, 但它们是偶联的, 因为用非离子去污剂提取时, 不仅有外层的 GPI-锚固蛋白, 还有许多信息分子共同被提出。用一种 GPI-锚固蛋白的抗体介导锚固蛋白聚集, 与此同时 Src 家族的酪氨酸激酶也被激活。如换成糖鞘脂的抗体, 也有同样的现象, GPI 蛋白及糖鞘脂都存在于膜外侧。Src 酪氨酸激酶在膜外侧, 这表明脂筏内外层之间是有联系的^[1,2]。

用不同的去污剂或改变溶解时的温度, 所得到的脂质及蛋白质都有差异, 说明细胞膜上的脂筏并不都等同, 脂筏可能有三类: 小窝、富含糖鞘脂膜区、富含多磷酸肌醇膜区。不同的脂筏有其各自的特异蛋白, 并有不同的功能^[1]。

脂筏内的蛋白质, 有的是经跨膜直接插入膜, 但更多的蛋白质需酰化, 由酰化后的脂肪酸插入膜。Zacharias^[3]的实验表明, 用水母蛋白的两个变体分别融合蓝荧光蛋白 (CFP) 及绿荧光 (YFP) 蛋白, 然后然后再多肽链上分别联接脂化的特异共同序列。用荧光能量共振转移测定邻近效应, 发现棕榈酰化及豆蔻酰化的蛋白质在脂筏的小窝区, 而异戊二烯化的蛋白质形成二聚体, 不在小窝区, 对胆固醇不敏感, 可能是另一类的脂筏。说明不同的酰化蛋白插入不同的脂筏。

2 脂质筏的功能

脂筏有两个特征: a. 许多蛋白质聚集在脂筏内, 便于相互作用。b. 脂筏的环境有利于蛋白质形成有效的构象, 所以它具有许多功能^[1]。

2.1 参与信号传导

由于脂筏内有多重信号分子，它可以参与许多信号转导通路。熊南翔^[4]研究组在去垢剂法成功提取脂质筏组分的基础上^[5]，以 Caveolin 为脂质筏组分的特异标志物^[6]，发现 NgR 与 Caveolin 在胞膜上有共同表达的部位。结果表明，NgR 可定位于神经元胞膜表面的脂质筏上，这是脂质筏影响 NgR 与其配体分子相互作用的前提。王海芳^[7]研究组的结果表明破坏细胞膜脂筏并不影响 MC3T3 细胞凋亡，并提示 TNFR1 在细胞膜脂筏和非脂筏区的分布对于下游信号通路的影响具有显著的细胞类型特异性。刘涛^[8]首次证实 tmTNF- α 在脂筏内的定位依赖于 -47 位棕榈酰化位点，且 tmTNF- α 的反向信号依赖脂筏，只有脂筏内的 tmTNF- α 才能激活 NF- κ B，促进抗凋亡基因 cIAP1 的表达，抑制促凋亡基因 Bax 的表达，引起 sTNF- α 抵抗；tmTNF- α 只有在脂筏内才能募集其反向信号分子 TRAF1、IKK- α 和 NF- κ Bp52 至脂筏内；tmTNF- α 能引起靶细胞 TNFR1 从脂筏外向脂筏内聚集，破坏靶细胞脂筏结构使其对 tmTNF- α 杀伤作用明显减弱。

2.2 参与病原微生物出入细胞

2.2.1 脂筏与细菌相互作用

这种相互作用表现在两个方面：(1) 通过与定位于脂筏的细胞表面受体(如 GPI-锚固蛋白、胆固醇等)相互作用内吞入胞，这对以分枝杆菌为代表的胞内寄生菌十分重要；(2) 细菌通过与脂筏这一质膜上的信号转导平台相互作用，活化宿主细胞胞内信号转导级联反应，引起细胞活化，产生生物学效应。细菌对宿主细胞产生上述两方面的作用依赖于脂筏结构和功能的完整性。Malaviya 等^[9]发现，大肠杆菌可以通过其表达于细菌菌毛末端的菌毛粘附素 FimH 与细胞表面 CD48 分子结合。CD48 作为一种 GPI-锚固蛋白，组成性地分布于脂筏结构中。FimH 可交联 CD48，进而引起脂筏融合聚集和脂筏内包括异三聚体 G 蛋白在内的多种信号分子活化，最终引起肥大细胞活化，脱颗粒^[10]。研究发现，内吞入胞的细菌周围富集了大量的脂筏成分^[11]，脂筏介导形成的内吞体不与溶酶体融合，因此，内吞入胞的病原菌能在胞内保持活力^[12]。分枝杆菌是经典的胞内寄生菌，Gatfield 等^[13]和 Peyron 等^[14]的研究发现，特异性破坏脂筏结构可以阻断 Myco. bovis 和 Myco. kansasii 进入小鼠巨噬细胞和人的中性粒细胞的过程^[11]。

2.2.2 脂筏与细菌毒素

霍乱弧菌(Vibrio cholerae)产生的内毒素——霍乱毒素(cholera toxin, CT)通过其 B 亚单位与细胞表面的 GM1 分子特异性结合，该分子是脂筏特征性脂质分子。在极性的上皮细胞中，CTB 与 GM1 结合后，毒素受体复合物被内吞，并经反式高尔基体转运至顺式高尔基体，最终到达 ER。在 ER 中，A 亚单位发挥活性，细胞表现出 CT 毒素的效应。特异性去除细胞胆固醇，从而破坏质膜表面脂筏结构的完整性，则 CT 或单独的 CTB 亚单位不能内吞入胞，同时，细胞也不出现病理学表现^[15~16]。

2.2.3 脂筏与病毒入胞

大多数病毒通过细胞以“主动吞饮”的方式内吞，内吞后进入经典的内吞体-溶酶体途径。但目前大量的研究清楚地显示，一些病毒还可以利用质膜微囊和脂筏介导的内吞途径感染细胞并在胞内定向转运，实现病毒去组装，达到或靠近其复制部位，最终完成其复制周期。

SV40 是一种简单的无包膜 DNA 病毒，在宿主细胞胞核中复制。SV40 首先与细胞表面的 MHC-I 类分子相结合，虽然后者并不分布于质膜微囊当中，也不随病毒内吞入胞，但 SV40 与 MHC-I 类分子结合后，可以招募质膜微囊及凹陷蛋白在病毒周围聚集，并进一步介导病毒内吞入胞^[17]。现已证明，SV40 经质膜微囊到达 ER 是其实现胞内感染所必需的^[18]。从内吞机制上看，SV40 与膜上受体结合后，可以活化胞内与质膜微囊相联系的信号级联反应，诱导局部蛋白酪氨酸激酶磷酸化、活化，并进一步引起局部肌动蛋白解聚，随后可以观察到肌动

蛋白和动力素 2 被招募至有病毒颗粒结合的质膜微囊处,并在局部形成放射状肌动蛋白多聚体,最终造成该质膜微囊结构及其内的病毒颗粒被高效地内吞^[19]。

2.2.4 脂筏参与介导病毒的组装和出芽

A 型流感病毒的组装部位发生在质膜,主要涉及两个跨膜糖蛋白——流感病毒血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)及在胞膜内侧与两者结合的外周基质蛋白 M1。实验研究发现,在低温条件下,用去污剂抽提流感病毒感染细胞总蛋白时,HA 和 NA 特异性地分布于 DRM 中,提示这两种病毒的衣壳蛋白具有内在的脂筏^[11,20]。

3 脂质筏与心血管疾病

脂筏和心血管疾病间关系的研究主要集中于动脉的内皮细胞和心肌中受体介导的信号。心肌细胞上的肾上腺素能受体^[21,22]和胆碱能受体^[23]刺激后,G 蛋白被激活后转位到脂筏。心脏内的钾通道 Kv1, Kv2 和 Kv4 等离子通道维持着膜电位,如被破坏可致高血压,缺血和心力衰竭^[24],它们既可与 caveolae 也可与不含 caveolin 的脂筏相互作用。脂筏尤其是其 caveolae 类型,可能参与动脉粥样硬化的发病过程,该病引起的血管改变是西方国家心脏疾病的主要原因,其病因是过多的胆固醇沉积在动脉壁上并被巨噬细胞吞噬^[25],吞噬了胆固醇的巨噬细胞变成泡沫细胞并积聚成为粥样斑块,可堵塞动脉并导致缺血和心肌梗死^[26],在动脉粥样硬化中,细胞外过多的胆固醇达到饱和因此会减少低密度脂蛋白胆固醇复合体被摄取到组织中。巨噬细胞的摄取某些种类的低密度脂蛋白,例如氧化型低密度脂蛋白和经酶解的低密度脂蛋白,需要与 CD36 受体结合,并需要定位于脂筏^[27]。低密度脂蛋白细胞内吞作用可导致形成不同的脂筏结构域^[28]。高密度脂蛋白内的载脂蛋白(载脂蛋白 AI)能介导从含有低密度脂蛋白胆固醇复合体的巨噬细胞摄取胆固醇,避免泡沫细胞的形成。载脂蛋白 AI 与巨噬细胞的相互作用^[29]和胆固醇从巨噬细胞外流^[30]均依赖脂筏,并可能改变细胞的脂筏的构成^[31]。这些发现意味着脂筏参与了心血管疾病的发生。

- [1] 陈岚,许彩民,袁建刚,潘华珍.脂筏的结构与功能.生物化学与生物物理进展,2003,3(1):54~59
- [2] Brown D A, London E. Structure and function of sphingolipid and cholesterol-rich membrane rafts. J Biol Chem,2000,275(23):17221~17224
- [3] Zacharias D A, Violin J D, Newton A C, et al. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. Science, 2002, 296(5569): 913~916
- [4] 熊南翔,赵洪祥,张方成,赵甲山,朱贤立. Nogo 66 受体在脂质筏中的定位. 华中科技大学学报, 2006, 2(1): 37~40
- [5] 熊南翔,赵洪洋,张方成,等.去垢剂法提取脂质筏及鉴定[J].医学研究生学报,2005,18(2):104-106.
- [6] VACCA F, AMADIO S, SANCESARIO G, et al. P2X3 receptor localizes into lipid rafts in neuronal cells[J]. J Neurosci Res, 2004, 76(5): 653-661.
- [7] 王海芳, Fredrick M. Pavalko, 梅其炳.成骨细胞膜脂筏在 TNFR1 介导信号转导中的作用.细胞与分子免疫学杂志 2011.27(2) 131~134
- [8] 刘涛.脂筏对 tmTNF- α 的双向信号影响的研究.华中科技大学博士论文.
- [9] Plieske J, Struss D. Microsatellite markers for genome analysis in Brassica. I. development in Brassica napus and abundance in Brassicaceae species. Theor Appl Genet, 2001,

102:689~694

- [10] Suwabe K, Iketani H, Nunome T, et al. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 1092~1098
- [11] 周一然, 宋建国. 脂质筏—病原微生物出入细胞的一种门户. *生命科学* 2004.16(3)144~148
- [12] Shin J S, Gao Z M, Abraham S N. Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells. *Science*. 2000,289: 785~788
- [13] Gatfield J, Pieters J. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science*, 2000, 288:1647~1650
- [14] Peyron P, Bordier C, N'Diaye E N, et al. Nonopsonic phagocytosis of *Mycobacterium kansasii* by human neutrophils depends on cholesterol and is mediated by CR3 associated with glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Immunol*, 2000, 165(9): 5186~5191
- [15] Wolf A A, Jobling M G, Wimer-Mackin S, et al. Ganglioside structure dictates signal transduction by cholera toxin and association with caveolae-like membrane domains in polarized epithelia. *J Cell Biol*, 1998, 141: 917~92
- [16] Lencer W I, Moe S, Rufo P A, et al. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 10094~10098
- [17] Parton R G, Lindsay M. Exploitation of major histocompatibility complex class I molecules and caveolae by simian virus 40. *Immunol Rev*, 1999, 168: 23~31
- [18] Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A. Caveolae endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol*, 2001, 3: 473~483
- [19] Pelkmans L, Ptener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*, 2002, 296: 535~539
- [20] Zhang J, Pekosz A, Lamb R A. Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tail of the spike glycoproteins. *J Virol*, 2000, 74: 4634~4644
- [21] Fujita, T., Toya, Y., Iwatsubo, K., Onda, T., Kimura, K., Umemura, S., and Ishikawa, Y. 2001. Accumulation of molecules involved in α 1-adrenergic signal within caveolae: caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res* 51:709-16.
- [22] Steinberg, S. F. 2004. β (2)-Adrenergic receptor signaling complexes in Cardiomyocyte caveolae /lipid rafts. *J Mol Cell Cardiol* 37:407-15
- [23] Feron, O., Smith, T. W., Michel, T., and Kelly, R. A. 1997. Dynamic targeting of the agonist stimulated m2 muscarinic acetylcholine receptor to caveolae in cardiac myocytes. *Biol Chem* 272:17744-8
- [24] Maguy, A., Hebert, T. E., and Nattel, S. 2006. Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. *Cardiovasc Res* 69:798-807.
- [25] Shashkin, P., Dragulev, B., and Ley, 2005. Macrophage differentiation to foam cells. *Curr Pharm Des* 11:3061-72.
- [26] Ohashi, R., Mu, H., Wang, X., Yao, Q., and Chen, C. 2005. Reverse cholesterol transport and cholesterol efflux in atherosclerosis. *Qjm* 98:845-56.
- [27] Zeng, Y., Tao, N., Chung, K. N., Heuse, J. E., and Lublin, D. M. 2003. Endocytosis of oxidized low density lipoprotein through scavenger receptor CD36 utilizes a lipid raft pathway that does not require caveolin-1. *J Biol Chem* 278:45931-6.
- [28] Grandl, M., Bared, S. M., Liebisch, G., Werner, T., Barlage, S., and Schmitz, G. 2006. E-LDL and Ox-LDL differentially regulate ceramide and cholesterol raft microdomains in human macrophages. *Cytometry A* 69:189-91.

-
- [29] Gaus, K., Kritharides, L., Schillitz, G., Boettcher, A., Drobnik, W., Langmann, T., Quinn, C. M., Death, A., Dean, R. T., and Jessup, W. 2004. ApoA-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages. *FASEB J* 18:574-6.
- [30] Gaus, K., Gooding, J. J., Dean, R. T., Kritharides, L., and Jessup, W. 2001. A kinetic model to evaluate cholesterol efflux from THP-1 macrophages to apolipoprotein A-1. *Biochemistry* 40:9363-73.
- [31] Drobnik, W., Borsukova, H., Boettcher, A., Pfeiffer, A., Liebisch, G., Schutz, G. J., Seindler, H., and Schmitz, G. 2002. Apo A1/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains. *Traffic* 3:268-78

姓名：马雨洪 学号：2013103010007

间充质干细胞和细胞因子诱导杀伤细胞对肿瘤的共同影响

摘要：肝癌是世界上最普遍的癌症之一，有效的治疗方式少之又少。细胞因子诱导杀伤细胞被证明对肿瘤细胞有杀伤作用，并且已经用于临床。目前，MSC 是否能抗肿瘤还存在诸多争议，但是 MSC 的免疫调节作用是不可否认。有研究证明，CIK 可诱导 MSC 发生凋亡，而 MSC 也可调节 CIK 的活性。如果将 CIK 和 MSC 共同作用于肿瘤，其作用是否会优于单独使用其中一种，这有待验证。

关键词：肝癌 细胞因子诱导杀伤细胞 间充质干细胞

一、肝癌

肝癌在全球发生率最高的恶性肿瘤中位列第五，是第三大肿瘤相关致死病因^[1]。近二十年，肝癌的发病率和致死率都翻了一倍，在肝癌的早期阶段，外科切除和肝脏移植都有一定的疗效^[2,3]。慢性肝炎，非酒精性脂肪肝，经常性摄入酒精，黄曲霉毒素都可能诱发肝癌，其中第一种为最主要诱因，80-90%的肝癌病人都是由慢性肝炎发展而来。在早期，没有明显症状，到了晚期，临床症状明显，但是等发展到晚期，治疗效果将差强人意。有许多研究证明，肝癌的早期诊断和有效治疗方式可帮助延长患者的寿命。 α -甲胎蛋白（AFP）是用于诊断肝癌的最广泛肿瘤标志物，在肝癌早期即可检测出来。另外还有一些标志物，分为三大类：蛋白类抗原，酶和同工酶，细胞因子^[4]。目前针对肝癌的治疗方法发展相对成熟，可根据患者的病因、病理特征及病程选择治疗方式。手术切除适用于非硬化性且没有远处转移的患者，因为患肝硬化性肝癌患者不能重复进行该手术，50%的患者术后五年内不复发，另外 50%患者两年内复发^[5-7]。肝脏移植不仅可以消除肿瘤还可以肿瘤产生的肝硬化，是肿瘤学角度最好的治疗方法，但术后护理繁杂，而且供体缺乏^[8]。动脉栓塞化疗是经过验证的非手术切除介入治疗，配合支持疗法，患者的存活期可以延长最多两年。这种方法基于区域化疗和肿瘤去血管相结合，目前没有可用于规范治疗的指导方针，对栓塞材料的选择，化疗药物，不同药物的结合，不同体重和肿瘤体积的适宜用药量都没有统一标准^[9,10]。肿瘤内注射酒精，射频消融术都是在不宜进行手术切除的早期肝癌患者进行的局部手术，前者的原理是在超声或者 CT 引导下，通过细胞脱水，蛋白变性诱导

肿瘤细胞坏死，后者也同样需要超声或者 CT 的指引，在肿瘤内放置电极，然后通过控制电流产生热消融^[11,12]。这两种只能将肿瘤控制到一定尺寸范围，并不能完全消除肿瘤组织。上述治疗方法不仅治疗效果都差强人意，复发的可能性很大，而且患者要承受一定的痛苦。

二、细胞因子诱导杀伤细胞

细胞因子诱导杀伤细胞（CIK）是一类体外诱导扩增获得的异质细胞，前体细胞是 CD3 阳性 T 淋巴细胞，其生物学特性促使其被应用于过继免疫治疗。从外周血、骨髓或者脐血中分离出单核细胞，接种到含有 IF- γ 、IL-2 和 CD3 单抗的培养基中培养 14 天到 21 天。CIK 表现出 T 细胞 NK 细胞的混合表型，CIK 细胞的前体是 CD3 + T 淋巴细胞，CD3CD56 双阳性被认为是主要负责抗肿瘤活性部分^[13,14]，只表达 CD3 不表达 CD56 部分是引起同种异体反应的部分，有研究证明将该部分剔除之后可以减少同种异体反应和接下来的 GVHD，这种情况只有在供体和受体 HLA 匹配度很低的时候才具有临床相关性^[15,16]。有多种分子间的相互作用参与 CIK 诱导的肿瘤杀伤作用，LFA-1 跟 ICAM-1 的相互结合与 CIK 识别肿瘤细胞相关^[17]，NKG2D 跟 MIC A/B 的作用与肿瘤细胞的识别和 CIK 的活化相关，识别后通过穿孔素，颗粒酶裂解肿瘤细胞^[18]，或者是利用 TRAIL 或 fas 诱导肿瘤细胞凋亡。CIK 的优势在于其对正常骨髓、脾脏细胞没有毒性作用，对肿瘤细胞的杀伤作用具有一定特异性并且是非 MHC 限制性的^[19]，并且有研究报道，CIK 进入肿瘤组织之后可以停留 9 天之久。

三、间充质干细胞

间充质干细胞（MSC）有多种来源，包括脐带，脐带血，骨髓和脂肪。相对于其他几种来源，脂肪组织有其独特优势，因为抽取脂肪对供体伤害小，一次的抽取量较大，在体外培养扩增后可无量供应，且免疫调节功能更强^[20-22]。对于 MSC 对肿瘤的作用有两种完全对立的观点，部分研究表明 MSC 促进肿瘤生长，MSC 与肿瘤细胞共同注射之后，肿瘤发生率升高，肿瘤体积变大，这可能是因为在组织中可以分化成成纤维细胞，周皮，也许还能分化成类内皮细胞或者血管粘附细胞，MSC 还能分泌细胞因子促进增殖和血管生成。需要注意的是，肿瘤体积的变大并不一定就是肿瘤细胞数目的增多，也可能是由于 MSC 自身的增殖，有研究报道表明 MSC 发生恶性转化，但是这些研究团队到后面都发现是被

肿瘤细胞污染^[23]。而部分研究支撑的观点却刚好相反，有研究报道^[24-27]，往建立良好的肿瘤模型体内注射 MSC 可以抑制肿瘤生长，而其促肿瘤作用往往都是在与肿瘤细胞共同注射的情况下，这提示选择好的时机注射 MSC 可以起到抑制肿瘤的作用，同时还要注意细胞用量，因为高数量的 MSC 容易导致促肿瘤生长的作用。这种差异性可能是由于模型建立方法不同，造模使用的细胞系不同，或者是 MSC 的组织来源不同。TLR 的表达或者其他相应受体激活，可以使 MSC 的表型从免疫抑制转向促炎性，对 MSC 作相应处理之后再注射进体内可能会增强 MSC 的抗肿瘤作用^[28]。导入肿瘤靶向性基因可以克服 MSC 的任何体内促肿瘤作用，所以可以考虑将 MSC 修饰之后在用于治疗。

四、CIK 与 MSC 的相互作用

众所周知，MSC 可抑制多种免疫细胞的作用，通过抑制免疫细胞的增殖，降低 NK 细胞因子的分泌和细胞裂解作用，从而抑制 T 细胞的增殖，B 细胞活化成熟，单核细胞来源树突细胞的发育^[29-35]。CIK 表面表达 FasL，而 MSC 表面表达 Fas，CIK 与 MSC 结合后，有可能诱导其发生凋亡。

五、结语

联合使用 CIK 和 MSC 杀伤肿瘤细胞时，二者存在相互干扰。但是二者在生理条件下的相互作用需要用体内实验去探究，二者的注射时机和注射顺序都在考虑范围之内。相信 CIK 和 MSC 有望共同应用与临床。

[1]. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001;94:153–156 [

[2]. El-Serag HB, Davila JA, Petersen NJ, McGlynn KA. The continuing increase in the incidence of hepatocellular carcinoma in the United States: an update. *Ann Intern Med* 2003;139:817–823.

[3]. Llovet JM. Treatment of hepatocellular carcinoma. *Curr Treat Opt Gastroenterol* 2004;7:431–441.

[4]. Debruyne EN and Delanghe JR: Diagnosing and monitoring hepatocellular carcinoma with alpha-fetoprotein: new aspects and applications. *Clin Chim Acta* 395: 19-26, 2008.

[5]. EASL–EORTC clinical practice guidelines: management of hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 2012;56:908–43.

[6]. Bralet MP, Regimbeau JM, Pineau P, Dubois S, Loas G, Degos F, et al. Hepatocellular carcinoma occurring in nonfibrotic liver: epidemiologic and histopathologic analysis of 80 French cases. *Hepatology* 2000;32:200–4.

[7]. Lubrano J, Huet E, Tsilivdis B, François A, Gorla O, Riachi G, et al. Long-term outcome of liver resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic nonfibrotic liver with no viral hepatitis or alcohol abuse. *World J Surg* 2008;32:104–9.

[8]. Berry K, Ioannou GN. Are patients with Child's A cirrhosis and hepatocellular carcinoma

-
- appropriate candidates for liver transplantation? *Am J Transplant* 2012;12:706–17.
- [9]. Takayasu K, Arii S, Ikai I, Omata M, Okita K, Ichida T, et al. Prospective cohort study of transarterial chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma in 8510 patients. The Liver Cancer Study Group of Japan. *Gastroenterology* 2006;131:461–9.
- [10]. Burrell M, Reig M, Forner A, Barrufet M, de Lope CR, Tremosini S, et al. Survival of patients with hepatocellular carcinoma treated by transarterial chemoembolisation (TACE) using drug eluting beads. Implications for clinical practice and trial design. *J Hepatol* 2012;56:1330–5.
- [11]. Seinsträ BA, van Delden OM, van Erpecum KJ, van Hillegersberg R, Mali WP, Bosch van den. Minimally invasive image-guided therapy for inoperable hepatocellular carcinoma: what is the evidence today. *Insights Imag* 2010;3:167–81.
- [12]. Lencioni R, Crocetti L. Local-regional treatment of hepatocellular carcinoma. *Radiology* 2012;262:43–58.
- [13]. Lu P.H and Negrin R.S. A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J. Immunol*, 1994. 153(4): 1687-1696.
- [14]. Sangiolo D, et al. Alloreactivity and anti-tumor activity segregate within two distinct subsets of cytokine-induced killer (CIK) cells: implications for their infusion across major HLA barriers. *Int Immunol*, 2008. 20(7): 841-8
- [15]. Verneris M.R, et al. Engineering hematopoietic grafts: purified allogeneic hematopoietic stem cells plus expanded CD8+ NK-T cells in the treatment of lymphoma. *Biol.Blood Marrow Transplant*, 2001. 7(10): 532-542.
- [16]. Yang Y.G, et al. Donor-derived interferon gamma is required for inhibition of acute graft-versus-host disease by interleukin 12. *J Clin Invest*, 1998. 102(12): 2126-35.
- [17]. Notter M, Ludwig W-D, Bremer S, Thiel E (1993) Selective targeting of human lymphokine-activated killer cells by CD3 monoclonal antibody against the interferon-inducible high-affinity Fc gamma RI receptor (CD64) on autologous acute myeloid leukemic blast cells. *Blood* 82 :3113–3124
- [18]. Verneris M.R, et al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8+ T cells. *Blood*, 2004. 103(8): 3065-3072.
- [19]. Schmidt-Wolf IGH, Lefterova P, Johnston V, Neubauer A, Huhn D, Negrin R, Blume KG (1994) Propagation of T cells with NK cell marker. *Br J Haematol* 87 : 453–458
- [20]. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147.
- [21]. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society For Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315–317.
- [22]. Pereira RF, Halford KW, O’Hara MD et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:4857–4861.
- [23]. Studeny M, Marini FC, Champlin RE et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res* 2002;62:3603–3608.
- [24]. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi’s sarcoma. *J Exp Med* 2006;203:1235–1247.
- [25]. Qiao L, Xu Z, Zhao T et al. Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells

in a hepatoma model. *Cell Res* 2008;18:500–507.

[26]. Qiao L, Xu ZL, Zhao TJ et al. Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett* 2008;269:67–77.

[27]. Ohlsson LB, Varas L, Kjellman C et al. Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol* 2003;75:248–255.

[28]. Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL et al. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: Polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 2010; 5:e10088.

[29]. M. Krampera, S. Glennie, J. Dyson, D. Scott, R. Laylor, E. Simpson, F. Dazzi, Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide, *Blood* 101 (2003) 3722–3729.

[30]. R. Meisel, A. Zibert, M. Laryea, U. Gobel, W. Daubener, D. Dilloo, Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation, *Blood* 103 (2004) 4619–4621.

[31]. A. Bartholomew, C. Sturgeon, M. Siatskas, K. Ferrer, K. McIntosh, S. Patil, W. Hardy, S. Devine, D. Ucker, R. Deans, A. Moseley, R. Hoffman, Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo, *Exp. Hematol.* 30 (2002) 42–48.

[32]. W. Zhang, W. Ge, C. Li, S. You, L. Liao, Q. Han, W. Deng, R.C. Zhao, Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells, *Stem Cells Dev.* 13 (2004) 263–271.

[33]. P.A. Sotiropoulou, S.A. Perez, A.D. Gritzapis, C.N. Baxevanis, M. Papamichail, Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells, *Stem Cells* 24 (2006) 74–85.

[34]. G.M. Spaggiari, A. Capobianco, S. Becchetti, M.C. Mingari, L. Moretta, Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation, *Blood* 107 (2006) 1484–1490.

[35]. G.M. Spaggiari, A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M.C. Mingari, L. Moretta, Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2, *Blood* 111 (2008) 1327–1333.