

自噬在动脉粥样硬化进展中的双重作用

姓名：李菲菲

学号：2015203010019

专业：生物化学与分子生物学

课程：生物大分子结构与功能

自噬在动脉粥样硬化进展中的双重作用

摘要：动脉粥样硬化（atherosclerosis, AS)是一种慢性炎症性疾病，广泛涉及多种细胞，如血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)、平滑肌细胞（smooth muscle cell, VSMC）、巨噬细胞(macrophage)等，病理机制较复杂，涉及氧化应激、炎症反应、血脂异常等，最近研究发现，自噬也参与动脉粥样硬化的形成和进展，并在其中可能发挥重要作用。

关键词：动脉粥样硬化；自噬；血管内皮细胞；平滑肌细胞；巨噬细胞

动脉粥样硬化(AS)是冠心病、脑梗死、外周血管病的主要原因，最初认为AS仅仅是由于过量的脂质沉积于血管壁导致，但经过研究发现AS斑块中存在巨噬细胞及其他炎性细胞浸润，现AS被认为是一种动脉血管壁内膜的慢性炎症性疾病，其特征是粥样斑块的形成^[1]，进一步动脉壁变硬，管腔狭窄，导致血栓形成、供血障碍等，缓慢进展并逐渐出现临床症状，其危险因素包括遗传、性别、高脂血症、糖尿病、高血压、肥胖及吸烟等^[2,3]。自噬(autophagy)是在饥饿等多种刺激下，细胞通过自噬基因调控，胞浆中形成双层囊泡结构的自噬体（autophagosome），包裹的受损细胞器或长寿大蛋白，最终与溶酶体融合形成自噬溶酶体而被降解的过程，以实现细胞本身的代谢需要和细胞器的更新。自噬广泛存在于生理和病理过程中。目前，人们对自噬的关注越来越高，如神经退行性病变、癌症、心肌疾病等，但关于自噬在AS斑块形成和稳定方面的作用还知之甚少^[4]。有研究显示，AS中基础性自噬是一种存活机制，通过自噬可保护细胞免受有害应激，尤其是在氧化损伤、代谢性应激和炎症情况下。但过度自噬又可加重AS的进展，甚至引起斑块破裂，诱发血栓形成，导致心脑血管缺血性疾病的发生。VEC、VSMC和巨噬细胞作为影响AS斑块形成及稳定的三类关键细胞，同自噬一起形成复杂的调节网络共同影响着AS发展。

1 AS中相关细胞的自噬及机制

AS发生发展过程中涉及多种细胞，其中VEC功能障碍是AS发生的起始环

节,氧化的低密度脂蛋白(oxLDL)接触受损的 VEC 并逐渐沉积在内皮下,刺激巨噬细胞吞噬 oxLDL,形成泡沫细胞和粥样斑块^[5]。VSMC 可产生胶原纤维,有助于提高纤维帽的抗张强度,故平滑肌细胞可维持斑块的稳定性。研究显示,在动物或人 AS 斑块的纤维帽内,变性的平滑肌细胞内出现某些自噬的结构特征如髓样结构和严重的空泡变性。VSMC 通过自噬来清除功能受损的蛋白质等大分子物质、细胞器及其胞内蓄积的有害物质,完成细胞代谢更新,维持自身内环境稳定。斑块中巨噬细胞上调表面清道夫受体(scavenger receptor, SR)并吞噬被修饰的脂蛋白(如 oxLDL 等),脂质在胞内不断蓄积形成泡沫细胞进而导致斑块形成。因此,巨噬细胞自噬性死亡可作为一种代偿机制,能够减轻其对斑块的不良影响。

1.1 血管内皮细胞的自噬

在氧化应激下,基础性自噬保护 VEC,维持细胞存活;相对于基础自噬,过度激活自噬会导致细胞自噬性死亡,加剧 AS 进程。在 AS 斑块中的细胞内,研究显示自噬活动增加,VEC 表现明显。VEC 的自噬可以发生在氧化应激反应的极早期,在细胞色素 C 释放之前就可降解损伤的细胞器,尤其是极化线粒体^[6],这表明 VEC 的自噬具有抗凋亡及修复和维持细胞功能的作用。研究发现,随着年龄增大,细胞的自噬活性降低,也可能与年龄相关性疾病的发生机制有密切关系^[7]。但急性或持续应激又可抑制 VEC 的自噬,最终导致细胞死亡^[6]。自噬诱导剂通过增加 VEC 基础自噬,或许可调节细胞功能,起到自身修复作用,维持细胞功能,并可能成为将来防治冠心病的策略之一。

1.2 血管平滑肌细胞的自噬

VSMC 调节血管舒缩功能,同时也分泌多种细胞因子及细胞外基质成分。血脂异常是 AS 的危险因素之一,也是诱导 VSMC 自噬的潜在因素。在过量胆固醇存在的情况下,LC3 II 蛋白含量明显升高,大量自噬泡聚集,VSMC 作为纤维帽中唯一产生间质胶原纤维的细胞,若发生凋亡会使胶原纤维合成减少,纤维帽变薄,斑块结构趋于不稳定。研究发现,mTOR 信号通路参与 VSMC 自噬的调节,抑制 mTOR 通路即意味着自噬的上调^[8]。PI3K/Akt 信号通路参与调节了 VSMC 自噬过程,PI3K 被激活后,形成第二信使 PIP3,与细胞内的信号蛋白 Akt 和 PDK1 结合,促使 Akt 活化,进而引起 Rheb-GTP 水平的升高而激活 mTOR,抑制自噬的发生^[9]。Akt 还可以调节 Beclin-1 的磷酸化,进而诱导自噬的发生^[10]。

p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK) 信号通路在调控 VSMC 自噬中也起着重要作用, p38 以生长停滞和 DNA 损伤 45β/MAPK/ERK 激酶 4 依赖性的生长方式抑制 Atg5 的磷酸化, 抑制自噬体的形成^[11]; p38MAPK 经 GSK3β 和 P70S6K 调节自噬, 诱导 LC3 II 的产生^[12]。

在 AS 斑块内 SMC 死亡和存活的平衡可能是决定斑块稳定性的主要因素。SMC 可通过自噬清除变性的蛋白质和其他细胞内大分子物质或细胞器, 对于维持自身内环境稳定发挥重要作用。利用 Western blot 方法可检测到人 AS 斑块中 LC3 II 超表达, 而在未发生 AS 的哺乳类动脉, LC3 II 表达不明显。因此, LC3 II 表达水平增高可作为 AS 斑块中 SMC 自噬的一个指标。

1.3 巨噬细胞的自噬

AS 斑块内巨噬细胞分泌趋化因子, 促使单核细胞进入血管内膜并分化成巨噬细胞。当巨噬细胞通过 SR 摄取过量修饰的脂质时, 巨噬细胞逐渐演变成泡沫细胞。另外, 巨噬细胞活化后还参与组织因子、细胞因子、基质金属蛋白酶的合成和分泌, 加重炎症反应, 降解细胞外基质组分, 破坏纤维帽, 进而导致斑块破裂, 触发血栓形成。研究发现, 巨噬细胞分泌的基质金属蛋白酶, 如 MMP2、MMP9 等具有降解胶原纤维的作用, 导致纤维帽变薄;其分泌的 TNF-α 等细胞因子可以使平滑肌细胞死亡, 导致斑块进展、失稳和破裂^[13]。因此, 在不影响 VSMC 情况下选择性清除斑块中的巨噬细胞对于 AS 的进展具有重要意义。AS 早期, 细胞自噬可以减少泡沫细胞的积聚, 抑制斑块的形成、发展; 中晚期, 自噬可以减少斑块中的炎症反应, 维持斑块稳定。巨噬细胞源性泡沫细胞通过诱导自噬, 以溶酶体依赖方式促进胆固醇逆转运^[14]。小鼠 AS 模型中, 加入雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抑制剂降低主动脉弓处胆固醇的含量, 延缓动脉粥样硬化的发展^[15]。研究表明, 抑制 mTOR 活性可诱导巨噬细胞自噬, 从而减少斑块中巨噬细胞数量, 起到维持斑块稳定的作用^[16]。近年来研究的转录因子 EB(TFEB), 可由 mTOR、细胞应激等激活, 并介导自噬和溶酶体相关基因表达, 调节脂质代谢^[17]。研究发现, TFEB 可通过调控协同溶酶体表达和调控 (coordinated lysosomal expression and regulation, CLEAR) 元件相关基因, 调节溶酶体的合成及自噬^[18]。另外, 还有报道, 在 HeLa 细胞中过表达 TFEB 可增加自噬体的数量^[19]。因此推测, TFEB 参与自噬调控。

Beclin1 为自噬所必需的 III 型 PI3K 复合物的一个组成部分。虽然 Beclin 在体外培养的巨噬细胞中高表达，但在人 AS 斑块的表达不明显。因此，由于检测技术等方面的限制、缺乏合适的标志蛋白以及多年来自噬在心血管研究方面进展缓慢等因素，对于 AS 斑块中 Beclin 1 的表达及其分布特征还需要作详细探讨。

2 诱导自噬发生的潜在因素

虽然在研究自噬在 AS 发展中的尚未取得很多进展，但体外研究提示，各种致 AS 相关因素均可能刺激斑块细胞的发生自噬。

2.1 氧化脂质诱导自噬

AS 进展中，过量 LDL 浸润到 AS 易发区，并被氧化或酶修饰^[20]。氧化浸润的脂质并产生大量有生物活性的中间体和终产物^[21]，包括过氧化氢脂质、脂质过氧化衍生醛（如丙二醛、4-HNE、POVPC 等）。用 4-HNE 处理 VSMCs,部分蛋白会发生修饰，可检测到抗 4-HNE 的抗体；用同位素标记的 3H 4-HNE 处理细胞后，蛋白也具有放射性，4-HNE 还可促使 LC3 向自噬体特异性的 LC3 II 转化^[22]。被 4-HNE 修饰的蛋白是有害的，因为它不仅可以破坏蛋白功能，还可导致非活化或交联蛋白的累积，因此必须清除这些蛋白阻止其对细胞进一步的毒害作用。蛋白-4-HNE 复合物的清除不受蛋白酶体抑制剂乳孢素抑制，提示蛋白酶体介导的降解可能是清除 4-HNE 修饰蛋白的次要途径。相反，用 3-MA 抑制溶酶体-自噬途径可导致蛋白-4-HNE 复合物明显增多，说明蛋白-醛复合物可能作为自噬反应的一部分而被降解。另外，自噬诱导剂雷帕霉素可加速蛋白-4-HNE 复合物的清除，而这一过程又可以被自噬抑制剂胰岛素干预^[22]。在超微结构水平，4-HNE 处理的细胞出现大量空泡、胞饮体、新月形吞噬泡和多层囊泡。ROS 产生和氧化损伤可诱导自噬发生。事实上，氧化应激是一种自噬刺激，促进损伤细胞器的清除，然而，脂质过氧化产物也可直接激活自噬途径。同 4-HNE, ox-LDL 可诱导自噬发生。将内皮细胞用 ox-LDL 处理，与用天然 LDL 处理和不处理相比，自噬加强。7-酮胆固醇是 ox-LDL 中主要的一类固醇，不仅可引起氧化损伤、蛋白-4-HNE 修饰，还可导致广泛空泡形成、蛋白泛素化和 VSMC 中 LC3 II 形成。

2.2 炎症诱导自噬

在斑块形成早期，T 细胞和单核细胞浸润动脉内膜，并释放促炎细胞因子，

如 IFN- γ 、IL-2、TNF- α ^[23]。最近研究报道, 细胞因子也参与调节自噬。事实上, TNF- α 通过 Akt/PKB 和 c-JNK 通路刺激 VSMC 的 LC3 和自噬基因 *belcin 1* 表达, 最终导致 VSMC 自噬性死亡。IFN- γ 通过免疫相关 GTP 酶 *Irgm1* 诱导巨噬细胞和非免疫细胞的自噬发生^[24]。其他免疫调节因子如 Th2 IL-4、IL-13 可抑制自噬激活 I 型 PI3K, 即 mTOR。此外, iNOS 在巨噬细胞来源的泡沫细胞中过表达, 具有细胞毒性的 NO 大量产生^[25], NO 通过形成过氧亚硝基导致氧化应激和组织损伤。过氧亚硝基一旦形成可氧化和损伤大量生物分子, 包括多不饱和脂肪酸、巯基类物质、DNA 等, 进而诱发自噬来清除这些物质^[26]。

2.3 内质网应激

在早期和晚期动脉粥样硬化斑块的巨噬细胞中, 内质网应激及未折叠蛋白反应 (UPR) 的激活显著增强^[27]。UPR 的潜在的引发因素之一即为细胞内游离胆固醇的蓄积, 其是巨噬细胞凋亡的强诱导物^[28]。游离胆固醇的蓄积在早期斑块中的巨噬细胞来源的泡沫细胞中可见, 但是这些细胞并不发生凋亡。内质网应激也是在近几年研究发现可诱导细胞自噬而维持细胞存活。GRP78 是 UPR 上调的主要靶蛋白, 分子量为 78kDa 的糖调节蛋白, 也是一种内质网分子伴侣, 也称为 BiP。GRP78/BiP 是哺乳动物细胞发生自噬的必须组分, 因为敲减或沉默这种蛋白质会导致内质网肿胀和抑制自噬小体的形成^[29]。

3 自噬在 AS 中的作用

3.1 自噬的保护作用

自噬在 AS 中的作用目前还知之甚少。由于自噬一直被认为是一种存活机制, 故推测进行性斑块损害的纤维帽中的 VSMC 自噬可能是维持斑块稳定性最重要的机制。自噬保护斑块中细胞免受氧化应激的损害, 通过降解有害物质, 去极化线粒体, 可维持细胞自身修复和存活。如果自噬不足以清除胞内损伤, 如严重的氧化应激, 线粒体内组分如细胞色素 c 释放可通过活化 caspase 级联反应而诱导凋亡。另外, 溶酶体膜的氧化损伤常可导致胞内水解酶释放, 引起胞内损伤进而发生细胞凋亡。因此, 自噬可发挥抗细胞凋亡的作用。除此之外, 自噬还可下调血液循环中的含 apoB 的脂蛋白水平, apoB 是肝细胞分泌的一种糖蛋白、人血浆脂蛋白的非脂肪成分, 是乳糜微粒 (CM)、极低密度脂蛋白 (VLDL)、低密度脂蛋白 (LDL) 的主要载脂蛋白。饮食多不饱和脂肪酸 (PUFA) 可诱导肝细胞内

apoB 的聚集, 这些 apoB 可逐渐进入溶酶体被自噬降解^[30], 从而抑制肝细胞 apoB 脂蛋白的输出, 降低血浆中乳糜微粒、极低密度脂蛋白、低密度脂蛋白, 从而抑制动脉粥样硬化的进展。

3.2 自噬的不利作用

自噬在 AS 中的发生可能与蜡样质形成有关。蜡样质存在于 AS 斑块中, 是一种蛋白和氧化脂质的不溶性复合物。Lee 等^[31]报道, 铁离子与蜡样质沉着物定位于斑块的泡沫样巨噬细胞或 VSMC 内。在人 AS 斑块中, 许多细胞含有大量含蜡样质的溶酶体, 但蜡样质不能被溶酶体酶水解, 而越来越多的溶酶体酶又进入含蜡样质的溶酶体内, 此时溶酶体功能受损, 最终导致自噬无效并诱导凋亡。受损溶酶体进一步刺激损害的线粒体累积、ROS 生成增多和蜡样质形成^[32]。

另外, 与基础自噬相反, 过度刺激自噬会导致自噬性 VSMC 死亡^[33], 进而导致斑块去稳定, 这是由于 VSMCs 合成胶原减少, 纤维帽逐渐变薄。自噬性内皮细胞死亡可能对斑块也有不利影响, 因为内皮的损伤或死亡也是由病灶血栓形成导致的急性临床事件的一种主要机制。

4 总结与展望

自噬可通过降解细胞内被损坏的大分子物质或细胞器抗凋亡, 并有助于细胞在不利条件下进行自我修复, 维持细胞存活。因此基础性自噬可能有有抗凋亡作用, 对于维持斑块稳定有重要作用。然而, 过度自噬, 可能诱发细胞凋亡, 去斑块稳定性可加重 AS 的进展。自噬广泛发生在 AS 发生发展过程中涉及的 VEC、VSMC 及巨噬细胞中。由于 VEC 功能异常是发生 AS 的起始因素, VEC 受损后带来的一系列炎症反应、血小板粘附聚集、血栓形成等等成为 AS 进展的关键环节, 因此, VEC 自噬水平的高低可能直接影响 AS 病变的发展。而 VSMC 是维持斑块稳定的重要细胞, VSMC 自噬异常将可能导致胶原合成降低, 导致动脉粥样硬化斑块不稳定而易于破裂。巨噬细胞自噬异常可导致斑块脂核的形成和扩大, 影响着斑块的稳定性及血栓的形成。另外, 还存在诸多诱发自噬的潜在因素, 如氧化应激、炎症等等。由此看来, 自噬在 AS 中的作用是双重的, 在 AS 病变的不同阶段, 自噬水平也各异, 自噬的在各细胞内的调控机制也错综交叉。AS 是一种慢性炎症性病变, 导致血管壁产生粥样斑块, 故可考虑利用特异性药物, 如通过选择性诱导巨噬细胞的自噬性死亡, 但对于维持斑块稳定的 VSMC 不受影

响,从而达到稳定易损或有破裂倾向的粥样斑块免受进一步的损伤的目的。综上所述,自噬参与 AS 的发生发展,机制错综复杂,深入了解自噬在 AS 中的作用、调控机制以及调节自噬相关信号通路的关键分子,将有可能为 AS 的防治提供新的治疗策略及治疗靶点。

参考文献

1. Hansson, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 2005, 352, 1685–1695.
2. Kannel WB, D'Agostino RB, Sullivan L, et al. Concept and usefulness of cardiovascular risk profiles [J]. *Am Heart J*, 2004, 148(1): 16–26.
3. Linton MF, Fazio S. A practical approach to risk assessment to prevent coronary artery disease and its complications [J]. *Am J Cardiol*, 2003, 92(1A): 19i–26i.
4. Wim Martinet, Guido R.Y. De Meyer .Autophagy in Atherosclerosis A Cell Survival and Death Phenomenon With Therapeutic Potential. *Circ Res.* 2009; 104:304-317.
5. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead[J]. *Cell*, 2001, 104(4): 503–516.
6. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2006, 8(1-2): 152–162.
7. Menghini R, Casagrande V, Marino A, et al. MiR-216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1029.
8. Salabei JK ,Cummins TD ,Singh M, et al. PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress[J].*The Biochemical Journal*,2013,451(3):375-388.
9. Qin L,Wang Z ,Tao L, et al.ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy[J].*Autophagy*,2010,6(2):239-247.
10. Wang RC ,Wei Y ,An ZZ , et al. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation[J].*Science*,2012,338(6109):956-959.
11. Keil E, Hocker R,Schuster M ,et al. Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45b-Mekk4-p38 pathway inhibits autophagy[J].*Cell Death Differ*,2013,20(2):321-332.
12. Choi CH, Lee BH, Ahn SG, et al. Proteasome inhibition induced p38 MAPK/ERK signaling regulates autophagy and apoptosis through the dual phosphorylation of glycogen synthase kinase 3β[J].*Biochem Biophys Res Commun*,2012,418(4):759-764.
13. Wildgruber M, Swirski FK, Zerneck A, et al. Molecular imaging of inflammation in atherosclerosis[J].*Theranostics*,2013,3(11): 865-884.
14. Christian P, Sacco J, Adeli K. Autophagy:Emerging roles in lipid homeostasis and metabolic control[J].*Biochemicaet Biophysica Acta*,2013,1831(4): 819-824.
15. Ouimet M, Franklin V, Mak E, et al. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cell via lysosomal acid lipase [J].*Cell Metab*, 2011, 13(6):655-667.

16. Zhai C, Cheng J, Mujahid H, et al. Selective Inhibition of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway Regulates Autophagy of Macrophage and Vulnerability of Atherosclerotic Plaque[J].*PloS one*,2014,9(3):e90563.
17. Rocznik-Ferguson A, Petit CS, Froehlich F, Qian S, Ky J, Angarola B, Walther TC, Ferguson SM. The transcription factor TFEB links mTORC1 signaling to transcriptional control of lysosome homeostasis. *Sci Signal*. 2012 Jun 12; 5(228):ra42.
18. Sardiello M, Ballabio A. Lysosomal enhancement: a CLEAR answer to cellular degradative needs [J].*Cell Cycle*, 2009, 8(24), 4021-4022.
19. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research [J]. *Cell*, 2010, 140(3):313-326.
20. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000; 407:233–241.
21. Porter NA. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods Enzymol*. 1984; 105:273–282.
22. Hill BG, Haberzettl P, Ahmed Y, Srivastava S, Bhatnagar A. Unsaturated lipid peroxidation-derived aldehydes activate autophagy in vascular smooth-muscle cells. *Biochem J*. 2008; 410:525–534.
23. Frostegard J, Ulfgren AK, Nyberg P, Hedin U, Swedenborg J, Andersson U, Hansson GK. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory (Th1) and macrophage-stimulating cytokines. *Atherosclerosis*. 1999; 145:33–43.
24. Deretic V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol*. 2006; 18:375–382.
25. Cromheeke KM, Kockx MM, De Meyer GRY, Bosmans JM, Bult H, Beelaerts WJ, Vrints CJ, Herman AG. Inducible nitric oxide synthase colocalizes with signs of lipid oxidation/peroxidation in human atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res*. 1999; 43:744–754.
26. Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal*. 2006; 8:152–162.
27. Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2005;111: 1814–1821.
28. Tabas I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ*. 2004;11:S12–S16.
29. Li J, Ni M, Lee B, Barron E, Hinton DR, Lee AS. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ*. 2008;15:1460–1471.
30. Pan M, Maitin V, Parathath S, Andreo U, Lin SX, St GC, Yao Z, Maxfield FR, Williams KJ, Fisher EA. Presecretory oxidation, aggregation, and autophagic destruction of apoprotein-B: a pathway for late-stage quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105: 5862–5867.
31. Lee FY, Lee TS, Pan CC, Huang AL, Chau LY. Colocalization of iron and ceroid

- in human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*. 1998; 138: 281–288.
32. Kurz T, Terman A, Brunk UT. Autophagy, ageing and apoptosis: the role of oxidative stress and lysosomal iron. *Arch Biochem Biophys*. 2007; 462:220–230.
 33. Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest*. 2005; 115:2679–2688.

Insights Into Methods Of Identifying And Quantifying Protein-Protein Interactions

姓名：柯尊辉 学院：基础医学院 专业：生物化学与分子生物学 学号：
2015203010022

[Abstract] Protein-protein interactions have been gradually verified to play critical roles both in biological processes and in developing new drugs. The determination of structure of protein complexes has been attracting great interest of researchers since the structural biology rose for that could reveal mechanism of how proteins interact with each other intuitively and it is essential to detect protein-protein interactions and purify them based on the interactions before determine their structures of complexes. A series of methods for detecting and analyzing protein-protein interactions therefore are explored. Currently, there are three classifications of approaches for studying protein-protein interactions that are named *in vitro*, *in vivo* and *in silico* methods. The *in vivo* and *in vitro* methods, also termed the experimental techniques, lay the foundation for the development of *in silico* method. However, though lots of attempts has been utilized to improve each approaches, inevitable disadvantages somewhat exist. In this review, ways of the experiment used universally for analysis of protein-protein interactions and comparison between different approaches will be discussed.

[Key Words] protein-protein interactions; yeast two-hybrid system; co-immunoprecipitation; GST-Pull down; tandem affinity purification; surface plasmon resonance; far-western blotting; fluorescence resonance energy transfer

1. Introduction

Protein-protein interactions (PPIS) have been gradually deciphered to be involved in almost every program of cellular activities(1)-(8), such as DNA replications and transcriptions, expression of proteins and posttranslational modification, signal transductions, cell senescence and apoptosis, cell proliferation and differentiation, and some others. Large researches have revealed that at least 80% proteins do not perform their functions as a single one but in complexes. An intricate network of PPIs *in vivo* is constituted by large proteins, some of which interact with others by transient contact and some do by forming permanent complexes (09). PPIs play a central role not only in maintaining orderly operation of cellular but also in resulting diseases (10). Based on these researches in recent several decades, new drugs based on protein-protein interactions and structures of molecular complexes for therapies (11) are exploring and that has been a hot topic in medical biology. With the accomplishment of Human Genome Project (HGP), thousands of proteins, most of which are not been completely revealed about their functions, have been found.

Therefore, to study protein-protein interactions is of great significance and researchers are racing to switch their research to PPIs. As a consequence, in order to meet the requirements of detecting PPIs, varieties of methods are developed. Initially, experimental methods for PPIs, including the *in vivo* and *in vitro* methods, are mainly exploited, such as Y2H, Co-IP, SPR, TAP and GST-Pull down and so on. Recently, with the database of PPIs enriched by experimental methods, computerized approaches, named the *in silico* methods, also become to prevail (12)-(15). And approaches via computer simulation or operated on the computer could efficiently detect large numbers of proteins that unknown and their interplays with the proteins that we have known well. Recently, protein-protein interactions (PPIs) has been one of the critical topics in biology research and development.

2. Experimental methods for identifying protein-protein interactions

It is universally acknowledged by most researchers that if proteins interact with others, they will form the complexes and these complexes or specific changes caused by the complexes could be detected and/or quantified (09). Presently, all the experimental methods to identifying protein-protein interactions (PPIs) are based on that viewpoint. Frequently-used experimental methods for studying PPIs include yeast two-hybrid system, co-immunoprecipitation, GST-Pull down, tandem affinity purification, surface plasmon resonance, far-western blotting and fluorescence resonance energy transfer and so on.

2.1 Yeast two-hybrid system

The yeast two-hybrid system (Y2H) was initially founded and utilized for detecting PPIs in 1989 by Fields and Song (16). The fundamental of Y2H for studying PPIs is that lots of transcription factors in eukaryotic cells that could regulate the transcription of a specific gene named report gene contain two domains, the DNA binding domain (BD) that is responsible for binding with DNA and the transcriptional activation domain (AD) that relate to activate the transcription of report gene. Only the two domains are closed to each other spatially may they induce the transcription of report DNA. We combine the nucleic sequences of a protein named ligand to the nucleic sequence of AD of a transcriptional factor, as well as the other protein named receptor to BD, and two fusion proteins, ligand with AD and receptor with BD, will be expressed (16). If the ligand and receptor interact with each other, the production of report gene could be detected.

The Y2H is universally used for analysis PPIs because of its advantages of easy accessibility, low costs and it could detect transient and weak PPIs (17). However, this method may cause high rate of false positive, as well as the false negative (17), which fail to reflect the actual reactions between two proteins. And in yeast, only the fusion proteins enter into cell nucleus can they activate the transcription of report gene, but parts of proteins have no nuclear localization sequences (NLS) or have other subcellular organelles localization sequences.

In order to overcome the disadvantages aforementioned, many improved

approaches and technologies are explored and that makes the use of Y2H in mammal and bacteria a reality (18)-(19). Whereas, Split TEV technology overcomes the restriction of false localization of fusion proteins (20).

The Y2H remains to be the fashionable methods for studying protein-protein interactions and it has been applied universally in studying protein interactome in varieties of species (21-25), such as yeast, nematode, drosophila, human, rice.

2.2 *Co-immunoprecipitation*

As well as the Y2H, a reliable approach, co-immunoprecipitation (Co-IP), is also used widely in PPIs researches. Based on the high and specific affinity between antibody and antigen expressed in cellular or bacteria, two proteins interacting with each other, one of which is combined with a tag, could be purified as a complex by affinity purification and then their interactions could be confirmed by western blotting or mass spectrum.

Frequently-used tags, the monoclonal antibodies of which are easy to access and have a high rate and lower time of combination with tags, includes flag, HA, c-myc, Protein A, GFP, 6*His. Among all the tags, GFP is rarely used in Co-IP but frequently utilized in detecting the expression quantity and localization in the subcellular of the fusion proteins via its observability (26)-(27).

Few years ago, Qing Chen etc. (28) reported a technique so-called the visual chip-based coimmunoprecipitation that could rapidly analysis PPIs which could analyse numbers of proteins at the same time and that greatly increased the efficiency. And Hong-Won Lee etc. (29) developed a novel Co-IP analysis called real-time single-molecular coimmunoprecipitation that could observe transient and weak PPIs at real time. Co-IP has its superiorities that it needs a few steps, little samples, lower costs and could conserve the modification of proteins, and it also takes the ability to detect transient and weak PPIs. But, generally, Co-IP has a low specificity that there are lots of aspecific binding proteins in the elution. Therefore, potential protein-protein interactions detected by Co-IP must be verified by other approaches such as SPR, FRET.

2.3 *GST Pull-down*

GST Pull-down is one of the common approaches for studying PPIs in vitro. The DNA sequence of bait protein is combined to the DNA sequences of glutathione-S-transferase (GST) and a fusion protein is expressed in cellular or bacteria. The fusion protein, which could capture proteins of lysate that interact with bait protein, is fixed to glutathione affinity resin via their high specific affinity (30).

GST Pull-down has a critical application in protein-protein interactions related to diseases. Lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) regulates large numbers of proteins in expression and formation of lipoprotein complexes, which is related to Alzheimer disease. Using GST Pull-down to research the interaction between the sequence Asn-Pr-X-Tyr (NPXY) of LRP1 in cytoplasmic region and the proteins in brain of mice suffering Alzheimer disease, Guttman etc. (31) discover that NPXY₄₅₀₇ interacts with many proteins through binding their tyrosine that phosphorylated and

NPXY₄₄₇₃ just interplays with few proteins that phosphorylated on tyrosine.

Compared to Co-IP, GST Pull-down could detect more PPIs at the same time and it has a high efficiency. However, the bait proteins of GST Pull-down are usually expressed in exogenous systems and they may lack posttranslational modifications. And, the combination of proteins is *in vitro*, as a result, the technology fails to reflect the real PPIs *in vivo*.

2.4 *Tandem affinity purification*

Tandem affinity purification (TAP) is a well-used method for purifying protein complexes that was reported by Rigaut *et al.* (32) in 1999 for the first time. Whereafter, using TAP to analyse PPIs on a large scale in different species emerged continuously (33)-(34). What TAP differ from Co-IP and GST Pull-down is that the bait protein of TAP is combined with double tags. Traditional tags used for TAP are constituted of protein A, digestible protein sequence that could be digested by TEV Protease and calmodulin-binding peptide (CBP) and they form up a complex. To reduce the rate of false positive, two steps of affinity purification are needed in TAP assays (35). First, protein A of the tag complexes are bound to IgG agar beads via high and specific affinity. After washing, the digestible protein sequences are digested by TEV Protease and the Bait-Protein A complexes are released. For the second step, the released complexes are bound to calmodulin beads based on their affinity between CBP and beads. And then, the protein complexes bound to calmodulin beads are eluted after washing and are identified by tandem mass spectra or other approaches.

Compared with other techniques for PPIs, TAP has its special superiorities that include higher specificity and conserving the modification of proteins *in vivo*. However, though, this method need much costs and samples and it can not detect the transient and weak PPIs (36), it is adopted in many research fields. To solve the problem that ubiquitylation can not tolerate severe conditions, Tagwerker *et al.* (37) reported a novel tag complex for TAP named HB, which was constituted of RGSG₆, 6*His and BIO and could cope with violent circumstance and 258 ubiquitin proteins are successfully identified from yeast by that tag.

In order to meet much more needs for studying PPIs, varieties of tags for TAP are explored. If the proteins of interest have the low molecular weight and big tags may influence their activities, small tags like SH-TAP, Flag-HA would be a ideal choice. And LAP helps to observe the localization of proteins of interest in cellular.

2.5 *Surface plasmon resonance*

The application of surface plasmon resonance (SPR), which has the ability to quantitatively analyse PPIs, dynamic characteristics and affinity, offers a powerful means for studying PPIs. The principle of SPR is based on that the optical properties would make changes that could be detected at real time when proteins of interest flow through immobilized ligand and form a complex (38). The data and quantity of PPIs could be acquired from induction curve.

SPR has a high sensitivity so that it could detect weak PPIs and little samples are needed during analysis. And, associated with mass spectra, SPR could realize that

sequences of proteins that bind to the ligand could be identified at the same time (39). No tags and stains are required in SPR approaches so that it could conserve the modification, natural structure and activity of proteins that exist in cellular. It is reported that some researchers combine SPR system with a newfangled active nanolayers to detect and identify the concentration of Zn^{2+} and that makes SPR a more universal application (40). But, because there is the limitation of high expense and it is time consuming, SPR technique is difficult to be widely generalized and other methods for identifying PPIs like Co-IP, Y2H must be operated and potential positive results of PPIs are detected before using SPR approach.

2.6 *Far-western blotting*

Far-western blotting, derives from western blotting, is frequently used in analyzing protein-protein interactions. In far-western blotting assays, samples of proteins of interest, also called the “prey”, are isolated by gel electrophoresis, transferred and immobilized to a membrane like nylon or nitrocellulose (NC) membrane, and then probed by the bait proteins that could be detected directly or are marked by enzyme, fluorescein, or other materials that are convenient to be observed (41).

What the far-western blotting particularly differ from other approaches for PPIs, such as GST-Pull down, Co-IP, and TAP, and so on, which may detect the interactions between three or more proteins, is that the target proteins are separated and immobilized on a membrane in advance and that makes the binding between target proteins and bait proteins to be not affected by non-target proteins, which presents the direct interactions between proteins and increases the sensitivity of probe. Thus, Co-IP or GST-Pull down assays are usually used before the application of far-western blotting to confirm direct interactions.

However, a deficiency inevitably goes with far-western blotting is that the target proteins are often denatured during the procedure of gel electrophoresis and transferring and the probe proteins are likely to be difficultly or absolutely not preyed. As a result, it is hard or impossible to detect the interactions that require active, folded, and native target proteins that exist in cellular. Therefore, far-western blotting is often utilized to detect domain-peptide interactions. Sato etc. (42) use improved far-western blotting to analyse transient and weak PPIs via the technique could enhance observability of the positive bands. And this approach could test if the interaction is direct or indirect, if indirect, candidate proteins could be explored for the next step.

2.7 *Fluorescence resonance energy transfer*

Fluorescence resonance energy transfer (FRET) was found by Forster in 1948 to be a high efficient technology for detecting spatial distance of molecular, which now has been a widely-used method for analyzing protein-protein interactions in cellular. The theory of FRET is based on that the spectrum of fluorescent molecular receptors would make changes when accepting optical energy from fluorescent molecular suppliers closed to the receptors and those changes are associated with the spatial distance between two molecules and could be detected (43). Combining fluorescent molecular receptors and suppliers with two proteins in cellular respectively, if the two

fusion proteins interact with each other, the two fluorescent molecular would stay close to each other and specific spectral changes would be probed.

Compared with other approaches, FRET has the ability to detect interactions in situ of cellular and reflect real distance of interactions it could present the localization of proteins in cellular intuitively (44). If increased the amount of fluorescent molecules, FRET could detect direct or indirect interactions between more proteins (45). But, because the proteins existing interactions with each other may astrict the contact of fluorescent molecular receptors and suppliers, the spectra changes happen in a low rate and that would result in false negative (46). And the optical wavelength of fluorescent molecular receptors may overlap with suppliers, which will influence final result (46).

3. Conclusion

Interactions between thousands of proteins exist diversity that we have not known and every method for analyse PPIs has its advantages and disadvantages that result in that available approaches fail to accurately predict interactions at a 100% rate. It is particularly important to combine different methods to identify PPIs and the in silico methods would be a complement to the experiment approaches. The unknown interactions may propel new techniques to be developed.

[1-46]

References

- [1] Daitoku H, Sakamaki J, Fukamizu A. Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2011. 1813(11): 1954-60.
- [2] Raczynska KD, Ruepp MD, Brzek A, et al. FUS/TLS contributes to replication-dependent histone gene expression by interaction with U7 snRNPs and histone-specific transcription factors. *Nucleic Acids Res*. 2015. 43(20): 9711-28.
- [3] Lu Y, Kucharski TJ, Gamache I, Blanchette P, Branton PE, Teodoro JG. Interaction of adenovirus type 5 E4orf4 with the nuclear pore subunit Nup205 is required for proper viral gene expression. *J Virol*. 2014. 88(22): 13249-59.
- [4] Gahoi N, Ray S, Srivastava S. Array-based proteomic approaches to study signal transduction pathways: prospects, merits and challenges. *Proteomics*. 2015. 15(2-3): 218-31.
- [5] Huynh TN, Chen LL, Stewart V. Sensor-response regulator interactions in a cross-regulated signal transduction network. *Microbiology*. 2015. 161(7): 1504-15.
- [6] Horstman A, Fukuoka H, Muino JM, et al. AIL and HDG proteins act antagonistically to control cell proliferation. *Development*. 2015. 142(3): 454-64.
- [7] Sastre-Perona A, Santisteban P. Wnt-independent role of beta-catenin in thyroid cell proliferation and differentiation. *Mol Endocrinol*. 2014. 28(5): 681-95.
- [8] Manfe V, Biskup E, Johansen P, et al. MDM2 inhibitor nutlin-3a induces apoptosis and senescence in cutaneous T-cell lymphoma: role of p53. *J Invest Dermatol*. 2012. 132(5):

- 1487-96.
- [9] Irene M.A.Nooren and Janet M.Thornton. Diversity of protein-protein interactions, The EMBO Journal Vol. 22 No. 14 pp. 3486-3492, 2003
- [10] Tran MK, Kurakula K, Koenis DS, de Vries CJ. Protein-protein interactions of the LIM-only protein FHL2 and functional implication of the interactions relevant in cardiovascular disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1863(2):219-28.
- [11] Sanghvi M, Moaddel R, Wainer IW. The development and characterization of protein-based stationary phases for studying drug-protein and protein-protein interactions. *J Chromatogr A*. 2011. 1218(49): 8791-8.
- [12] Jacobs TM, Kuhlman B. Using anchoring motifs for the computational design of protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans*. 2013. 41(5): 1141-5.
- [13] Zhu, W.Chen, Y. P. Computational developments in microRNA-regulated protein-protein interactions. *BMC Syst Biol*. vol 8.(2014)
- [14] Tuncbag N, Gursoy A, Keskin O. Prediction of protein-protein interactions: unifying evolution and structure at protein interfaces. *Phys Biol*. 2011. 8(3): 035006.
- [15] Durmus S, Cakir T, Ozgur A, Guthke R. A review on computational systems biology of pathogen-host interactions. *Front Microbiol*. 2015. 6: 235.
- [16] Rezwan, M, Auerbach, D. Yeast "N"-hybrid systems for protein-protein and drug-protein interaction discovery. *Methods*. 2012. 4: 423-9.
- [17] Ito T, Ota K, Kubota H, et al. Roles for the two-hybrid system in exploration of the yeast protein interactome. *Mol Cell Proteomics*. 2002. 1(8): 561-6.
- [18] Stynen B, Tournu H, Tavernier J, Van Dijck P. Diversity in genetic in vivo methods for protein-protein interaction studies: from the yeast two-hybrid system to the mammalian split-luciferase system. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012. 76(2): 331-82.
- [19] Hu JC. Model systems: Studying molecular recognition using bacterial n-hybrid systems. *Trends Microbiol*. 2001. 9(5): 219-22.
- [20] Wehr MC, Laage R, Bolz U, Fischer TM, Grünewald S, Scheek S, Bach A, Nave KA, Rossner MJ. Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV. *Nat. Methods*, 2006, 3(12): 985–993.
- [21] Peter Uetz, Loic Giot, Gerard Cagney, Traci A. Mansfield, Richard S. Judson³, James R. Knight, Daniel Lockshon, Vaibhav Narayan³, Maithreyan Srinivasan, Pascale Pochart, Alia Qureshi-Emili, Ying Li, Brian Godwin, Diana Conover, Theodore Kalbfleisch, Govindan Vijayadamodar, Meijia Yang, Mark Johnston, Stanley Fields & Jonathan M. Rothberg. A comprehensive analysis of protein±protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *nature*. 2000. 403. 623-627
- [22] Li S, Armstrong CM, Bertin N, et al. A map of the interactome network of the metazoan *C. elegans*. *Science*. 2004. 303(5657): 540-3.
- [23] L. Giot, J.S.Bader, C.Brouwer, A.Chaudhuri, B. Kuang, Y.Li, Y.L.Hao, C.E.Oci, B. Godwin, E. Vitols, G.Vijayadamodar, P. Pochart, H. Machineni, M. Welsh, Y.Kong, B. Zerhusen, R. Malcolm, Z.Varrone, A. Collis, M.Minto, S.Burgess, L.McDaniel, E.Stimpson, F. Spriggs, J.Williams, K. Neurath, N. Ioime, M. Agee, E. Voss, K. Furtak, R. Renzulli, N. Aanensen, S.Carrolla, E. Bickelhaupt, Y. Lazovatsky, A. DaSilva,1 J. Zhong, C. A. Stanyon, R. L. Finley Jr., K. P. White, M. Braverman, T. Jarvie, S. Gold, M. Leach, J. Knight, R. A. Shimkets, M. P. McKenna, J. Chant, J. M. Rothberg.

- A Protein Interaction Map of *Drosophila melanogaster*. SCIENCE VOL 302, 1727-1736 (2003)
- [24] Rolland T, Tasan M, Charleatoux B, et al. A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell*. 2014. 159(5): 1212-26.
- [25] Raksha Singh, Mi-Ok Lee, Jae-Eun Lee, Jihyun Choi, Ji Hun Park, Eun Hye Kim, Ran Hee Yoo, Jung-Il Cho, Jong-Seong Jeon, Randeep Rakwal, Ganesh Kumar Agrawal, Jae Sun Moon, and Nam-Soo Jwa. Rice Mitogen-Activated Protein Kinase Interactome Analysis Using the Yeast Two-Hybrid System. *Plant Physiology*. 2012, Vol. 160, pp. 477–487
- [26] Reitz MU, Pai S, Imani J, Schafer P. New insights into the subcellular localization of Tubby-like proteins and their participation in the Arabidopsis-Piriformospora indica interaction. *Plant Signal Behav*. 2013. 8(8).
- [27] Huet S, Gorre H, Perrocheau A, Picot J, Cinier M. Use of the Nanofitin Alternative Scaffold as a GFP-Ready Fusion Tag. *PLoS One*. 2015. 10(11): e0142304.
- [28] Chen Q, Liu Q, Li Z, Zhong W, He W, Xu D. A visual chip-based coimmunoprecipitation technique for analysis of protein-protein interactions. *Anal Biochem*. 2010. 404(2): 244-6.
- [29] Lee, H. W. Ryu, J. Y. Yoo, J. Choi, B. Kim, K. Yoon, T. Y. Real-time single-molecule coimmunoprecipitation of weak protein-protein interactions. *Nat Protoc*. 2013.10: 2045-60
- [30] Luo L, King NP, Yeo JC, Jones A, Stow JL. Single-step protease cleavage elution for identification of protein-protein interactions from GST pull-down and mass spectrometry. *Proteomics*. 2014. 14(1): 19-23.
- [31] Guttman, M. Betts, G. N. Barnes, H. Ghassemian, M. van der Geer, P. Komives, E. A. Interactions of the NPXY microdomains of the low density lipoprotein receptor-related protein 1. *Proteomics*. 2009. 22: 5016-28
- [32] Rigaut G, Shevchenko A, Rutz B, Wilm M, Mann M, Seraphin B. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol*. 1999. 17(10): 1030-2.
- [33] Veraksa A, Bauer A, Artavanis-Tsakonas S. Analyzing protein complexes in *Drosophila* with tandem affinity purification-mass spectrometry. *Dev Dyn*. 2005. 232(3): 827-34.
- [34] Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, et al. A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol*. 2004. 6(2): 97-105.
- [35] Gerace E, Moazed D. Affinity Purification of Protein Complexes Using TAP Tags. *Methods Enzymol*. 2015. 559: 37-52.
- [36] Berggard, T, Linse, S. James. P. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*. 2007.16: 2833-42
- [37] Tagwerker C, Flick K, Cui M, et al. A tandem affinity tag for two-step purification under fully denaturing conditions: application in ubiquitin profiling and protein complex identification combined with in vivocross-linking. *Mol Cell Proteomics*. 2006. 5(4): 737-48.
- [38] Vachali PP, Li B, Bartschi A, Bernstein PS. Surface plasmon resonance (SPR)-based biosensor technology for the quantitative characterization of protein-carotenoid interactions. *Arch Biochem Biophys*. 2015. 572: 66-72.
- [39] Zhang Y, Li X, Nie H, et al. Interface for Online Coupling of Surface Plasmon Resonance to Direct Analysis in Real Time Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 2015. 87(13): 6505-9.

- [40] Fen YW, Yunus WM, Talib ZA, Yusof NA. Development of surface plasmon resonance sensor for determining zinc ion using novel active nanolayers as probe. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2015. 134: 48-52.
- [41] Jadwin, J. A. Mayer, B. J. Machida, K. Detection and quantification of protein-protein interactions by far-western blotting. *Methods Mol Biol.* 2015. 379-98.
- [42] Sato Y, Kameya M, Arai H, Ishii M, Igarashi Y. Detecting weak protein-protein interactions by modified far-western blotting. *J Biosci Bioeng.* 2011. 112(3): 304-7.
- [43] Krause CD, Izotova LS, Pestka S. Analytical use of multi-protein Fluorescence Resonance Energy Transfer to demonstrate membrane-facilitated interactions within cytokine receptor complexes. *Cytokine.* 2013. 64(1): 298-309.
- [44] Seong J, Ouyang M, Kim T, et al. Detection of focal adhesion kinase activation at membrane microdomains by fluorescence resonance energy transfer. *Nat Commun.* 2011. 2: 406.
- [45] Wallrabe, H. Sun, Y. Fang, X. Periasamy, A. Bloom, G. S. Three-color confocal Forster (or fluorescence) resonance energy transfer microscopy: Quantitative analysis of protein interactions in the nucleation of actin filaments in live cells. *Cytometry A.* 2015. 6: 580-8.
- [46] Chen H, Puhl HL 3rd, Koushik SV, Vogel SS, Ikeda SR. Measurement of FRET efficiency and ratio of donor to acceptor concentration in living cells. *Biophys J.* 2006. 91(5): L39-41.

足细胞损伤与糖尿病肾病的研究进展

摘要：糖尿病肾病（DN）是目前糖尿病最普遍的一种慢性并发症，影响着将近三分之一的糖尿病患者。高血糖是引发糖尿病肾病的关键，并能引起肾脏的一些微观结构和超微结构的改变，微观变化包括肾小球基底膜（GBM）、肾小管基底膜（TBM）增厚，系膜增生，动脉硬化和肾小球硬化。足细胞是肾小囊脏层上皮细胞，是一种终末分化细胞，附着于肾小球基底膜的外侧，连同GBM和毛细血管内皮一起构成了肾小球滤过膜的屏障。最近有研究表明，有些肾小球疾病是与足细胞损伤有关的，足细胞已经被证实在表征DN的病理变化过程中起到关键的作用，包括全血细胞减少，肾小球肥大，肾小球硬化和细胞凋亡。足细胞数量的减少和足突消失都能直接导致蛋白尿和肾小球硬化症。我们希望通过减轻足细胞损伤来减轻肾脏的负担从而缓解DN的发生和发展并为其治疗提供新的思路和方法。

关键词：糖尿病肾病；足细胞损伤；肾小球

DN是糖尿病最常见的微血管并发症，也是导致慢性肾衰竭的主要原因，在我国，糖尿病的发病率逐年增加，而在终末期肾功能衰竭的患者中，DN所占的比例也越来越高。在DN早期，临床表现为肾小球高滤过状态和蛋白尿，肾小球早期改变表现为肾小球肥大、基底膜增厚、系膜基质增多和细胞外基质蛋白如纤连蛋白、层粘蛋白和胶原等的增多^[1]。其中足细胞的损伤与其具有密不可分的关系。

1 足细胞的结构和功能

足细胞是一种高度特化的终末分化上皮细胞，由细胞体、主突和足突三部分构成。细胞体位于细胞的中央，包括线粒体、内质网、高尔基复合体、和细胞核，和主突一起悬浮在鲍曼囊中。足突作为足细胞的一种特异性的标志在鲍曼囊中；足突是足细胞的标志性特征，通过 $\alpha3\beta1$ 整合素复合体和 α - β -蛋白聚糖复合体连接于肾小球基底膜上^[2]。相邻的足突之间的裂隙由一层宽为40nm的隔膜连接，是大分子的蛋白的主要滤过屏障，裂孔隔膜是由一系列包括Nephrin、Podocin、CD2相关蛋白（CD2AP）、紧密连接蛋白（ZO-1）在内的一系列特定的蛋白组成，SD与肌动蛋白骨架密切相关，肌动蛋白的骨架支撑着整个足细胞并最终决定足细胞的形态。研究发现，Nephrin基因的失活或者在动物体内注射抗Nephrin的抗体都会引起大量蛋白尿^[3]。Podocin主要表达在足突膜上，其羧基端可以与Nephrin结合来促进Nephrin的信号转导^[4]。Nephrin与CD2AP的交互作用可以锚定Nephrin胞浆区域到足细胞的细胞骨架。ZO-1主要表达在足突上，可以通过PZD结构域将SD蛋白连接到肌动蛋白的细胞骨架上，对稳定足突的结构非常重要。足细胞结构的改变主要表现在足突增宽、融合、消失，最终导致蛋白尿等一系列肾脏疾病的产生^[5]。

足细胞复杂的结构为其高度专业化的功能奠定了基础，主要表现在一下几个方面：(i) 肾小球滤过屏障，肾小球内皮细胞、GBM、最外面的足细胞共同构成滤过屏障，足细胞表

面还覆有一层具有高度负极性的上皮细胞聚阴离子层来构成电荷屏障,足细胞还可以通过对堵塞滤过屏障的蛋白质和免疫球蛋白的去除来维持滤过屏障的滤过状态^[6]; (ii) 维护毛细血管循环的屏障,足细胞里丰富的肌动蛋白有着介于上皮细胞和间充质收缩平滑肌细胞之间的表型,这些间充质特性可以对毛细血管的收缩起到支撑作用,抵消肾小球毛细血管的静态压力; (iii) 合成和修复 GBM, GBM 的主要成分是 IV 型胶原蛋白,在胎儿的发育中,初始的 $\alpha1\alpha2\alpha1$ 网络蛋白由肾小球上皮细胞分泌,但在早期发育里,渐渐被足细胞分泌的等强大的 $\alpha3\alpha4\alpha5$ 网络蛋白所代替^[7],足细胞也分泌 GBM 的其他组分来维持 GBM; (iv) 合成和分泌肾小球内皮所需要的 VEGF^[6], VEGF 穿过 GBM 和肾小球滤过的屏障到达上皮细胞并与其上面的受体结合,从而维持有孔内皮的正常状态。

2 足细胞损伤机制

DN 病人早期就有足细胞损伤,足突融合消失、足细胞密度和数量减少、足细胞肥大变性都是足细胞损伤的表现,通过研究其损伤的机制可以从源头上来减弱足细胞损伤从而缓解 DN。

本文将从先天性、遗传性和获得性三个方面来阐述足细胞损伤机制。足细胞异常结构蛋白质的出现是导致先天性肾病综合症出现的主要原因,在这种疾病中,有几种不同的肾病蛋白基因突变导致正常的足细胞功能丧失,蛋白尿就是其损伤后最常见的病症。有研究表明,与足细胞肌动蛋白相关联的蛋白的突变会导致常染色体显性 FSGS,组成 SD 的蛋白 Podocin 的突变会导致常染色体隐性遗传激素耐药性肾病综合症和 FSGS^[9],最近发现的组成 SD 的蛋白 TRPC6 的突变也会导致遗传性蛋白尿^[10]。大多数足细胞损伤疾病的都是后天获得,可分为免疫介导和非免疫介导的。足细胞损伤的特异性免疫介导形式是膜性肾病和微小病变肾脏疾病^[11];非免疫介导的足细胞损伤有很多种,包括因感染引起的 HIV 相关肾病和 HIV 感染局部足细胞损伤的塌陷性肾小球肾病^[12]。典型的代谢原因导致足细胞损伤的是糖尿病,虽然 DN 一直被认为是肾小球系膜细胞病变产生,但也和足细胞损伤有不可分割的联系,尤其是在 DN 早期,微量蛋白尿的产生使得足细胞损害加重,反过来加重肾小球蛋白尿。有文献表明,过度紧张和压力增加了肾小球内压使得足细胞损伤,这可能是高血压、糖尿病肾病、代谢综合症、因肾单位数量减少的肾小球肾病所经历的共同途径^[13]。

3 足细胞损伤与 DN

有研究表明, DN 状态下的一系列代谢紊乱包括高血糖、脂代谢异常、高血压、血流动力学异常引起的机械应力以及血管紧张素 II、氧化应激、细胞因子等均可引起足细胞损伤

和丢失^[14]。在 DN 的发生和发展过程中，高血糖引起的血流动力学改变和糖代谢紊乱造成肾脏结构和功能损伤，大量蛋白尿的出现是最终导致肾小球硬化的一个重要原因。

正常情况下，因肾小球滤过屏障的存在，仅有少量的小分子蛋白可以在肾小球滤过，而在 DN 早期，足细胞密度和数量较正常者已经出现明显下降，足细胞及其胞核体积增大，长期的这样一个对足细胞的损伤使得患者出现轻微的蛋白尿，随着 DN 微量蛋白尿的出现，足细胞数量开始减少，而残留的足细胞为覆盖面积增大的 GBM 而代偿性肥大、足突增宽，进而使得肾小球滤过屏障通透性增加，导致大量蛋白尿产生，大量蛋白尿又反过来加重足细胞损伤，如此反复，足细胞损伤后会发生一系列表型的改变，足突融合、回缩、消失，胞体缩小，阴离子电荷减少等等，足细胞从 GBM 上脱落使得基底膜区域性裸露，SD 受到破坏，大量蛋白由此滤过，使肾小球形成“高滤过、高灌注和高跨膜压”，最终形成肾小球硬化、肾功能进行性丧失^[15]。

4 潜在的治疗靶点

4.1 阻塞血管紧张素 不论是在糖尿病引起的肾脏疾病还是非糖尿病引起的肾脏疾病中，阻塞血管紧张素能够起到比较好的治疗作用。血管紧张素可能通过改变足细胞表面的电荷而增加蛋白尿，血管紧张素 II 和其受体 AT 在足细胞表面的结合会导致足细胞损伤和肌动蛋白骨架重组，增加 IV 型胶原蛋白的产生，降低 Nephlin 的表达^[16]，其中 AT1 受体在转基因小鼠足细胞上的选择性的过度表达会自发形成肾小球硬化症^[17]。通过抑制血管紧张素的产生或阻断其受体可以减轻足细胞受损。

4.2 改善胰岛素敏感性 胰岛素可以通过 GLUT1 和 GLUT4 蛋白作用于足细胞骨架蛋白发挥作用^[18]。从缺乏 Nephlin 的肾小球上分离出来的足细胞对胰岛素无反应，其摄取葡萄糖的能力也较野生型足细胞大大降低，并推测改善胰岛素的敏感性可能会减少足细胞损伤。

4.3 全反式维甲酸 (ATRA) 大量研究表明，给予 ATRA 刺激足细胞损害的小鼠可以很大程度上改善蛋白尿，可能的机制是通过预防 Nephlin 和 Podocin 这两种蛋白的减少来维持 SD 的功能，ATRA 还能够减轻 HIV 病毒转基因小鼠的肾小球硬化症^[19]，ATRA 对于改善足细胞损伤的积极作用还有待发现。

4.4 雌激素受体 Catanuto 等研究发现，17- β -雌二醇和他莫昔芬处理组 db/db 小鼠的蛋白排泄率、肾小球体积和基质蓄积较安慰剂组明显下降^[20]；17- β -雌二醇和他莫昔芬亦可使下体内足细胞 TGF β 表达水平，导致 p38MAPK 和 caspase-3 表达下降，最终延缓足细胞凋亡^[21]，并由此判断 17- β -雌二醇和他莫昔芬可以通过上调雌激素 β 受体表达，控制足细胞信号转导

途径。

综上，DN 是糖尿病严重的并发症，临床上以蛋白尿和肾功能损害为主要特征，近年来人们对足细胞的认识有所提高，足细胞超微结构和功能的改变在发病机制中占有重要地位，而我们对发病机制的深入了解可以从分子生物学、病理学水平出发，通过减轻足细胞损伤来缓解 DN，新的治疗方案有望被开发来改变足细胞损伤引起的肾脏疾病负担。

参 考 文 献

- [1] Bieke F. Schrijvers, An S. De Vriese, Allan Flyvbjerg. From Hyperglycemia to Diabetic Kidney Disease: The Role of Metabolic, Hemodynamic, Intracellular Factors and Growth Factors/Cytokines [J]. *Endocr Rev*,2004,25(6):971-1010.
- [2] Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD 1993 The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The Collaborative Study Group. *N Engl J Med* 329:1456–1462
- [3] Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Hara M, Shimada N, Ebihara I, Koide H 2000 Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 15:1379–1383
- [4] S.J. Shankland The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis Elsevier .12(2006),pp.2131–2147
- [5] P. Mundel, W. Kriz Structure and function of podocytes: an update *Anat Embryol*, 192 (1995), pp. 385–397
- [6] T.U.C. Nakamura, S. Suzuki, M. Hara, et al. Urinary excretion of podocytes in patients with diabetic nephropathy *Nephrol Dial Transplant*, 15 (2000), pp. 1379–1383
- [7] J. Ashley Jefferson, M.D., F.R.C.P. Charles E. Alpers, M.D: Podocyte Biology for the Bedside *Am J Kidney Dis* . 2011 November ; 58(5): 835–845.
- [8] Banas MC, Banas B, Hudkins KL, et al. TLR4 links podocytes with the innate immune system to mediate glomerular injury. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Apr;19(4):704–713.
- [9] Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney Int*. 2008 Jul;74(1):22–36.
- [10] Appel D, Kershaw DB, Smeets B, et al. Recruitment of podocytes from glomerular parietal epithelial cells. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Feb;20(2):333–343.
- [11] Thorner PS, Ho M, Eremina V, Sado Y, Quaggin S. Podocytes contribute to the formation of glomerular crescents. *J Am Soc Nephrol*. 2008 Mar;19(3):495–502.
- [12] Korgaonkar SN, Feng X, Ross MD, et al. HIV-1 upregulates VEGF in podocytes. *J Am Soc Nephrol*. 2008 May;19(5):877–883.
- [13] Agarwal R. Vitamin D, proteinuria, diabetic nephropathy, and progression of CKD. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009 Sep;4(9):1523–1528.
- [14] Liu Y, Liang W, Yang Q, Ren Z, Chen X, Zha D, Singhal PC, Ding G (2013) IQGAP1 mediates angiotensin II-induced apoptosis of podocytes via the ERK1/2 MAPK signaling pathway. *Am J Nephrol* 38:430–444.
- [15] Greka A, Mundel P (2012) Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol* 74:299–323.
- [16] Shirato I., Sakai T., Kimura K., Tomino Y., Kriz W. Cytoskeletal changes in podocytes

associated with foot process effacement in Masugi nephritis. *American Journal of Pathology*. 1996;148(4):1283–1296.

[17] Mizuno M, Sada T, Kato M, Koike H 2002 Renoprotective effects of blockade of angiotensin II AT1 receptors in an animal model of type 2 diabetes. *Hypertens Res* 25:271–278

[18] Pagtalunan M. E., Miller P. L., Jumping-Eagle S., et al. Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;99(2):342–348. doi: 10.1172/JCI119163.

[19] Kriz W. Podocyte is the major culprit accounting for the progression of chronic renal disease. *Microscopy Research and Technique*. 2002;57(4):189–195. doi: 10.1002/jemt.10072.

[20] Smeets B., Moeller M. J. Parietal epithelial cells and podocytes in glomerular diseases. *Seminars in Nephrology*. 2012;32(4):357–367. doi: 10.1016/j.semnephrol.2012.06.007.

[21] D'Agati V. D., Kaskel F. J., Falk R. J. Focal segmental glomerulosclerosis. *The New England Journal of Medicine*. 2011;365(25):2398–2411. doi: 10.1056/nejmra1106556.

FABP5 在 LDL 氧化中作用的探究

姓名：王贵玲

院系：生化与分子

学号：

2015203010024

摘要：动脉粥样硬化性疾病(Atherosclerosis, AS)是心血管系统最常见的疾病。氧化修饰的低密度脂蛋白(Oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)在动脉粥样硬化的发生和发展过程中起着重要的作用。但是目前 LDL 的氧化过程尚不明确。本实验在实验室原有的基础上计划通过研究 FABP5 在细胞内的表达,进一步研究它与各种脂肪酸的关系从而揭示 LDL 的氧化过程,为 AS 的研究与防治提供理论依据。

关键词： AS LDL 的氧化 FABP5 脂肪酸 互相作用

研究背景：心血管疾病具有发病率第一、致残率第一、死亡率第一等特点,根据我国卫生部编写的中国心血管疾病报告显示中国心血管病现患者至少 2.3 亿,每年心血管疾病死亡 300 万,这么严峻的数字表明心血管疾病已成为威胁我国人民健康的头号杀手^[1],其中在致残、致死的心血管疾病中,75%以上是动脉粥样硬化性疾病(Atherosclerosis, AS)(Lewis 2009)。AS 是一组动脉硬化的血管病中常见的最重要的一种,其特点是受累动脉病变从内膜开始。一般先有脂质和复合糖类积聚、出血及血栓形成,纤维组织增生及钙质沉着,并有动脉中层的逐渐蜕变和钙化,病变常累及弹性及大中等肌性动脉,一旦发展到足以阻塞动脉腔,则该动脉所供应的组织或器官将缺血或坏死^[2]。由于在动脉内膜积聚的脂质外观呈黄色粥样,因此称为动脉粥样硬化。其临床症状主要决定于血管病变及受累器官的缺血程度^[3]。

早期动脉粥样硬化病变引起一系列炎症反应,如内皮渗透性增加以及黏附因子 ICAM 和 VCAM 的表达。这就导致越来越多的白细胞(主要是单核细胞)渗透到内皮下,在这里分化成巨噬细胞。与此同时,LDL 能够轻易的从动脉血管壁的内皮细胞层渗入到动脉血管壁的内层组织中。在高脂血症的情况下,LDL 持续进入内皮下,而 LDL 的清除效率远远赶不上渗透率,堆积的 LDL 被自由基或者活化的血管细胞产生的 ROS 氧化。氧化型 LDL 显示细胞毒性以及促炎特性,能够影响血管细胞正常的生理功能,加重内皮损伤,巨噬细胞大量吞噬氧化型 LDL (oxidated-LDL,ox-LDL),最终导致泡沫细胞和脂纹的形成。LDL 在 AS 中有着重要的作用,但是它的氧化机制目前还不清楚^[4]。作为动脉粥样硬化病变的细胞模型,巨噬细胞被推测是低密度脂蛋白氧化主要介质^[5,6]。巨噬细胞已被证明通过活性氧^[7],脂氧合酶^[8]和髓过氧化物酶(MPO)^[9]的产生来调节低密度脂蛋白氧化。为了更好的研究脂质筏氧化过程,在我们实验室之前的研究中发现利用天然的 LDL 刺激小鼠的 Raw264.7 细胞 15min 可以促进脂质筏的聚集,诱导脂质筏的形成,并且能够调控巨噬细胞中的各种蛋白的表达量改变,同时促进脂质筏蛋白组分发生转位^[4],这一系列的研究提示我们把脂肪酸代谢和血管炎症反应联系起来,脂类物质可能通过和相关蛋白作用参与 LDL 氧化和炎症反应,采用脂质组学的方法研究主动氧化过程中脂质介质的变化,可能为揭示血管稳态失衡到恢复稳态过程提供重要的实验依据。

实验基础：我们已经证明天然的 LDL 在 LDL 氧化过程中诱导脂质筏的形成,LDL 刺激细胞 15min 后,脂质筏蛋白组分发生转位,在脂质筏的定量蛋白组学数据中,我们发现脂肪酸结合相关蛋白(FABP)脂肪酸合成酶(FASN)在 LDL 刺激后有所增加(log₂ ratio >0)刺激后有所增加;而本实验室另一组数据研究 Raw264.7 细胞经 LDL 诱导 15min 后脂质筏中脂类物质是否发生变化,与对照组相比,经 LDL 诱导的 Raw264.7 细胞脂质筏中单不饱和脂肪酸(MUFAs)与 n-9 不饱和脂肪酸(UFAs)组分增加;多不饱和脂肪酸(PUFAs)和 n-6 UFAs 组分减少,改变了细胞脂筏的脂肪微环境。脂筏中棕榈酸、十六烯酸、油酸、硬脂酸和二十四烯酸显著升高,而亚油酸、花生四烯酸和二十碳三烯酸显著降低;GM₁ 含量和胆固醇

醇含量都显著增高^[11]。数据表明,经 LDL 诱导的 Raw264.7 细胞脂质筏中的脂类物质确实发生了变化,预示动脉粥样硬化形成过程的脂质筏中可能会出现这些异常情况,有利于我们进一步研究 LDL 氧化过程中脂类物质的作用及其与蛋白质的相互作用,有利于进一步研究 LDL 氧化过程中脂类物质的作用及其与蛋白质的相互作用。

脂肪酸结合蛋白(fatty - acid - binding protein, FABP)是一种低相对分子质量的胞内脂质分子伴侣,按其最先发现或分离的组织来源而命名,包括脂肪细胞型(adipocyte FABP, A - FABP/FABP4/aP2)、表皮型(epidermal FABP, E - FABP/FABP5/mal1)、肝脏型(liver FABP, L - FABP/FABP1)、肠型(intestinal FABP, I - FABP/FABP2)、心肌型(heart FABP, H - FABP/FABP3)、回肠型(ileal FABP, II - FABP/FABP6)、脑型(brain FABP, B - FABP/FABP7)、髓磷脂型(myelin FABP, M - FABP/FABP8)和睾丸型(testis FABP, T - FABP/FABP9)等,并且具有组织特异性^[10]。为了探究 LDL 氧化过程中脂类物质的作用及其与蛋白质的相互作用,我们挑取了一个变化明显的蛋白—脂肪酸结合蛋白 FABP5 对其进行细致研究。

FABP5 属于脂质结合蛋白超家族的一员,分子量大小为 15 kD,它与脂肪酸和相关的化合物(胆汁酸或类维生素 a)结合的能力很强,主要参与细胞脂肪酸的代谢、转运,在长链脂肪酸的摄取、转运及代谢调节和炎症反应中发挥着重要作用^[11]。FABP5 在表皮细胞、脂肪细胞、巨噬细胞和肺泡上皮细胞中均有表达^[12-15],有研究指出, FABP5 的表达促进了脂肪细胞和巨噬细胞中的炎症反应和新陈代谢反应^[16-18]。它广泛分布于哺乳动物的多种组织中,免疫组织化学染色显示脑胶质瘤样本中 FABP5 阳性染色主要定位于细胞质中^[19]。在一个微环境中,脂肪酸结合蛋白 aP2(脂肪酸结合蛋白(FABP)4)和 mal1(EFABP)是密切相关的,两者都是在脂肪细胞表达。除了与脂肪酸结合相关,缺乏 EFABP / mal1 还易导致系统性胰岛素敏感性增加。脂肪细胞分离 mal1-缺陷型老鼠还表现出增强的葡萄糖运输能力。相比之下,老鼠在脂肪组织表达高水平的 mal1 显示系统性胰岛素减少活动。它在炎症相关疾病和动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)糖尿病和肥胖病等代谢中的关键作用越来越引起研究者的重视^[20-21]。

实验设计:我们的实验方案如下:

将 Raw264.7 细胞经 LDL 分别诱导 1h, 3h, 5h 后利用 Qpcr 技术对 FABP5 基因的表达进行定量分析。

(小鼠 Raw264.7 巨噬细胞用 DMEM 培养基,添加 10%新生牛血清和 1%青链霉素,置于二氧化碳培养箱中,在 5% CO₂ 于 37℃ 条件下培养。5×10⁸ 个细胞在无血清 DMEM 培养基中同步化过夜,用 LDL (终浓度 100μg/mL,含终浓度为 1μM 的 Cu²⁺) 分别刺激细胞 1h, 3h, 5h。收集细胞,加 tritol,利用 法提取细胞总 RNA. 利用 RNA 逆转录试剂盒进行逆转录,获得细胞 cDNA。

②设计引物,在 pubmed 中得到小鼠 FABP5mRNA 序列,设计两对引物:正向引物:ACGGTGGCCGAGAGCA. 反向引物:CACTCCTGGCAGCTAACTCCT; 正向引物:AGAGCAGTGAAGACGACTG. 反向引物:AAGCCCTCATTGCACCTTCT. 对引物进行测定功能正常。

③利用设计好的引物进行 Qpcr 实验,对小鼠 FABP5 基因的表达进行测定,与内参进行对比,结果预测,小鼠 FABP5 基因表达量升高。

2.将 Raw264.7 细胞经 LDL 分别诱导 1h,3h,5h 后利用 WB 技术对 FABP5 基因的在蛋白表达水平进行定量分析。

①小鼠 Raw264.7 巨噬细胞用 DMEM 培养基,添加 10%新生牛血清和 1%青链霉素,置于二氧化碳培养箱中,在 5% CO₂ 于 37℃ 条件下培养。5×10⁸ 个细胞在无血清 DMEM 培养基中同步化过夜,用 LDL (终浓度 100μg/mL,含终浓度为 1μM 的 Cu²⁺) 分别刺激细胞 1h, 3h, 5h。收集细胞,将细胞裂解液加入皿中在冰上裂解 10min,刮尽细胞,并收集到以标好的 1.5mlEP 管中,在预冷离心机中离心。

②在 96 孔板中设计好空白孔 3 组，标准蛋白孔组 3 组，试验孔 3 组进行蛋白浓度的测定，配平浓度，将五分之一体积的 5*SDS 上样缓冲液加入样品中混合。放入沸水中煮沸使之变性。接着进行 Western Blot.

③主要步骤有制胶，电泳分离，样品上样，转膜，封闭，附一抗，附二抗，显影，最后进行条带分析。与内参进行对比，结果预测，小鼠 FABP5 蛋白表达量升高。

3. 利用磷脂酶活性测定试剂盒分析小鼠 Raw264.7 巨噬细胞脂质筏中磷脂酶 A1, A2, B1, B2 活性有没有变化，结果预测，鼠 Raw264.7 巨噬细胞脂质筏中磷脂酶 A1, A2, B1, B2 活性升高。

讨论;有研究指出，FABP5 的表达促进了脂肪细胞和巨噬细胞中的炎症反应和新陈代谢反应^[55,56]。FABP5 与 AS 密切相关，且我们预测经 LDL 诱导的 Raw264.7 细胞脂质筏的 FABP5 在转录和翻译水平都会有所升高，在 LDL 刺激后,脂质筏中脂肪酸和 FABP5 同步升高，更进一步证明了我们的推测 FABP5 和脂肪酸相互作用参与 AS 中 LDL 氧化过程，所以我们计划下一步进行 FABP5 在脂质筏中的转位，进一步研究 FABP5 与不同脂肪酸之间的相互作用结构域是否有特异性及脂肪酸转运机制是否与 LDL 氧化有关，为揭示 LDL 氧化机制提供重要的实验依据。

参考文献

1. Zoungas S, McGrath BP, Branley P, Kerr PG, Muske C, Wolfe R, Atkins RC, Nicholls K, Fraenkel M, Hutchison BG et al: Cardiovascular morbidity and mortality in the Atherosclerosis and Folic Acid Supplementation Trial (ASFAST) in chronic renal failure: A multicenter, randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 47: 1108-1116, 2006.
2. Yoshida H and Kisugi R: Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta* 411: 1875-1882, 2010.
3. 宋健, 脂质筏参与巨噬细胞 Raw264.7 介导的低密度脂蛋白的氧化[J]. 武大图书馆, 2016
4. JIAN SONG, LING-YAN PING, DUC M. DUONG, XIAO-YAN GAO, Native low density lipoprotein promotes lipid raft formation in macrophages, 2015
5. Chisolm GM III, Hazen SL, Fox PL and Cathcart MK: The oxidation of lipoproteins by monocytes - macrophages. Biochemical and biological mechanisms. *J Biol Chem* 274: 25959-25962, 1999.
6. Müller K, Carpenter KL and Mitchinson MJ: Cell mediated oxidation of LDL: Comparison of different cell types of the atherosclerotic lesion. *Free Radic Res* 29: 207-220, 1998.
7. Chen K, Thomas SR and Keaney JF Jr: Beyond LDL oxidation: ROS in vascular signal transduction. *Free Radic Biol Med* 35: 117-132, 2003.
8. Sparrow CP, Parthasarathy S and Steinberg D: Enzymatic modification of low density lipoprotein by purified lipoxygenase plus phospholipase A2 mimics cell-mediated oxidative modification. *J Lipid Res* 29: 745-753, 1988.
9. Malle E, Waeg G, Schreiber R, Gröne EF, Sattler Wand Grone HJ: Immunohistochemical evidence for the myeloperoxidase/H₂O₂/halide system in human atherosclerotic lesions: Colocalization of myeloperoxidase and hypochlorite-modified proteins. *Eur J Biochem* 267: 4495-4503, 2000.
10. 许冰冰, 低密度脂蛋白诱导巨噬细胞 Raw264.7 细胞后脂质筏中脂类物质组分的变化, 2015
11. Madsen P, Rasmussen H H, Leffers H, et al. Molecular cloning and expression of a novel keratinocyte protein (psoriasis-associated fatty acid-binding protein [PA-FABP]) that is highly up-regulated in psoriatic skin and that shares similarity to fatty acid-binding

- proteins[J]. *Journal of Investigative Dermatology*, 1992, 99(3): 299-305.
12. Ghelfi E, Karaaslan C, Berkelhamer S, et al. Fatty Acid – Binding Proteins and Peribronchia Angiogenesis in Bronchopulmonary Dysplasia[J]. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 2011, 45(3): 550-556.
 13. Maeda K, Uysal K T, Makowski L, et al. Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2003, 52(2): 300-307.
 14. Siegenthaler G, Hotz R, Chatellard-Gruaz D, et al. Purification and characterization of the human epidermal fatty acid-binding protein: localization during epidermal cell differentiation in vivo and in vitro[J]. *Biochemical Journal*, 1994, 302(2): 363-371.
 15. Furuhashi M, Ishimura S, Ota H, et al. Lipid chaperones and metabolic inflammation[J]. *International journal of inflammation*, 2011, 2011.
 16. Furuhashi M, Fucho R, Görgün C Z, et al. Adipocyte/macrophage fatty acid – binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice[J]. *The Journal of clinical investigation*, 2008, 118(7): 2640-2650.
 17. Krieg P, Feil S, Fürstenberger G, et al. Tumor-specific overexpression of a novel keratinocyte lipid-binding protein. Identification and characterization of a cloned sequence activated during multistage carcinogenesis in mouse skin[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1993, 268 (2 3) :17362-17369.
 18. Boord J B, Fazio S, Linton M R F. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis[J]. *Current opinion in lipidology*, 2002, 13(2): 141-147.
 19. 曾令成, 叶飞, 韩林, 脂肪酸结合蛋白 5 和细胞维甲酸结合蛋白 2 在脑胶质瘤中的表达肿瘤防治研究 2015.42.3
 20. Tso A W K, Xu A, Sham P C, et al. Serum Adipocyte Fatty Acid – Binding Protein as a New Biomarker Predicting the Development of Type 2 Diabetes A 10-year prospective study in a Chinese cohort[J]. *Diabetes Care*, 2007, 30(10): 2667-2672.
 21. 刁建升, 张曦. 表皮型脂肪酸结合蛋白的研究进展[J]. *国际病理科学与临床杂志*. 2009.

基于质谱的定量蛋白质泛素化修饰组学研究进展

基础医学院 袁森 2015203010023

摘要：泛素化修饰是一种被广泛研究的翻译后修饰类型，越来越多的研究表明泛素化修饰能够参与调控细胞内多种信号通路和生理功能。近年来，质谱技术突飞猛进，多种标记技术及泛素化修饰抗体富集技术广泛运用，泛素化修饰研究逐渐走向高通量、定量比较研究阶段，本文就基于质谱技术的定量蛋白质泛素化修饰组学研究方法及其最新进展做一个综述。

关键词：泛素，泛素化修饰，质谱，蛋白质修饰组学，

1. 泛素与泛素化修饰

泛素(Ubiquitin, Ub)是一种在广泛存在于真核生物中的高度保守的蛋白质，由 76 个氨基酸组成，分子量约为 85kD。在真核细胞内，泛素在 ATP 的作用下通过三个级联酶促反应与靶蛋白共价结合，形成泛素-蛋白质缀合物，该过程称为泛素化 (Ubiquitylation)。泛素化过程需要三类酶参与催化，分别是泛素激活酶 (E1)、泛素结合酶 (E2) 和泛素连接酶 (E3)。首先，在 ATP 的参与下泛素分子连接到 E1，泛素分子被激活。随后，激活的泛素分子转移到 E2，E2 传递泛素分子给 E3，E3 可以特异性招募不同的底物，最终使泛素分子连接到底物蛋白质特定的赖氨酸残基上。

泛素化修饰可分为三种不同类型：单泛素化 (monoubiquitylation)，即单个泛素分子与底物上特定的赖氨酸残基结合；多个单泛素化 (multimonoubiquitylation)，即单个泛素分子与底物上不同的赖氨酸残基相结合；多聚泛素化 (polyubiquitylation)，即由多个泛素分子通过其自身的七个赖氨酸残基 (Lys6, Lys11, Lys27, Lys29, Lys33, Lys48, Lys63) 或者第一个泛素分子的 α -氨基酸 (Met1) 末端相连延伸形成的泛素链与底物蛋白结合 (Swatek and Komander, 2016)。泛素化修饰可以参与调控细胞内多种重要功能，包括信号转导、蛋白质降解、DNA 修复以及转录调控等。

2. 基于质谱的定量蛋白质修饰组学研究方法

蛋白质修饰组学是在大规模水平上研究细胞内动态变化的蛋白质翻译后修饰的一门学科，从而在整体水平探寻不同生理、病理条件下细胞内蛋白质修饰改变的规律，揭示蛋白质修饰改变与细胞生命活动之间的联系。

随着质谱技术在蛋白质组学研究中的应用，人们可以利用质谱技术对细胞内蛋白质及其翻译后修饰进行高通量研究与分析。传统的质谱实验流程通常有以下几个步骤：组织或细胞样品蛋白提取，胰酶酶解，色谱分离肽段，质谱分析，数据处理等。相较于传统的质谱实验流程，基于质谱的定量蛋白质修饰组学实验流程主要增加了标记过程和翻译后修饰肽段富集过程等。在泛素化修饰组学研究中，主要利用能够识别泛素化肽段“-K-ε-GG”结构域的抗体进行富集(Mertins et al., 2013)。根据不同的研究需要，可以采用不同的标记方法和翻译后修饰肽段富集方法并联合使用一种或多种质谱检测手段。

基于质谱的定量蛋白质修饰组学研究方法主要分成两大类：相对定量研究法和绝对定量研究法。相对定量蛋白质修饰组学研究可以检测不同生理、病理条件或受到某种刺激后，样品翻译后修饰的相对变化情况，但不能提供化学计量值信息，而绝对定量蛋白质修饰组学研究则可以提供翻译后修饰变化的化学计量值信息。目前相对定量法在蛋白质修饰组学研究仍占主流地位，根据是否采用标记技术可以将相对定量蛋白质修饰组学研究方法分为：非标 (Label-free) 定量法以及标记定量法。以下对几种常用的相对定量蛋白质修饰组学研究方法进行介绍。

2.1. 非标 (Label-free) 定量法

非标 (Label-free) 定量法相比标记定量法具有不受样本数量限制、样本种类广泛、实验耗费低等优势。近几年，Label-free 法在蛋白质修饰组学研究中得到逐步应用，可以用于多种翻译后修饰的定量。该方法是在蛋白质酶解成肽段后，对需要研究的翻译后修饰肽段进行富集，再利用高精度质谱进行相对定量分析 (Swaney et al., 2013)。Label-free 定量法多用于以组织为样本的定量蛋白质修饰组学研究，因不需要用到昂贵的同位素标记，所以该方法的实验流程也较为简便，在临床研究和植物研究等领域都有广泛应用。

2.2. 标记定量法

根据标记引入方式的不同，可以将标记定量法分为代谢标记定量法、化学标

记定量法和酶解后标记定量法。代谢标记法：标记物在细胞培养过程中引入并把样品在细胞水平进行混合；化学标记法：标记物在样品提取为蛋白质后引入并进行混合；酶解后标记法：标记物在样品裂解为肽段后引入并进行混合。

常用的基于标记技术的相对定量蛋白质修饰组学研究方法主要可以分为以下两大类：酶解后标记（post-trypsinization labeling）和细胞培养过程中的稳定同位素标记（stable isotope labeling with amino acids in cell culture, SILAC）(Cox and Mann, 2011; Ordureau et al., 2015; Shao-En Ong, 2002)。

酶解后标记法可以用于标记不能被代谢标记的组织样本，主要包括串联质量标签法（tandem mass tagging, TMT）和等重同位素标记相对与绝对定量法（isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ）(Dayon et al., 2008; Ross et al., 2004; Thompson et al., 2003)。该研究方法是通过等重标记试剂（如 TMT、iTRAQ 等）标记肽段，再利用串联质谱检测报告离子的强度来进行定量的。以 TMT 等重标记试剂为例，进行相对定量时，TMT 试剂可以实现对蛋白质酶解肽段的十重标记(McAlister et al., 2012)，每个等重标签包含一个报告离子（质量范围为 126-131），报告离子将在质谱的高能碰撞诱导解离（HCD）下从等重标签上释放。在等量混合样品后，二级质谱可以通过检测 HCD 碎片对每个肽段的报告离子进行定(Thomas Ko"cher, 2009; Wu et al., 2013)。然而，由于具有相似荷质比的肽段会在一级质谱中被共同分离出来，在二级质谱中目标报告离子的信号会被相似的报告离子干扰，导致蛋白质定量结果不准确。不过，这个问题可以通过串联三级质谱得到解决，把二级质谱 HCD 碎片进一步化学诱导解离（CID），在三级质谱中检测报告离子强度从而进行定量(McAlister et al., 2014; Ting et al., 2011)。

在以可传代细胞为样本的定量修饰组学研究中，对细胞进行代谢标记可能是个更好的选择。在早期研究中，SILAC 标记法是通过在细胞培养过程中，加入轻重同位素标记的赖氨酸（或精氨酸），从而使标记肽段之间质量差别保持恒定，再用质谱比较 2-3 个细胞样品之间的差别(Shao-En Ong, 2002)。然而，借助于高精度质谱在该领域的应用，在传统 SILAC 标记法基础上改进的中子编码（neutron encoding, NeuCode）SILAC 标记法的标记范围得到很大的提升，可以实现多重样品标记(Hebert et al., 2013; Merrill et al., 2014)。

3. 基于质谱的定量蛋白质泛素化修饰组学研究进展

泛素化修饰参与调控生物体内多种生命活动，是研究最为广泛的几种翻译后修饰类型之一，基于质谱的定量蛋白质泛素化修饰组学研究也越来越多。

在细胞功能和信号转导机制研究领域，Silva 等研究者(Silva et al., 2015)对啤酒酵母 (yeast *Saccharomyces cerevisiae*) 的研究发现，K63 泛素化是一种新的氧化应激反应调控机制。他们利用 SILAC 定量蛋白质组学方法，鉴定出 100 余种从未报道过的 K63 泛素化靶点，其中主要是核糖体蛋白。后续研究发现，过氧化物抑制了去泛素酶 Ubp2，从而导致 Rad6 泛素结合酶与 Bre1 泛素连接酶共同参与装配的 K63 泛素化的积聚，帮助细胞表达 Trx1, Prx1 等抗氧化蛋白从而度过危机。Martin Zoltner 等研究者(Zoltner et al., 2015)同样利用 SILAC 定量蛋白质组学方法，在对非洲锥虫表面蛋白的研究中，发现了泛素化在非洲锥虫表面蛋白 ISG、VSG 调控方面的重要功能。

在植物研究领域，Xin Xie 等研究者(Xie et al., 2015)通过分析水稻叶片细胞蛋白质泛素化修饰谱，发现了 861 个具有“-K-G-G”结构的泛素化修饰位点。经过后续生物信息学分析，发现了多种泛素化蛋白对水稻叶片细胞中的多条信号通路产生影响，泛素化蛋白质对细胞内钙调过程和叶片细胞生长发育具有显著影响，该研究也为后续水稻泛素化修饰研究奠定了基础。

在医学基础和临床诊断研究领域，Takefumi Kikuchi 等研究者(Kikuchi, 2012)和 Pei-Jun Liu 等研究者(Liu et al., 2015)都利用蛋白质组学方法对非小细胞肺癌 (Nonsmall Cell Lung Cancer, NSCLC) 与正常肺组织的蛋白表达差异进行研究，揭示了 NSCLC 的发生机制，找到 NSCLC 的治疗靶点和诊断标志物。Minzhi Zha 等(Zhao et al., 2015)利用定量蛋白质组学方法，对 Abraxane (一种人类蛋白、白蛋白结合型紫杉醇，可用于治疗 NSCLC) 敏感型和耐受型 NSCLC-A549 细胞系的研究中发现多种差异蛋白，其中包括泛素连接酶 RNF139 和 HMGCS1 等显著差异蛋白。该研究揭示了 NSCLC 耐药细胞对纳米药物的独特抗药反应。除了直接寻找不同组织间蛋白质表达的差异外，研究不同生理、病理状态下细胞内蛋白质修饰以及多种修饰之间的关系也是目前的一个热点。Wu Quan 等研究者(Wu et al., 2015)利用 SILAC 定量蛋白质组学技术结合翻译后修饰抗体富集技术，对伏立诺他 (一种常用的组蛋白去乙酰化抑制剂) 处理下 NSCLC-A549 细胞系进行研究，发现细胞内 2968 种蛋白质、1099 个乙酰化位点和 1012 个泛素化位点发生变化。通过生

物信息学分析, 揭示了伏立诺他处理下 NSCLC-A549 细胞系内总蛋白质与泛素化、乙酰化变化之间交叉对话, 增进了我们对伏立诺他治疗 NSCLC 的认识。

越来越多的研究者利用该方法比较不同生理、病理条件下的泛素化修饰组的差别以及多种翻译后修饰类型之间的交叉对话, 修饰组学技术让我们能够大规模、全方位、整体分析细胞内翻译后修饰的变化, 这是超越传统方法的一个重大优势。相信大规模组学分析联合生物学信息学以及系统的功能研究将是未来研究的热点方式之一。

参考文献

- [1] Cox, J., and Mann, M. (2011). Quantitative, high-resolution proteomics for data-driven systems biology. *Annual review of biochemistry* 80, 273-299.
- [2] Hebert, A.S., Merrill, A.E., Bailey, D.J., Still, A.J., Westphall, M.S., Strieter, E.R., Pagliarini, D.J., and Coon, J.J. (2013). Neutron-encoded mass signatures for multiplexed proteome quantification. *Nature methods* 10, 332-334.
- [3] Kikuchi, T.H., M.Amann, J. M.Liu, Q.Slebos, R. J. C.Rahman, S. M. J.Kaufman, J. M.Zhang, X.Hoeksema, M. D.Harris, B. K.Li, M.Shyr, Y.Gonzalez, a. L.Zimmerman, L. J.Liebler, D. C.Massion, P. P.Carbone, D. P. (2012). In-depth Proteomic Analysis of Nonsmall Cell Lung Cancer to Discover Molecular Targets and Candidate Biomarkers. *Molecular & Cellular Proteomics* 11, 916-932.
- [4] Liu, P.-J., Chen, C.-D., Wang, C.-L., Wu, Y.-C., Hsu, C.-W., Lee, C.-W., Huang, L.-H., Yu, J.-S., Chang, Y.-S., Wu, C.-C., *et al.* (2015). In-depth Proteomic Analysis of Six Types of Exudative Pleural Effusions for Nonsmall Cell Lung Cancer Biomarker Discovery. *Molecular & Cellular Proteomics* 14, 917-932.

- [5] McAlister, G.C., Huttlin, E.L., Haas, W., Ting, L., Jedrychowski, M.P., Rogers, J.C., Kuhn, K., Pike, I., Grothe, R.A., Blethrow, J.D., *et al.* (2012). Increasing the multiplexing capacity of TMTs using reporter ion isotopologues with isobaric masses. *Analytical chemistry* *84*, 7469-7478.
- [6] McAlister, G.C., Nusinow, D.P., Jedrychowski, M.P., Wuhr, M., Huttlin, E.L., Erickson, B.K., Rad, R., Haas, W., and Gygi, S.P. (2014). MultiNotch MS3 enables accurate, sensitive, and multiplexed detection of differential expression across cancer cell line proteomes. *Analytical chemistry* *86*, 7150-7158.
- [7] Merrill, A.E., Hebert, A.S., MacGilvray, M.E., Rose, C.M., Bailey, D.J., Bradley, J.C., Wood, W.W., El Masri, M., Westphall, M.S., Gasch, A.P., *et al.* (2014). NeuCode labels for relative protein quantification. *Molecular & cellular proteomics : MCP* *13*, 2503-2512.
- [8] Mertins, P., Qiao, J.W., Patel, J., Udeshi, N.D., Clauser, K.R., Mani, D.R., Burgess, M.W., Gillette, M.A., Jaffe, J.D., and Carr, S.A. (2013). Integrated proteomic analysis of post-translational modifications by serial enrichment. *Nature methods* *10*, 634-637.
- [9] Ordureau, A., Munch, C., and Harper, J.W. (2015). Quantifying ubiquitin signaling. *Molecular cell* *58*, 660-676.
- [10] Shao-En Ong, B.B., Irina Kratchmarova, Dan Bach Kristensen, Hanno Steen, Akhilesh Pandey, Matthias Mann (2002). Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture, SILAC, as a Simple and Accurate Approach to Expression Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 376-386.
- [11] Silva, G.M., Finley, D., and Vogel, C. (2015). K63 polyubiquitination is a new

modulator of the oxidative stress response. *Nature structural & molecular biology* 22, 116-123.

[12] Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., Krogan, N.J., and Villen, J. (2013). Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nature methods* 10, 676-682.

[13] Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell research* 26, 399-422.

[14] Thomas Ko"cher, † Peter Pichler,‡ Michael Schutzbier,† Christoph Stingl,† Axel Kaul,§Nils Teucher,§ Gerd Hasenfuss,§ Josef M. Penninger,| and Karl Mechtler†,| (2009). High Precision Quantitative Proteomics Using iTRAQ on an LTQ Orbitrap: A New Mass Spectrometric Method Combining the Benefits of All. *Journal of Proteome Research*.

[15] Ting, L., Rad, R., Gygi, S.P., and Haas, W. (2011). MS3 eliminates ratio distortion in isobaric multiplexed quantitative proteomics. *Nature methods* 8, 937-940.

[16] Wu, L., Candille, S.I., Choi, Y., Xie, D., Jiang, L., Li-Pook-Than, J., Tang, H., and Snyder, M. (2013). Variation and genetic control of protein abundance in humans. *Nature* 499, 79-82.

[17] Wu, Q., Cheng, Z., Zhu, J., Xu, W., Peng, X., Chen, C., Li, W., Wang, F., Cao, L., Yi, X., *et al.* (2015). Suberoylanilide hydroxamic acid treatment reveals crosstalks among proteome, ubiquitylome and acetylome in non-small cell lung cancer A549 cell line. *Scientific reports* 5, 9520.

[18] Xie, X., Kang, H., Liu, W., and Wang, G.L. (2015). Comprehensive profiling of the

rice ubiquitome reveals the significance of lysine ubiquitination in young leaves. *J Proteome Res* *14*, 2017-2025.

[19] Zhao, M., Li, H., Bu, X., Lei, C., Fang, Q., and Hu, Z. (2015). Quantitative Proteomic Analysis of Cellular Resistance to the Nanoparticle Abraxane. *ACS Nano* *9*, 10099-10112.

[20] Zoltner, M., Leung, K.F., Alsford, S., Horn, D., and Field, M.C. (2015). Modulation of the Surface Proteome through Multiple Ubiquitylation Pathways in African Trypanosomes. *PLoS pathogens* *11*, e1005236.

周瑞

2015203010020

动脉粥样硬化发病的炎症机制及相关治疗药物

摘要 动脉粥样硬化是一种通过脂质的累积、平滑肌细胞的增殖和钙化而引起的一种动脉损伤为特征的疾病。随着动脉粥样硬化病变和机理的研究更加透彻，现在有了更多的方法阻止动脉粥样硬化，抗动脉粥样硬化药物研究发展迅速。本文对近年来几种主要的抗动脉粥样硬化药物在抗动脉粥样硬化症中研究进展进行了综述。

关键词 动脉粥样硬化；炎症反应；抗动脉粥样硬化药

动脉粥样硬化（*atherosclerosis*, AS）是一种慢性动脉疾病，可引起冠心病和脑梗死等，是严重危害人类健康的常见病、多发病。在发达国家以及一些发展中国家，动脉粥样硬化性心血管疾病的发病率呈逐年上升趋势，被称为“头号杀手”。

动脉粥样硬化(*atherosclerosis*, AS)系指在动脉及其分支的脉管壁内膜和内膜下有脂质沉着,以胆固醇及胆固醇酯为主,同时伴有中层平滑肌细胞向内膜移行、增殖,使内膜增厚而形成粥样病灶或纤维脂质斑块病灶的一种疾病。动脉粥样硬化是一个复杂的病理过程,到目前为止,As 的发病机制尚未完全清楚,存在多种学说,涉及多种危险因素,以至于临床缺乏有效的防治药物^[1]。大量基础和临床研究表明,致 As 的危险因素包括高脂血症、高血压、高血糖、高纤维蛋白原血症、高半胱氨酸血症、高尿酸血症、肥胖、肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RASS)活化、吸烟、凝血功能亢进(组织因子、凝血酶)、微量元素代谢失调、自体生物活性物质(如 5-羟色胺、NO、内皮素-1 等)代谢紊乱^[2]、慢性应激^[3]等,而对于解释 As 发病机制的学说目前学术存在多种理论,如氧化应激理论和脂质浸润理论等,从不同角度对其发生、发展机制进行了阐明,但是迄今为止还没有一种理论能够全面地阐明动脉粥样硬化的发病机制。近年来随着基础医学的不断发展,国内外学者分别从感染、炎性反应及免疫学等多个方面入手,提出了动脉粥样硬化发病机制的新学说^[4],其中以 Ross^[5]及 Libby 等^[6]提出的炎症学说最为突

出。目前,抗动脉粥样硬化新药的研究发展非常迅速,现将近年来的抗动脉粥样硬化药物作一简单综述。

1 炎症反应在动脉粥样硬化中的作用及机制

动脉壁内皮损伤及脂质的沉积是目前公认的 AS 始动因素^[7],其基本过程如下:血管内皮细胞受某些因素如:高血压、高脂血症等的刺激发生损伤后,发生功能改变和渗透性增高。血液中的脂质在内皮下沉积。随后单核细胞黏附在内皮细胞损伤处进入内皮下,吞噬脂质成为泡沫细胞,形成脂肪斑。血小板也逐渐聚集并黏附于内皮的损伤处。吞噬细胞、内皮细胞及黏附于内皮细胞损伤处的血小板释放生长因子刺激平滑肌细胞进入内膜,增生并合成胶原纤维,脂肪斑演变成纤维斑块。此时脂质进一步沉积,沉积的脂质进一步加重吞噬细胞的黏附、血小板的聚集和炎性反应因子的释放。随着这一过程的发展,脂质不断沉积,多种炎性细胞逐渐浸润,纤维帽渐渐变薄,慢慢演变为不稳定斑块。以不稳定斑块的裂缝、糜烂或破裂为基础形成血栓,最终导致严重心脑血管损害^[8-10]。

1999年,Ross等(*N Engl J Med*)提出了动脉粥样硬化的“损伤反应”学说,此后,越来越多的研究结果提示动脉粥样硬化实质上为血管受损后发生的一种炎症过程。

炎症反应贯穿于动脉粥样硬化发生和发展的整个过程:在动脉粥样硬化起始阶段,血液中的白细胞(主要是淋巴细胞和单核细胞)向血管内皮损伤处迁移和粘附,进而穿过内皮,在内皮下积聚。在此阶段中,选择素(如 P 选择素和 E 选择素)、细胞间粘附分子(ICAM)及血管细胞粘附分子(VCAM)参与了白细胞的积聚过程并发挥了重要作用——选择素可介导白细胞在内皮表面滚动; ICAM 和 VCAM 可介导白细胞向内皮细胞迁移、粘附和穿越内皮的行为。白细胞一旦在内皮下积聚,其与内皮细胞产生的炎症因子将使血管局部的炎症反应长期存在。其间,单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)可刺激单核细胞形成巨噬细胞,后者与氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)结合形成泡沫细胞。泡沫细胞可因过量吞入脂质而发生破裂,或在炎症因子作用下凋亡,在细胞外形成脂质池使病灶进一步恶化。此外,巨噬细胞和受损的内皮细胞还会释放白细胞介素 IL-6、IL-8 和 MCP-1 等因子,进一步诱发炎症反应的级联放大。随着炎症的不断进展,内皮细胞和白细胞还可释放成纤维生长调节因子,促使血管平滑肌细胞增殖进入动脉内膜,表达大量的

细胞因子和粘附分子,进而参与炎症反应,并促进动脉粥样硬化中细胞外基质形成。值得一提的是,炎症反应在动脉粥样硬化斑块破裂中也发挥着重要作用:平滑肌细胞可产生间质胶原以维持斑块的稳定,而激活的巨噬细胞可产生多种基质金属蛋白酶,后者可有效降解间质胶原蛋白和其他细胞外基质蛋白,使斑块易于破裂;同时,激活的白细胞也可抑制斑块表面间质胶原的更新,增加其脆性,使斑块破裂的可能性增大^[11]。

2 抗动脉粥样硬化药物

2.1 抗炎药物

近来研究显示,炎症过程中的多种因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、核转录因子 κ B(NF- κ B)和 Rho 家族 GTP 酶等均与动脉粥样硬化的发生发展密切相关,且陆续有研究证实,一些药物可通过作用于这些因子发挥抗动脉粥样硬化作用,提示可将上述因子开发为动脉粥样硬化治疗靶点。

2.1.1 肿瘤坏死因子- α 及其抑制剂

TNF- α 为一种强效促炎症细胞因子,在类风湿性关节炎中起关键作用,并可加速动脉粥样硬化的进程。曾有临床研究显示:接受 TNF- α 受体抑制剂依那西普(etanercept)、英夫利昔单抗(infliximab)和阿达木单抗(adalimumab)治疗的类风湿性关节炎患者体内的高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平较治疗前显著增加^[12]。上述研究结果提示,TNF- α 受体抑制剂或可开发为治疗动脉粥样硬化及心血管疾病的药物。

2.1.2 核转录因子 κ B 及其抑制剂

NF- κ B 为炎症过程中的关键调控因子,对多种细胞因子(如 TNF- α 和 IL 等)水平具有调节功能,故在动脉粥样硬化的病程中也发挥着重要作用。研究人员发现,血管紧张素受体阻滞剂厄贝沙坦(irbe-sartan)可在动脉粥样硬化形成的早期减缓炎症发生进程,从而达到抵抗动脉粥样硬化的效果;随后在成年雄性 ApoE 基因敲除小鼠中进行的机制研究显示,厄贝沙坦可抑制其主动脉中由 NF- κ B 介导的 TNF- α 、VCAM-1、MCP-1 和 IL-6 等炎症因子的表达^[13]。

2.1.3 Rho 家族 GTP 酶及其抑制剂

Rho 家族 GTP 酶(如 Rho、Rac1 和 Ras)为真核细胞内重要的信号传递分子,系许多膜表面受体(如 G 蛋白偶联受体和细胞因子受体等)的下游效应蛋白,在细

胞信号传递过程中发挥着分子开关作用。Rho 家族 GTP 酶与 GTP 结合时具有信号转导活性，可进而与下游的效应分子结合；Rho 家族 GTP 酶将 GTP 水解为 GDP 后，即丧失信号转导活性。近来研究表明：Rho 家族 GTP 酶可参与动脉粥样硬化中血管平滑肌细胞、内皮细胞和外膜细胞等的迁移、增殖、凋亡及相关基因的转录^[14]，该酶异常活化是心血管疾病的发生机制之一。研究显示，他汀类药物可通过作用于 Rho 家族 GTP 酶而发挥抗血管壁炎症和抗动脉粥样硬化的作用^[15]。

2.1.4 抑制白细胞聚集和转运的药物

在动脉粥样硬化发生过程中，白细胞会向血管内皮损伤处迁移和粘附，随之引发炎症反应，并促使动脉粥样硬化不断加重，因此，许多参与白细胞粘附到血管壁的因素都被认为是动脉粥样硬化的治疗靶点。其中，选择素(如 P、E 和 L 选择素)、白细胞整合粘附分子、NF- κ B、促炎症细胞因子(如 IL-1、IL-2、IL-6 和 IL-18)、抗炎细胞因子(如 IL-1 受体拮抗剂、IL-9、IL-10 和 IL-11)、趋化因子(如 MCP-1 和 RANTES)、基质细胞衍生因子 1(SDF-1)，以及巨噬细胞抑制因子(MIF)和其受体等，这些因子在动脉粥样硬化^[16]发生时迅速、大量地表达，在动脉粥样硬化发展中发挥了关键作用^[17-18]。某些已上市或在研的可针对这些因子的药物均具有开发为抗动脉粥样硬化治疗药物的潜力，相关研究也已展开。有研究人员研制唾液酸化酶 X(Sialyl-LewisX, SLX)的类似物，试图通过其来影响 SLX 与选择素之间的相互作用，从而阻止白细胞向内皮细胞粘附。例如，P 选择素抑制剂 PSI-697(5)为一种 SLX 类似物，可与 P 选择素结合，从而抑制其与 SLX 结合，在大鼠中进行的体内研究已证实该化合物具有抑制血管炎症的疗效^[19]；进一步研究显示：PSI-697 可有效降低动脉粥样硬化模型小鼠血管病灶斑块大小，抑制内皮细胞表面的白细胞聚集，从而发挥抗炎和抗动脉粥样硬化的作用^[20]。

2.2 对血管调节类药物

血管壁主要是由三种细胞组成，即血管内皮细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞，其中内皮细胞受损是 As 发生的必要条件。血管内皮细胞参与多种生理及病理过程，如协调血管舒张因子与收缩因子、促凝血因子与抗凝血因子、生长抑制物与生长促进物之间的平衡等。平滑肌细胞和巨噬细胞同样参与了 As 的形成。

2.2.1 抗血小板类药物

血小板是由巨核细胞生成的血液中三种有形成分之一，具有黏附、变形、分泌、释放及聚集等功能，是生理止血和血栓形成的主要因素。抗血小板药就是通过封闭血小板膜上的受体或血小板内 TAX2 合成途径等使血小板不被激活，从而抑制血小板的粘附和聚集，对 As 的形成过程具有重要作用。大蒜素（allicin）是一直在研究的一种代表性药物。研究表明，大蒜素具有明显的抗血小板凝集作用，大蒜提取物能抑制多种化学物质诱导的血小板聚集，其抑制作用呈剂量依赖性^[21]。

2.2.2 扩张血管运动类药物

这类药物主要对血管平滑肌和内皮细胞作用，松弛血管平滑肌，舒张冠状动脉阻力血管，从而扩张血管，降低血压，达到治疗 As 的目的。

现在研究比较多的大豆异黄酮（soybean isoflavones, SI）类药物，除了调脂作用外，研究表明类黄酮物质能够抑制与动脉硬化和炎症反应相关的细胞间应答，降低粘附活性，减少免疫细胞在动脉壁上的积聚，防止泡沫细胞的生成，同时可能抑制各种致炎因子的分泌或其基因的表达^[22]。雌激素直接抑制细胞核因子活性及炎症细胞因子分泌，从而减少血管内皮细胞、平滑肌细胞增殖和转移，抑制 As 斑块的形成。

2.3 抗氧化药物

研究证实，氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)可引起细胞的坏死和凋亡，同时还可刺激细胞因子和趋化因子的分泌，加重病灶的炎症反应，诱导内皮细胞和平滑肌细胞的增生和迁移，影响 AS 病变发生发展的多个过程。抗氧化类药物可以降低机体的氧化应激状态有助于预防和阻断 AS 的发生。其代表药物为普罗布考。

根据大量的动物实验和临床研究结果普罗布考抗动脉粥样硬化的药理机制主要表现在以下 3 个方面。1)普罗布考强大的抗氧化作用，这是基础和根本，而我们已经知道，氧化是动脉粥样硬化形成的“关键”环节；2)普罗布考影响到动脉粥样硬化形成过程的许多细胞因子的基因表达；3)普罗布考促进胆固醇逆转运，降低血浆胆固醇的作用，也在某种程度上抑制了动脉粥样硬化的形成^[23]。

2.4 调节血脂类药物

脂代谢紊乱导致血脂水平异常是 As 发生的重要基础，调控血脂水平是抗 As 的关键环节。As 早期的病理表现为动脉以内膜下层平滑肌细胞与泡沫细胞的出

现和胆固醇脂类物质的沉积为主要特点。而对动脉壁和内皮细胞的生理和病理研究，粥样斑块中脂质主要来自血浆。调脂类药物通过降低血清低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、甘油三酯(TG)、升高高密度脂蛋白(HDL-C)，以及直接影响斑块成分和结构两条途径，发挥阻止斑块的形成和进展。目前，调节血脂类药物广泛应用于临床。

2.4.1 他汀类药物

他汀类药物即 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A,HMG-CoA)还原酶抑制剂，通过竞争性抑制 HMG-CoA 还原酶，使 HMG-CoA 向甲基二羟戊酸转化减少，减少 LDL-C 的生物合成。他汀类药物能够抑制平滑肌细胞增殖和血管内皮的炎性反应、稳定斑块、改善血管内皮功能、延缓动脉粥样硬化程度、保护神经和抗血栓等作用。经过临床研究已证实，他汀类药物的抗炎作用在缺血性心血管事件的预防与治疗中发挥了重要作用，学者们提出他汀类药物治疗所带来的心血管事件的减少，在很大程度上是由其抗炎性反应作用介导^[24-26]。如洛伐他汀、氟伐他汀、辛伐他汀、等等

2.4.2 贝特类与烟酸类药物

烟酸类通过抑制极低密度脂蛋白(VLDL)合成，降低血清中甘油三酯(TG)、TC、LDL-C，升高 HDL-C 调节血脂，如烟酸通过降低血浆 VLDL 和 TG，从而起到防治 AS 的作用。贝特类药物通过降低 TG、升高 HDL-C、降低血小板黏性发挥治疗 AS 的作用。目前正在研发的此类药物有 PPAR α 、PPAR γ 和 PPAR δ 激动剂^[27]。

3.结语

综上所述，目前在对 AS 的病理及发病机制不断深入了解的过程中已经研究了不少抗动脉粥样硬化药物，但由于 AS 的发病机制非常复杂，尚不完全明确，导致目前抗动脉粥样硬化药物效果不是很明显。所以，要争取不断推出新的抗动脉粥样硬化药物并使传统的抗动脉粥样硬化药物更加完善，从而给患者带来更多的好处。

相信随着临床与基础研究的不断进步，防治 AS 的方法会进一步出现，我们终将消除动脉粥样硬化对人类健康的巨大威胁。

参考文献

- [1] Roos R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 801—809.
- [2] WANG CJ, LIU JT, GUO F, et al. Endothelin-1 induces the expression of C-reactive protein in vascular smooth muscle cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 389(3): 537-542.
- [3] 李金平. 慢性应激与动脉粥样硬化 [J]. *心血管病学进展*, 2009, 30(6): 1020—1022.
- [4] Danesh J, Wheeler J G, Hirschfield G M, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease[J]. *N Engl J Med*, 2004, 350 (14) : 1387-1397.
- [5] Ross R . Atherosclerosis-an inflammatory disease[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(2): 115-126.
- [6] Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2002, 105(9): 1135-1143.
- [7] Williams J K, Sukhova G K, Herrington D M, et al. Pravastatin has cholesterol lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, 31: 684-691.
- [8] Moghadasian M H. Experimental atherosclerosis: a historical overview[J]. *Life Sci*, 2002, 70: 855-865.
- [9] Danesh J, Wheeler J G, Hirschfield G M, et al. C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease[J]. *N Engl J Med* 2004, 350: 1387-1397.
- [10] Curb J D, Abbott R D, Rodriguez B L, et al. C-reactive protein and the future risk of thromboembolic stroke in healthymen [J]. *Circulation*, 2003, 107: 2016-2020.
- [11] 覃军, 何作云. 冠状动脉粥样硬化斑块破裂的细胞与分子生物学研究进展 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2000, 8(1): 79-81. .
- [12] Serio B, Paolino S, Sulli A, et al. Effects of anti-TNF- α treatment on lipid profile in patients with active rheumatoid arthritis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1069: 414-419.
- [13] Yao R, Cheng X, Chen Y, et al. Molecular mechanisms of irbesartan suppressing atherosclerosis in high cholesterol-diet apolipoprotein E knock-out mice [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 139(2): 113-122.
- [14] 武星, 李虹伟, 李卫萍. Rho 激酶与心血管疾病 [J]. *中国心血管杂志*, 2011, 16(5): 393-395.
- [15] Rikitake Y, Liao J K. Rho GTPases, statins, and nitric oxide [J]. *Circ Res*, 2005, 97 (12): 1232-1235.
- [16] Reutershan J. CXCR2 the receptor to hit ?[J]. *DrugNews Perspect*, 2006, 19(10) : 615-623.
- [17] Aslanian A M, Charo I F. Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2006, 114(6): 583-590.
- [18] Barringhaus K G, Phillips J W, Thatté J S, et al. $\alpha 4\beta 1$ Integrin (VLA-4) blockade attenuates both early and late leukocyte recruitment and neointimal growth following carotid injury in apolipoprotein E (-/-) mice [J]. *J Vasc Res*, 2004, 41(3): 252-260.
- [19] Bedard P W, Clerin V, Sushkova N, et al. Characterization of the novel P-selectin inhibitor PSI-697 [2-(4-chloro-benzyl) -3-hydroxy-7 , 8 , 9 , 10-tetrahydrobenzo [h] quino-line-4-carboxylic acid] in vitro and in rodent models of vascular inflammation and

- thrombosis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2008, 324(2): 497-506.
- [20] Bedard P W, Kaila N. Selectin inhibitors: a patent review [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2010, 20(6): 781-793
- [21] Son E W, Mo S J, Rhee D K, et al. inhibition of ICAM-1 expression by garlic component , allicin, in gamma –irradiated human vascular endothelial cells via downregulation of the JNK signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2006, 6(12): 1788-1795.
- [22] Luz P L, Coimbra SR. alcohol and atherosclerosis [J]. *An Acad Bras Cienc*, 2001, 73: 51-55.
- [23] Tanous D, Brasen J H, Choy K, et al. Probucol inhibits instent thrombosis and neointimal hyperplasia by promoting reendothelialization [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 189(2): 342-349.
- [24] de Lorenzo F, Feher M, Martin J, et al. Statin therapy-evidence beyond lipid lowering contributing to plaque stability [J]. *Cur Med Chem*, 2006, 13(28): 3385-3393.
- [25] Ringleb PA. Thrombolytics. anticoagulants, and antiplatelet agents [J]. *Stroke*, 2006, 37(2): 312-313.
- [26] Tedgui A, Mlalat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways [J]. *Physiol Rev*, 2006, 86(2): 515-581.
- [27] Bays H, Stein EA. Pharmacotherapy for dyslipidaemia -current therapies and future agents [J]. *Opin Pharmacother*, 2003, 4(11):1901-1938.