

- [J]. J Inorg Biochem, 2013,128:221-228
- 8 Jansen T, Daiber A. Direct antioxidant properties of bilirubin and biliverdin. Is there a role for biliverdin reductase? [J]. Front Pharmacol, 2012,3:30
- 9 Parfenova H, Leffler CW, Basuroy S, *et al.* Antioxidant roles of heme oxygenase, carbon monoxide, and bilirubin in cerebral circulation during seizures [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2012, 32 (6): 1024-1034
- 10 张清队,刁军,武维恒,等. 血红素加氧酶-1 对脂肪干细胞的保护性研究[J]. 中国分子心脏病学杂志, 2016,1:1567-1569
- 11 Wegiel B, Otterbein LE. Go green: the anti-inflammatory effects of biliverdin reductase[J]. Front Pharmacol, 2012,3:47
- 12 Tayem Y, Green CJ, Motterlini R, *et al.* Isothiocyanate-cysteine conjugates protect renal tissue against cisplatin-induced apoptosis via induction of heme oxygenase-1 [J]. Pharmacol Res, 2014,81:1-9
- 13 Song S, Wang S, Ma J, *et al.* Biliverdin reductase/bilirubin mediates the anti-apoptotic effect of hypoxia in pulmonary arterial smooth muscle cells through ERK1/2 pathway[J]. Exp Cell Res, 2013,319 (13):1973-1987
- 14 Park EJ, Park SW, Kim HJ, *et al.* Dehydrocostuslactone inhibits LPS-induced inflammation by p38MAPK-dependent induction of hemeoxygenase-1 in vitro and improves survival of mice in CLP-induced sepsis in vivo[J]. Int Immunopharmacol, 2014,22(2):332-340
- 15 Yeh PY, Li CY, Hsieh CW, *et al.* CO-releasing molecules and increased heme oxygenase-1 induce protein S-glutathionylation to modulate NF-kappaB activity in endothelial cells [J]. Free Radic Biol Med, 2014,70:1-13
- 16 Libby P, Lichtman AH, Hansson GK. Immune effector mechanisms implicated in atherosclerosis: from mice to humans [J]. Immunity, 2013,38(6):1092-1104
- 17 Hassan N, El-Bassossy HM, Zakaria MN. Heme oxygenase-1 induction protects against hypertension associated with diabetes: effect on exaggerated vascular contractility [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2013,386(3):217-226
- 18 Liu D, He Z, Wu L, *et al.* Effects of induction/inhibition of endogenous heme oxygenase-1 on lipid metabolism, endothelial function, and atherosclerosis in rabbits on a high fat diet [J]. J Pharmacol Sci, 2012,118(1):14-24
- 19 Lu CY, Yang YC, Li CC, *et al.* Andrographolide inhibits TNFalpha-induced ICAM-1 expression via suppression of NADPH oxidase activation and induction of HO-1 and GCLM expression through the PI3K/Akt/Nrf2 and PI3K/Akt/AP-1 pathways in human endothelial cells [J]. Biochem Pharmacol, 2014,91(1):40-50
- 20 Meng X, Wang M, Sun G, *et al.* Attenuation of Abeta25-35-induced parallel autophagic and apoptotic cell death by gypenoside X VII through the estrogen receptor-dependent activation of Nrf2/ARE pathways [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2014,279(1):63-75
- 21 Cheng CC, Guan SS, Yang HJ, *et al.* Blocking heme oxygenase-1 by zinc protoporphyrin reduces tumor hypoxia-mediated VEGF release and inhibits tumor angiogenesis as a potential therapeutic agent against colorectal cancer [J]. J Biomed Sci, 2016,23:18
- 22 Loboda A, Jozkowicz A, Dulak J. HO-1/CO system in tumor growth, angiogenesis and metabolism-Targeting HO-1 as an anti-tumor therapy [J]. Vascu Pharmacol, 2015,74:11-22
- 23 Ram M, Singh V, Kumawat S, *et al.* Bilirubin modulated cytokines, growth factors and angiogenesis to improve cutaneous wound healing process in diabetic rats [J]. Int Immunopharmacol, 2016,30:137-149
- 24 Li L, Dong H, Song E, *et al.* Nrf2/ARE pathway activation, HO-1 and NQO1 induction by polychlorinated biphenyl quinone is associated with reactive oxygen species and PI3K/AKT signaling [J]. Chem Biol Interact, 2014,209:56-67
- 25 Chang TP, Vancurova I. NFkappaB function and regulation in cutaneous T-cell lymphoma [J]. Am J Cancer Res, 2013,3(5):433-445
- (收稿日期:2017-12-20)
- (修回日期:2018-02-06)

RGS 与心血管系统的研究进展

胡哲夫 唐其柱

摘要 G 蛋白信号调节因子(regulators of G protein signaling,RGS)是一种具有多功能的蛋白质分子大家族,它们的共性是在分子结构中拥有一个相同的核心为 130 个氨基酸残基的保守性 RGS 结构域,可以直接与活化状态下的 $G\alpha$ 亚基结合使 GTPase 降解失活,从而负性调控 G 蛋白偶联受体(G protein coupled receptor,GPCR)信号相关信号通路反应。经过多年的研究,RGS 分子可表达于 20 余种哺乳动物体内。在人体中,RGS 被证实与多种系统疾病的发生、发展密切相关,包括肺、心血管、骨骼、肿瘤的生

基金项目:国家教育部博士点基金资助项目(20130141130010)

作者单位:430060 武汉大学人民医院

通讯作者:唐其柱,教授,博士生导师,电子信箱:qztang@whu.edu.cn

长等,已成为医学领域的研究热点之一。本文就 RGS 与心血管系统的研究进展做一简要概述。

关键词 G 蛋白信号调节因子 心血管系统 G 蛋白偶联受体 研究进展

中图分类号 R541

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.11.003

一、RGS 分子的研究背景

RGS 最早被科学家发现于啤酒酵母之中,啤酒酵母 RGS 信号分子证实为 G 蛋白信号转导的负调控因子,广泛参与 G 蛋白偶联受体(GPCR)信号的多种反应。G 蛋白偶联受体家族是最大的胞膜受体成员之一并负责机体内一系列复杂的生化反应^[1-3]。当配体(ligand)结合 G 蛋白偶联受体后完成,从而激活相关的异三聚体 G 蛋白和细胞内的相关信号转导通路。G 蛋白偶联受体激酶(G-protein coupled receptor kinases,GRKs),与 β -抑制蛋白相似,具有经典的脱敏受体信号特点,从而防止 GPCR 下游的级联反应过度激活,保持胞内稳定的调控作用。近来许多研究表明,GRKs 涉及到多种心血管疾病,包括心力衰竭、心肌梗死、高血压、心脏肥大,并且已作为潜在的诊断研究目标^[4,5]。当各种原因引起交感神经兴奋时,机体内释放的儿茶酚胺刺激鸟嘌呤核苷酸(G)-蛋白偶联 β -交感肾上腺素能受体,使心率加快,收缩性加强,显著改善心脏泵血功能。在分子水平,异三聚体 G 蛋白亚基分解为 α 和 β 、 γ 3 种,反应后刺激腺苷酸环化酶增加 cAMP 的产生,并激活蛋白激酶 A-7(PKA-7),从而对机体实现精密的调控。依据 RGS 的分子大小,结构域序列的同源性及模体不同可分为 8 大亚家族,分别为 A/RZ、B/R4、C/R7、D/R12、E/RA、F/RL、H/SNX 和 G/GRK,每一家族包含不同的 RGS 分子。RGS 主要通过 3 种方式发挥作用:①调节 Ca^{2+} 信号通路;②作为支架蛋白连接 GPCR 受体和相关的信号蛋白;③控制细胞膜上的 K^{+} 和 Ca^{2+} 通道。由于 RGS 蛋白对 G 蛋白信号精密的调控作涉及到细胞生理活动的核心,因此人类对 RGS 蛋白的研究会愈发深入。

二、RGS 在心血管系统中的表达

RGS 超家族成员在多种细胞中广泛表达,而在心脏细胞中,但 RGS(1~7、9、12、14)处于 mRNA 水平^[6]。Cho 等^[7]证实人在类的心脏及主动脉内皮细胞中存在 RGS1、RGS2、RGS3S(short-form)、RGS3L(long-form)、PDZ-RGS3 及 RGS4。近年来 RGS5 被证实与肿瘤与血管增殖密切相关^[8]。Zhang 等^[9]通过 RT-PCR 检测表明,RGS2、RGS3 和 RGS5 在人的心脏表达最多,而 RGS4 只表现出非常低的水平。

另有证据表明,RGS4 主要存在于窦房结,而 RGS6 在窦房结和房室结组织中表达量最大,并参与心脏的副交感神经激活^[10]。而关于 RGS3 的报道却相对较少,尽管其在体外受到 G_q 偶联受体激动剂的刺激而上调。相关研究表明 RGS3 是 R4 亚家族蛋白成员之一^[11]。当配体结合 $\text{G}\beta\gamma$ 后使 GS3L(519 个氨基酸残基)抑制 $\text{G}\beta\gamma$ 介导的清除功能。另外,还可转换 Gi/o 偶联的毒蕈碱受体和腺苷受体诱导 Rac1 活化为 RhoA 的能力。然而,这种转换反应高度依赖内源 RGS3L 的表达水平,然而其表达量受到成纤维细胞生长因子 2(FGF2)的负调控,这种机制在心脏具有重要的病理生理学意义。近年来,RGS6 被证实通过影响 G 蛋白偶联的内向整流 K^{+} 通道实现对心率的调控作用,从而控制心房颤动及其他类型的心律失常^[12]。另一方面,RGS6 可弱化阿霉素在心脏组织中产生的活性氧簇(ROS)水平,达到抗癌的效果,且能够对抗乙醇引起的心脏损伤。随着人类对 RGS 分子研究的不断深入,其在心血管系统疾病中的地位不断被挖掘出来。既往相关研究表明 RGS4、5 蛋白分子广泛参与心肌肥厚的发生、发展过程,然而近年来,RGS2、3、6 等蛋白分子亦得到进一步的深入研究。

三、RGS 与心血管系统疾病

1. RGS3 与心肌肥厚:心肌肥厚是心脏在长期压力、容量负荷的作用下的一种慢性适应性代偿反应,是由多种神经、体液及免疫等多因素介导的复杂病理生理过程^[13]。心脏组织在这种条件下可发生心肌细胞形态学的改变,表现为心肌细胞形态增大,收缩力变强,由起初的离心性肥厚(心室腔扩大)过渡为向心性肥厚(心室壁增厚)。发生肥厚的心肌组织会逐渐失去正常的舒张及收缩反应,并影响左心室的射血功能,最终导致周围脏器的灌注不足。Liu 等^[14]通过主动脉结扎术(aortic banding)术发现,小鼠心脏在 AB 术 4 周后 RGS3 蛋白表达量有所下降,8 周后几乎没有表达,且血管紧张素-Ⅱ(Ang Ⅱ)可下调心肌细胞的 RGS3 表达量。与假手术组相比,RGS3 过表达组的心脏在心重/体重比(HW/BW),肺重/体重比(HW/BW)及肺重/胫长比(LW/TL)等指标上明显下降,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。另一方面,心脏组织切片在天狼星红染色(PSR)结果表明,AB 术

后的心脏,血管组织周围的胶原蛋白分子(collagen)沉积更为明显。随后 Liu 等^[14]进一步研究了相关的信号通路证实具体机制,Western blot 法检测结果发现该组研究证实心脏组织中 p - MEK1/2、p - ERK1/2、p - P38、p - JNK1/2、p - AKT、p - GSK3 β 等指标在 AB 组中表达量显著上调,蛋白条带密度差异有统计学意义($P < 0.05$)。该研究表明 RGS3 分子在心脏组织中可通过弱化 MEK - ERK1/2 及 AKT 信号通路保护心肌,这提示 RGS3 对于心肌梗厚的诊断及治疗是一个潜在的研究靶点。

2. RGS2/3 与心力衰竭:心力衰竭是各种心血管疾病的终末期,是各种心血管疾病发展的最后阶段^[15]。尽管人类在心力衰竭的诊断及治疗领域取得了突出成就,许多患者的预后仍然欠满意,主要仍以改善生活质量及延长生存期为治疗目标。心脏再同步治疗(CRT)已经是治疗心力衰竭疾病一种有效的方法。在装有 CRT 的心力衰竭患者中,通过使左右心室节奏达到同步收缩从而改善心脏的传导延迟,该方法可显著改善急性和慢性心力衰竭患者的心脏功能,同时有效降低了病死率。CRT 能显著提高心室的机械效率,但对于 β - 肾上腺素能受体信号通路在 HF 的治疗中有关键影响。Chakir 等^[16]通过左束消融制作犬心力衰竭模型,于第 6 周诱导心房快速起搏。该组实验结果表明,与对照组比较,CRT 组的心肌细胞表现出弱化的 G α i 信号通路。G α i 信号通路与 RGS2、RGS3 密切相关,可弱化心肌细胞中 β 2 - 肾上腺素能受体的反应。为了进一步确定 RGS2/3 在心力衰竭患者中的作用,他们继续将心力衰竭模型中的心肌细胞分为同步化组(HFsyn)与非同步化组(HFdys),通过免疫双染的方法标记 RGS2/3,结果表明同步化组的心肌细胞中,Ca²⁺ 内流及收缩能力有所提高,而 RGS2/3 的含量相对较高,证实了 RGS2/3 可显著改善心肌细胞收缩力。然而 CRT 治疗具体是否通过提高 HF 心肌细胞内部的 RGS2/3 水平还有待证实,但该团队的研究发现让科学家认识到 RGS2/3 在药理学或起搏治疗的领域开辟了新的研究视角。

3. RGS6 与心肌缺血再灌注损伤:心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)是指心肌在缺血后恢复血流后损伤反而加重,甚至发生不可逆损伤的现象^[17]。尽管科学家对 MIRI 做过大量研究,然而其确切机制仍有待阐明。缺血性心脏病是全世界死亡的主要原因。目前急性心肌缺血的治疗重点是溶栓药物和冠状动脉介入治疗的再灌注

治疗。冠状动脉再灌注对心肌组织的存活至关重要。然而,内源性信号通路是有害的或心脏缺血的识别可能会导致新的药物疗法的发展补充灌注程序和缺血性心脏病患者心肌损伤减轻。Rorabough 等^[18]通过进行小鼠心脏 RGS6 基因敲除模拟心肌缺血再灌注模型,将冠脉阻断 30min 后恢复血流,计算出心肌梗死面积。结果表明,与对照组比较,RGS6 基因敲除组小鼠心肌梗死范围明显扩大,且心肌组织中 β 2 肾上腺素能受体磷酸化水平表达量增高。另外,RGS6 基因敲除组在阻断血流后心肌细胞线粒体中 GRK2 及 c - caspase - 3 含量明显增加。该组研究人员推测,RGS6 蛋白对心肌的保护作用与 β 2AR - GRK2 - 依赖性信号转导通路密切相关。

4. RGS3 与上皮 - 间质转化现象:上皮 - 间质转化(epithelial - mesenchymal transition, EMT)近几年在科学领域已经过的而大量的研究,指上皮细胞在一定条件下,通过特定的细胞内部程序,如转化生长因子 - β 1(transforming growth factor - β 1)刺激下转化为具有间质细胞表型细胞的复杂病理生理学过程^[19]。EMT 现象在胚胎发育、炎症、组织重建、肿瘤分化生长和多种纤维化相关疾病中发挥了重要作用。在分子水平上,其主要特征为细胞黏附分子(如 E - 钙黏蛋白,E - cadherin)表达的减少、细胞角蛋白、细胞骨架转化为波形蛋白(vimentin),间质组织标记物如 N - cadherin 表达上调,细胞逐渐向具有间充质细胞特点的方向转化等方面。上皮细胞会逐渐丧失原有的细胞稳定极性,与基膜的连接减少,获得了较高的迁移与侵袭能力,并获得类似于成纤维细胞的形态。EMT 可受到各种转录因子如血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、Twist1/Twist2、ZEB1/ZEB2、Snail1/Snail2、血小板源性生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、雌激素等物质的调控,并涉及 Wnt、MAPK、NF - κ B、PI₃K/Akt、Notch 等信号通路。Yau 等^[20]通过重点研究 RGS3(519 残基亚型),该亚型中 380 ~ 519 区域包含 RGS 域。根据结合研究结果推测,RGS3 的 1 ~ 379 区域可能是通过直接结合钙离子的 EF - 手性区域(221 ~ 233 区),另一方面可介导钙依赖性 RGS3 的膜定位,推测 314 ~ 379 区域可能介导核转位;而丝氨酸可能与 RGS3 分子 14 - 3 - 3 片段相互作用,从而调节 RGS3 的部分功能,该研究表明,RGS3 可与转录调控因子 Smad2、Smad3 和 Smad4 蛋白相互作用,涉及到转化生长因子(TGF - β)激活的转录因子受体信号。

这种相互作用是通过 RGS3 外的区域和 RGS 结构域及 Smad 分子的 Mad2 同源域。RGS3 的过表达可阻滯 Smad 分子介导的基因转录。RGS3 并不影响 TGF- β 诱导 Smad 磷酸化,但它抑制 Smad3 与 Smad4 相互聚合,这对 Smads 转录活性是所必需的,也就意味 RGS3 对于 TGF- β /Smas 信号转导通路有着功能上的抑制。通过 TGF- β 刺激,检测肺脏组织中肌成纤维细胞的分化水平,以 SM- α -actin 作为目标蛋白,证实在 RGS3 过表达的细胞中,成纤维细胞数量显著低于对照组。通过 Douglas 的研究,证实了 RGS3 可负性调控肺脏组织肌成纤维细胞的分化,然而该机制也可应用于心血管。RGS3 分子是否通过 EMT 现象保护心肌纤维化仍需进一步的研究。

综上所述,G 蛋白偶联受体家族是最大的胞膜受体成员之一并负责机体内一系列复杂的生化反应。在机体中,RGS 分子可与 GRKs 相互影响并调控多种重要的病理生理反应。RGS 是一种具有多功能的蛋白质分子大家族,虽然经历多年的研究并取得一定的成果,但许多 RGS 分子的角色依然处于不断的发现中。在人体中,RGS 被证实与多种系统疾病的发生、发展密切相关,如肿瘤的生长、纤维化疾病、凋亡等。关于 RGS 的研究任重而道远。

参考文献

- Moretti M, Wang L, Grognet P, *et al.* Three regulators of G protein signaling differentially affect mating, morphology and virulence in the smut fungus *ustilago maydis*[J]. *Mol Microbiol*,2017,105(6):901-921
- Jeon JP, Thakur DP, Tian JB, *et al.* Regulator of G-protein signaling and GoLoco proteins suppress TRPC4 channel function via acting at Gai/o[J]. *Biochem J*, 2016,473(10):1379-1390
- Yu S, Sun L, Jiao Y,*et al.* The role of G protein-coupled receptor kinases in cancer[J]. *Int J Biol Sci*,2018,14(2):189-203
- Schumacher SM, Koch WJ. Noncanonical roles of G protein-coupled receptor kinases in cardiovascular signaling[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*,2017,70(3):129-141
- Bouley R, Waldschmidt HV, Cato MC,*et al.* Structural determinants influencing the potency and selectivity of indazole-paroxetine hybrid G protein-coupled receptor kinase 2 inhibitors[J]. *Mol Pharmacol*, 2017,92(6):707-717
- Daniel JM, Prock A, Dutzmann J,*et al.* Regulator of G-protein signaling 5 prevents smooth muscle cell proliferation and attenuates neointima formation[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*,2016,36(2):317-327

- Cho H, Harrison K, Schwartz O, *et al.* The aorta and heart differentially express RGS (regulators of G-protein signalling) proteins that selectively regulate sphingosine 1-phosphate, angiotensin II and endothelin-1 signalling[J]. *Biochem J*,2003,371(3):973-980
- Hu M, Chen X, Zhang J, *et al.* Over-expression of regulator of G protein signaling 5 promotes tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma cells[J]. *J Surg Oncol*,2013,108(3):192-196
- Zhang P, Mende U. Regulators of G-protein signaling in the heart and their potential as therapeutic targets[J]. *Circ Res*,2011,109(3):320-333
- Posokhova E, Ng D, Opel A, *et al.* Essential role of the m2R-RGS6-1KACH pathway in controlling intrinsic heart rate variability[J]. *PLoS One*,2013,8(10):e76973
- Wang J, Zhou Y, Fei X, *et al.* Regulator of G-protein signaling 3 targeted by miR-126 correlates with poor prognosis in gastric cancer patients[J]. *Anticancer Drugs*,2017,28(2):161-169
- Wydeven N, Posokhova E, Xia Z, *et al.* RGS6, but not RGS4, is the dominant regulator of G protein signaling (RGS) modulator of the parasympathetic regulation of mouse heart rate[J]. *J Biol Chem*,2014,289(4):2440-2449
- Li AL, Lv JB, Gao L. MiR-181a mediates Ang II-induced myocardial hypertrophy by mediating autophagy[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*,2017,21(23):5462-5470
- Liu Y, Huang H, Zhang Y, *et al.* Regulator of G protein signaling 3 protects against cardiac hypertrophy in mice[J]. *J Cell Biochem*, 2014,115(5):977-986
- Sano S, Oshima K, Wang Y, *et al.* Tet2-mediated clonal hematopoiesis accelerates heart failure through a mechanism involving the IL-1 β /NLRP3 inflammasome[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2018, 71(8):875-886
- Chakir K, Depry C, Dimaano VL, *et al.* Galphas-biased beta2-adrenergic receptor signaling from restoring synchronous contraction in the failing heart[J]. *Sci Transl Med*,2011,3(100):100-188
- Gao QJ, Yang B, Chen J, *et al.* Sigma-1 receptor stimulation with PRE-084 ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2018,131(5):539-543
- Rorabaugh BR, Chakravarti B, Mabe NW, *et al.* Regulator of G protein signaling 6 protects the heart from ischemic injury[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2017,360(3):409-416
- Cheng Y, Song Y, Qu J, *et al.* The chemokine receptor CXCR4 and c-MET cooperatively promote epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells[J]. *Transl Oncol*,2018,11(2):487-497
- Yau DM, Sethakorn N, Taurin S, *et al.* Regulation of Smad-mediated gene transcription by RGS3[J]. *Mol Pharmacol*,2008,73(5):1356-1361

(收稿日期:2018-01-30)

(修回日期:2018-03-05)