

泛素 - 蛋白酶体系统及其抑制剂与 动脉粥样硬化的相关性研究

付 洋 孙瑞红

摘 要 动脉粥样硬化是全球高病死率的疾病之一, 尽管多年来其发病机制不断被研究, 但临床治疗效果仍不理想, 迫切需要一种新的、具有针对性的治疗药物。泛素 - 蛋白酶体系统调控的蛋白水解对细胞维持蛋白稳态至关重要, 其已被公认为心脑血管疾病的重要监管途径, 参与影响动脉粥样硬化疾病进展的许多过程。然而在研究过程中, 泛素蛋白酶抑制剂对动脉粥样硬化的影响结果有所差异。因此, 针对泛素蛋白酶系统治疗动脉粥样硬化的合理性和可行性越来越受到重视。本文对泛素 - 蛋白酶体系统对动脉粥样硬化的监管机制, 以及差异影响的原因做一综述。

关键词 泛素蛋白酶体抑制剂 炎症反应 动脉粥样硬化

中图分类号 R34

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.004

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 作为一种慢性多因素血管性疾病, 是大多数严重心脑血管事件的主要原因。泛素 - 蛋白酶体系统 (ubiquitin - proteasome system, UPS) 所调控的蛋白水解对细胞维持蛋白质稳态至关重要, 现已发现其涉及 AS 诸多过程如: 如氧化应激、凋亡、炎症等, 探索 UPS、泛素蛋白酶抑制剂 (ubiquitin protease inhibitors, UPI) 与 AS 三者之间的相关性, 可为心脑血管疾病的临床治疗开辟一条新的道路。

一、UPS 与 UPI

1. UPS: UPS 的发现可追溯到在 20 世纪 70 年代早期, 科学家分离出能够诱导 T 细胞分化的多肽, 并命名为泛素, 它通过 26S 蛋白酶的多酶复合物来标记蛋白质并进行降解^[1]。现已认识到泛素介导的蛋白质降解涉及许多细胞的基础生命过程, 其中包括调控细胞周期和细胞信号传递、维持基因组和蛋白质组的完整性, 以及调节细胞凋亡等。高达 30% 的新合成的蛋白质被蛋白酶体降解。UPS 是一种大型的三磷酸腺苷 (ATP) 依赖性级联系统, 泛素标记蛋白是一种涉及 3 种酶的 3 步共轭过程: 蛋白激活 (E_1) 酶依赖于 ATP 激活泛素蛋白; 泛素缀合 (E_2) 酶通过将泛素从 E_1 转移到自身, 从而产生一种聚泛素链; 泛素连

接 (E_3) 酶将泛素从 E_2 酶转移, 通常转移到底物中的赖氨酸残基^[1]。

2. UPI: 选择性蛋白酶体抑制剂不仅是研究 UPS 功能的宝贵研究工具, 同时也是一个有效的治疗恶性疾病方法。在过去的几十年里, 大量结构多样化的多肽抑制剂已被研究, 大多数的研究目标是活跃的 20S 核心粒子。依据化学结构的不同, 蛋白酶体抑制剂有多种类型, 与此同时, 新类型的 UPI 也不断出现, 如基于环氧酮的不可逆性 UPI - 卡非佐米^[2]。新的、结构多样的 UPI 在对于抗癌治疗的基础和临床试验中不断涌现。虽然 UPI 作为抗癌药物在临床受到认可, 但其在 AS 发生、发展中的抗炎、抗氧化能力不容忽视。

二、UPS 与 AS

1. UPS 调控 AS 的关键过程: UPS 对于所有真核细胞的生存和稳态至关重要。许多细胞过程中的基础作用也意味着其参与许多疾病的发生和发展。氧化应激、炎症、增殖和凋亡为 AS 的主要特征, 而所有这些过程都由 UPS 调节。蛋白质错误折叠伴随着正常的蛋白质合成, 但可以通过诸如氧化应激等条件而显著增强。热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 家族的分子伴侣识别那些因蛋白质错误折叠所暴露的疏水区, 这些伴侣促进蛋白质重折叠, 并且它们还与泛素 E_3 连接酶相互作用, 这促进了不可逆错误折叠蛋白质的多聚泛素化, 导致其被蛋白酶体降解。若错误折叠的蛋白质超过 UPS 所能容纳的最大量, 蛋白质便会发生聚集^[3]。

自噬是一种与 UPS 有关的降解过程, 其聚合蛋

基金项目: 黑龙江省科研计划项目 (201602)

作者单位: 150000 哈尔滨医科大学附属第一医院神经内科、黑龙江省医学科学院神经科学研究所

通讯作者: 孙瑞红, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: sunruihong119@163.com

白质并破坏细胞结构(包括整个细胞器),被封闭在膜泡中与溶酶体融合在一起。在蛋白酶体的抑制作用下,自噬被激活,在蛋白酶活性受损的情况下提供了一种重要的补偿机制。有证据表明,斑块中的氧化脂质、炎症和缺氧为刺激因素影响自噬,从而影响 AS 斑块的稳定程度和组成成分^[4]。

炎症作为病变形成、进展和不稳定的驱动力原因已得到认可。核转录因子(nuclear factor kappa B, NF- κ B)的活化是血管炎症的核心。健康的人类血管含有分布在胞质溶胶中的 p50 和 p65,而在 AS 的内膜和内侧细胞中,细胞核却是其主要所在位置。进一步的研究涉及在血管炎症中 NF- κ B 的特殊作用(典型激活途径作用)。在这个途径中,蛋白酶体调节 NF- κ B 抑制剂分子的降解。I- κ Ba 是一种可以遮挡 NF- κ B 核定位信号从而阻止 p50/p65 复合物进入细胞核的蛋白质。TNF- α 、IL-1 这两种促炎细胞因子对 AS 发生有促进作用,激活用于将 I- κ Ba 磷酸化的 I- κ B 激酶(IKK)-2,引起 I- κ Ba 的泛素化和蛋白酶降解,使 NF- κ B 的核易位^[5]。NF- κ B 核易位促进了大量参与 AS 的基因的转录,如内皮黏附分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)和趋化因子(monocyte chemoattractant protein, MCP-1),UPS 还通过启动子结合的 p50/p65 的迅速降解来调节典型激活途径的终止,以同样的方式,蛋白酶体也终止非典型途径中 p50 / p65 转录^[6,7]。

氧稳态的失衡是 AS 从初期发展到复杂阶段的原因。氧稳态的两个主要调节因子由 UPS 监管:Nrf2 和 HIF-1。Nrf2 调控细胞抗氧化防御系统中相关酶的表达,如:血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)和超氧化物歧化酶 1(superoxide dismutase-1, SOD1)。在稳态条件下,Nrf2 与其抑制剂 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1(KEAP1)结合。Nrf2 与 Cullin3 依赖性泛素连接酶被 KEAP1 连接,快速泛素化后 26S 蛋白酶体降解 Nrf2。氧化应激致 Nrf2 和 KEAP1 解离,Nrf2 降解衰减,使转录因子的核易位增强。因此,通过与抗氧化反应组分位点的结合,引起内源性抗氧化剂系统的许多基因转录激活。Nrf2 靶基因 SOD1 和 HO-1 参与了抗动脉粥样硬化的保护^[8]。因此,Nrf2 和 UPS 被认为是血管疾病治疗潜力的。在缺氧环境下,氧依赖性脯氨酰羟化酶被抑制,HIF-1 α 的羟基化被阻止,稳定了 HIF-1 α 并促进其迁移到细胞核中并与 HIF-1 β 二聚化。HIF-1 二聚体与缺氧反应元件结合并诱导负责细胞对缺氧反

应的基因转录。HIF-1 影响动脉粥样硬化中的几个过程:平滑肌细胞增殖、泡沫细胞形成、缺氧诱导的细胞凋亡、血管生成和斑块新血管形成^[9]。

作为 AS 的发病因素之一,高胆固醇血症的危险性众所周知,而 UPS 在胆固醇合成及流出过程中起到了调节的作用。HMG-CoA 还原酶是合成胆固醇的限速酶,一般情况下还原酶是稳定的。然而,当胆固醇水平升高时,HMGCoA 还原酶被 UPS 迅速降解,E₃ 连接酶 gp78 和 TRC8 参与 HMG-CoA 还原酶的加速降解^[10]。三磷酸腺苷结合盒转运子 1(ABCA1)也在反向胆固醇转运(RCT)过程中发挥重要作用,其通过将非肝细胞内的游离胆固醇和磷脂通过加载到细胞外受体载脂蛋白 A-I(apoA-I)上,从而形成高密度脂蛋白(HDL),使血浆胆固醇转运回肝。有关实验表明,UPS 通过 ABCA1 的泛素化和蛋白酶体降解从而影响 RCT^[11]。

UPS 通过凋亡相关途径调控细胞凋亡,包括调节凋亡基因表达的转录、外线粒体膜透化和半胱天冬酶活化^[12]。26S 蛋白酶体依次降解细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶(CDKs)和 CDK 抑制剂(CKI)可以调节细胞周期^[13]。VSMC 从静止(收缩)转变为增殖(合成)表型是导致 AS 斑块生长的主要因素,UPS 在 VSMC 再次进入细胞周期、细胞周期过程中以及收缩基因表达的损伤中起重要作用^[14]。在早期疾病阶段,VSMC 和巨噬细胞的凋亡可以延缓损伤进展;而在晚期斑块中,细胞的凋亡会促进坏死核心的生长并使病变发生不稳定^[15]。鉴于凋亡在动脉粥样硬化中的矛盾作用以及细胞对 UPI 的反应从诱导细胞凋亡变为阻止细胞凋亡,UPI 针对于 AS 的作用可能是由多种因素决定其最终治疗效果。

UPS 参与 AS 发病机制的所有细胞类型的功能调节,并在疾病进展期间调控这些细胞所经历的变化。UPS 对 AS 进程的调节可能并不局限于某一固定的阶段,而是在其整个过程中均起作用。

2. 动脉粥样硬化中 UPS 的调节:来自体外和体内研究的大量证据表明,UPS 调节血管细胞稳态,并在某些病理状况下失调。蛋白酶体活性受血糖水平的影响,高血糖诱导的二巯基甲基乙二醛形成共价修饰 20S 蛋白酶体,从而降低其活性^[16]。相反,已经表明高糖也可以增强内皮细胞中的蛋白酶体活性,这导致四氢生物蝶呤(BH4)缺乏和内皮功能障碍,这是由于蛋白酶体降解鸟苷 5 磷酸三氢叶酸脱水酶 I(GTPCH)增强,而 GTPCH 是合成 BH4 必需的酶^[17]。

26S 蛋白酶体活性的增强已被归因于蛋白酶体调节亚基 PA700 (19S) 的酪氨酸硝化^[18]。

研究表明,UPS 在重要冠状动脉斑块进展中所起的作用。在与非梗死冠状动脉相比,梗死冠状动脉斑块有更高的泛素免疫反应性,泛素在脂质核心和病变区域的富集,内膜平滑肌细胞、T 细胞、巨噬细胞和凋亡细胞的联合定位表明这些细胞受 UPS 的干扰^[19]。

Versari 研究发现,氧化应激和细胞凋亡会使蛋白酶的活性降低,巨噬细胞和平滑肌细胞与泛素共轭共定位,蛋白酶体活性的损伤与晚期动脉粥样硬化的疾病进展相联系^[20]。相比之下,Marfella 发现,与无症状的患者比较,炎性细胞浸润增多,蛋白酶体活性增强,随之 NF- κ B 水平升高,I- κ B 水平较低。在基于尸体解剖的研究中,来自大脑中动脉的不稳定斑块显示泛素缀合物和 NF- κ B 比稳定斑块和正常血管组织更高的表达^[21]。

这些看似矛盾的结果使得人们对 UPS 与 AS 的相关性产生质疑,同时也阻挡了 UPI 在临床的使用。作用结果的不同是由于 AS 的阶段性,蛋白酶体活性可能是在早期 AS 中保留或甚至增强,从而通过 NF- κ B 驱动炎性反应,晚期特征在于蛋白酶体活性受损和消除功能障碍蛋白质能力的缺失^[15]。总之,体外和体内证据表明促动脉粥样硬化的刺激(氧化应激,LDL 修饰和降低 NO 生物利用度)影响血管细胞的蛋白酶体活性,许多动脉粥样硬化危险因素导致在患病血管系统中 UPS 的失调。

三、UPI 对 AS 差异影响的原因分析

蛋白酶体抑制并不影响单个蛋白或单一通路,它会引起细胞功能的广泛调控。因此,蛋白酶体抑制的程度决定了蛋白酶体抑制剂是否具有毒性,是否诱导细胞死亡,或者是作为补救调节细胞功能。在人类脐静脉内皮细胞(HUVEC)中应用不同剂量的 UPI 进行分析研究,结果显示,高剂量抑制其活性并诱导凋亡,低剂量不影响活性。这种低剂量治疗引起内皮细胞中的血管保护性模式启动,这是内皮细胞对非有毒蛋白酶抑制的适应性细胞反应,从而改善抗氧化应激的保护,降低炎性反应并改善内皮功能,调节 UPI 抗氧化作用的潜在机制是 Nrf2 的稳定性。

细胞类型特异性反应也可以影响 UPI 的作用效果。一般情况下,与静止细胞相比,增殖细胞对 UPI 所诱导的细胞毒性更敏感。UPI 对凋亡作用的敏感度似乎与蛋白质合成速率相关^[22]。不同的细胞类型

有不同的蛋白酶体亚型。例如,非炎性内皮和 VSMC 主要表达组成型蛋白酶体,而血管浸润性免疫细胞组成型表达大量的免疫蛋白酶体。考虑到干扰素- γ (IFN- γ) 是动脉粥样硬化中重要的促炎因子介质,也是免疫蛋白酶体亚单位表达的强诱导剂,在 AS 形成过程中,蛋白酶体亚基的组成可能发生变化。蛋白酶体亚型的组成影响 UPI 的治疗效果。

迄今为止,在动脉粥样硬化组织中没有系统地研究过翻译后修饰,例如磷酸化、亚硝基化、泛素化和蛋白酶体亚基的乙酰化。很可能这样修饰不仅影响蛋白酶体活性,而且影响参与动脉粥样硬化的细胞中蛋白酶体抑制的易感性。

总之,UPI 作用受多种变量的影响。体外证据已经阐明了蛋白酶体抑制剂的剂量、治疗持续时间、靶向蛋白酶体的亚基组成以及细胞(增殖或静止)的增殖状态均是导致其差异影响的原因。

四、展 望

过去几年中,UPS 与动脉粥样硬化的关系不断被探索,可以预期的是在探索过程中所获得的知识将刺激这一重要研究领域的进步。当前主要的研究方向为细胞 UPS。然而,一些研究报道了细胞外 UPS 的存在,并且已经提出它作为内源性免疫调节剂起作用。第 2 代抑制剂如卡非佐米的临床应用将会提供关于其在肿瘤学领域以外的治疗潜力信息,这些不断涌现的新的蛋白酶体抑制剂,特别是位点特异性抑制剂将被开发,并应在动脉粥样硬化中进行测试。在未来,用于病变靶向应用的技术可以支持从基础科学到临床应用的转变,从而避免长期系统性应用的缺点。此外,建立适当的生物学标志物和新型非侵入性成像技术将能够监测治疗干预措施的效果。相信随着关于动脉粥样硬化相关知识的增加和新型抑制剂的出现,针对 UPS 治疗仍然是一种有前景的治疗方向。

参考文献

- Barac YD, Emrich F, Krutzwald J, Josefson E, *et al.* The ubiquitin-proteasome system: a potential therapeutic target for heart failure[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2017, 36(7): 708-714
- Boccia RV, Bessudo A, Agajanian R, *et al.* A multicenter, open-label, phase 1b study of carfilzomib, cyclophosphamide, and dexamethasone in newly diagnosed multiple myeloma patients (CHAMPION-2)[J]. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*, 2017, 17(7): 433-437
- Summers DW, Wolfe KJ, Ren HY, *et al.* The Type II Hsp40 Sis1 cooperates with Hsp70 and the E₃ ligase Ubr1 to promote degradation of terminally misfolded cytosolic protein[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e52099
- Park C, Cuervo AM. Selective autophagy: talking with the UPS[J].

- Cell Biochem Biophys, 2013, 67(1): 3–13
- 5 Pateras I, Giaginis C, Tsigris C, *et al.* NF- κ B signaling at the crossroads of inflammation and atherogenesis: searching for new therapeutic links[J]. Expert Opin Ther Targets, 2014, 18(9): 1089–1101
 - 6 Collieran A, Collins PE, O'Carroll C, *et al.* Deubiquitination of NF- κ B by ubiquitin-specific protease-7 promotes transcription[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(2): 618–623
 - 7 Cullen SJ, Ponnappan S, Ponnappan U. Proteasome inhibition up-regulates inflammatory gene transcription induced by an atypical pathway of NF- κ B activation[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(5): 706–714
 - 8 Ryu MJ, Chung HS. Fucoidan reduces oxidative stress by regulating the gene expression of HO-1 and SOD-1 through the Nrf2/ERK signaling pathway in HaCaT cells[J]. Mol Med Rep 2016, 14(4): 3255–3260
 - 9 Gao L, Chen Q, Zhou X, *et al.* The role of hypoxia-inducible factor 1 in atherosclerosis[J]. J Clin Pathol, 2012, 65(10): 872–876
 - 10 Jo Y, Lee PC, Sguigna PV, *et al.* Sterol-induced degradation of HMG CoA reductase depends on interplay of two Insigs and two ubiquitin ligases, gp78 and Trc8[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(51): 20503–20508
 - 11 Ogura M, Ayaori M, Terao Y, *et al.* Proteasomal inhibition promotes ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and ABCG1 expression and cholesterol efflux from macrophages in vitro and in vivo[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31(9): 1980–1987
 - 12 Bernassola F, Ciechanover A, Melino G. The ubiquitin proteasome system and its involvement in cell death pathways[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(1): 1–3
 - 13 Koepp DM. Cell cycle regulation by protein degradation[J]. Methods Mol Biol, 2014, 1170: 61–73
 - 14 Xie P, Fan Y, Zhang H, *et al.* CHIP represses myocardin-induced smooth muscle cell differentiation via ubiquitin-mediated proteasomal degradation[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(9): 2398–2408
 - 15 Wilck N, Fechner M, Dan C, *et al.* The effect of low-dose proteasome inhibition on pre-existing atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(4)
 - 16 Queisser MA, Yao D, Geisler S, *et al.* Hyperglycemia impairs proteasome function by methylglyoxal[J]. Diabetes, 2010, 59(3): 670–678
 - 17 Wang F, Lerman A, Herrmann J. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerotic cardiovascular disease[J]. Am J Cardiovasc Dis, 2015, 5(1): 83–100
 - 18 Xu J, Wang S, Zhang M, *et al.* Tyrosine nitration of PA700 links proteasome activation to endothelial dysfunction in mouse models with cardiovascular risk factors[J]. PLoS One, 2012, 7(1): e29649
 - 19 Wang Z, Guo D, Yang B, *et al.* Integrated analysis of microarray data of atherosclerotic plaques: modulation of the ubiquitin-proteasome system[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110288
 - 20 Versari D, Herrmann J, Gössl M, *et al.* Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in human carotid atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006, 26(9): 2132–2139
 - 21 Sun R, Xiao L, Duan S. High expression of ubiquitin conjugates and NF- κ B in unstable human intracranial atherosclerotic plaques[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(2): 784–788
 - 22 Cenci S, Oliva L, Cerruti F, *et al.* Pivotal Advance: Protein synthesis modulates responsiveness of differentiating and malignant plasma cells to proteasome inhibitors[J]. J Leukoc Biol, 2012, 92(5): 921–931

(收稿日期:2017-09-25)

(修回日期:2017-11-17)

尿酸与肾功能关系的研究进展

胡竹萌 陈海冰

摘要 高尿酸血症是继糖尿病之后的另一代谢性疾病,它与许多疾病的发生、发展相关。本综述主要阐述了在高尿酸血症或合并糖尿病、高血压时,血尿酸、尿酸排泄与蛋白尿和肾损伤的关系。现有的研究表明,不论是否合并糖尿病、高血压,血尿酸与蛋白尿和肾损伤的发生、发展均有密切关联,血尿酸可能是蛋白尿和肾损伤的独立危险因素。目前关于尿酸排泄和蛋白尿、肾损伤的研究过少,仍需要广大学者深入探寻。

关键词 蛋白尿 肾损伤 血尿酸 尿酸排泄 高尿酸血症

中图分类号 R4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.08.005

基金项目:国家重点基础研究发展计划(“973”计划)项目(2012CB517700);国家自然科学基金资助项目(面上项目)(81070649)

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院内分泌代谢科、上海市糖尿病研究所、上海市糖尿病临床医学中心、上海市糖尿病重点实验室

通讯作者:陈海冰,电子信箱:chenhb@sjtu.edu.cn