

动脉粥样硬化人群中血液外泌体的蛋白质谱分析

江梅^{1,2}, 全晶³, 张恒³, 丁倩倩³, 向萌³, 孟丹³, 孙宁³, 董强¹, 陈思锋³

(1. 复旦大学附属华山医院神经内科, 上海市 200042; 2. 浦东新区公利医院神经内科, 上海市 200135; 3. 复旦大学基础医学院生理与病理生理学系, 上海市 200032)

[关键词] 高血压; 动脉粥样硬化; 外泌体; 蛋白质谱分析

[摘要] **目的** 预测血液中外泌体在动脉粥样硬化中的作用及机制。**方法** 招募 56 个受试对象, 分成两个比较组: 健康人群与动脉粥样硬化人群、高血压人群与高血压合并动脉粥样硬化人群。用试剂盒提取受试者血液中外泌体, 利用蛋白质谱分析技术检测外泌体中蛋白表达, 将蛋白表达谱的结果进行基因功能(GO)分析。**结果** GO 分析显示, 在生物学过程中, 两个比较组中都出现显著差异的有 5 个条目, 分别是“固有免疫反应的正向调节”、“免疫反应激活信号转导”、“固有免疫反应激活”、“固有免疫反应激活信号转导”和“固有免疫反应激活细胞表面受体信号通路”; 在分子功能类别中, 两个比较组中有 2 个条目是重复出现的, 分别是“抗原结合”和“酶结合”; 在两个组别比较中都出现差异蛋白有 3 个, 分别是蛋白酶亚基 $\alpha 6$ (PSMA6)、蛋白酶亚基 $\alpha 7$ (PSMA7) 和膜联蛋白 A2。**结论** 固有免疫系统可能在动脉粥样硬化疾病发病中起重要作用。PSMA6、PSMA7 和膜联蛋白 A2 有可能成为动脉粥样硬化疾病防治的新的靶蛋白。

[中图分类号] Q51

[文献标识码] A

Proteomic Identification of Proteins in Exosomes of Patients with Atherosclerosis

JIANG Mei^{1,2}, QUAN Jing³, ZHANG Heng³, DING Qian-Qian³, XIANG Meng³, MENG Dan³, SUN Ning³, DONG Qiang¹, and CHEN Si-Feng³

(1. Department of Neurology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200042, China; 2. Department of Neurology, Shanghai Pudong New Area Gongli Hospital, Shanghai 200135, China; 3. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China)

[KEY WORDS] Hypertension; Atherosclerosis; Exosome; Proteomic Identification

[ABSTRACT] **Aim** Atherosclerosis (As) primarily involves the systemic arteries. The luminal surface of the artery is directly exposed to blood and is susceptible to active blood substances. Exosomes contain a significant amount of components that are either beneficial or detrimental to cells. Thus, blood exosomes may contribute to As. The aim of this study was to investigate the contribution of exosome proteins to As. **Methods** Fifty-six subjects were recruited and divided into two comparison pairs: healthy subjects vs. As patients, and hypertension vs. hypertension+As patients. Serum exosomes were decoded by protein mass spectrometry. Protein profile and function were analyzed by gene ontology (GO). A structure hierarchy tree was constructed to illustrate the proteins associated with GO terms, and protein-protein interaction analysis was performed to indicate the proteins involved in As. **Results** Five differentiated child terms appeared in both comparisons under the biological process GO terms of “response to stimulus” and “immune system process”. They are “positive regulation of innate immune response”, “immune response-activating signal transduction”, “activation of innate immune response”, “innate immune response-activating signal transduction” and “innate immune response activating cell surface receptor signaling pathway”. Two differentiated child terms emerged in both comparisons in the molecular function category of “binding”: “antigen binding” and “enzyme binding”. In addition, three differentiated proteins, PS-

[收稿日期] 2016-08-19

[修回日期] 2016-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金重大国际合作项目(81220108002)、重大研究计划项目(91539120)和面上项目(81201029); 上海市浦东新区卫生系统学科带头人培育项目(PWRd2014-09); 上海市浦东新区重点学科项目(PWZx2014-08)

[作者简介] 江梅, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 jiangmei0416@sina.com。通讯作者董强, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制, E-mail 为 qiang_dong163@163.com。通讯作者陈思锋, 博士研究生导师, 研究方向为外泌体相关疾病的机制研究, E-mail 为 Chen1216@fudan.edu.cn。

MA6, PSMA7 and annexin A2, appeared in both comparisons. **Conclusions** The innate immune system contributes to AS development. PSMA6, PSMA7 and annexin A2 may be new target proteins for As prevention and treatment.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是血管常见病。近十年来,As及其并发症在中国人群中的发生率逐年上升,继发于As的心脑血管疾病是国人最主要的死亡原因。蛋白质谱分析通过大批量的蛋白谱差异筛查,可有的放矢地选择相关蛋白进行验证和机制研究。Viiri等^[1]利用蛋白质谱的方法检测人粥样硬化组织内平滑肌中的蛋白。他们发现ATP合成亚基和乙酰脱氢酶2表达量有不同程度的降低。这两个指标和线粒体的功能相关,As可能会导致线粒体功能紊乱,并且诱导内皮细胞凋亡。Moxon等^[2]利用质谱技术检测腹主动脉瘤处未堵塞血管血栓分泌物的蛋白表达水平,发现凝血酶敏感蛋白1的表达降低。凝血酶敏感蛋白1是可以加速凝血进程的,而在未堵塞血管的血栓中凝血酶敏感蛋白降低提示此处血栓可能破裂的危险。

外泌体是一种直径为30~100 nm脂质双分子层的圆形颗粒。20世纪80年代,Johnstone等^[3]首次发现未成熟的羊网织红细胞中的多囊泡体与红细胞膜进行融合后释放了其中的小囊泡。最初外泌体被发现的时候被当作细胞的废物。其后发现外泌体可出现在脑脊液、乳汁、尿液和血液等生物体液中,其中包含的物质有mRNA、miRNA和蛋白质。细胞间通过外泌体与微粒中包含的物质进行物质交换、信息传递、肿瘤形成和转移以及免疫系统促发炎症因子释放发挥免疫效应^[4]。

大量的研究表明,不同细胞来源的外泌体和微粒及其内含物质参与了炎性反应。换言之,外泌体与微粒有可能在As的过程中起重要作用。Aharon等^[5]发现单核细胞分泌的外泌体可以促使内皮细胞凋亡和通过释放组织因子增加血液凝固性。巨噬细胞来源的外泌体和微粒可能通过提高细胞间黏附分子1和核因子 κ B来促使白细胞的边集与黏附^[6-7]。除了促炎作用外,Gasser等^[8]发现中性粒细胞分泌的微粒通过刺激生长转化因子促使炎症抑制,这一过程是通过微粒表面抗炎蛋白质Annexin V来介导的,B淋巴细胞和单核细胞吞噬了这种来源的外泌体之后可以从活化状态转变到抗炎表型。外泌体内含有大量不同的蛋白质,其在As中的作用很可能取决于其所含的各种蛋白质综合作用的结果,特别是协同作用的结果。但血液中的外泌体在As的进程中所起到的作用还未见报道。

我们采用蛋白质谱分析技术检测血液中外泌

体的蛋白谱,进行健康与As、高血压与高血压合并As的双差异分析,以期找出在As病程中出现表达量明显改变的蛋白质。而后利用基因功能分析(GO)包括生物学过程(biological process, BP)、细胞包含物(cell component, CC)和分子功能(molecular function, MF)分析,找出和这些生物学过程以及分子功能密切相关的蛋白质,揭示外泌体及其包含的蛋白质在As进程中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料来源

57个人体血液样本,共分为两个类别:第一个类别是健康人群与As患者;第二个类别是高血压患者与高血压合并As患者。所有受试者的血液均在浦东新区公利医院检验科采集并检测血液中的常规指标。本研究在实验开始之前经过公利医院伦理委员会批准,每份血液样本收集之前均告知受试者,并签订了知情同意书。高血压的诊断标准依据《2005年中国高血压治疗指南建议》,收缩压大于139 mmHg和/或舒张压大于89 mmHg为高血压。高血压均是在本院心内科通过血压测量仪非同日3次测量血压后确诊。以局部动脉内膜中膜厚度(intima-media thickness, IMT) ≥ 1.3 mm为斑块认定标准^[9],As程度参照华盛顿大学颈动脉As斑块超声分级标准分成3级^[10]:0级为无斑块;1级为单侧斑块 ≤ 2 mm;2级为单侧斑块 > 2 mm,或双侧均有斑块且其中至少一侧 ≤ 2 mm;3级为双侧斑块 > 2 mm。纳入研究人员的具体信息见表1和表2。

1.2 血液中外泌体的提取

血液提出后,将其放入4 mL离心管中,放置在离心机中(超速离心机,Optima L-100XP, Beckman公司),3000 \times g离心15 min以去除细胞和细胞碎片。将上清转移到高压灭菌过的4 mL离心管中,加入ExoQuick Exosome预混液(PureExo[®] Exosome Isolation, P100, 101Bio公司),用Vortex将离心管中的液体充分混匀,混匀后放入4 $^{\circ}$ C的冰箱中过夜沉淀。第二天早晨取出混匀液放入事先预冷的4 $^{\circ}$ C离心机中,1500 \times g离心30 min。离心后离心管底部有白色沉淀,外泌体就结合在底部沉淀中。弃上清,将遗留于离心管的沉淀物1500 \times g离心5 min,弃上清,注意不要摇晃沉淀的白色物质。加入400 μ L高压灭

表 1. 健康人群与 As 人群一般特征

Table 1. The general characteristics of healthy and As subjects

项目	健康人群(<i>n</i> =4)	As 1 级(<i>n</i> =6)	As 2 级(<i>n</i> =2)	As 3 级(<i>n</i> =2)
年龄(岁)	58.75±10.62(76~47)	70.00±12.82(82~49)	62±21(83~41)	81±9(90~72)
男性(例)	3	1	2	2
吸烟(例)	2	1	1	0
总胆固醇(mmol/L)	4.46±0.32(4.97~4.15)	4.78±0.57(5.36~3.86)	4.63±1.38(6.01~3.25)	4.5±0.14(4.6~4.3)
甘油三酯(mmol/L)	1±0.31(1.43~0.63)	1.15±0.55(2.26~0.43)	1.24±0.56(1.79~0.68)	1.2±0.3(1.4~0.93)
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.22±0.42(1.94~0.91)	1.3±0.4(2.05~0.78)	0.96±0(0.96~0.96)	1.12±0.1(1.2~1.02)
低密度脂蛋白(mmol/L)	2.765±0.3(3.27~2.53)	2.93±0.89(3.77~1.27)	1.92±0(1.92~1.92)	2.78±0.02(2.79~2.76)

表 2. 高血压合并 As 人群的一般特征

Table 2. The general characteristics of subjects of hypertension with As

项目	高血压(<i>n</i> =8)	高血压合并 As 1 级(<i>n</i> =13)	高血压合并 As 2 级(<i>n</i> =16)	高血压合并 As 3 级(<i>n</i> =6)
年龄(岁)	70.8±6.9(80~61)	73.1±7.65(60~90)	69.3±13.5(47~87)	70.6±8.8(56~81)
男(例)	3	6	8	4
吸烟(例)	2	4	2	2
总胆固醇(mmol/L)	4.1±1.2(4.3~7.8)	4.43±1.5(2.82~7.8)	4.60±0.98(2.83~6.1)	4.5±1.2(6.7~2.83)
甘油三酯(mmol/L)	2.1±1.9(2.3~0.7)	1.36±0.6(1.6~0.64)	1.57±0.72(3.01~0.63)	1.7±0.7(2.9~0.63)
高密度脂蛋白(mmol/L)	1.2±0.5(2.6~0.6)	1.1±0.2(1.42~0.85)	1.14±0.39(2.13~0.62)	1.1±0.2(1.51~0.6)
低密度脂蛋白(mmol/L)	1.9±0.7(3.3~1.1)	2.7±1.47(6.6~1.14)	2.78±0.85(4.31~1.57)	2.5±0.66(3.3~1.5)

菌的双蒸水重悬稀释,利用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测外泌体浓度,然后将所分离的外泌体置于-80℃冰箱冷冻备用。

1.3 血液中外泌体的鉴定

1.3.1 透射电镜观察外泌体形态 将 10 μL 外泌体滴于铜网上,静置 2 min,用滤纸将铜网边缘的液体擦掉,注意不能让铜网太干。在铜网上面滴加 10 μL 乙酸双氧铀,染色 1 min。利用透射电镜(Oregon, USA)进行观察。

1.3.2 Western blot 鉴定 CD63 标记蛋白 将外泌体放入 1.5 mL 离心管中,加入 30 μL RIPA 裂解液,将离心管放置在冰上裂解 30 min。按照蛋白质定量方法进行定量,加入配制的电泳胶进行电泳。电泳后进行牛奶封闭抗原 1 h,敷上一抗 CD63(1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 4℃ 过夜,第二天洗膜。洗完后敷二抗(1:2000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA, 美国) 1 h,洗膜,之后加入 picoA 和 picoB 液各 1 mL 混匀敷在膜上显影。显影后利用灰度值分析其表达量差异。

1.4 外泌体蛋白的质谱分析

15 μL 的蛋白溶液与缓冲液预混合,放入 95℃ 的金属浴中进行变性。而后加入配好的 4%~12% 双三聚丙烯酰胺梯度凝胶孔道中进行电泳分离。凝胶用考马斯亮蓝染色,然后沿着染成蓝色的条带切成 1 cm 大小的胶条。将这些胶条用洗脱剂去除染色。然后将这些胶条在 37℃ 的温箱中放入 40 μL 的胰酶消化 16~18 h。使用连接到 AS-1 nanoLC 系统的自动取样器,取出 10 μL 消化后的样品加入 MS 缓冲液(0.1% 甲酸),将混合液以 20 μL/min 的速度加到 C8 捕集柱上。使用 Mascot 2.2 软件对数据库进行检索,并对数据进行分析。将蛋白质质谱的结果代入 GO 分析(Omicsbean, 金弗莱公司)以确定外泌体中蛋白质在生物学过程、细胞包含物和分子功能方面的变化。最终选择两个组别:健康人群与 As 3 级患者、高血压患者与高血压合并 As 3 级患者的 GO 数据进行深度分析。

1.5 数据分析

利用 STATA 12.0 软件分析数据差异。组间差异利用 One-way 进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外泌体鉴定

从健康人群血液和患者血液中提取出外泌体,利用透射电镜扫描铜板上的外泌体,可以看出,外泌体为圆形,直径在 30~100 nm 之间(图 1)。提取出外泌体并且将其裂解后,用 Western blot 验证外泌

体中的特异性蛋白 CD63。CD63 属于四次跨膜蛋白,通常被用来选作外泌体的标志蛋白。经过灰度值差异分析后,四个组中两种蛋白表达均无明显差异($P < 0.05$;图 2)。外泌体经过蛋白定量,健康人群为 637 μg ,As 3 级患者为 691 μg ,高血压患者为 652 μg ,高血压合并 As 3 级患者为 674 μg ,组间没有明显差异($P < 0.05$)。

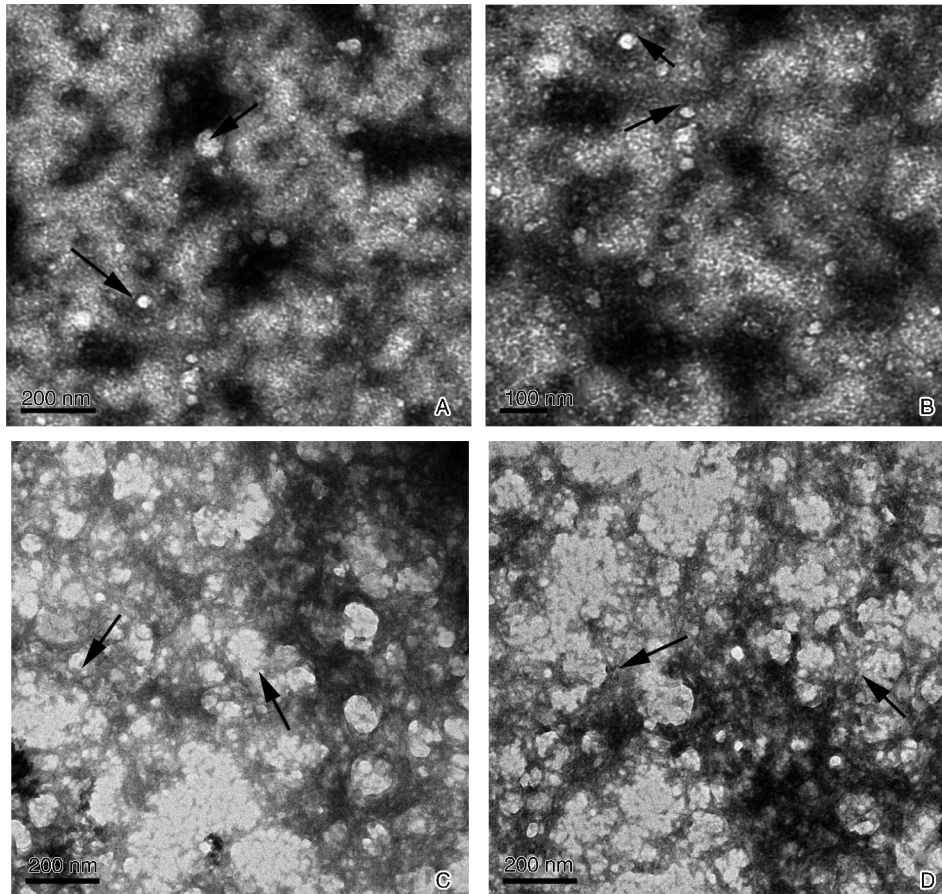


图 1. 透射电镜观察血外泌体大小与形态 A 为健康人群血外泌体形态,B 为 As 3 级患者血外泌体形态,C 为高血压患者血外泌体形态,D 为高血压合并 As 3 级患者血外泌体形态。

Figure 1. Size and morphology of exosomes under electronic microscope

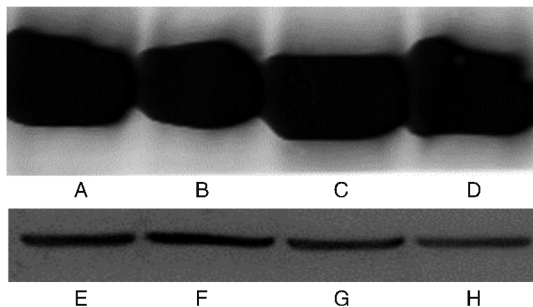


图 2. Western blot 检测血外泌体 CD63 A-D 为健康人群、As 患者、高血压患者和高血压合并 As 3 级患者血外泌体 CD63 检测,E-H 为相应内参 β -actin 检测。

Figure 2. Identification of CD63 by Western blot

2.2 GO 分析和蛋白质-蛋白质相互作用分析

2.2.1 健康人群与 As 患者 这个组别中,GO 分析找到了 110 个变化明显的蛋白质,其中 58 个蛋白上调,52 个蛋白下调。通过 GO 分析,发现了 121 个表达有明显差异的细胞包含物,前十位显著表达差异的条目为胞外区、细胞外膜有界细胞器、胞外体、细胞外的细胞器、胞囊、胞外区部分、膜小泡、囊泡、胞外空间、细胞质。同时发现了 929 个生物学过程出现了明显的差异性表达。其中“刺激反应”($P = 2.01\text{E-}15$)和“免疫系统过程”($P = 8.80\text{E-}15$)两个起始条目变化最显著。“刺激反应”参与的基因数目

有 75 个,“免疫系统过程”参与的基因数目有 37 个。将这两个起始项目进入 GO 数据库进行深度分析,寻找起始条目的各个子条目,观察子条目在本实验的数据库中是否出现差异性改变,从而构架出层级模式图(图 3)。另外,利用蛋白质-蛋白质相互作用(protein protein interaction, PPI)检索出与最终子项目相关的蛋白质。蛋白酶亚基 $\alpha 7$ (proteasome subunit alpha type-7, PSMA7)、蛋白酶亚基 $\alpha 6$ (proteasome subunit alpha type-6, PSMA6) 和膜联蛋白 A2 (annexin 2, ANXA2) 都与“固有免疫反应激活细胞表面受体信号通路”和“刺激反应的负向反应”这两个最终子条目相关。“免疫系统过程”的分析结果见图 4。GO 分析在分子功能的项目中提供了 125 个出现明显变化的分子功能条目。其中分子功能

母条目“结合”下的子条目差异最显著。母条目“结合”有 4 个子项目,分别是“抗原结合”(P = 1.35E-17,参与的基因数目是 17 个)、“蛋白结合”(P = 1.24E-12,参与的基因数目是 73 个)、“核酸结合”(P = 9.60E-01,参与的基因数目是 16 个)、“酶结合”(P = 1.07E-05,参与的基因数目是 18 个;图 5)。最终子条目有“钙依赖蛋白结合”(P = 1.30E-02,参与基因数目是 2 个)、“多聚(A) RNA 结合”(P = 9.48E-06,参与基因数目是 14 个)。PPI 搜索提供的蛋白是 ANXA2 和膜联蛋白 A6 (annexin 6, ANXA6),这两种蛋白和条目“钙依赖蛋白结合”有很显著的相关性。热休克同族蛋白(heat shock cognate 71 kDa protein, HSPA8)和 ANXA2 与“多聚(A) RNA 结合”有很显著的相关性。

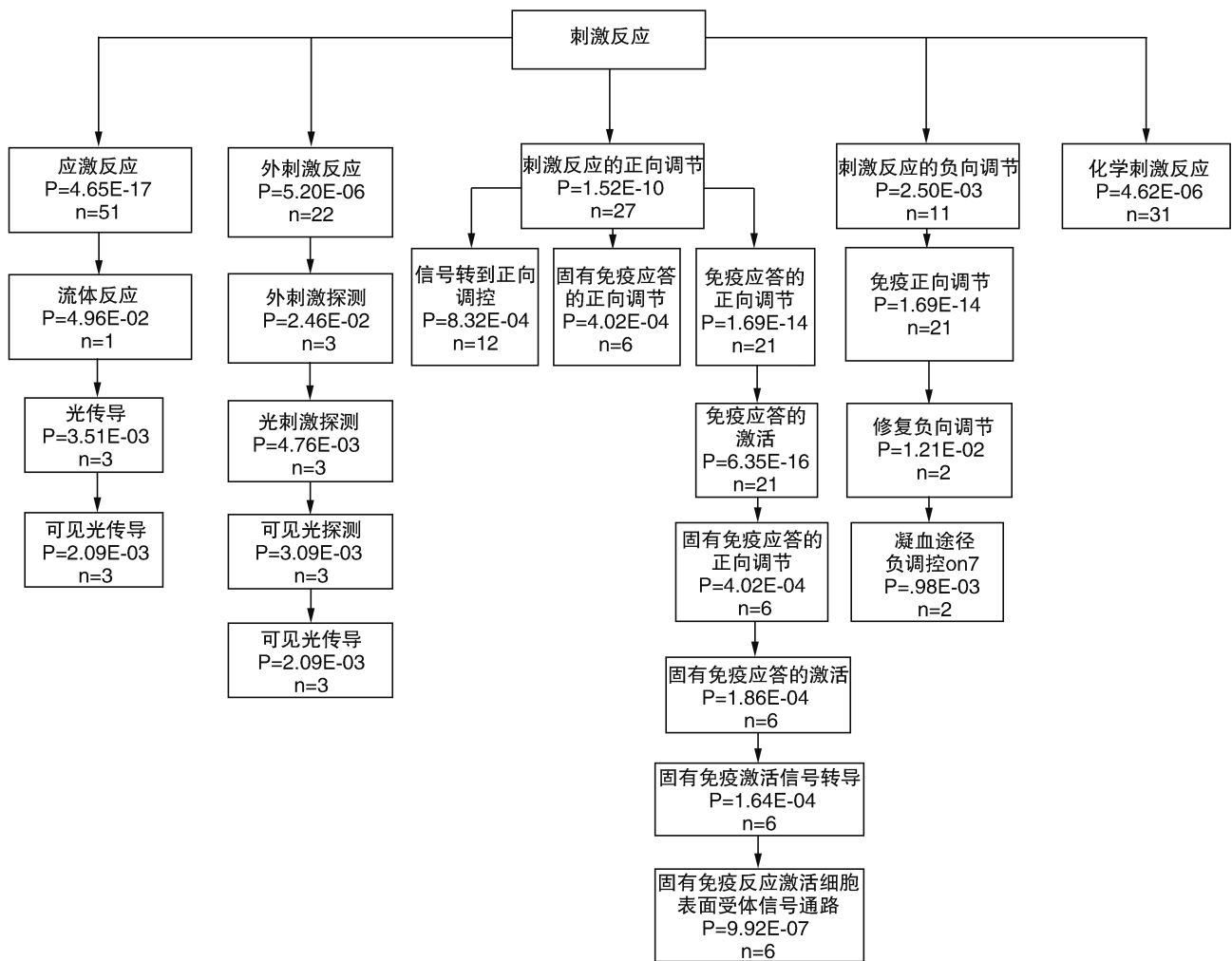


图 3. 起始条目“刺激反应”的树形层级分析
Figure 3. The function tree of “response to stimulus”

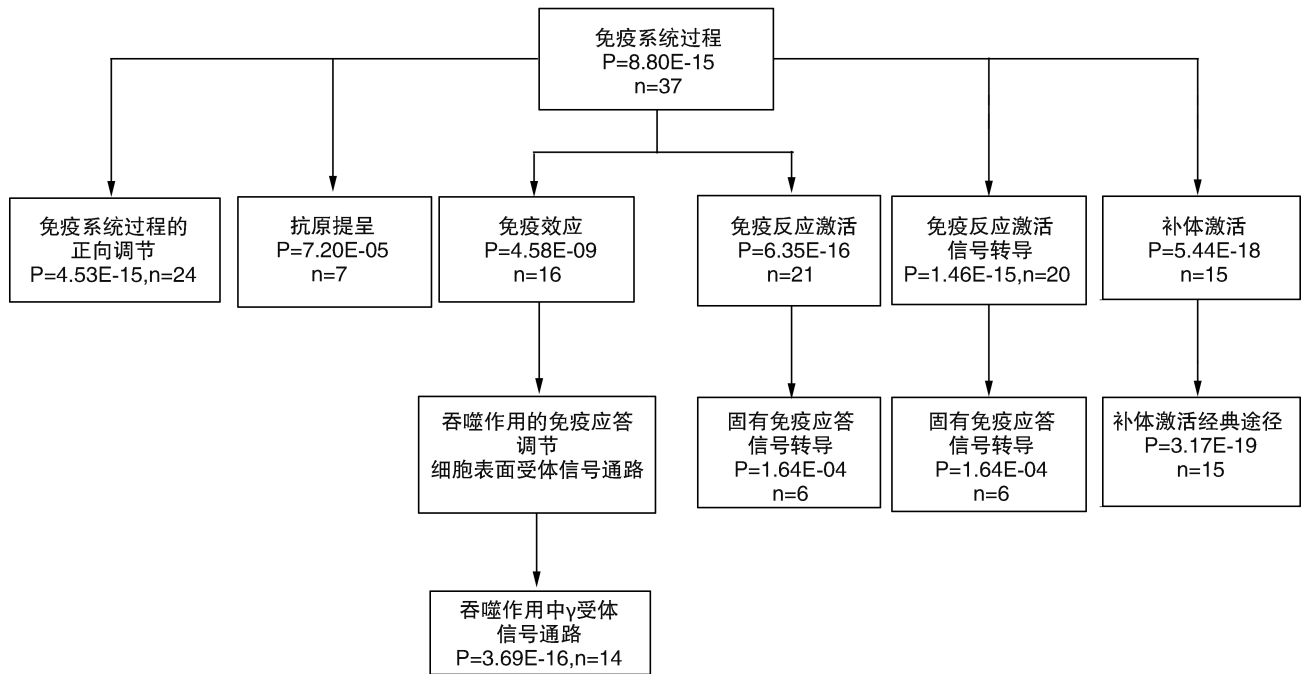


图 4. 起始条目“免疫系统过程”的树形层级分析

Figure 4. The function tree of “immune system process”

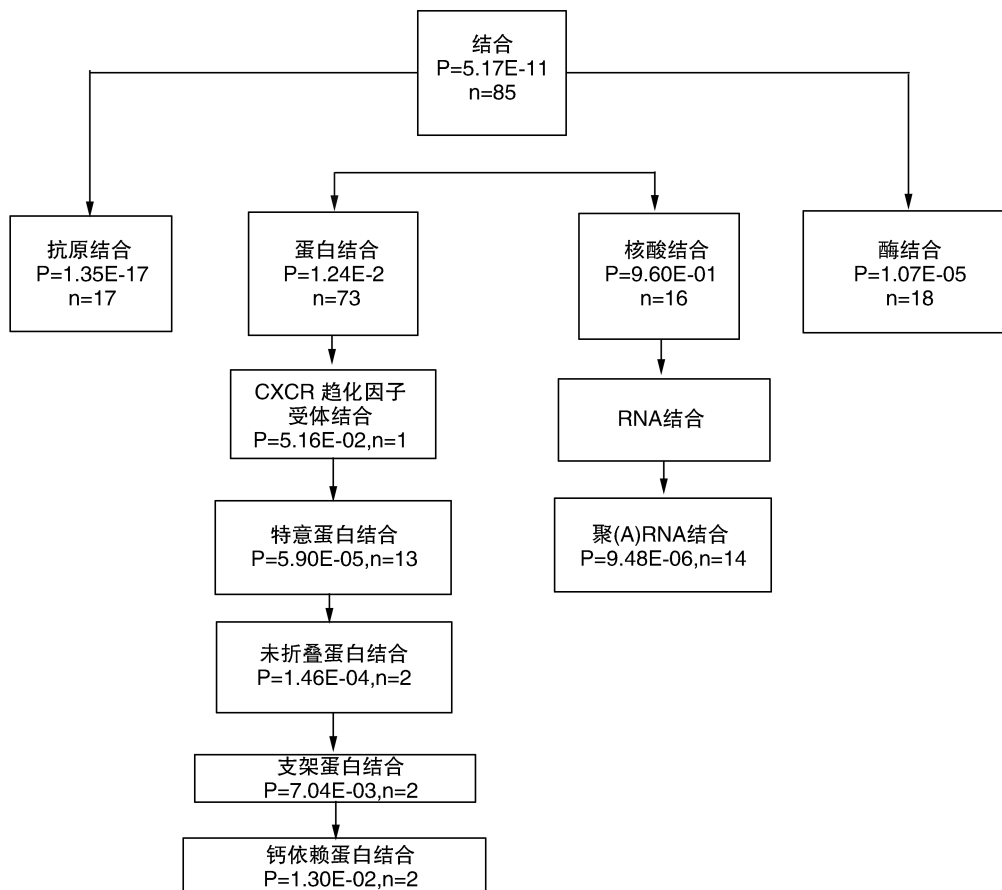


图 5. 起始条目“结合”树形层级分析

Figure 5. The molecular tree of “binding”

2.2.2 高血压患者与高血压合并 As 患者 在这个组别中,有 90 个蛋白质出现明显差异。其中 35 个蛋白上调,55 个蛋白下调。GO 分析锁定了 119 个细胞包含物出现了明显的变化;927 个生物学过程有明显的变化趋势。与健康人群和 As 患者的比较结果类似,“刺激反应”(P=1.93E-13)母条目变化最显著,参与的基因数目是 62 个,主要表现为其下“免疫反应”(P=9.81E-17)和“应激反应”(P=1.24E-18)两个大条目,分别有 30 个和 47 个基因产物参与(图 6)。其中值得注意的是,“应激反应”的一个子条目“凝血反应”(P=5.49E-06,参与的基因数目是 9 个)变化非常明显。属于这个子条目的下游条目“纤维蛋白凝块形成”(P=5.73E-02,参与的基因数目是 1 个)和“内源性凝血途径”(P=4.27E-

02,参与的基因数是 1 个)。凝血因子 XI 与内源性凝血途径有明显的相关性。“免疫反应”的下游条目包括了“免疫反应调节”(P=4.03E-18,参与基因数目是 25 个)、“体液免疫反应”(P=1.73E-17,参与基因数目是 16 个)、“器官组织特异性免疫反应”(P=2.10E-03,参与基因数目是 2 个)、“固有免疫反应”(P=2.23E-16,参与基因数目是 25 个)、“适应性免疫反应”(P=4.77E-14,参与基因数目是 15 个)。最终子条目为“固有免疫反应激活细胞表面受体信号通路”(P=2.45E-03,参与基因数目是 3 个),其相关蛋白为 PSMA6 和 PSMA7。固有免疫(P=2.23E-16,参与基因数目是 25 个)相关蛋白为 TNFAIP3-相互作用蛋白 2(TNFAIP3-interacting protein 2, TNIP2)、PSMA6 和 PSMA7。

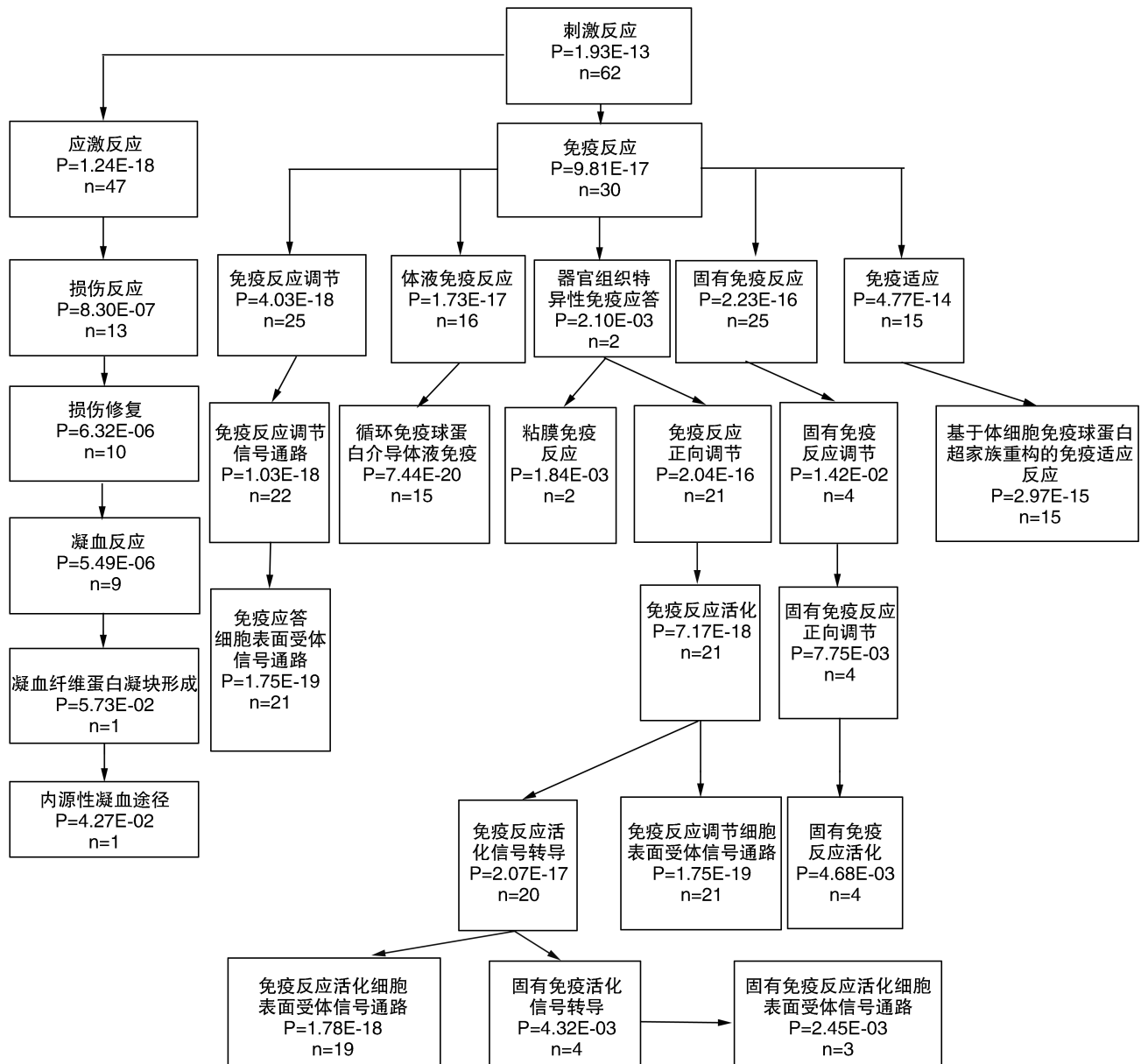


图 6. 高血压患者与高血压合并 As 患者比较的起始条目“刺激反应”树形层级分析

Figure 6. The function tree of “response to stimulus” in comparison of hypertension and hypertension complicated with atherosclerosis

GO 分析给出了 116 个出现明显变化的分子功能。“结合”功能母条目变化最显著,所以对其进行了深度分析。“结合”包括了 6 个子条目,其中“抗原结合”(P = 4.65E-19)参与的基因数目是 17 个;“有机环状化合物”的子条目“核酸结合”下的最终子条目“RNA 结合”(P = 7.31E-04)参与的基因数目是 14 个;“蛋白结合”(P = 3.86E-07)参与的基因数

目是 54 个,其子条目“酶结合”(P = 1.30E-05)参与的基因数目是 16 个,最终子条目有 2 个,分别是“蛋白酶结合”(P = 1.80E-07,参与的基因数目是 6 个)和“蛋白磷酸酶结合”(P = 2.68E-03,参与的基因数目是 3 个)。硒蛋白 P (selenoprotein P, SEEP1) 和 ANXA2 分别与这些条目相关(图 7)。

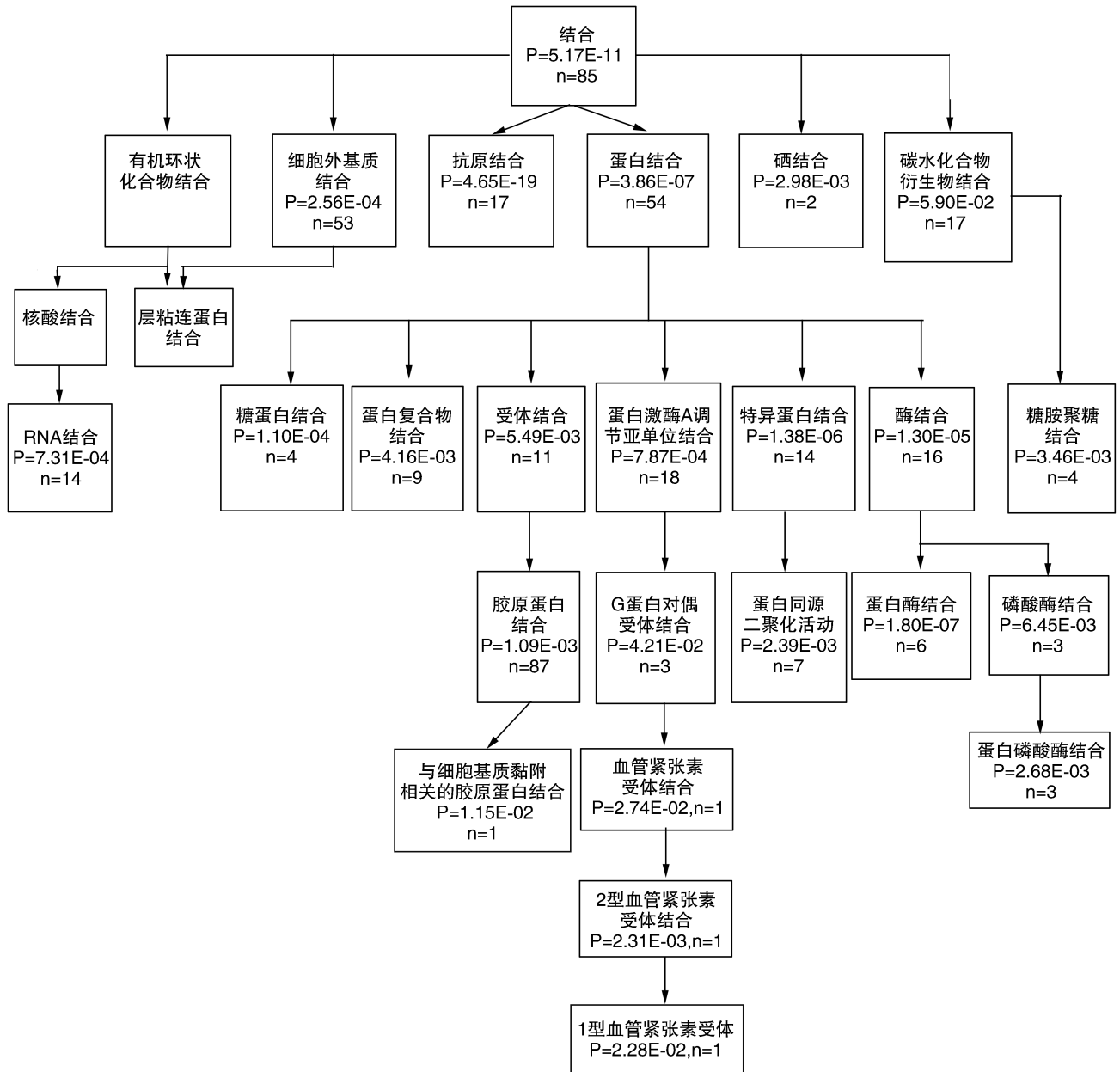


图 7. 高血压患者与高血压合并 As 患者比较的起始条目“结合”树形层级分析

Figure 7. The molecular function tree of “binding” in comparison of hypertension and hypertension complicated with atherosclerosis

2.2.3 两个比较组别中都出现的差异条目和蛋白质 在“刺激反应”的子条目中有 5 个条目在两

个组别的生物学过程比较中均出现,它们是“固有免疫反应的正向调节”、“免疫反应激活信号转导”、

“固有免疫反应激活”、“固有免疫反应激活信号转导”和“固有免疫反应激活细胞表面受体信号通路”。两个组别的分子功能差异中,“结合”包含了两个均有显著差异的子条目,它们是“抗原结合”和“酶结合”。PSMA6、PSMA7 和 ANXA2 也重复出现在两个比较的差异中。

3 讨论

As 是一种慢性炎症性疾病。血液中运载的炎症因子和炎性细胞共同促进了 As 的进程。蛋白组学结合 GO 分析可以在某一层面揭示 As 的发病原因与过程。粥样硬化的血管壁、患者的血浆和粥样斑块中的平滑肌都曾被选择作为蛋白组学的研究对象。现有文献表明 As 的发病发展与炎症免疫系统密切相关。这些研究集中在蛋白的表达差异上,忽视了蛋白质之间的协调作用和相互影响,缺乏关于生物学过程、细胞包含物和分子功能的分析研究。

本课题采用 As 患者血中的外泌体进行蛋白质组学检验和 GO 分析。近几年来,外泌体越来越多的为人们所熟知。外泌体在细胞间通讯中承担着重要的作用。粥样斑块中包含着大量来源于淋巴细胞的微泡^[11]。Aharon 等^[5]发现单核细胞来源的外泌体可以通过组织因子途径诱导内皮细胞凋亡和增加血液凝固性。Liu 等^[4]发现巨噬细胞来源的外泌体可以通过细胞间黏附分子 1 和核相关因子诱导淋巴细胞间的黏附。Zakharova 等^[12]发现 CD4⁺T 分泌的微泡可以通过神经酰胺受体加速胆固醇在单核细胞里的堆积。另一方面,Hergenreider 等^[13]发现层流诱导的血流剪切力可以使内皮细胞高表达 KLF2,有助于延缓粥样斑块形成。Gidlof 等^[14]发现血小板来源的外泌体通过 miR-320 抑制内皮细胞产生细胞间黏附分子 1 从而抑制炎症反应。然而,As 患者血液中的外泌体还没有被研究过。通过对血液中外泌体的研究可能会给 As 的形成与发展带来新的观点。

我们利用 GO 分析检索到 As 患者明显改变的外泌体蛋白功能条目。这些条目分布于生物学过程、细胞包含物和分子功能中。我们挑选出层级较高的条目作为母条目,其它检索出来的条目作为子条目。而后将这些条目组成树形图用来解析在 As 发生和发展的过程中发生的生物学过程和分子功能的变化。随后利用 PPI 检索出和这些最终子条目相关的蛋白质,这些蛋白很有可能在 As 的发生和进展中起重要的作用。

通过分析健康人群与 As、高血压合并 As 与单纯高血压两种比较的共同差异,寻找可能参与 As 的外泌体蛋白。我们发现“固有免疫”和“免疫反应的信号转导”在两种比较中均出现显著差异,提示固有免疫系统在外泌体影响 As 中起重要作用。巨噬细胞和单核细胞是固有免疫系统的重要成员,它们堆积在 As 的病变血管壁中。Erbay 等^[15]发现巨噬细胞暴露于与 As 相关的脂类信号分子时,发生内质网应激反应。单核细胞的外泌体可以通过组织因子诱导内皮细胞凋亡和血液凝固^[5]。巨噬细胞分泌的微泡可通过增加细胞间黏附分子 1 以及核因子 κ B 诱导细胞黏附。所以,固有免疫系统中的巨噬细胞和单核细胞可以通过外泌体的方式影响 As 的发展与进程。

血液凝固性改变在 As 的发生和斑块脱落中起重要作用,多处发现可改变血液凝固性的外泌体蛋白。Falati 等^[16]发现单核细胞释放的微泡含有高丰度的组织因子,可激活血液凝固途径。Al-Nedawi 等^[17]发现肥大细胞分泌的外泌体增加血液中凝固成分的溶解度,增加了斑块的不稳定性。

在 PPI 的分析中,我们发现很多不同的功能子条目都会连接到相同的几个蛋白质:PSMA6、PSMA7 和 ANXA2,这几个蛋白可能在 As 形成过程中起重要作用。PSMA7 是一种水解蛋白酶复合物,其可以在微碱性或中性的条件下发挥 ATP 依赖的水解蛋白酶活性。这种水解蛋白酶的活性在很多方面起到了关键效应,如细胞增殖或细胞周期调控、细胞分化和凋亡等。这个蛋白酶还可以抑制缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 的转录激活功能。在粥样斑块中,HIF-1 α 与 As 炎症表型以及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达相关。结合我们的结果分析,血外泌体的 PSMA7 表达上调意味着抑制了 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,抑制损伤的内皮细胞修复与更新,促进 As 的发生发展。PSMA6 也是一种具有多重水解活性的蛋白酶体复合物,它具有一个高度有序的环形 20 s 结构。全基因组关联分析显示 PSMA6 的高表达是心肌梗死的遗传危险因素^[18]。但 PSMA6 与 As 的关系尚待阐明。ANXA2 是钙离子依赖的膜结合蛋白,此种蛋白对于钙离子的亲和力可以被阴离子磷脂促进。它通过结合两个钙离子抑制前蛋白转化酶枯草溶菌素 9 (proprotein convertase subtilisin/kexin type 9, PCSK9) 促进低密度脂蛋白受体 (low density lipoprotein receptor, LDLR) 增加,因为 PCSK9 可以和 LDLR 互相结合以降低

LDLR 的表达水平。在我们的实验结果中,As 患者血外泌体内的 ANXA2 下调,可能意味着 PCSK9 的上调以及与 LDLR 结合的升高,导致肝细胞中 LDLR 表达量降低,使血中 LDL 含量进一步升高,促进 As 的发展。综合以上的文献和我们的结果推断,在 As 的进程中可能有两种通路发挥作用:一个是 PSMA7 升高通过抑制 HIF-1 α 和 VEGF,抑制血管细胞更新与修复;另一个是 ANXA2 降低,导致血液中 LDL 的上升促进 As 的发生发展。

我们首次分析了 As 患者血中的外泌体蛋白质谱,利用 GO 分析描绘出层级树形图来解释,在 As 的发病中有哪些生物学功能和分子功能出现了显著性的差异,探讨外泌体在 As 发病与进展中的作用。发现外泌体中的参与固有免疫和凝血的蛋白可能在 As 的发病和进展中起到了促进的作用,外泌体中的 PSMA7、PSMA6 和 ANXA2 可能成为 As 的新标志。

[参考文献]

- [1] Viiri LE, Full LE, Navin TJ, et al. Smooth muscle cells in human atherosclerosis: proteomic profiling reveals differences in expression of Annexin A1 and mitochondrial proteins in carotid disease[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 54: 65-72.
- [2] Moxon JV, Liu D, Moran CS, et al. Proteomic and genomic analyses suggest the association of apolipoprotein CI with abdominal aortic aneurysm[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2014, 8 (9-10): 762-772.
- [3] Johnstone RM. The Jeanne Manery-Fisher Memorial Lecture 1991. Maturation of reticulocytes: formation of exosomes as a mechanism for shedding membrane proteins[J]. *Biochem Cell Biol*, 1992, 70 (3-4): 179-190.
- [4] Liu ML, Scalia R, Mehta JL, et al. Cholesterol-induced membrane microvesicles as novel carriers of damage-associated molecular patterns: mechanisms of formation, action, and detoxification [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32 (9): 2 113-121.
- [5] Aharon A, Tamari T, Brenner B. Monocyte-derived micro-particles and exosomes induce procoagulant and apoptotic effects on endothelial cells[J]. *Thromb Haemost*, 2008, 100 (5): 878-885.
- [6] 谭艳美, 孟磊, 汪江波, 等. 巨噬细胞极化与动脉粥样硬化[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24 (2): 207-212.
- [7] 许秋莲, 杨阳, 田野. 巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中的作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2016, 24 (1): 97-100.
- [8] Gasser O, Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis[J]. *Blood*, 2004, 104 (8): 2 543-548.
- [9] 赵玉霞, 刘运芳, 张梅, 等. 声学密度定量技术检测动脉粥样斑块的临床研究[J]. *中国超声医学杂志*, 2002, 18 (10): 762-764.
- [10] 朱世明, 关玉庆, 王磊, 等. 高血压患者颈动脉超声与脑循环动力学的关系[J]. *中国超声医学杂志*, 2002, 18 (8): 586-588.
- [11] Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis[J]. *Circulation*, 2009, 119 (21): 2 808-817.
- [12] Zakharova L, Svetlova M, Fomina AF. T cell exosomes induce cholesterol accumulation in human monocytes via phosphatidylserine receptor [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212 (1): 174-181.
- [13] Hergenreider E, Heydt S, Treguer K, et al. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14 (3): 249-256.
- [14] Gidlof O, van der Brug M, Ohman J, et al. Platelets activated during myocardial infarction release functional miRNA, which can be taken up by endothelial cells and regulate ICAM1 expression[J]. *Blood*, 2013, 121 (19): 3 908-917.
- [15] Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis[J]. *Nat Med*, 2009, 15 (12): 1 383-391.
- [16] Falati S, Liu Q, Gross P, et al. Accumulation of tissue factor into developing thrombi in vivo is dependent upon microparticle P-selectin glycoprotein ligand 1 and platelet P-selectin[J]. *J Exp Med*, 2003, 197 (11): 1 585-598.
- [17] Al-Nedawi K, Szemraj J, Cierniewski CS. Mast cell-derived exosomes activate endothelial cells to secrete plasminogen activator inhibitor type 1[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25 (8): 1 744-749.
- [18] Heckman MG, Soto-Ortolaza AI, Diehl NN, et al. Genetic variants associated with myocardial infarction in the PSMA6 gene and Chr9p21 are also associated with ischaemic stroke [J]. *Eur J Neurol*, 2013, 20 (2): 300-308.

(此文编辑 文玉珊)