

Ezrin 基因沉默通过降低 Calpain-1 活性抑制血管紧张素 II 诱导的 ABCA1 降解

王兰¹, 郭静¹, 莫显刚², 安静¹, 张莉², 洪伟³

(1. 贵州医科大学; 2. 贵州医科大学附属医院综合病房; 3. 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵州省贵阳市 550004)

[关键词] 埃兹蛋白; 钙激活中性半胱氨酸蛋白酶; 三磷酸腺苷结合盒转运体 A1; 血管紧张素 II

[摘要] 目的 探讨埃兹蛋白(Ezrin)基因表达降低对 RAW264.7 钙激活中性半胱氨酸蛋白酶(Calpain-1)活性及三磷酸腺苷结合盒转运体 A1(ABCA1)蛋白表达的影响。方法 实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法分别检测靶向作用于 Ezrin 基因的小干扰 RNA(siRNA)的抑制效率。Western blot 法检测血管紧张素 II(Ang II)及联合加入 Ezrin siRNA 后 Calpain-1 的蛋白表达水平变化。Western blot 法检测 Ang II 及联合加入 Calpain 抑制剂 N-乙酰基-L-亮氨酸-L-亮氨酸-L-正亮氨酸(ALLN)、Ezrin siRNA 后对 ABCA1 蛋白表达水平的影响。结果 Ezrin siRNA 转染组较对照组 Ezrin 的 mRNA 和蛋白表达均下调($P < 0.05$)。Western blot 结果显示 Ang II 可上调 Calpain-1 的活性(4.92 ± 0.23 比 1.00 ± 0.17 , $P < 0.05$), 而 Ezrin siRNA 可逆转 Calpain-1 的活性上调(0.23 ± 0.21 比 4.92 ± 0.23 , $P < 0.05$)。此外, Ang II 处理后 ABCA1 蛋白表达下调(0.167 ± 0.055 比 0.732 ± 0.072 , $P < 0.05$), 这种作用可被 Ezrin siRNA 逆转(0.611 ± 0.048 比 0.167 ± 0.055 , $P < 0.05$), 而给予 Calpain 抑制剂 ALLN 干预未能进一步提高 ABCA1 蛋白水平。结论 Ezrin 可能通过 Calpain-1 途径在 Ang II 诱导的 ABCA1 表达降低过程中发挥重要作用。

[中图分类号] R543.5; R363

[文献标识码] A

Ezrin silencing inhibits angiotensin II -induced ABCA1 decrease by reducing calpain-1 activity

WANG Lan¹, GUO Jing¹, MO Xian-Gang², AN Jing¹, ZHANG Li², HONG Wei³

(1. Guizhou Medical University; 2. Department of Comprehensive Ward, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University; 3. Guizhou Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

[KEY WORDS] Ezrin; Ca^{2+} -dependent cysteine proteinase; Adenosine triphosphate binding cassette transporter A1; Angiotensin II

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of Ezrin gene knockout on calpain-1 activity and adenosine triphosphate binding cassette transporter A1(ABCA1) protein levels in RAW264.7 cells. **Methods** RAW264.7 cells transfected with small interfering RNA (siRNA) targeting Ezrin were subject to real time PCR and Western blot to detect the inhibition ratio. Added with angiotensin II (Ang II) or Ang II + Ezrin siRNA, calpain-1 protein expression and activity were determined by using Western blot. Then, the expression of ABCA1 protein was examined by Western blot after the treatment with Ang II, Ezrin siRNA, calpain inhibitor N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucine (ALLN). **Results** Ezrin mRNA and protein expression in Ezrin siRNA groups were inhibited($P < 0.05$). The calpain-1 expression were up-regulated by Ang II treatment (4.92 ± 0.23 vs 1.00 ± 0.17 , $P < 0.05$), which were reversed by Ezrin siRNA (0.23 ± 0.21 vs 4.92 ± 0.23 , $P < 0.05$). Therefore, the ABCA1 protein expression was inhibited by addition of Ang II (0.167 ± 0.055 vs 0.732 ± 0.072), which were reversed by Ezrin siRNA (0.611 ± 0.048 vs 0.167 ± 0.055 , $P < 0.05$). There were no statistically significant differences at ABCA1 protein levels between Ang II + Ezrin siRNA group and Ang II + Ezrin siRNA + ALLN group. **Conclusion** Ezrin might play an important role in Ang II-induced ABCA1 protein attenuation via calpain-1 pathway.

[收稿日期] 2017-11-20

[修回日期] 2018-01-08

[基金项目] 国家自然科学基金(31260250 和 31660288)资助项目

[作者简介] 王兰, 硕士研究生, 主要研究方向为动脉粥样硬化的发病机制与防治, E-mail 为 18615393387@163.com。通讯作者莫显刚, 博士, 硕士研究生导师, 主要研究方向为动脉粥样硬化的发病机制与防治, E-mail 为 moxiangang123@126.com。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)是冠心病、脑梗死及外周血管病等疾病主要病因,而脂质代谢障碍是 As 最重要的发病机制。ATP 结合盒转运蛋白 A1(adenosine triphosphate binding cassette transporter A1, ABCA1)促进细胞内胆固醇及磷脂流出至细胞外^[1],具有抗 As 作用^[2]。研究发现血管紧张素 II(angiotensin II, Ang II)可通过下调 ABCA1 基因表达来增加泡沫细胞内胆固醇浓度^[3]。钙激活中性半胱氨酸蛋白酶家族(Ca²⁺-dependent cysteine proteinase, Calpain)是一类钙激活蛋白酶家族,包括非特异性和组织特异性 Calpain 两大类,非特异性 Calpain 包括 μ -calpain (Calpain-1) 和 m-calpain (Calpain-2)^[4-5]。Howatt 等^[6]发现 Calpain 基因敲除小鼠中 Ang II 致动脉粥样硬化的作用减弱。Ezrin 是细胞骨架蛋白 Ezrin/Radixin/Moes (ERM) 的重要成分,是细胞骨架和细胞膜之间的接头蛋白^[7-8]。研究表明 Calpain 活性与 Ezrin 定位于细胞膜附近密切相关,抑制 Ezrin 表达可以抑制 Calpain 活性^[9]。研究发现^[10] Calpain 介导 ABCA1 的 PEST 序列磷酸化从而诱导 ABCA1 降解。Ezrin 能否通过调节 Calpain-1 活性参与 Ang II 介导的 ABCA1 降解尚未清楚。本研究利用小 RNA 干扰技术敲降小鼠巨噬细胞 RAW264.7 中 Ezrin 表达,探讨 Ezrin 基因敲降后 Calpain-1 活性及 ABCA1 表达。

1 材料和方法

1.1 主要材料

小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞购于中科院上海细胞所。DMEM/F12 培养基、Opti-MEM 购自 Hyclone 公司, siRNA 购自上海吉玛公司, Lipofectamine[®] RNAiMAX Transfection Reagent 购自 Invitrogen 公司。钙蛋白酶活性测定试剂盒(BioVision 公司,货号:K240-100)。一抗 ABCA1 mouse IgG 及一抗 Calpain-1 mouse IgG 购自 Abcam 公司,一抗 Ezrin Rabbit IgG 购自 CST,碱性磷酸标记山羊抗兔 IgG 及碱性磷酸标记兔抗小鼠 IgG 购自 CST 公司。Calpain 抑制剂 N-乙酰基-L-亮氨酸-L-亮氨酸-L-正亮氨酸(N-acetyl-L-leucyl-L-leucyl-L-norleucinal, ALLN)及 Ang II 购自 Sigma 公司。

1.2 细胞培养、转染

RAW264.7 细胞培养于含低糖 DMEM 培养基(Hyclone),15%灭活胎牛血清,100 kU/L 青霉素、链霉素(Hyclone)的完全培养基。将生长至对数期的

RAW264.7 细胞,用胰蛋白酶消化,按 3×10^5 /孔的浓度接种至 6 孔板上,待细胞贴壁后,细胞汇合率 $\geq 80\%$ 时,即可开始进行瞬转,以 Opti-MEM 为转染培养液转染 RAW264.7 细胞。3 μ L 浓度为 3 μ mol/L 的 siRNA 和 9 μ L Lipofectamine[®] RNAiMAX 室温混匀后转染 RAW264.7,6 h 后换成无抗生素高糖 DMEM 培养液(10%FBS),继续培养至 48 h。针对 Ezrin 基因干扰序列:Ezrin siRNA1:正义链 5'-CGAGCAGAUUGAGAAG-GCCCUCCAA-3',反义链 5'-UUGGAGGGCCUUCUCAAUCUGCUCG-3';Ezrin siRNA2:正义链 5'-CCUUGGAGUGAGAUCAGGAACAUCU-3',反义链 5'-AGAU-GUCCUGAUCUCACUCCAAGG-3';乱码短 RNA 序列(scramble RNA)为阴性对照:正义链 5'-UUCUC-CGAACGUGUCACGUTT-3',反义链 5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGATT-3'。转染后 48 h 进行 PCR 及 WB 检测干扰效率及筛选最有效 siRNA。

1.3 实验分组

为检测小干扰 RNA(siRNA)对 Ezrin 抑制效率,实验分成空白对照组、阴性干扰组(转染乱码 siRNA)、转染 Ezrin siRNA1 组及转染 Ezrin siRNA2 组;为探讨 Ezrin siRNA 对 AngII 诱导 Calpain-1 及 Calpain 活性影响,实验分为空白对照组、AngII 组(终浓度为 1 μ mol/L)及 AngII+siRNA 组;为探讨 ABCA1 表达及机制,将实验分为对照组、AngII 组、AngII+siRNA 组、AngII+siRNA+ALLN 组(ALLN:终浓度 100 μ mol/L)。

1.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 Ezrin 基因 mRNA 水平

提取 RAW264.7 细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA。RT-PCR 25 μ L 反应体系包括 SYBRGreen Realtime PCR Master Mix 12.5 μ L,cDNA 模板 1 μ L、Ezrin 或 GAPDH 上下游引物各 0.5 μ L。Ezrin 基因引物 F:5'-CAGAGGCAGAGAAGAATGA-3',R:5'-GCAGCGTCTTATACTTGTC-3';GAPDH 基因引物 F:5'-TGGACTCCACGACGTACTCAG-3',R:5'-ACAT-GTCCAATATGATTCCA-3'。反应条件如下:50 $^{\circ}$ C 2 min,95 $^{\circ}$ C 10 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,35 个循环。所有样本的 Ct 值均由荧光定量 PCR 扩增仪 GeneAmp7300(美国 Applied Biosystems 公司)读取,得到样本中 Ezrin 和 GAPDH 的 Ct 值,Ezrin 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.5 Western blot 法测定 Ezrin、Calpain-1 及 ABCA1 蛋白水平

裂解细胞提取蛋白,碧云天蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,100 $^{\circ}$ C 蛋白变性 5 min,SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,湿转法将蛋白转移至聚偏二氟乙烯

膜。兔抗 Ezrin 单克隆抗体 (1 : 1000), 小鼠抗 Calpain-1 多克隆抗体 (1 : 2000), 小鼠抗 ABCA1 单克隆抗体 (1 : 500), 兔抗 GAPDH 单克隆抗体 (1 : 1000) 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜三遍, 每次 10 min, 孵育碱性磷酸标记的山羊抗兔 IgG (1 : 1000), 碱性磷酸标记的兔抗小鼠 IgG (1 : 10000), 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 遍, 每次 10 min, 增强化学发光法显色。

1.6 Calpain-1 活性的测定

按文献^[11]方法, 各组细胞提取蛋白, 进行 Western blot 法检测, 方法同上, 一抗为小鼠抗 Calpain-1 多克隆抗体 (1 : 2000)。检测由相对分子量 81 kDa 的无活性形式 Calpain-1 (holo Calpain-1) 经自身激活去除 14 个氨基酸残基形成约 55 kDa 的具有活性 Calpain-1 形式, 计算活性/无活性 Calpain-1 条带光密度值的比值, 表示为 Calpain-1 相对活性。

1.7 小鼠巨噬细胞钙蛋白酶活性检测

参考文献^[12]并按钙蛋白酶活性测定试剂盒操作。取各组 RAW264.7 细胞 1×10^6 个细胞离心后, 加入提取缓冲液重悬置于冰上 20 min, 轻轻拍打 4 次混匀, 1×10^4 g 离心力离心 1 min, 取上清, 测蛋白浓度, 取 100 μ g 蛋白加入 85 μ L 提取缓冲液, 加入 10 μ L 10 \times 反应缓冲液及 5 μ L 钙蛋白酶荧光标记底物, 避光 37℃ 孵育 1 h, 以 400 nm 激发波长、505 nm

发射波长检测相对荧光值。

1.8 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较进行方差齐性检验后采用单因素方差分析, 组间多重比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐用 Dunnett T3 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染 siRNA 后 RAW264.7 细胞中 Ezrin 基因表达变化

两条 Ezrin siRNA 转染 RAW264.7 细胞, 48 h 后转染效率都在 80% 以上。溶解曲线显示 GAPDH 与 Ezrin 基因均为单峰, 提示各基因为特异性扩增。定量 PCR 的结果显示: 阴性干扰组与空白对照组相比较无统计学差异 ($P > 0.05$); siRNA1 及 siRNA2 组中 Ezrin 的 mRNA 表达水平低于阴性干扰组 ($0.20 \pm 0.27, 0.21 \pm 0.29$ 比 $0.97 \pm 0.15, P < 0.05$) (图 1A)。Western blot 法检测各组细胞中 Ezrin 蛋白的表达, 结果显示: 与阴性干扰组相比, 两个 siRNA 转染组的蛋白水平明显降低 ($0.18 \pm 0.27, 0.17 \pm 0.11$ 比 $0.78 \pm 0.19, P < 0.05$), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$; 图 1B), 选择其中一条 Ezrin siRNA 进行后续实验。

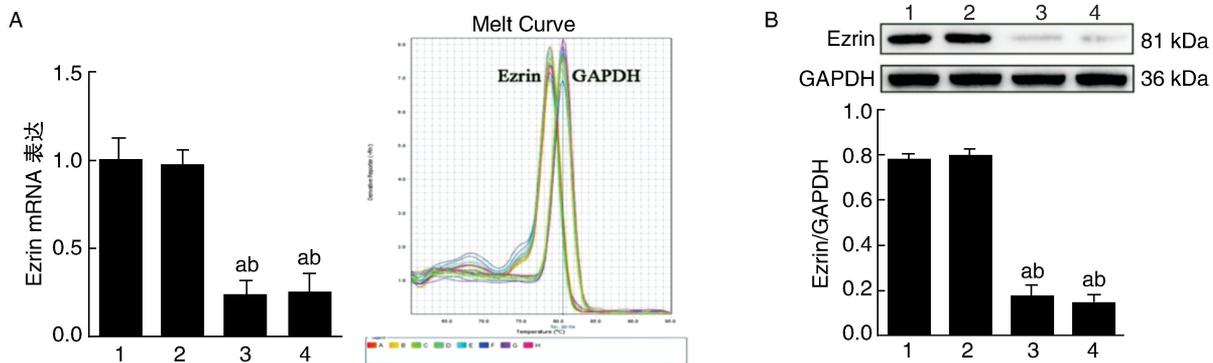


图 1. siRNA 干扰对 RAW264.7 细胞 Ezrin 基因表达的影响 ($n=3$) A 为 qR-PCR 结果及溶解曲线; B 为 Western blot 结果。1 为空白对照组, 2 为阴性干扰组, 3 为 Ezrin siRNA1 组, 4 为 Ezrin siRNA2 组。a 为 $P < 0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与阴性干扰组比较。

Figure 1. Effect of siRNA on Ezrin in RAW264.7 cells ($n=3$)

2.2 Ezrin 敲降对 Calpain-1 活性的影响

为探讨 Ezrin 表达变化对 Calpain-1 活性的影响, Western blot 检测 Calpain-1 的激活及无活性片段, 用活性片段与无活性片段的比值表示 Calpain-1 活性, 结果显示 Ang II 组 Calpain-1 蛋白表达高于空白对照组 (4.92 ± 0.23 比 $1.00 \pm 0.17, P < 0.05$), 相比 Ang II 组 Ang II + Ezrin siRNA 组 Calpain-1 蛋白活性降低 (0.23 ± 0.21 比 $4.92 \pm 0.23, P < 0.05$) (图 2), 提示

Ang II 激活 Calpain-1 活性可以被 Ezrin 基因表达敲降所抑制。

为了验证 Ezrin 的敲降与 Calpain 活性的关系, 运用荧光法检测各组巨噬细胞 Calpain 活性。结果显示, 与空白对照组比较, Ang II 组 Calpain 活性均明显升高 (5.16 ± 0.36 比 $1.00 \pm 0.37, P < 0.05$), 相比 Ang II 组 Ang II + Ezrin siRNA 组 Calpain 活性降低 (0.47 ± 0.21 比 $5.16 \pm 0.36, P < 0.05$) (图 2)。

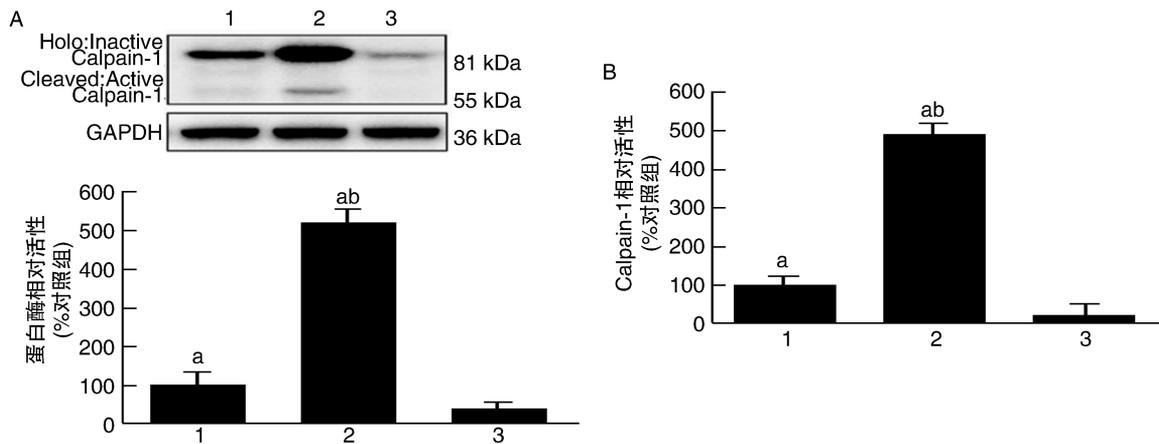


图 2. Ezrin 敲降对 Calpain-1 活性的影响 ($n=3$) A 为 Western blot 检测 Calpain-1 蛋白表达及统计结果, B 为 Calpain 活性统计结果。1 为空白对照组, 2 为 Ang II 组, 3 为 Ang II+Ezrin siRNA 组。a 为 $P<0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 Ang II 组比较。

Figure 2. Effect of Ezrin knockdown on calpain-1 activity ($n=3$)

2.3 Ezrin 参与 ABCA1 蛋白水平下调机制

为探讨 ABCA1 蛋白水平下调机制, 分别检测各组 ABCA1 的水平, 结果发现, Ang II 组蛋白表达低于对照组 (0.167 ± 0.055 比 0.732 ± 0.072 , $P<0.05$), 而 Ang II+Ezrin siRNA 组高于 Ang II 组 (0.611 ± 0.048 比 0.167 ± 0.055) ($P<0.05$) (图 3), 提示 Ezrin siRNA 能部分逆转 Ang II 诱导的 ABCA1 蛋白水平降低; 在此基础上, 进一步给予 Calpain 抑制剂 ALLN 干预, ABCA1 表达水平较 Ang II+Ezrin siRNA 组稍提高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$; 图 3), 提示 Ezrin siRNA 可能通过抑制 Calpain-1 活性或通过 Calpain-1 途径从而抑制 ABCA1 蛋白降解, 说明 Ezrin 通过调节 Calpain-1 表达参与 ABCA1 降解过程。

3 讨论

ABCA1 作为跨膜蛋白以 ATP 为能源, 促进细胞内游离胆固醇流出从而参与胆固醇逆向转运的初始阶段, 形成高密度脂蛋白 (high-density lipoprotein, HDL), 并发挥抗 As 的作用^[13]。Ang II 不仅在心功能衰竭中发挥重要作用, 在动脉粥样硬化斑块形成与发展中亦发挥重要作用。研究表明 Ang II 可抑制 THP-1 源性泡沫细胞 ABCA1 的表达并减少胆固醇外流, 促进 As 进展^[14], 而 Calpain 介导 ABCA1 降解在 ABCA1 转录后调控 HDL 生物合成中发挥重要作用^[15]。本研究发现 Ang II 上调 Calpain 活性, 小 RNA 干扰 Ezrin 表达能抑制 Calpain 活性及 ABCA1 蛋白水平降低, 提示 Ezrin 可能在 Calpain 介导 ABCA1 降解中起重要作用。

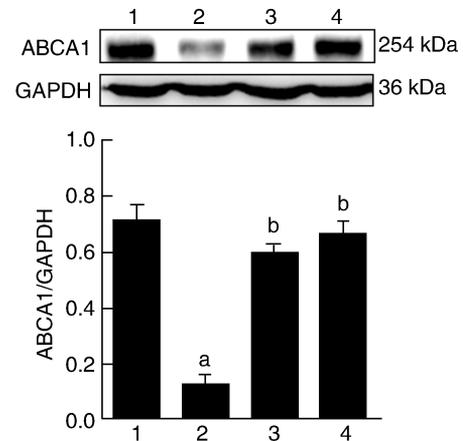


图 3. Ezrin 基因沉默通过下调 Calpain-1 基因的活性而上调 ABCA1 蛋白表达水平 ($n=3$) 1 为对照组, 2 为 Ang II 组, 3 为 Ang II + Ezrin siRNA 组, 4 为 Ang II + Ezrin siRNA + ALLN 组。a 为 $P<0.05$, 与对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与 Ang II 组比较。

Figure 3. Ezrin gene silencing up-regulates the expression of ABCA1 protein by down-regulating the activity of Calpain-1 gene ($n=3$)

Ezrin 是 ERM 蛋白家族成员之一, 1989 年克隆出其 DNA 序列, 是提供质膜相关蛋白之间连接的微丝-膜连接器^[16-17], 主要参与上皮细胞中细胞骨架与胞膜之间的连接, 具有维持细胞形态和运动、连接黏附分子及调节信号转导等功能^[18]。Ezrin 亦可作为细胞质内蛋白酶的底物, 既往研究表明 Calpain 激活降解 Ezrin, Ezrin 作为 Calpain 底物, 参与细胞运动调节^[19]。本研究发现当下调 Ezrin 基因表达, 可抑制 Ang II 诱导的 Calpain-1 活性增高。Ang II 上调 Calpain-1 表达、Calpain-1 自身激活以及 Calpain 总活性, Calpain-1 活性与总活性改变类似, 提示

Calpain-1 激活可能是控制 Calpain 总活性的主要原因。Ezrin 可能与 Calpain 结合,稳定 Calpain-1,免于被蛋白酶降解^[20]。Ezrin 基因敲降下调 Calpain 活性机制可能为:Calpain-1 蛋白水平下调;Calpain-1 自身激活下调。Youn 等^[9]既往研究表明抑制 Ezrin 表达亦可下调血管内皮生长诱导 Calpain 活性进而抑制一氧化氮(NO)产生。Hoskin^[21]研究表明乳腺癌肿瘤细胞 Ezrin 基因敲降可以下调 Calpain 活性,Ezrin 通过改变 Calpain 活性调节黏附及伪足动态改变,促进癌细胞侵袭。不论本研究还是既往研究均提示 Ezrin 不仅仅是 Calpain 的底物,而且能调节 Calpain 活性及 Calpain-1 介导底物降解。至于 Ezrin 参与 Calpain-1 介导 ABCA1 降解,是否巨噬细胞中 Ezrin 也类似内皮细胞^[9]及乳腺癌细胞^[21]的 Ezrin 可以将 Calpain-1 募集到细胞膜附近从而防止 Calpain-1 降解并激活 Calpain-1 有待进一步研究。

本研究仍存在一些不足。转染时间仅选择 48 h,尚未完全阐明转染对时空表达的影响。本研究尚需对 Ezrin 高表达时 Calpain-1 活性做进一步研究,尚需完善 Ezrin 与 Calpain-1 蛋白之间的显微共聚焦实验,以期明确二者之间的时空定位的关系。未能进行动物实验,进一步完善实验结果。

本研究发现 Ang II 可激活 Calpain-1,促进 Calpain-1 介导 ABCA1 降解,Ezrin 基因敲降可抑制 Ang II 对 Calpain 激活,升高 ABCA1 蛋白水平,表明 Ezrin 在 Ang II 诱导的经 Calpain-1 途径 ABCA1 降解发挥重要作用。鉴于 Ezrin 蛋白作为接头蛋白广泛参与细胞形态重建以及 ABCA1 在炎症与胆固醇逆向转运中承担重要角色,Ezrin 参与 ABCA1 降解的研究结果,或许将细胞结构重塑与胆固醇逆向转运联系起来,为拓展 ABCA1 介导胆固醇逆向转运新领域提供新的思路。

[参考文献]

[1] Li G, Gu HM, Zhang DW. ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation[J]. *IUBMB Life*, 2013, 65(6): 505-512.

[2] Huang L, Fan BY, Ma A, et al. Inhibition of ABCA1 protein degradation promotes HDL cholesterol efflux capacity and RCT and reduces atherosclerosis in mice[J]. *J Lipid Res*, 2015, 56(5): 986-997.

[3] Ibrahim IA, Nakaya M, Kurose H. Ezrin, radixin, and moesin phosphorylation in NIH3T3 cells revealed angiotensin II type 1 receptor cell-type-dependent biased signaling[J]. *J Pharmacol Sci*, 2013, 122(1): 1-9.

[4] Neuhof C, Neuhof H. Calpain system and its involvement in myocardial ischemia and reperfusion injury[J]. *World J Cardiol*, 2014, 6(7): 638-652.

[5] Morton JD, Lee HYY, Mcdermott JD, et al. A macrocyclic calpain

inhibitor slows the development of inherited cortical cataracts in a sheep model[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013, 54(1): 389-395.

[6] Howatt DA, Balakrishnan A, Moorleghen JJ, et al. Leukocyte calpain deficiency reduces angiotensin II-induced inflammation and atherosclerosis but not abdominal aortic aneurysms in mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2016, 36(5): 835-845.

[7] Krishnan K, Bruce B, Hewitt S, et al. Ezrin mediates growth and survival in Ewing's sarcoma through the AKT/mTOR, but not the MAPK, signaling pathway[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2006, 23: 227-236.

[8] Leslie K L, Song G J, Barrick S, et al. Abstract 13042: Ezrin binding phosphoprotein 50 promotes inflammation and atherosclerosis[J]. *Circulation*, 2013, (22): A13 042.

[9] Youn J Y, Wang T, Cai H. An ezrin/calpain/PI3K/AMPK/eNOSs1179 signaling cascade mediating VEGF-dependent endothelial nitric oxide production[J]. *Circ Res*, 2009, 104(1): 50-59.

[10] Wang N, Chen W, Linselmitschke P, et al. A PEST sequence in ABCA1 regulates degradation by calpain protease and stabilization of ABCA1 by apoA-I[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(1): 99-107.

[11] Wei C, Zhou J, Dehne N, et al. Hypoxia induces calpain activity and degrades SMAD2 to attenuate TGF β signaling in macrophages[J]. *Cell Biosci*, 2015, 5(1): 36.

[12] McCarthy DA, Clark RR, Bartling TR, et al. Redox control of the senescence regulator interleukin-1 α and the secretory phenotype[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(45): 32 149-159.

[13] Feig J E, Hewing B, Smith J D, et al. High-density lipoprotein and atherosclerosis regression: evidence from preclinical and clinical studies[J]. *Circ Res*, 2014, 114(1): 205.

[14] 柴婵娟, 杨慧宇, 杨志明, 等. 血管紧张素(1-7)和血管紧张素 II 对 THP-1 源性泡沫细胞胆固醇外流的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2014, 22(9): 885-890.

[15] Yokoyama S, Arakawa R, Wu CA, et al. Calpain-mediated ABCA1 degradation: post-translational regulation of ABCA1 for HDL biogenesis[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1821(3): 547-551.

[16] Shrivastava R, Köster D, Kalme S, et al. Tailor-made Ezrin actin binding domain to probe its interaction with actin in-vitro[J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123 428.

[17] Babich V, Di SF. The Na⁺/H⁺ exchanger-3 (NHE3) activity requires ezrin binding to phosphoinositide and its phosphorylation[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129 306.

[18] Louvet-Vallée S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling[J]. *Biol Cell*, 2000, 92(5): 305-316.

[19] Yao X, Thibodeau A, Forte J G. Ezrin-calpain I interactions in gastric parietal cells[J]. *Am J Physiol*, 1993, 265(1): 36-46.

[20] Wang H, Guo Z, Wu F, et al. PKA-mediated protein phosphorylation protects ezrin from calpain I cleavage[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(2): 496-501.

[21] Hoskin V, Szeto A, Ghaffari A, et al. Ezrin regulates focal adhesion and invadopodia dynamics by altering calpain activity to promote breast cancer cell invasion[J]. *Mol Biol Cell*, 2015, 26(19): 3 464-479.

(此文编辑 许雪梅)