

泌代谢杂志, 2006, 22(3): 290-293.

[6] Janke J, Engeli S, Boschmann M, et al. Retinol binding protein 4 in human obesity [J]. Diabetes, 2006, 55(10): 2805-2810.

[7] 张博, 张黎军. 视黄醇结合蛋白 4 在糖尿病动脉粥样硬化大鼠血清中的表达及意义[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(4): 515-517.

[8] 周奎臣, 李合峰. 视黄醇结合蛋白检测在糖尿病早期肾病的应用[J]. 中国医药导报, 2010, 7(13): 83.

[9] Cabre A, Lazaro L, Girona, et al. Retinol binding protein 4 as a plasma biomarker of renal dysfunction and cardiovascular disease in type 2 diabetes [J]. Intern Med, 2007, 262(4): 496-503.

[10] Murata M, Saito T, Otani T, et al. An increase in serum retinol binding protein 4 in the type 2 diabetic Subjects with nephropathy[J]. Endocrine journal. 2009, 56(2): 287-294.

[11] 张素华, 张真, 解松刚, 等. 视黄醇结合蛋白与胱抑素 c 诊断早期 2 型糖尿病肾病的价值[J]. 江苏医药, 2010, 36(7): 772-773.

[12] Ziegelmeier M, Bachmaun A, Seeger J, et al. Serum levels of adipokine retinol binding protein 4 in relation to renal function Diabetes Care [J]. Intern Med, 2007, 30(10): 2588-2592.

[13] 高璐, 常志文, 秦明照, 等. 视黄醇结合蛋白 4 与冠心病的关系[J]. 医药论坛杂志, 2010, 31(15): 10-11.

[14] Graham TE, Yang Q, Blaher M, et al. Retinol binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese and diabetic subjects [J]. N Engl J Med, 2006, 354(24): 2552-2563.

[15] Mauat Z, Simon T, Bencssiano J. Retinol-binding protein 4 and prediction of incident coronary events in healthy men and women [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(1): 255-260.

[16] von Eynatten M, Lepper PM, Liu D, et al. Retinol-binding protein 4 is associated with components of the metabolic syndrome, but not with insulin resistance, in men with type 2 diabetes or coronary artery disease [J]. Diabetologia, 2007, 50(9): 1930-1937.

(收稿日期: 2012-06-08)

脂联素与心血管疾病的相关性

卓志娟, 雷鸣 综述, 夏先考 审校 (湖南省常德市第一人民医院检验科 415000)

【关键词】 脂联素; 心血管疾病; 心力衰竭

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 23. 044 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)23-2992-03

脂联素 (APN) 是近年发现的一种由脂肪细胞合成并分泌的血浆蛋白, 具有广泛而活跃的生物学作用, 在能量代谢、改善胰岛素抵抗、抗炎性反应及抗动脉粥样硬化的形成等生理病理过程中发挥重要的调节作用。研究显示, 血浆 APN 水平在糖尿病、动脉粥样硬化及急性冠脉综合征患者体内明显降低, 在慢性心力衰竭患者体内明显升高^[1-2]。

1 APN 的发现与结构

1995 年 Scherer 等^[3]通过实验克隆出 Acrp30, 发现脂联素的存在。其后, 它又被命名为 apM 1, adipoQ, GBP28 等, 目前比较公认的名称为脂联素 (APN)。APN 由 24 个氨基酸组成, 其氨基酸组成与胶原 VIII、X 及补体成分 C1q 有同源性。APN 以聚合体的形式存在, 3 个单体通过球形结构域连接成同源三聚体, 再以二硫键构成低相对分子质量六聚体, 4~6 个三聚体可结合成高分子质量多聚体, 循环中大部分 (大于 80%) 的 APN 是以多聚体的形式发挥生理作用。APN 受体有 Adipor1 和 Adipor2 2 型, 前者广泛存在于骨骼肌, 对球形 APN (gAd APN) 具有高亲和力^[4], 但对全长 APN (fAd APN) 亲和力低; 后者主要存在于肝脏, 对 gAd APN 和 fAd APN 都具有中等亲和力。APN 受体与胰岛素敏感性呈正相关, APN 可能通过与其受体 Adipor1 和 Adipor2 结合, 经过氧化物酶体增殖物活化受体 α 途径和腺苷酸活化蛋白激酶途径发挥抗炎性、抗氧化、抑制细胞凋亡、刺激一氧化氮生成和增加胰岛素敏感性的效应。

2 APN 的功能

2.1 APN 对糖脂代谢的影响 基础研究表明, APN 在糖脂代谢的多个环节中发挥作用^[5]。在骨骼肌, APN 可以增加胰

岛素受体的酪氨酸磷酸化, 直接促进胰岛素受体及受体后水平信号传导, 从而增加胰岛素的敏感性; 在肝脏, APN 通过减低脂肪酸输入, 增加脂肪酸的氧化而减低肝糖输出和极低密度脂蛋白、三酰甘油的合成, 调节糖脂代谢; 在心脏, APN 通过增加能量供应, 减少由前列腺素诱导的肿瘤坏死因子 (TNF- α) 的合成而抑制凋亡, 同时还可以抑制脂肪组织 TNF- α 信号转导, TNF- α 与血浆 APN 呈负相关。TNF- α 活性减少可改善胰岛素敏感性。近年来的研究还发现, 脂肪组织在胰岛素抵抗的发生、发展中起着关键作用。实验发现, 由脂肪细胞或脂肪组织分泌的 APN 在胰岛素抵抗及 2 型糖尿病中扮演了重要角色^[6]。

2.2 APN 抗血管内皮细胞炎性 APN 通过在损伤血管处积聚, 抑制血管内皮细胞内黏附分子的表达和巨噬细胞中细胞因子的产生, 抑制内皮炎性反应和平滑肌细胞增殖, 抑制单核细胞和巨噬细胞的移动以及向泡沫细胞的转化来抑制炎症反应。一些研究显示, APN 能减弱 TNF- α 诱导的肝素钠结合的表皮生长因子在培养的内皮细胞的表达。此外, APN 的抗炎效应还包括抑制白细胞集落的形成, 降低吞噬细胞的活性以及减少巨噬细胞分泌 TNF- α 等。另外, Kohayashi 等^[7]证实 APN 可活化内皮细胞的凋亡, 这一作用主要是通过腺苷酸激活蛋白激酶 (AMPK) 信号途径实现的。有研究发现, 在血管成形术造成损伤的血管内皮及内皮间隙有 APN 聚集, 而周围完整无损的内皮及内皮间隙中找不到 APN, 表明 APN 参与血管损伤修复, 提示 APN 在血管重塑中起调节剂的作用。

3 APN 与心血管疾病

在多种心血管疾病中, 如冠状动脉粥样硬化心脏病 (冠心

病)、高血压、动脉粥样硬化、心力衰竭等,都发现了 APN 水平的变化,在某些疾病中还随疾病的严重程度、发生、发展呈相关性变化,究其原因可能是心血管疾病所引起的病理生理改变影响着 APN 水平。

3.1 APN 与高血压 目前多数研究支持高血压患者血浆 APN 水平明显降低^[8-9]。血管平滑肌细胞的活化、迁移与增殖,导致血管内膜增厚,管腔狭窄,这是高血压的重要条件,而 APN 可以抑制血管平滑肌细胞的增殖,参与血管损伤状态下的血管重构^[10]。APN 参与高血压的可能机制还表现在增加胰岛素敏感性,降低胰岛素水平,从而高血压常伴随低 APN 血症。

3.2 APN 与动脉粥样硬化 APN 在动脉粥样硬化及血管重塑中发挥作用。这是由于血小板源性生长因子(PDGF)在血管平滑肌增殖中发挥着重要作用,而研究发现生理浓度 APN 对由 PDGF 诱导的血管平滑肌的增殖和迁移有明显抑制效应^[11]。而动脉粥样硬化还有的原因就是内皮细胞功能的损伤,APN 可以活化内皮细胞的凋亡,这一作用是通过腺苷酸激活蛋白酶(AMPK)信号途径实现的。血管内皮损伤在损伤间隙会有 APN 聚集,而 APN 缺陷的个体血管损伤易导致血管内膜增厚,说明 APN 在生物体内起着抗动脉粥样硬化的作用。APN 抑制白细胞集落形成,降低吞噬细胞分泌的细胞因子和活性,进一步说明 APN 的抗动脉粥样硬化作用。

3.3 APN 与冠心病 一些研究表明血 APN 水平与冠心病的发生发展呈负相关,低 APN 血症是冠心病的高危因素^[12-14]。APN 可以通过多种途径参与冠心病的发生发展,APN 可抑制成熟巨噬细胞的吞噬活性和 LPS 诱导的 TNF- α 的表达,从而抑制炎症反应;APN 抑制的增殖和迁移,防止血管内膜增厚;APN 还通过与其他细胞因子的相互调节发挥抗炎作用^[15]。冠心病患者血清 APN 水平降低的可能是其 TNF- α 水平的升高,TNF- α 抑制减少 APN 在脂肪组织中的表达和分泌,从而导致血清 APN 水平的下降;APN 沉积在受损的动脉壁及不稳定瘢痕内,抑制此处的炎症反应,进一步使血清 APN 降低。

在分子水平上,有研究显示,APN 基因与早发冠心病显著相关,在年轻的冠心病患者(小于 51 岁),APN 基因的单核苷酸多态性(SNPS)(+276 G>T)与冠心病有显著的相关性^[16],多变量分析显示携带有此基因的人患冠心病的概率增加,并与年龄明显相关。APN 的基因的变异或突变决定着低 APN 基因表达,冠心病患者较健康人明显增高,携带此突变基因者 APN 水平也比无此突变的明显减低。

3.4 APN 与心力衰竭 心力衰竭是神经激素炎症调节失常所致的进行性心室重塑的一组复杂综合征。近年的研究表明,肾素-血管紧张素系统(RAS)被激活后。在心肌上血管紧张素 I(ATI)通过各种途径使新的收缩蛋白合成增加;细胞外的醛固酮刺激成纤维细胞转变为胶原纤维,使胶原纤维增多,促进心肌间质纤维化。在血管中使 SMC 增生管腔变窄,同时降低血管内皮细胞分泌 NO 的能力,使血管舒张受影响。这些不利因素的长期作用,对慢性心力衰竭患者可导致病情的恶化,促进死亡。而 APN 却可以影响到形成心力衰竭的很多因素。一些研究表明心力衰竭患者存在明显的血清 APN 水平增高^[17]。姜红峰等^[18]通过比较心力衰竭老年人患者血清中 APN 水平与健康对照组发现有明显差异,在消除了年龄、性别和身高体重质量比的影响后,慢性心力衰竭患者还是较非心力衰竭患者有明显的高 APN 水平,这表明高 ANP 水平和心力衰竭有着相关性。

4 APN 测定的前景

APN 作为所有脂肪因子中的惟一负性调节激素在心脏疾病的形成等生理及病理过程中发挥重要的作用,深入研究 APN 水平在心血管疾病发生发展中的变化,以及 APN 在于其他细胞因子,特种蛋白在疾病中的相关性,为心力衰竭的早期临床诊疗判断提供理论依据,为心力衰竭的药物、基因、手术治疗等提供分子神经生物学依据,为心力衰竭治疗药物的研制探索新的方向,使心力衰竭心脏结构和功能的内源性缺陷得到真正的生物学改善,提高心力衰竭患者的生活质量。

参考文献

- [1] 黄喆. 冠心病患者脂联素水平测定的临床意义[J]. 中国中医药咨讯, 2011, 3(16): 375.
- [2] 张燕, 孙辽. 脂联素与胰岛素抵抗、血液流变学改变及 2 型糖尿病大血管病变[J]. 中国医学创新, 2011, 8(29): 149-152.
- [3] Scherer P, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes [J]. J Biol Chem, 1995, 270(45): 26746-26749.
- [4] Beylot M, Pinteaur C, Peroni O, et al. Expression of adiponectin receptors AdipoR1 and AdipoR2 in lean rats and in obese Zucker rats [J]. Metabolism, 2006, 55(3): 396-399.
- [5] 倪黎刚, 戎娟. 2 型糖尿病及其合并动脉粥样硬化患者血浆脂联素检测与血液流变学分析[J]. 实用老年医学, 2008, 22(5): 387-388.
- [6] Bjursell M, Ahnmark A, Bohiooly YM, et al. Opposing effects of adiponectin receptors 1 and 2 on energy metabolism [J]. Diabetes, 2007, 56(3): 583-593.
- [7] Kohayashi H, Ouchi N, Kihara S, et al. Selective suppression of endothelial cell apoptosis by the high molecular weight form of adiponectin [J]. Circ Res, 2004, 94(4): 27-31.
- [8] Iwashima Y, Katsuya T, Ishikawa K, et al. Hypoadiponectinemia is an independent risk factor for hypertension [J]. Hypertension, 2004, 43: 1318-1324.
- [9] 张志伟, 林泽鹏, 徐验, 等. 高血压病患者血清脂联素浓度的变化及其意义[J]. 岭南心血管病杂志, 2005, 11(1): 13-14.
- [10] 苏珂, 龙艳, 荀靖琼, 等. 2 型糖尿病大血管病变与血清脂联素及 C 反应蛋白关系的研究[J]. 中国临床新医学, 2011, 4(1): 5-8.
- [11] 康红丽, 杨静. 脂联素、瘦素水平与冠心病及其相关危险因素研究[J]. 中国实用医药, 2011, 5(13): 191-192.
- [12] Shibata R, Lzuniya Y, Sato K, et al. Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction [J]. J Mol Cell Cardiol, 2007, 42(6): 1065-1069.
- [13] Shioji K, Moriwake S, Takeuchi Y, et al. Relationship of serum adiponectin level to adverse cardiovascular events in patients who undergo percutaneous coronary intervention [J]. Circ J, 2007, 71(5): 675-681.
- [14] 尹炯, 蒲红, 潘晓明, 等. 冠心病患者血浆脂联素水平降低[J]. 中华高血压杂志, 2007, 15(8): 685-688.

[15] Matsuzawa Y, Funa hashi T, Kihara S, et al. Adiponectin and Metabolic syndrome[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2004, 24(1): 29-33.

[16] 罗素新, 雷寒, 柳青, 等. 脂联素基因+45 位核苷酸 T/G 多态性与冠心病的相关性研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(12): 1517-1522.

[17] Andersson SE, Edvinsson ML, Bjork J, et al. High Nt-proBNP is a strong predictor of outcome in elderly heart

failure patients [J]. Am J Geriatr Cardiol, 2008, 17(1): 13-19.

[18] 姜红峰, 彭少蓉, 缪希莉, 等. 老年慢性心力衰竭患者血清脂联素与严重程度的关系[J]. 中国老年学杂志, 2008, 28(5): 494-496.

(收稿日期: 2012-06-12)

基因敲除技术在结核分枝杆菌研究中的应用

王 蕾 综述, 董志玲 审校(河北省邯郸市中心医院检验科 056001)

【关键词】 基因敲除; 结核分枝杆菌; 结核病
DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 23. 045 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)23-2994-03

随着结核分枝杆菌全基因组被测序, 功能基因组学成为时下结核分枝杆菌研究的热点。研究基因功能的方法主要有两种思路: 一是通过增强其表达, 取得表达产物进行研究; 二是减弱或者终止其表达, 观察整体功能的变化, 进而推测相应的基因功能。前者因为不能反映基因产物的真实表达情况, 而逐渐被抛弃。后者将基因与生物的整体功能联系起来考察, 并能为基因的功能提供直接证据, 因而其技术不断得到发展和完善, 其中最常用的就是基因敲除技术^[1]。

1 基因敲除技术

基因敲除技术又称基因剔除, 是自 20 世纪 80 年代开始发展起来的, 通过一定途径使机体特定基因失活或缺失的一种分子生物学技术。基因敲除利用基因同源重组原理, 用含有已知的外源性 DNA 片段与受体细胞基因组中序列相同或非常相近的基因发生同源重组, 整合至受体细胞基因组中并得以表达, 从而改变细胞的基因型, 以研究该基因的体内功能或相关疾病的致病机制^[2-3]。

基因敲除的技术路线如下: 第 1 步, 构建重组基因载体, 其构建的成功与否是进行基因敲除的关键。第 2 步, 转染质粒载体导入待敲除的靶细胞中, 方法有磷酸钙 DNA 共沉淀法、电穿孔法、逆转录病毒感染法等。第 3 步, 用选择培养基筛选已转染好的细胞。第 4 步, 观察被击中细胞的生物学特征, 将已击中的胚胎干细胞转入胚胎使其生长, 对转基因动物进行形态学及分子生物学检测。

2 基因敲除技术在结核分枝杆菌研究中的应用

2.1 寻找新的抗结核药物的作用靶点 结核分枝杆菌的细胞壁结构独特, 对细菌的生命、形态、毒性传播等非常重要, 也是目前多种抗结核药物作用的靶点。结核分枝杆菌细胞壁中具有两种主要成分, 即分枝菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖(mAGP)和脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)^[4]。mAGP 是细胞壁的核心结构, 为一种复杂的脂多糖肽, 由分枝菌酸、阿拉伯聚糖半乳糖和肽聚糖 3 种成分组成。阿拉伯聚糖半乳糖通过 L-鼠李糖-D-N-乙酰葡萄糖胺二糖衔接分子, 共价连接到肽聚糖大分子上; 分枝菌酸-阿拉伯半乳糖-肽聚糖(mAGP)直接影响了细胞壁的完整性, 是药物作用良好的靶点。在细胞壁的核心结构 mAGP 中, 乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)是其中必需的组成成分, 主要参与组成肽聚糖和 L-鼠李糖-D-N-乙酰葡萄糖胺二糖衔接分子。GlcNAc 的活性前体是 UDP-GlcNAc^[5]。GlmU 是 UDP-GlcNAc 合成过程的一种重要酶, GlmU 是双功能酶, 具

有乙酰基转移酶活性和尿嘧啶转移酶活性。在结核分枝杆菌(M. tuberculosis)中, 编码 GlmU 的基因是 GlmU, 在基因组上的定位为 Rv1018c。现已构建了 GlmU 基因敲除的菌株 mc2155GlmU 敲除(KOT), 此菌株与结核分枝杆菌亲缘关系近、细胞壁结构相似, 且无致病性, 可被用于对 M. tuberculosis 的研究; 通过对此菌株生长曲线的测定, 已证实 GlmU 基因为分枝杆菌生长所必需。由于 GlmU 在细菌生长过程中具有必不可少的作用, 并且对细胞壁完整性具有重要影响, 当缺失活性 GlmU 时, 阿拉伯糖含量增加, 且其增加是来自于具有分支的阿拉伯糖末端的增多。由此推断, 在活性 GlmU 缺失的 mc2155GlmU KOT 菌株中, 负责合成聚阿拉伯糖末端分支的阿拉伯糖基转移酶(embA)和 embB 功能可能异常, 因而造成 mAGP 中聚阿拉伯糖末端的改变, 故对造成聚糖结构改变的原因继续进行研究、分析, 将能更进一步地认识 GlmU 的功能以及当 GlmU 功能异常时对细菌造成的影响, 这些都将有助于对研究以 GlmU 为靶点的药物对细菌的影响提供支持。

2.2 为提高 BCG 的免疫活性提供新方向 通过 BCG 接种免疫是预防结核的一个主要的可行性手段。BCG 是减毒活疫苗, 可引起淋巴肿大和化脓等异常反应, 在接种 BCG 的过程中, 除了会干扰纯蛋白衍生物(PPD)诊断结核分枝杆菌感染的价值, 最主要的禁忌之一就是当接种者有免疫缺陷, 特别是细胞免疫缺陷时, 不能进行疫苗接种, 且 BCG 的免疫性不能达到完全控制结核的效果。有研究表明, 不同地区、不同年龄的人群接种了 BCG 后的有效率在 0%~80%, 因此提高 BCG 的免疫性成为迫切的需要。

分布在分枝杆菌细胞膜上的 LAM 被认为主要与细菌导致的免疫应答及毒性的传播等有关。纯化后的甘露糖帽脂阿拉伯甘露聚糖(ManLAM)参与了结核分枝杆菌体内感染时抑制某些细胞因子分泌的作用如白细胞介素-12(IL-12)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-8, 使诱发的巨噬细胞凋亡减少并调节树突状细胞的抗原呈递过程, 对结核杆菌的毒力和免疫逃避作用可能有大的影响^[6]。而通过分离纯化得到了 BCG 细胞壁上的 ManLAM, 在体外攻击巨噬细胞实验中, 发现抑制了巨噬细胞分泌的 IL-8 和 TNF-α。脂甘露聚糖(LM)是 LAM 的前体, 由 embC 基因编码的蛋白酶帮助阿拉伯糖链的聚合并转移至甘露糖链上, 最终形成脂阿拉伯甘露聚糖。乙胺丁醇(emb)基因簇编码的蛋白酶是一类参与了阿拉伯糖苷的聚合和转移的酶类。通过置换型基因打靶使 embC 基因功能失活, 发现分枝杆