

· 综 述 ·

凝溶胶蛋白与脓毒症

黄立锋, 龚 平, 姚咏明

(解放军总医院第一附属医院全军烧伤研究所, 北京 100048)

【摘 要】 凝溶胶蛋白是凝溶胶蛋白超家族的成员之一, 是一种重要的肌动蛋白结合蛋白, 其可通过切断、封端肌动蛋白丝, 或使肌动蛋白聚集成核等方式来控制肌动蛋白的结构。凝溶胶蛋白除了在重组肌动蛋白丝中发挥作用以外, 还在细胞运动、控制细胞程序性死亡等细胞活动中发挥着重要作用。本文重点回顾肌动蛋白的生物学特性、凝溶胶蛋白的基本结构和功能, 以及在脓毒症患者中凝溶胶蛋白结合肌动蛋白的作用。临床上可通过监测血浆凝溶胶蛋白水平预测脓毒症患者的预后, 评估脓毒症患者的病情严重程度; 文章最后对外源性凝溶胶蛋白的治疗作用进行了简要介绍。

【关键词】 凝溶胶蛋白; 脓毒症; 肌动蛋白类

【中图分类号】 R631.3

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2011.00047

Gelsolin and sepsis

HUANG Lifeng, GONG Ping, YAO Yongming

(Burns Institute, First Hospital Affiliated to Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China)

【Abstract】 Gelsolin is a member of gelsolin superfamily, which is an important actin binding protein. The gelsolin controls actin structure by severing filaments, capping filament ends and nucleating actin assembly. It occurs in a wide range of vertebrate, lower eukaryotic and plant cells, and its function is as variant as its biochemical activities. In addition to its role in actin filament remodeling, gelsolin has also other roles in several cellular processes, including cell motility, apoptosis control, and so on. In this paper, we introduced its biological features, structure, function, as well as its effect on actin binding in septic patients. The plasma gelsolin concentration is a predictor for severity and prognosis of septic patients. In addition, we introduced the therapeutic effects of exogenous gelsolin.

【Key words】 gelsolin; sepsis; actin

This work was supported by National Natural Science Foundation of China(30872683;30901561)

细胞骨架损伤是许多疾病发生的基础, 肌动蛋白是细胞骨架的重要组成部分, 而凝溶胶蛋白是一种多功能的肌动蛋白结合蛋白(actin binding proteins, ABPs), 对微丝具有剪切、封端和成核作用。有研究证实, 凝溶胶蛋白在相关疾病的发生发展中会被消耗, 其水平呈下降趋势, 在脓毒症患者中表现尤为突出^[1]。本文就凝溶胶蛋白在脓毒症发生、发展中的作用及其临床意义进行简要综述。

1 肌动蛋白的特性

细胞骨架作为构成细胞支持结构和胞质其他成分的依附支架, 以其不同的形式广泛存在于机体多种细胞内, 以此维持细胞的特定形状和细胞内多种

成分的空间位置。肌动蛋白是细胞骨架的主要成分, 也是大多数真核细胞中含量最高的蛋白质, 它在进化中高度保守, 不同物种间差异很小。单个肌动蛋白分子呈球形(G-肌动蛋白), 在钾离子、镁离子、ATP存在的条件下, G-肌动蛋白可变成丝状肌动蛋白(F-肌动蛋白), 并进一步聚合成螺旋微丝。据报道, 微丝的装配和解聚是一个动态过程, 并与细胞质溶胶-凝胶状态的转换相对应, 只有聚合态的肌动蛋白才具有生物效应^[2]。炎症因子刺激后, 丝状肌动蛋白会出现重组和再分布, 使细胞收缩, 细胞间隙增大、增多, 导致血管通透性升高, 随之可造成组织细胞的缺氧、损伤和死亡, 严重时则引起毛细血管渗漏综合征或多脏器功能障碍综合征^[3]。在细胞外液和循环中已经发现有F-肌动蛋白的存在, F-肌

收稿日期: 2010-08-16; 修回日期: 2011-04-21

基金项目: 国家自然科学基金(30872683; 30901561)

通讯作者: 姚咏明, Tel: 010-66867394, E-mail: c_ff@sina.com

动蛋白在循环中长度达到 10 μm 时即能改变血液特征甚至阻塞小血管。除了这种直接效应外, 丝状肌动蛋白能够激活血小板, 也可以直接与血纤维蛋白相互作用促进血凝块的形成, 对肺部的内皮细胞和微血管有较大的毒害作用^[1]。

能与肌动蛋白结合并调节其聚合-解聚作用的一类蛋白统称为ABPs^[4]。目前, 生物界已发现了几十种ABPs, 而凝溶胶蛋白是其中研究较为清楚的一种。

2 凝溶胶蛋白的结构和功能

2.1 凝溶胶蛋白基因定位及表达

凝溶胶蛋白作为一种多功能的ABP, 普遍存在于哺乳动物体内, 它由单一基因编码。在哺乳动物中由于外显子的不同剪接方式, 存在两种形式的凝溶胶蛋白: 血浆凝溶胶蛋白和胞质凝溶胶蛋白。人类凝溶胶蛋白基因定位于9号染色体长臂(HSA9q33.2)。凝溶胶蛋白在脊椎动物、低等真核生物和植物的细胞和血浆中普遍存在, 可在多种组织中表达; 它在成年动物肌肉中表达量相对较低, 而胚胎期肌肉是表达量最多的组织。

2.2 凝溶胶蛋白蛋白结构

凝溶胶蛋白是凝溶胶蛋白超家族的成员之一。该超家族是一类普遍存在且进化保守的蛋白质家族, 共由 7 种蛋白组成, 分别为凝溶胶蛋白、绒毛蛋白、肾上腺肌割蛋白、凝溶胶蛋白样加帽蛋白、近绒毛蛋白、超绒毛蛋白和 flightless I。这 7 种蛋白都含有 3 个或 6 个称为凝溶胶蛋白样结构域的同源重复序列, 其中凝溶胶蛋白包含 6 个凝溶胶蛋白样结构域, 分子量为 82~84 ku, 是一种经典的 ABP^[5], 其结构见图 1。

2.3 凝溶胶蛋白的生物学功能

凝溶胶蛋白由 6 个同源的结构相似片段 (S1~S6) 组成, 其中 S3 与 S4 之间有一个长的链状连接,

胱天蛋白酶 (caspase)-3 可从此处将其切断。S1 和 S4 能结合 G-肌动蛋白, S2 只能结合 F-肌动蛋白。S1, S4 和 S6 存在 Ca²⁺结合位点, S2 存在磷脂酰肌醇二磷酸 (polyphosphoinositide1-4, 5-bisphosphate, PIP₂) 的结合位点。凝溶胶蛋白在非活化状态时紧密压缩在一起, 当胞浆内 Ca²⁺浓度瞬时达到 10⁻⁶mol/L 时, Ca²⁺与凝溶胶蛋白结合使之活化, 其构象发生改变, 暴露出肌动蛋白的结合位点, 破坏肌动蛋白-肌动蛋白之间的非共价键连接, 从而将肌动蛋白微丝切断; 进一步可在微丝新露出的末端形成覆盖, 阻断其进行连接, 从而导致肌动蛋白微丝细胞骨架的解聚, 其切割机制见图 2^[5]。PIP₂与凝溶胶蛋白结合后使凝溶胶蛋白从覆盖在肌动蛋白微丝的末端解离出来, 去除其对肌动蛋白微丝的覆盖作用, 使肌动蛋白-肌动蛋白之间可以重新连接, 恢复肌动蛋白微丝细胞骨架网络结构^[6]。有资料提示, 凝溶胶蛋白是决定肌动蛋白微丝长度的一个关键成分, 它对肌动蛋白微丝细胞骨架的效应使其与细胞的运动性、形状、生长以及凋亡等特性联系起来, 在多种生理和病理环境中发挥重要调节作用^[7]。最近研究发现, 凝溶胶蛋白的成核活性可被一种钙调蛋白通过与其结合形成高亲和力的复合体而抑制^[8]。然而, 凝溶胶蛋白的成核活性对于细胞的生理功能, 究竟是对截断的肌动蛋白丝起到去封端的作用, 还是作为肌动蛋白相关蛋白 2/3 功能启动机制的成分来发挥作用, 至今仍有争议^[9]。

在脊椎动物体内同时存在胞浆型和血浆型两种凝溶胶蛋白, 它们是由不同转录起始位点转录形成的两种蛋白形式, 但是有着共同的抗原决定簇和部分分子同源性。现已发现, 胞浆型和血浆型凝溶胶蛋白具有共同的 3'端(约 32 kb, ≥10 个外显子), 但在 5'端存在明显差异。两种凝溶胶蛋白含有共同的 29 个氨基酸, 分别位于胞浆型凝溶胶蛋白 N 末端和血浆型凝溶胶蛋白 N 末端的 26~55 位氨基酸。血浆

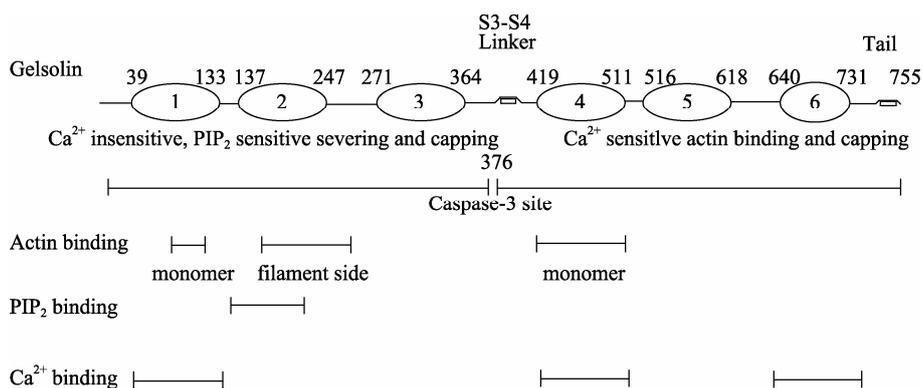


图 1 肌动蛋白结构图

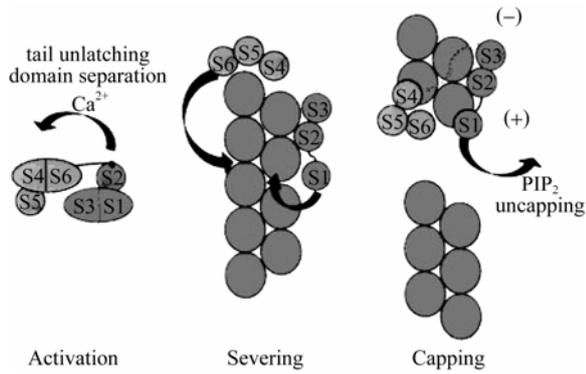


图2 凝溶胶蛋白结合、剪切和戴帽丝状肌动蛋白

型凝溶胶蛋白在其N末端还含有额外的25个氨基酸组成的一段典型的信号肽。这导致血浆型凝溶胶蛋白在N末端含有Ca²⁺不敏感的肌动蛋白微丝切断结构域，可在C末端含有Ca²⁺敏感的肌动蛋白结合结构域，故与胞浆型凝溶胶蛋白执行相似的功能^[7]。血浆中的凝溶胶蛋白最初称为肌动蛋白解聚因子或短杆菌素，由肌肉合成和释放，血浆中半衰期为2.3 d。在正常人血浆中有较高的浓度（200 mg/L），通过对循环中丝状肌动蛋白剪切、戴帽作用，形成球状肌动蛋白凝溶胶蛋白复合物，在Gc球蛋白（维生素D结合蛋白）的参与下，被肝脏中网状内皮系统清除。这两种蛋白构成了肌动蛋白清除系统，对维持内环境稳定、保护机体起着重要的作用。当在急性呼吸窘迫综合征、暴发性肝坏死、脓毒症、心肌梗死等危重状态下，循环中球状肌动蛋白和丝状肌动蛋白浓度升高，超过清除的范围，就会导致发病^[1]。

3 凝溶胶蛋白与脓毒症

3.1 凝溶胶蛋白与细胞凋亡

有关凝溶胶蛋白对脓毒症病理过程中细胞凋亡的调节作用仍存在争议。有实验发现，在细胞凋亡过程中发挥核心效应的caspase-3是凝溶胶蛋白的靶蛋白之一。凝溶胶蛋白可通过不同机制抑制效应酶caspase的活性及其激活过程，因此认为其可能通过抑制caspase的活性来减轻细胞凋亡。也有研究发现，凝溶胶蛋白N端片段具有促进细胞凋亡的潜能。缺失凝溶胶蛋白的细胞能够延迟细胞凋亡的发生，而且瞬间过量表达凝溶胶蛋白N端片段则可诱发细胞凋亡。此外，凝溶胶蛋白N端片段也能介导干扰素- α 诱发的细胞凋亡^[10]。鉴于程序细胞死亡可由细胞内外因素诱导，内源性诱导主要由内源性活性内切酶的激活使DNA断裂所致，而内切酶介导DNA断裂有酶依赖和非酶依赖两种方式。酶依赖途径包括三步级联反应：首先，来自于细胞内或细胞外的死亡信

号诱发内质网应激，继而激活caspase-12；其次，死亡信号诱发线粒体应激，刺激细胞色素C的释放，然后激活caspase-9；最后，caspase-8活化。这三步级联反应都会激活caspase-3，继而使下游的一些靶蛋白裂解。值得注意的是，凝溶胶蛋白也是caspase-3下游的靶蛋白之一，caspase-3可从天冬氨酸³⁵²与甘氨酸³⁵³之间裂解凝溶胶蛋白^[11]。另一方面，DNaseI是细胞凋亡时一种重要的DNA降解酶，完整的凝溶胶蛋白可与肌动蛋白、DNaseI非竞争性结合成为凝溶胶蛋白/肌动蛋白/DNaseI三元复合物，该复合物以完整形式存在时会抑制核的易位及DNaseI酶的活性。然而凝溶胶蛋白被caspase-3从S3, S4部位裂解后，其N端片段能够打断肌动蛋白与DNaseI间的连接，竞争性地与肌动蛋白结合，释放出DNaseI酶，因而在一定程度促进了DNA断裂，最终导致细胞凋亡。肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）- α 在很多细胞，包括MCF-7细胞中均能引起细胞凋亡。研究证实，在抗TNF- α 并敲除掉凝溶胶蛋白基因的MCF-7细胞系中，加入外源性凝溶胶蛋白可以恢复TNF- α 诱导细胞死亡的活性，表明TNF- α 诱导的细胞凋亡需要凝溶胶蛋白的参与^[12]。

3.2 凝溶胶蛋白在脓毒症中的预警作用

业已明确，凝溶胶蛋白是目前已知最有效的肌动蛋白纤维切割蛋白。在肌动蛋白清除系统中，凝溶胶蛋白可以缓冲从损伤组织中释放出来的肌动蛋白所致潜在的毒副作用。现已发现，血浆型凝溶胶蛋白在心肌梗死、脓毒性休克、肌肉坏死、急性肺损伤以及急性肝损伤表达明显降低^[13,14]。一些资料提示，血浆中凝溶胶蛋白还是严重创伤患者一个早期预后标志物。Mounzer等^[15]报道，严重创伤患者血浆凝溶胶蛋白水平明显低于健康对照组，且其降低幅度大于两个标准差的患者与发生急性呼吸窘迫综合征、延长机械通气时间、死亡等密切相关；同时，与存活组患者相比，死亡组血浆凝溶胶蛋白浓度明显降低，其可以作为一个预测预后的指标。DiNubile等^[16]报道，造血干细胞移植后血浆凝溶胶蛋白浓度降至100 mg/L以下时，发生致死性自发性肺炎综合征的危险性明显高于血浆凝溶胶蛋白浓度维持在适度水平的患者。

凝溶胶蛋白不仅对肌动蛋白具有剪切、成帽和成核的作用，还是炎症反应的生物标记物，与细菌脂多糖、溶血磷脂酸、血小板活化因子、革兰阴性菌和革兰阳性菌细胞壁成分等有较高的亲和力^[17-20]，可以调整宿主对脓毒症、疟疾、烧伤和创伤等状况的过激反应，从而保护患者免受炎症过度反应的打

击。暴露在严重损伤部位的肌动蛋白扮演了“聚集槽”的角色,耗尽了凝溶胶蛋白的供应,使得炎症反应级联放大,直至形成多器官功能衰竭^[21]。有研究证实,在慢性炎症中凝溶胶蛋白水平也会降低^[22]。

由于脓毒症患者发病的基础是全身炎症反应综合征和代偿性抗炎症反应综合征之间的动态平衡被打破,炎症因子大量分泌,造成细胞损伤或死亡,肌动蛋白释放入血,这些均会使凝溶胶蛋白被消耗,水平降低。另外,危重患者凝溶胶蛋白水平变化趋势可能与临床情况的改善及预后相关。Wang等^[21]通过对9例严重脓毒症患者连续14d凝溶胶蛋白值的监测发现,存活的4例患者,在第12天凝溶胶蛋白值明显恢复;而5例死亡的患者,其水平保持不变或更低。Lee等^[23]对31例外科危重患者进行了连续5d的凝溶胶蛋白水平监测,发现当其值低于61 mg/L时,能预测ICU住院时间、机械通气时间延长及院内死亡率增加。Lee等^[24]还对21例非外科脓毒症患者进行观察,在17例患者血液中发现肌动蛋白;存活组血浆凝溶胶蛋白均值明显高于死亡组,且血浆凝溶胶蛋白值在预测28天死亡率优于急性生理和慢性健康状况评分系统。

3.3 凝溶胶蛋白对脓毒症的治疗作用

据报道,小鼠循环中丝状肌动蛋白增多是脓毒症引起细胞损伤的标志^[25]。小鼠在遭受脓毒症攻击6h内,血浆凝溶胶蛋白水平降至正常水平的25%~50%,此时如给予凝溶胶蛋白,则能使肌动蛋白溶解,挽救致死剂量内毒素攻击小鼠的生命。进一步实验证实,对照组小鼠无一存活,而凝溶胶蛋白处理小鼠存活率达88%。此外,凝溶胶蛋白还能逆转细胞因子水平,使细胞因子从“炎症”水平恢复至正常范围。有资料证实,血清凝溶胶蛋白水平大幅下降与重症患者临床后果不良高度相关。基于此, Lee等^[25]认为,对高危重症患者早期检出血浆凝溶胶蛋白水平减低后给予补充,能提供有效且良好耐受的治疗干预。另据报道,在大鼠皮肤总体表面积40%烧伤后12h内凝溶胶蛋白含量降至正常水平的10%,并在烧伤后6d内一直低于正常范围;如将重组人凝溶胶蛋白输入大鼠,则明显降低其肺组织微循环通透性,对烧伤所致肺微血管损伤具有保护作用^[26]。同样,将小鼠在高氧状态下($FiO_2 > 95\%$)暴露72h,观察到支气管肺泡液中性粒细胞计数升高和凝溶胶蛋白含量降低,但输注凝溶胶蛋白后急性炎症反应程度显著减轻^[27]。此外,在临床上已有使用吸入性重组人凝溶胶蛋白治疗囊性肺纤维化患者的案例,一方面,它可以降低气道分泌物的黏滞性,另一方

面,它能增加内源性抗微生物肽类和外源性抗生素的抗菌活性^[22]。

4 小结

综上所述,由于分子遗传学和体外分析技术的发展与应用,凝溶胶蛋白不同结构域的结构解析和潜在功能已得到了初步探讨,但整个凝溶胶蛋白分子在体内对肌动蛋白作用的结构基础和调控机制尚未完全明了。由于哺乳动物的骨骼肌是血浆凝溶胶蛋白的主要来源,且其在生肌细胞分化过程中表达显著上调,可能对骨骼肌细胞的生长发育有深远的影响,但目前对其了解甚少。此外,虽然从目前已有的资料有理由初步推测,在临床实践中可以通过监测血浆凝溶胶蛋白水平来了解脓毒症患者病情严重程度和预测预后,并且也可通过补充外源性凝溶胶蛋白作为治疗手段,但如何适当地应用于临床实践,其确切干预效果如何,尚需更加深入的基础研究与更大规模的临床试验来进一步明确^[28,29]。

【参考文献】

- [1] Sadzyński A, Kurek K, Konończuk T, *et al.* Gelsolin-variety of structure and functions[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2010, 64(2): 303-309.
- [2] Erukhimov JA, Tang ZL, Johnson BA, *et al.* Actin-containing sera from patients with adult respiratory distress syndrome are toxic to sheep pulmonary endothelial cells[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(1): 288-294.
- [3] 郑运江, 汤耀卿, 刘伟, 等. 肿瘤坏死因子- α 对血管内皮细胞通透性及细胞骨架和紧密连接形态变化的诱导作用[J]. 中国危重病急救医学, 2009, 21(3): 160-163.
- [4] Lee PS, Bhan I, Thadhani R. The potential role of plasma gelsolin in dialysis-related protein-energy wasting[J]. Blood Purif, 2010, 29(2): 99-101.
- [5] Spinardi L, Witke W. Gelsolin and diseases[J]. Subcell Biochem, 2007, 45(1): 55-69.
- [6] Carrwik C, Stenevi U. Lattice corneal dystrophy, gelsolin type (Meretoja's syndrome) [J]. Acta Ophthalmol, 2009, 87(8): 813-819.
- [7] Chauhan V, Ji L, Chauhan A. Anti-amyloidogenic, anti-oxidant and anti-apoptotic role of gelsolin in Alzheimer's disease[J]. Biogerontology, 2008, 9(6): 381-389.
- [8] Ferjani I, Fattoum A, Maciver SK, *et al.* A direct interaction with calponin inhibits the actin-nucleating activity of gelsolin[J]. Biochem J, 2006, 396(3): 461-468.
- [9] McGough AM, Staiger CJ, Min JK, *et al.* The gelsolin family of actin regulatory proteins: modular structures,

- versatile functions[J]. FEBS Lett, 2003, 552(2-3): 75-81.
- [10] Martin P, Pardo J, Schill N, *et al.* Granzyme B-induced and caspase 3-dependent cleavage of gelsolin by mouse cytotoxic T cells modifies cytoskeleton dynamics[J]. J Biol Chem, 2010, 285(24): 18918-18927.
- [11] Oikonomou N, Thanasopoulou A, Tzouveleki A, *et al.* Gelsolin expression is necessary for the development of modelled pulmonary inflammation and fibrosis[J]. Thorax, 2009, 64(6): 467-475.
- [12] Li Q, Ye Z, Wen J, *et al.* Gelsolin, but not its cleavage, is required for TNF-induced ROS generation and apoptosis in MCF-7 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 385(2): 284-289.
- [13] Archer SK, Claudianos C, Campbell HD. Evolution of the gelsolin family of actin-binding proteins as novel transcriptional coactivators[J]. Bioessays, 2005, 27(4): 388-396.
- [14] Ferjani I, Fattoum A, Bettache N, *et al.* The gelsolin: calponin complex nucleates actin filaments with distinct morphologies[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 392(2): 118-123.
- [15] Mounzer KC, Moncure M, Smith YR, *et al.* Relationship of admission plasma gelsolin levels to clinical outcomes in patients after major trauma[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(5 Pt 1): 1673-1681.
- [16] DiNubile MJ, Stossel TP, Ljunghusen OC, *et al.* Prognostic implications of declining plasma gelsolin levels after allogeneic stem cell transplantation[J]. Blood, 2002, 100(13): 4367-4371.
- [17] Bucki R, Georges PC, Espinassous Q, *et al.* Inactivation of endotoxin by human plasma gelsolin[J]. Biochemistry, 2005, 44(28): 9590-9597.
- [18] Goetzl EJ, Lee H, Azuma T, *et al.* Gelsolin binding and cellular presentation of lysophosphatidic acid[J]. J Biol Chem, 2000, 275(19): 14573-14578.
- [19] Osborn TM, Dahlgren C, Hartwig JH, *et al.* Modifications of cellular responses to lysophosphatidic acid and platelet-activating factor by plasma gelsolin[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(4): C1323-C1330.
- [20] Bucki R, Byfield FJ, Kulakowska A, *et al.* Extracellular gelsolin binds lipoteichoic acid and modulates cellular response to proinflammatory bacterial wall components[J]. J Immunol, 2008, 181(7): 4936-4944.
- [21] Wang H, Cheng B, Chen Q, *et al.* Time course of plasma gelsolin concentrations during severe sepsis in critically ill surgical patients[J]. Crit Care, 2008, 12(4): R106.
- [22] DiNubile MJ. Plasma gelsolin as a biomarker of inflammation[J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(6): 124.
- [23] Lee PS, Drager LR, Stossel TP, *et al.* Relationship of plasma gelsolin levels to outcomes in critically ill surgical patients[J]. Ann Surg, 2006, 243(3): 399-403.
- [24] Lee PS, Patel SR, Christiani DC, *et al.* Plasma gelsolin depletion and circulating actin in sepsis: a pilot study[J]. PLoS One, 2008, 3(11): e3712.
- [25] Lee PS, Waxman AB, Cotich KL, *et al.* Plasma gelsolin is a marker and therapeutic agent in animal sepsis[J]. Crit Care Med, 2007, 35(3): 849-855.
- [26] Rothenbach PA, Dahl B, Schwartz JJ, *et al.* Recombinant plasma gelsolin infusion attenuates burn-induced pulmonary microvascular dysfunction[J]. J Appl Physiol, 2004, 96(1): 25-31.
- [27] Christofidou-Solomidou M, Scherpereel A, Solomides CC, *et al.* Recombinant plasma gelsolin diminishes the acute inflammatory response to hyperoxia in mice[J]. J Invest Med, 2002, 50(1): 54-60.
- [28] 王旭涛, 张新超. 凝溶胶蛋白和危重病[J]. 中国全科医学, 2009, 12(22): 2088-2091.
- [29] Bucki R, Levental I, Kulakowska A, *et al.* Plasma gelsolin: function, prognostic value, and potential therapeutic use[J]. Curr Protein Pept Sci, 2008, 9(6): 541-551.

(编辑: 周宇红)