

# 骨桥蛋白及炎症反应与颈动脉粥样硬化斑块关系的研究进展

赵士娇 韩雪 高燕军

【中图分类号】 R543.5    【文献标识码】 A    【文章编号】 1007-0478(2018)05-0607-04  
【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2018.05.031

颈动脉粥样硬化斑块是一种纤维炎性脂质斑块,是导致缺血性脑卒中的主要危险因素之一<sup>[1]</sup>,据相关文献报道,在我国有 45%~86.7% 的脑梗死和颈动脉粥样硬化斑块有关,在欧美则有 35%~76%<sup>[2]</sup>。斑块破裂脱落阻塞远端的颅内动脉进而引起缺血性脑血管事件的发生。Dirksen 等<sup>[3]</sup>从尸检资料中发现,巨噬细胞在颈动脉斑块内的分布存在明显差异,而斑块内巨噬细胞数量是决定斑块稳定性的重要因素,斑块的稳定性随巨噬细胞数量的增多而降低。在斑块内部炎症反应可通过诱发新血管生成及斑块内出血而增加斑块易损性。因此,包括骨桥蛋白(osteopontin, OPN)在内的炎症因子在颈动脉粥样硬化斑块中的研究越来越受到重视,现将骨桥蛋白及炎症反应在颈动脉粥样硬化斑块形成至转变为易损斑块中的作用作一综述。

## 1 颈动脉粥样硬化(carotid atherosclerosis, CAS)与易损斑块

Chaturvedi 等<sup>[4]</sup>调查发现,70 岁以上的人群中有 6.9% 的女性和 12.5% 的男性有无症状的中度颈动脉粥样硬化(狭窄率 50%~70%),在 70 岁以下的人群中有 2.2% 的女性和 4.8% 的男性有无症状的中度颈动脉粥样硬化(狭窄率 50%~70%)。上述事实证明无法单纯用颈动脉狭窄程度来解释缺血性脑卒中的发生。近年来,越来越多的学者认为脑卒中发生机制与斑块的组织学特性即是否为易损斑块密切相关<sup>[3]</sup>。在 2003 年 Naghavi 等<sup>[5]</sup>提出了关于易损斑块的组织学特征:(1)薄纤维帽及大的脂质核心;(2)发生活动性炎症反应;(3)斑块表面纤维帽破裂及随后血栓形成;(4)内皮脱失后导致血小板聚集或纤维蛋白沉积;(5)斑块内新生血管及斑块内出血;在脑梗死致病机制中颈动脉斑块的稳定性的作用逐渐被认识,斑块破裂后可直接堵塞下游血管,裸露的含高凝物质的核心能迅速形成血栓,引起缺血性脑血管事件的发生<sup>[6]</sup>。

## 2 炎症反应在颈动脉粥样硬化发生各个阶段的作用

有多种学说从不同的角度来阐述动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的发病机制,如脂质浸润学说、内皮损伤学说、血栓形成学说、受体学说、慢性炎症学说、平滑肌细胞增殖学说等。随着对动脉粥样硬化机制研究的深入,AS 的慢性炎

症性特征已被广泛认可,1999 年 Ross<sup>[7]</sup>提出“AS 是一种炎症性疾病”。炎症进程贯穿于动脉粥样硬化形成发生、发展的各个阶段,即从早期血管内皮功能紊乱到最终斑块破裂,动脉粥样硬化具有经典炎症变性、渗出及增生的特点,动脉粥样硬化发病初期主要表现为急性渗出性炎症,即单核巨噬细胞浸润等,而在进展期主要表现出血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMC)大量增殖及细胞外基质过度合成等慢性增生性炎症的特点<sup>[8]</sup>。

Wu 等<sup>[9]</sup>证明 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞在伴有颈动脉粥样硬化斑块的患者体内活性显著增强,同时其他的一些炎症标志物表达也增多。颈动脉斑块易损性与血清中的炎症标志物高度相关,主要的相关炎症标志物有 CRP、hs-CRP、白细胞计数、IL-6、IL-8、SAA、纤维蛋白原、TNF- $\alpha$ 、S100A 蛋白、MMP 家族、新喋呤及 FABP4 等。血管周边的肥大细胞通过 IL-8 受体 CXC 趋化因子受体蛋白 2(CXCR2)使斑块内小血管的通透性增加,促进斑块内出血及白细胞浸润,多效性的细胞因子与 CXCR2 作用使巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)表达上调,并诱导基质金属蛋白酶-9 的表达<sup>[10]</sup>。相关研究表明,心脑血管不良事件的风险与颈动脉硬化斑块中 MIF 的表达增加高度相关;一方面,斑块中的炎症反应刺激斑块内微小血管的生成,另一方面,炎症反应可导致斑块组织局部缺氧,更加促进斑块中新生血管的形成。斑块中的微血管由于结构及功能不成熟,极易增加斑块内出血和斑块破裂的风险<sup>[11]</sup>。由此可见,颈动脉粥样硬化斑块的自然倾向从一个稳定的斑块转变为易损斑块主要取决于炎症的程度。

## 3 骨桥蛋白(osteopontin, OPN)

### 3.1 OPN 的结构、生物学功能及活性调节

骨桥蛋白(OPN)是一种特异性骨涎蛋白,首次是从大鼠肉瘤细胞克隆而成并因此得名而被知晓<sup>[12]</sup>。它是编码在人类基因组中的 4 号染色体。它有几个名字包括早期 T 淋巴细胞激活(ETA1)蛋白 1,分泌磷酸化蛋白 1(SPPI)和骨涎蛋白 1(BSP1)。多个名称表示 OPN 的多功能性,并且可以被多种类型的细胞表达。骨桥蛋白一种带负电的磷酸化糖蛋白,广泛存在人体多种组织如肺、肝、骨、脑等,作为一种多功能蛋白在多种细胞中表达,尤其是病理情况下(肿瘤、炎症、免疫反应等)表达明显增强<sup>[13]</sup>。骨桥蛋白的功能多样性归因于两个主要特点:第一,有 3 个已知的剪接变体(亚型 OPN-a、b、c),具有不同的结构域和功能;另一个原因是翻译后修饰包括磷酸化、糖基化、硫酸化,酶裂解与蛋白质交联。选择性剪接和翻译后修饰的联合结果是产生多种不同的

OPN 形式,具有不同的生物活性以及与七种整合素和 CD44 受体结合的能力<sup>[14]</sup>。

OPN mRNA 剪接主要是在人体组织中,主要在肿瘤细胞。这种剪接形成了 3 个剪接变体:OPN-a、opn-b 和 OPN-c<sup>[15]</sup>。OPN-a 和 OPN-b 促进肺癌血管生成,增加血管内皮生长因子(VEGF)的表达,而 OPN-c 实际上可能抑制血管生成<sup>[16]</sup>。最近的研究表明,OPN 剪接变异体的作用不仅在恶性肿瘤,而且在退行性疾病如主动脉瓣钙化中也起作用,其中 OPN-a 在疾病的早期阶段时达到高峰,OPN-b 和 OPN-c 水平随主动脉钙化的进展而增加<sup>[17]</sup>。

除了明显调节的 mRNA 剪接外,OPN 还可以通过大量的翻译后修饰如丝氨酸/苏氨酸磷酸化、糖基化和酪氨酸硫酸化,导致单体分子量范围在 41~75 kDa 之间<sup>[18]</sup>,从而产生不同的作用。重组非磷酸化 OPN 增加血管平滑肌细胞的矿化,而酶促磷酸化 OPN 是一种强效的血管钙化抑制剂。Christensen 等研究证明了高度磷酸化的 OPN 与较少磷酸化形式相比,在 C-末端区域通过  $\alpha(V)\beta(3)$ -整合素对细胞粘附有较高的抑制作用;另一个重要的影响 OPN 活性的翻译后修饰是酶裂解。OPN 形成几种蛋白酶切割位点与细胞相互作用的结构域,切割位点包括凝血酶和几种基质金属蛋白酶(MMPs)裂解位点<sup>[19]</sup>。细胞相互作用域包含精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)细胞结合序列和丝氨酸-缬氨酸-缬氨酸-酪氨酸-谷氨酸-亮氨酸精氨酸(SVVYGLR)功能域。SVVYGLR 功能域是隐藏的,只在凝血酶介导的裂解过程中显示出来。RGD 和 SVVYGLR 域通过与细胞表面的整合素相互作用激活细胞信号转导。OPN 通过 RGD、SVVYGLR 序列能够与细胞表面的多种整合素受体如整合素  $\alpha v\beta 1$ 、 $\alpha v\beta 3$ 、 $\alpha v\beta 5$ 、 $\alpha 4\beta 1$ (多在炎性细胞中表达如淋巴细胞、单核-巨噬细胞)等相互作用而调节细胞黏附、迁移、增殖等多种生物学行为。OPN 通过这 2 个黏附序列来介导细胞-细胞、细胞-基质间的黏附和细胞信号传导,并促进血管平滑肌细胞由中膜向内膜的迁移以及巨噬细胞为主的炎性细胞向损伤部位的聚集,加速动脉粥样硬化进程。体外研究表明,含 RGD 序列的多肽可以阻止 OPN 与  $\alpha v\beta 3$  相互作用,从而可以抑制血管平滑肌细胞迁移、减缓血管内皮损伤后的再狭窄<sup>[20]</sup>。

### 3.2 OPN 与炎症

如上所述,多种整合素通过 OPN 的 RGD、SLAYGLR 结构域与 OPN 相互作用,这两种结构域通过调节迁移、存活和组织积聚而在巨噬细胞生物学领域发挥关键作用。OPN 也与各种促炎细胞因子相互作用,包括 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ ,它们可以增加 OPN 的表达<sup>[21]</sup>,并且 OPN 还可以与动脉粥样硬化过程更为相关的其他的炎症介质相互作用如血管紧张素 II(Ang II)和氧化低密度脂蛋白。Ang II 是动脉粥样硬化过程的中介,在动脉壁主要诱导 OPN 的表达<sup>[22]</sup>。氧化低密度脂蛋白增加 OPN 在各种血管细胞包括血管平滑肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞中的表达。OPN 是巨噬细胞和 T 细胞的趋化因子<sup>[23]</sup>,能够增强巨噬细胞和辅助性 T 细胞的活动,如增加 T 细胞表达 CD3 和活性氧的生成。OPN 诱导的氧化应激可能是加速动脉粥样硬化形成、促进活性不稳定斑块的形成的机制之一。

OPN 既可作为促炎细胞因子又可作为抗炎细胞因子,是炎症环境中的关键因子<sup>[24]</sup>。OPN 的高促炎活性在凝血酶裂解后更为明显,酶裂解产生超高效 N 末端片段的产生,该片段带有 2 个整合素激活结构域:RGD 和 SVVYGLR 序列。OPN-N 末端片段可能是 OPN 蛋白家族中的主要促炎症介质。然而,OPN 片段或剪接变异体中哪些片段主要发挥抗炎特性尚未明确。一些研究者认为 OPN 的 C-末端片段可以减轻炎症:Takahashi 等<sup>[25]</sup>人通过细胞粘附试验表明,OPN 的 C-末端片段的加入抑制了由 OPN 和 OPN-N 末端片段诱导的细胞粘附。Christensen 等<sup>[26]</sup>证实了 OPN 的 C-末端片段对细胞粘附的抑制作用取决于它的磷酸化。OPN-C 末端的抗炎作用还可以归因于它能够抑制巨噬细胞向炎性病灶的迁移。因此,OPN 不是单一的细胞因子;相反它是 1 个多肽,包括剪接变异体和多种活性蛋白裂解产物,具有免疫调节等功能。

### 3.3 OPN 与颈动脉粥样硬化斑块

血管内皮细胞受损为动脉粥样硬化形成的始动因素,当血管内膜受损时在细胞因子和生长因子的刺激下位于血管中膜的血管平滑肌细胞(VSMC)可由收缩表型转化为合成表型,从而向内膜下迁移,增殖及合成和分泌大量细胞外基质(extracellular matrix,ECM)。血管平滑肌细胞的迁移主要是由细胞外基质蛋白和细胞表面整合素受体的相互作用所介导的。研究表明,OPN 是各种细胞外基质蛋白中与细胞迁移和黏附的关系最为密切的。如前所述,OPN 通过 RGD、SVVYGLR 这 2 个黏附序列促进 VSMC 由中膜向内膜的迁移及炎性细胞向损伤部位的聚集,从而介导血管平滑肌细胞的趋化、黏附和迁移<sup>[27]</sup>,而黏附、增殖与迁移是动脉粥样硬化等血管重塑性疾病的细胞病理学基础<sup>[28]</sup>。另外,动脉粥样硬化斑块中微血管形成(血管生成)有助于易损斑块的形成,OPN 可通过  $\alpha v\beta 3$ /PI3-K/Akt/eNOS/NO 信号通路,直接刺激血管生成<sup>[29]</sup>,进而增加斑块破裂的风险。研究表明,OPN 通过细胞介导炎症反应致颈动脉粥样硬化斑块破损、纤维帽薄化,进而引起脑血管临床事件发生<sup>[30]</sup>。OPN 通过不同途径参与颈动脉粥样硬化的发生、发展,有实验研究结果表明颈动脉粥样硬化、颈动脉血管再狭窄部位的内皮细胞骨桥蛋白 mRNA 呈高表达状态。动物实验模型研究结果显示内皮细胞、平滑肌细胞内骨桥蛋白 mRNA 的表达在颈动脉血管内皮损伤后明显上调,8 h 可达到高峰,持续 14 d 后逐渐下降,说明血清 OPN 参与形成了动脉粥样硬化,导致斑块不稳定性增高,可能导致较高的脑梗死发生率。Carbone 等<sup>[31]</sup>对急性缺血性脑卒中患者研究发现,与事件刚发生时相比,7 d 后血清 OPN 水平达到高峰,这时血清的 OPN 水平与脑缺血面积及第 7 d、第 10 d 的 NIHSS 评分成正比。

OPN 参与动脉粥样硬化过程的所有步骤:它是斑块形成以及斑块特性的代表,在动脉粥样硬化的发病机制中起着重要作用,它在炎症和钙化中有重要的调控作用。最后这 2 个因素对动脉粥样硬化病变的性质有重要的影响,即是否形成稳定的、无并发症的斑块或者形成与增加症状性疾病的脆弱斑块有关。近年来普遍认为,钙化可以增强斑块的稳定性,降低心脑血管事件的发生率,而 OPN 是一种强效的软组

组织矿化抑制剂,从而可防止血管钙化。OPN 不仅在原发性颈动脉粥样硬化过程中起作用,而且在血管重建术后颈动脉再狭窄中起作用。骨桥蛋白在血管损伤后重塑中的作用在另一项研究中证实,在颈动脉内膜剥脱前用抗 OPN 抗体治疗可降低内膜增生<sup>[30]</sup>。

大多数现有的研究都认为 OPN 是 1 个单一的肽,其结论主要是归因于全长蛋白。然而,目前的证据表明这种观点可能是不完整的,忽略了 OPN 蛋白家族全部的生物学效应。凝血酶裂解 OPN 导致 OPN-N 端片段的形成,该片段比全长蛋白或 OPN-C 端片段具有更高的促炎症的潜力。事实上,OPN-N 末端片段而不是全长 OPN 和 OPN-C 末端片段与颈动脉斑块的炎症有关,因此并非 OPN 家族中的所有成员均具有促炎作用。血浆凝血酶切割的 OPN 与症状性脑血管病有更高的相关性<sup>[32]</sup>。

#### 4 小结和展望

OPN 不仅是颈动脉粥样硬化的标志,而且可能是调节其斑块稳定性的介质。当评价 OPN 作为治疗靶点时特别是在针对促炎作用同时保留其抗炎作用,因此目标不应该瞄准完整的 OPN,而应该针对 OPN 系统中的 1 个或多个成员:其不同剪接变异体和/或其裂解片段。具体、准确地操纵 OPN 系统将有助于斑块稳定性,积极调整动脉粥样硬化的自然病程,最终将改善患者结局。

#### 参 考 文 献

- [1] Chistiakov D, Orekhov AN and Bobryshev YV. endothelial barrier and its abnormalities in cardiovascular disease[J]. Front Physiol, 2015, 6(10):365.
- [2] Willeit P, Thompson SG, Agewall S, et al. Inflammatory markers and extent and progression of early atherosclerosis: Meta-analysis of individual-participant-data from 20 prospective studies of the PROG-IMT collaboration[J]. Eur J Prev Cardiol, 2016, 23(2):194-205.
- [3] Dirksen MF. Distribution of inflammatory cells in atherosclerotic plaques relates to the direction of flow[J]. Circulation, 1998, 98(19):2000-2003.
- [4] Chaturvedi S, Chimowitz M, Brown RD, et al. The urgent need for contemporary clinical trials in patients with asymptomatic carotid stenosis[J]. Neurology, 2016, 87(21):2271-2278.
- [5] 凌雪辉, 吴晓华, 韩瑛, 等. 颈动脉粥样硬化斑块发生的危险因素及与脑梗死的关系[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(17):3310-3312.
- [6] Van Dijk AC, Truijman MT, Hussain B, et al. Intraplaque hemorrhage and the plaque surface in carotid atherosclerosis: the plaque at RISK study (PARISK)[J]. AJNR Am J Neuroradiol, 2015, 36(11):2127-2133.
- [7] Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2):115-126.
- [8] 刘俊田. 动脉粥样硬化发病的炎症机制的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2015, 32(2):141-152.
- [9] Wu MY, Li CJ, Hou MF, et al. New insights into the role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(10):2034.

- [10] Luo JY, Xu R, Li XM, et al. MIF gene polymorphism rs755622 is associated with coronary artery disease and severity of coronary lesions in a Chinese kazakh population: a Case-Control study[J]. Medicine, 2016, 95(4):e2617.
- [11] Ruddy JM, Ikonomidis JS, Jones JA. Multidimensional contribution of matrix metalloproteinases to atherosclerotic plaque vulnerability: multiple mechanisms of inhibition to promote stability[J]. J Vasc Res, 2016, 53(1/2):1-16.
- [12] Oldberg A FA. Sequence Analysis of Rat Bone Sialoprotein. (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(23):8819-8823.
- [13] Mark MP, Prince CW, Osawa T, et al. Role of osteopontin in systemic lupus Erythematosus[J]. Arch immunol Ther EXP (wiesz), 2014, 62(6):475-482.
- [14] Castello LM, Raineri D, Salmi L, et al. Osteopontin at the crossroads of inflammation and tumor progression[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017(10):4049098.
- [15] Yang X, Yan W, Tian Y, et al. Family with sequence similarity member 20C is the primary but not the only kinase for the small-integrin-binding ligand N-linked glycoproteins in bone[J]. FASEB J, 2016, 30(1):121-128.
- [16] Mirzaei A, Ghaffari SH, Nikbakht M, et al. OPN b and c isoforms doubtless veto anti-angiogenesis effects of curcumin in combination with conventional AML regiment[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(9):2591-2599.
- [17] Wei R, Wong JPC, Kwok HF. Osteopontin — a promising biomarker for cancer therapy[J]. J Cancer, 2017, 8(12):2173-2183.
- [18] Clemente N, Raineri D, Giuseppe C, et al. Osteopontin bridging innate and adaptive immunity in autoimmune diseases[Z], 2016:7675437.
- [19] Zhu Q, Luo X, Zhang J, et al. Osteopontin as a potential therapeutic target for ischemic stroke[J]. Curr Drug Deliv, 2017, 14(6):766-772.
- [20] Boggio E, Dianzani C, Gigliotti CL, et al. Thrombin cleavage of osteopontin modulates its activities in human cells in vitro and mouse experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo[Z], 2016:9345495.
- [21] Salvi V, Scutera S, Rossi S, et al. Dual regulation of osteopontin production by TLR stimulation in dendritic cells[J]. J Leukoc Biol, 2013, 94(1):147-158.
- [22] Remus EW, Lyle AN, Weiss D, et al. miR181a protects against angiotensin II-induced osteopontin expression in vascular smooth muscle cells[J]. Atherosclerosis, 2013, 228(1):168-174.
- [23] Wolak T, Sion-Vardi N, Novack V, et al. N-terminal rather than full-length osteopontin or its C-terminal fragment is associated with carotid-plaque inflammation in hypertensive patients[J]. Am J Hypertens, 2013, 26(3):326-333.
- [24] Jiang Z, Xu B, Yang M, et al. Protection by Hydrogen against gamma ray-induced testicular damage in rats[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2013, 112(3):186-191.
- [25] Maeda K, Takahashi K, Takahashi F, et al. Distinct roles of osteopontin fragments in the development of the pulmonary involvement in sarcoidosis[J]. Lung, 2001, 179(5):279-291.
- [26] Christensen B, Klänning E, Nielsen MS, et al. C-terminal modifi-

cation of osteopontin inhibits interaction with the  $\alpha V\beta 3$ -integrin[J]. J Biol Chem, 2012, 287(6):3788-3797.

- [27] Sponder M, Reuter C, Fritzer-Szekeres M, et al. Osteopontin is elevated in patients with mitral annulus calcification Independent from classic cardiovascular risk factors[J]. BMC Cardiovasc Disord, 2016, 16(6):132.
- [28] Sponder M, Fritzer-Szekeres M, Marculescu R, et al. Physical inactivity increases endostatin and osteopontin in patients with coronary artery disease[J]. Heart Vessels, 2016, 31(10):1603-1608.
- [29] Yao XX, Lu JB, Ye ZD, et al. Hairy/enhancer of Split Homologue-1 Suppresses Vascular Endothelial Growth Factor-in-

duced Angiogenesis via Downregulation of Osteopontin Expression[J]. Sci Rep, 2017, 7(1):898.

- [30] Chen J, Lu Y, Huang D, et al. Relationship of osteopontin and renal function with severity of coronary artery lesions[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 7(4):1122-1127.
- [31] Carbone F, Vuilleumier N, Burger F, et al. Serum osteopontin levels are upregulated and predict disability after an ischaemic stroke[J]. Eur J Clin Invest, 2015, 45(6):579-586.
- [32] Ozaki S, Kurata M, Kumon Y, et al. Plasma thrombin-cleaved osteopontin as a potential biomarker of acute atherothrombotic ischemic stroke[J]. Hypertens Res, 2017, 40(1):61-66.

(2018-02-25 收稿)