

不对称二甲基精氨酸检测方法的研究进展*

郭紫轩¹, 刘运洪², 彭传梅¹, 张 胜¹综述, 高 辉^{1△}审校

(1. 昆明市延安医院检验科, 云南昆明 650051; 2. 中国科学院深圳先进技术研究院, 广东深圳 518000)

关键词: 不对称二甲基精氨酸; 检测; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.20.026

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)20-2870-04

不对称二甲基精氨酸 (ADMA) 是内源性一氧化氮合酶 (NOs) 的抑制剂, 可竞争抑制一氧化氮 (NO) 的产生, 诱发氧化应激反应, 引起血管内皮功能不全^[1], 血浆中 ADMA 水平是血管内皮细胞功能受损的指标之一。调查研究发现冠状动脉支架再狭窄患者 ADMA 浓度比冠状动脉支架无狭窄患者 ADMA 浓度明显升高^[2]。Riccioni 等^[3]研究发现, 在无症状颈动脉粥样硬化的老年患者中, ADMA 水平与颈动脉粥样硬化程度呈正相关。Huang 等^[4]采用 Gensini 评分测定了 168 名糖耐量受损患者的冠状动脉病变严重程度, 发现这些患者体内 ADMA 水平比健康对照者高, 认为 ADMA 是影响 Gensini 评分的独立因素。研究人员还发现在患者体质量指数较低时, 体内 ADMA 浓度每升高 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 发生急性心肌梗死的风险率增加 1.21%^[5]。Ast 等^[6]发现, 高血压治疗组在连续补充精氨酸 4 周后, 血压明显下降, 由此可见精氨酸具有降低血压的作用。但高浓度的 ADMA 会抑制精氨酸的利用度, 因此血液中高浓度的 ADMA 可能在高血压的形成过程中起了重要的作用。Benito 等^[7]发现, 慢性肾脏疾病患者体内的 ADMA 浓度显著增加。大量证据表明, 高浓度的 ADMA 可能会导致心血管相关疾病, 如动脉粥样硬化^[8]、高血压^[9]、肾脏疾病的发生发展^[10]。此外, ADMA 与累积性炎症负荷呈正相关^[11]。新近研究证明, ADMA 是 2 型糖尿病血糖控制不良的患者并发心血管疾病的一个独立危险因素^[12-13]。血浆 ADMA 水平还可以反映患者脑梗死的严重程度, ADMA 水平与神经损伤呈正相关^[14]。大量证据表明 ADMA 是心血管相关疾病发生发展的标志物, 但是在健康个体中, ADMA 浓度仅仅在 0.3~0.8 $\mu\text{mol/L}$ 的范围中, 在患者体液中 ADMA 浓度也只有数十到数百微摩尔, 这给 ADMA 检测带来了巨大的困难^[15]。同时对称性二甲基精氨酸 (SDMA) 是 ADMA 的同分异构体, 在血液中 ADMA 含量与 SDMA 大致相同, 而且 ADMA 和 SDMA 的相对分子质量也相同, 在检测血液中 ADMA 水平时, 要注意区分 ADMA 与 SDMA。因此, 建立一个简单、稳定性好、适用于临床快速准确地检测 ADMA 含量的方法对基础研究和临床诊断都有非常重要的意义。

1 ADMA 的检测方法

1.1 高效液相色谱法 (HPLC) 许多研究表明, HPLC 可同时测定精氨酸、单甲基精氨酸 (L-NMMA)、ADMA 和 SDMA 的浓度, 而只需 0.05~0.20 mL 的样品^[16]。但血液中有许多复杂的蛋白质干扰物质, 在检测 ADMA 时要进行样品预处理, 去除血液中的蛋白质等干扰^[18]。样品处理方法大致有 3 种: 将样品通过过滤膜过滤、通过有机溶剂萃取后离心沉淀蛋白, 以及固相萃取 (SPE)。早期 HPLC 检测氨基酸一般采用离子交换色谱柱后衍生法, 但是这种方法存在一个很大的缺点,

即分离时间一般在 30~60 min, 耗费较长的时间。为了减少时间, 现常用柱前衍生反相 HPLC: 先将样品通过 SPE 法进行预处理, 然后采用化学衍生法对样品进行检测^[16-17]。SPE 是近年来发展的一种样品预处理技术, 由液固萃取和柱液相色谱技术相结合发展而来, 主要用于样品的分离、纯化和浓缩, 与传统的液液萃取法相比, SPE 可以提高分析物的回收率, 更有效地将分析物与干扰物分离, 减少样品预处理过程, 操作简单、省时、省力。研究报道, SPE 对 ADMA 的绝对回收率高于 80%, 而相对回收率则为 101%、批内相对标准差和批间相对标准差分别为 2.1% 和 2.7%^[18]。Heresztyn 等^[19]研究认为, SPE 能够较好地分离血浆中的精氨酸、ADMA 和 SDMA, 其灵敏度和精确度与化学衍生法检测 ADMA 相似。化学衍生法通常是通过特殊的化学试剂将 ADMA 转变为相应的衍生物进而进行检测。常用的衍生试剂有许多种, 包括邻苯二甲醛 (OPA)、异苯硫氰酸酯 (PITC)、7-氟-4-硝基苯并-1,2,3-恶二唑 (NBD-F) 等。OPA 是现在应用最广泛的衍生化学试剂, 其将 ADMA 转变为荧光衍生物, 并且反应迅速, 在室温下即可瞬间产生荧光衍生物, 而且 OPA 本身不具有荧光性质, 无本底干扰, 使色谱图干净明了^[16]。但是 OPA 产生的荧光衍生物的稳定性相对较差, 同时血浆中 L-NMMA 的浓度远远低于 ADMA 和 SDMA, OPA 产生的荧光强度不足以同时区别这 3 种物质。Nonaka 等^[20]研究认为 NBD-F 比 OPA 产生的荧光衍生物更加灵敏和稳定。但是, HPLC-荧光法都需要通过特殊的化学试剂将 ADMA 转变为相应的衍生物再进行检测, 需要进行衍生这一步骤, 使样品的衍生和纯化都耗费很长的时间^[20-21]。

1.2 质谱法 (MS) MS 可以通过质谱图对 ADMA 进行定性分析^[22]。根据从样品中分离待测物质的方法不同, 又可以分为单独 MS、气相色谱-串联 MS (GC-MS) 及高效液相色谱-串联 MS (LC-MS)。LC-MS 是通过 HPLC 将样品分离, 串联质谱对样品进行检测, 进而得到质谱图。LC-MS 优化了 HPLC 的样品处理部分, 不需要样品衍生化^[23-25]。Bishop 等^[26]采用离子交换柱将 ADMA 和 SDMA 分离, 进而避免样品衍生化。尽管 ADMA 和 SDMA 的前体离子的质荷比 (m/z) 都为 230.2, 但是进一步发生分解产生的特定离子却可以区分 ADMA 和 SDMA。ADMA 产生的特定离子的 m/z 为 46, 而 SDMA 产生的特定离子的 m/z 为 172^[27-29]。而 Di Gangi 等^[25]采用电喷雾电离方法产生多电荷离子, 使离子进入到质谱仪中进行检测, 通过检测常见离子与特定离子之间的比例来排除 SDMA 对 ADMA 的干扰, 再采用离子对试剂进行色谱法分离样品。Andrade 等^[30]发现, 采用浓度为 0.2% 离子对试剂三氟乙酸 (TFA) 可以形成良好的峰形, 同时避免了 SPE 和产生荧光衍生物, 进一步减少标本处理时间, 后期研究采用超滤法过滤血

* 基金项目: 云南省应用基础研究项目 (昆医联和专项) (2015FB089); 昆明医科大学 2017 年研究生创新基金 (2017S150)。

△ 通信作者, E-mail: 459820005@qq.com。

浆标本,在去除蛋白质的同时减少了代谢产物的降解,采用同位素稀释法进行色谱分析。Gopu 等^[24]认为尿液也存在 ADMA,并且仅含有少量干扰性蛋白质,收集方便,且无创,因此可以用尿液代替血浆检测 ADMA 浓度。LC-MS 检测 ADMA 改善了 HPLC 检测 ADMA 的一些不足,样品从 HPLC 流出到质谱仪仅需 3~7 min,减少了检测的时间,避免了一些复杂的步骤,Jacopo 检测 ADMA 的检出限和定量限分别为 0.005 mmol/L 和 0.01 mmol/L,回收率高于 96%,批内和批间 CV 均低于 6%,而且可以同时检测血浆中的精氨酸、ADMA 和 SDMA,目前许多研究认为 MS 是检测 ADMA 最特异的方法之一^[22-24,31-32]。

1.3 酶联免疫法 2004 年,Schulze 等^[33]建立了酶联免疫吸附(ELISA)法检测 ADMA。同时,ELISA 法检测 ADMA 平均回收率为 94.6%,批间和批内 CV 分别为 19%和 9%,具有较高的敏感度和精确性^[33-34]。其采用的是竞争法,将 ADMA 包被在微孔板中,然后加入酶标抗体和经过处理的血清(50 μ L),血清中的 ADMA 会与包被的 ADMA 竞争酶标抗体,进而通过酶标仪得到血清中 ADMA 的浓度^[33,35]。但一些研究认为,ELISA 法检测 ADMA 存在基质效应,对 ADMA 的分析具有显著的干扰,会影响 ADMA 结果的准确性^[31,35]。后期有研究发现 ELISA 法测定 ADMA 的值通常比 MS 和色谱法测定 ADMA 的值偏高^[31,33,35]。有研究发现,采用 ELISA 方法检测肾脏疾病患者的 ADMA 的平均值为 0.78 μ mol/L,而 LC-MS 检测 ADMA 的平均值为 0.59 μ mol/L^[33],并且认为采用 ELISA 法检测肾脏疾病患者的 ADMA 水平时应适当地校准 ADMA 的值^[31]。Horowitz 等^[36]认为 LC-MS 检测 ADMA 得到的结果与 HPLC 和 ELISA 法相比较更稳定,同时更准确。ELISA 法和 LC-MS 检测 ADMA 的差异还需进一步研究^[35]。但是 ELISA 法检测 ADMA 更方便快捷,此外操作步骤简单、对实验室的要求相对较低,并且在临床开展相对容易^[37]。

1.4 毛细管电泳法(CE) ADMA 在酸性或者碱性缓冲液中容易电离,因此可以采用 CE 进行检测^[17]。CE 是在毛细管中以高压直流电场为驱动力对样品进行分离的方法。这种方法不需要对样品进行 SPE 或者衍生化产生荧光产物,因此减少了处理样品的时间与步骤。Zinellu 等^[38]采用场放大进样法(FASD)改善了以往的乙腈法或过滤法,不但去除了样品中的蛋白质,还进一步减少了进样量,使进样量从 400 μ L 减少到 100 μ L,此外样品处理时间也缩短了,最终通过紫外定量检测 ADMA。但是,紫外光检测通过样品的光程短,导致灵敏度较低。因此出现了毛细管电泳-串联 MS(CE-MS),常用毛细管电泳-电喷雾串联 MS(CE-ESI-MS)检测血浆中的精氨酸、ADMA 及 SDMA,高分辨率的电泳分离技术可以在基线分离 ADMA 和 SDMA,使质谱更好地区分二者^[17]。Linz 等^[39]和 Trapp 等^[40]采用微芯片毛细管电泳法分离样品,通过激光诱导荧光(LIF)检测血浆中的 ADMA,使标本处理时间减少为 20 min 左右,此外避免了衍生化产生荧光产物。微芯片毛细管电泳在芯片上进行进样、反应、分离和检测,使检验快速、高效和低耗^[39]。

2 小 结

目前,检测 ADMA 的实验室方法有许多,但检测水平参差不齐,能够应用于临床的却很少。HPLC 及其荧光衍生法相对灵敏度高、分辨率好、重复性好,但需要通过特殊的化学试剂将 ADMA 转变为相应的衍生物进而进行检测,这个过程操作复杂且耗时。LC-MS 价格昂贵,要用各种填料柱,对实验室的仪器设备要求高,在临床上使用尚比较困难。虽然 HPLC、LC-

MS、CE 检测 ADMA 的准确性、灵敏度和重复性较好,但对实验室的要求较高,费用较为昂贵,并不适合临床检测使用。而 ELISA 法测定 ADMA 的值通常偏高,但是在临床开展较为方便。因此,现在需要制订 ADMA 检测的参考方法及改善 ADMA 检测的方法,使其能准确、快速和稳定地为临床医师提供可靠的结果,使 ADMA 的检测结果为心血管相关疾病的诊断和治疗提供参考依据。

参考文献

- [1] Co AS, Mozaffarian D, Roger VL, et al. Heart disease and stroke statistics-2014 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2014, 129(3): 399-410.
- [2] Bal UA, Yildirim A, Aydinalp A, et al. Could plasma asymmetric dimethylarginine level be a novel predictor beyond the classic predictors of stent restenosis? [J]. *Anadolu Kardiyol Derg*, 2014, 14(6): 491-497.
- [3] Riccioni G, Scotti L, D'orazio N, et al. ADMA/SDMA in elderly subjects with asymptomatic carotid atherosclerosis: values and site-specific association[J]. *Int J Mol Sci*, 2014, 15(4): 6391-6398.
- [4] Huang S, Zou D, Peng W, et al. The prediction roles of asymmetric dimethyl-arginine, adiponectin and apelin for macroangiopathy in patients with impaired glucose regulation[J]. *Ann Endocrinol (Paris)*, 2016, 77(6): 633-640.
- [5] Borgeraas H, Hertel JK, Svingen GF, et al. Association between body mass index, asymmetric dimethylarginine and risk of cardiovascular events and mortality in norwegian patients with suspected stable angina pectoris[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0152029.
- [6] Ast J, Jablecka A, Bogdanski P, et al. Evaluation of the antihypertensive effect of L-arginine supplementation in patients with mild hypertension assessed with ambulatory blood pressure monitoring[J]. *Med Sci Monit*, 2010, 16(5): 266-271.
- [7] Benito S, Sánchez A, Unceta N, et al. LC-QTOF-MS-based targeted metabolomics of arginine-creatine metabolic pathway-related compounds in plasma: application to identify potential biomarkers in pediatric chronic kidney disease[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408(3): 747-760.
- [8] Haissman JM, Haugaard AK, Knudsen A, et al. Marker of endothelial dysfunction asymmetric dimethylarginine is elevated in HIV infection but not associated with subclinical atherosclerosis[J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2016, 73(5): 507-513.
- [9] Inan B, Ates I, Ozkayar N, et al. Are increased oxidative stress and asymmetric dimethylarginine levels associated with masked hypertension? [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2016, 38(3): 294-298.
- [10] Alpoim PN, Sousa LP, Mota AP, et al. Asymmetric dimethylarginine(ADMA) in cardiovascular and renal disease [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 440: 36-39.
- [11] Sandoo A, Dimitroulas T, Hodson J, et al. Cumulative inflammation associates with asymmetric dimethylarginine in rheumatoid arthritis: a 6 year follow-up study [J].

- Rheumatology(Oxford),2015,54(7):1145-1152.
- [12] Jawalekar SL,Karnik A,Bhutey A. Risk of cardiovascular diseases in diabetes mellitus and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine [J]. *Biochem Res Int*, 2013,2013;189430.
- [13] Surdacki A,Kruszelnicka O,Rakowski T, et al. Asymmetric dimethylarginine predicts decline of glucose tolerance in men with stable coronary artery disease; a 4. 5-year follow-up study[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2013, 12: 64.
- [14] Blackwell S. The biochemistry, measurement and current clinical significance of asymmetric dimethylarginine[J]. *Ann Clin Biochem*, 2010, 47(Pt 1): 17-28.
- [15] Teerlink T. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 851(1/2): 21-29.
- [16] Teerlink T. Determination of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor asymmetric dimethylarginine in biological samples by HPLC[J]. *Methods Mol Med*, 2005, 108: 263-274.
- [17] Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Mass spectrometric quantification of L-arginine and its pathway related substances in biofluids; the road to maturity[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014, 964: 89-102.
- [18] Jones CE, Darcy CJ, Woodberry T, et al. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, homoarginine and arginine in small plasma volumes using a Gemini-NX column at high pH[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2010, 878(1): 8-12.
- [19] Heresztyn T, Worthley MI, Horowitz JD. Determination of L-arginine and NG, NG - and NG, NG' -dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 805(2): 325-329.
- [20] Nonaka S, Tsunoda M, Imai K, et al. High-performance liquid chromatographic assay of N-G-monomethyl-L-arginine, N-G-dimethyl-L-arginine, and (NNG)-N-G-dimethyl-L-arginine using 4-fluoro-7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazole as a fluorescent reagent[J]. *J Chromatogr A*, 2005, 1066(1/2): 41-45.
- [21] Ivanova M, Artusi C, Boffa GM, et al. HPLC determination of plasma dimethylarginines; method validation and preliminary clinical application[J]. *Clin Chim Acta*, 2010, 411(21/22): 1632-1636.
- [22] Schwedhelm E. Quantification of ADMA; analytical approaches[J]. *Vasc Med*, 2005, 10(Suppl 1): S89-S95.
- [23] Gervasoni J, Bonelli F, Zuppi C, et al. Determination of asymmetric dimethyl arginine in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry; clinical application in hypertensive subjects [J]. *Clin Chem Lab Med*, 2011, 49(12): 2109-2115.
- [24] Gopu CL, Hari PR, George R, et al. Simultaneous determination of homocysteine and asymmetric dimethylarginine in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, 939(22): 32-37.
- [25] Di Gangi IM, Chianchetti L, Gucciardi A, et al. Simultaneous quantitative determination of N(G), N(G)-dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 677(2): 140-148.
- [26] Bishop MJ, Crow B, Norton D, et al. Direct analysis of underivatized asymmetric dimethylarginine(ADMA) and L-arginine from plasma using mixed-mode ion-exchange liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 859(2): 164-169.
- [27] Martens-Lobenhoffer J, Bode-Böger SM. Fast and efficient determination of arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine in biological fluids by hydrophilic-interaction liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(3): 488-493.
- [28] Brame CJ, Moran MF, Mcbroom-Cerajewski LD. A mass spectrometry based method for distinguishing between symmetrically and asymmetrically dimethylated arginine residues[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2004, 18(8): 877-881.
- [29] Rappsilber J, Friesen WJ, Paushkin S, et al. Detection of arginine dimethylated peptides by parallel precursor ion scanning mass spectrometry in positive ion mode[J]. *Anal Chem*, 2003, 75(13): 3107-3114.
- [30] Andrade F, Llarena M, Lage S, et al. Quantification of arginine and its methylated derivatives in healthy children by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr Sci*, 2015, 53(5): 787-792.
- [31] Pecchini P, Malberti F, Mieth M, et al. Measuring asymmetric dimethylarginine(ADMA) in CKD: a comparison between enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Nephrol*, 2012, 25(6): 1016-1022.
- [32] Saigusa D, Mai T, Kanemitsu Y, et al. Determination of Asymmetric Dimethylarginine and Symmetric Dimethylarginine in Biological Samples of Mice Using LC/MS/MS [J]. *Am J Anal Chem*, 2011, 2: 303-313.
- [33] Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E, et al. Determination of asymmetric dimethylarginine(ADMA) using a novel ELISA assay[J]. *Clin Chem Lab Med*, 2004, 42(12): 1377-1383.
- [34] Valtonen P, Karppi J, Nyysönen K, et al. Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine(ADMA) determination in human serum[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 828(1/2): 97-102.
- [35] Boelaert J, Schepers E, Glorieux G, et al. Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine in serum

- from patients with chronic kidney disease; UPLC-MS/MS versus ELISA[J]. *Toxins*(Basel), 2016, 8(5):149.
- [36] Horowitz JD, Heresztyn T. An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies; methodological considerations[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 851(1/2):42-50.
- [37] Yokoro M, Suzuki M, Yatani M, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay system for the determination of asymmetric dimethylarginine using a specific monoclonal antibody [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2012, 76(2):400-403.
- [38] Zinellu A, Sotgia S, Usai MF, et al. Improved method for plasma ADMA, SDMA, and arginine quantification by

- field-amplified sample injection capillary electrophoresis UV detection[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 399(5):1815-1821.
- [39] Linz TH, Snyder CM, Lunte SM. Optimization of the separation of NDA-derivatized methylarginines by capillary and microchip electrophoresis[J]. *J Lab Autom*, 2012, 17(1):24-31.
- [40] Trapp G, Sydow K, Dulay MT, et al. Capillary electrophoretic and micellar electrokinetic separations of asymmetric dimethyl-L-arginine and structurally related amino acids; quantitation in human plasma[J]. *J Sep Sci*, 2004, 27(17/18):1483-1490.

(收稿日期:2017-04-23 修回日期:2017-06-26)

• 综 述 •

PDGF 及相关信号通路致骨髓组织纤维化的研究进展^{*}

蒋 艳 综述, 冀林华[△] 审校
(青海大学, 青海西宁 810000)

关键词: 血小板衍生因子; 信号通路; 骨髓组织纤维化

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.20.027

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)20-2873-03

骨髓中的造血组织胶原增生,被纤维组织替代,多见于骨髓增殖性疾病和骨髓增生异常综合征,还可见于白血病等血液系统恶性疾病^[1-3]。另外一些非血液系统疾病,如严重感染、低氧环境等也可引起继发性骨髓组织纤维化^[4-5],其中血小板衍生因子(PDGF)在骨髓组织纤维化中发挥了重要作用,它是一种重要的生长因子,能激活有丝分裂,促使成纤维细胞增生及分泌 I 型胶原及 III 型胶原,形成组织纤维化^[6],骨髓组织纤维化严重影响疾病预后,近年来,关于 PDGF 致组织纤维化的研究甚多,现综述如下。

1 PDGF 的生理学特征及作用

PDGF 属于血管内皮生长因子家族,是一种糖蛋白,由骨髓巨核细胞合成,贮存于血小板 α -颗粒中,在血液凝固过程中,可释放入血清,是血清中主要的促细胞分裂剂,它能刺激成纤维细胞生长、分裂,并能分泌胶原蛋白,在一定浓度范围内能刺激骨髓成纤维细胞增生,可加速成纤维细胞的增殖,刺激网状纤维或胶原纤维的产生,从而形成骨髓纤维化^[7]。但是 PDGF 必须与受体结合才能发挥生物效应,PDGF 与受体结合,通过激活 PDGFR 激酶活性及下游信号通路,从而将信号传入细胞内,经级联式放大瀑布效应调控细胞的生命活动。Niino 等^[8]研究了 18 例急性巨核细胞白血病患者,其中 11 例患者中 PDGF 高度表达,说明 PDGF 与骨髓组织的纤维化相关。除此之外,继发性红细胞增多症患者长期低氧刺激也可促进 PDGF 过度表达,而刺激骨髓组织纤维增生。由此推断 PDGF 在骨髓组织纤维化的发生发展中可能发挥着重要的作用。

2 PDGF 相关信号通路

2.1 MAPK-ERK 通路 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是 PDGF 致组织纤维化的最主要通路,可将细胞外刺激信号传递到细胞核引起一系列细胞生物学反应。PDGF 与细胞表面相

应的蛋白酪氨酸激酶受体结合,使受体上的酪氨酸残基磷酸化→结合含有 SH2 结构域的生长因子受体结合蛋白 2(Grb2)→结合 Ras 蛋白,在膜下形成 PDGF 受体(PDGFR)、Grb2、Ras 蛋白复合体,从而激活 Ras 蛋白,激活后的 Ras 蛋白启动 MAPK 三级激酶级联反应,最终激活 ERK(ERK),活化的 ERK 转位到细胞核中,磷酸化 Elk-1、C-myc、C-fos、NF- κ B 和 AP-1 等转录因子及许多调控细胞周期的蛋白,从而发挥生物效应。有文献报道,PDGF 能够刺激肺成纤维细胞 I 型、III 型胶原蛋白表达增加,同时上调磷酸化 ERK1/2 蛋白的表达,证实 PDGF 可能通过介导的 ERK1/2 信号转导通路的激活,进而促进矽肺纤维化的形成与发展^[9]。国外文献报道,PDGF 与 PDGFR 结合,可诱导 ERK17 的磷酸化,而 CD248 可调节 ERK18 的磷酸化,可致 c-fos 表达,介导 PDGF 下游通路,而致肝纤维化^[10]。Wang 等^[11]通过动物实验证实 mRNA-9 可以直接作用 PDGF- β 受体,减少其蛋白水平,作用于其下游基因的蛋白水平,并且能作用于(ERK)1/2,从而可以达到抑制心肌纤维化的可能。体外试验中,双氢青蒿素(DHA)可下调 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、 α 1-I 型胶原蛋白和纤连蛋白表达水平,可能与 PDGF- β 受体介导的 ERK 途径有关,表明 DHA 经由 PDGF- β 受体、ERK 通路抑制肝纤维化^[12]。

2.2 Keap1-Nrf2-ARE 信号通路 Nrf2 是细胞氧化应激反应中的关键因子,是 CNC 转录因子家族成员,Nrf2 能通过调节氧化还原敏感的转录激活蛋白和核转录因子 κ B,下调促纤维化因子的表达。在氧化物质或异型物质的刺激下,Nrf2 与 Keap1 解离,易位到细胞核中,与 Maf、JunD、c-Jun 等结合形成杂化二聚体,进一步与下游 II 相解毒基因和抗氧化酶基因启动子中的 ARE 位点结合,激活下游启动子,转录大量相关的下游蛋白,从而发挥生物作用。有文献报道,绿原酸可以预防四

^{*} 基金项目:青海省科技计划项目(2014-HZ-808)。

[△] 通信作者, E-mail:13997244508@163.com。