



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Glucose and Lipid Metabolism—Review

普列克底物蛋白同源物样结构域家族A成员1(PHLDA1)蛋白——导致代谢性疾病的多方面细胞存活因素

Tamana Yousof, Jae Hyun Byun, Jack Chen, Richard C. Austin*

Department of Medicine, Division of Nephrology, McMaster University, The Research Institute of St. Joe's Hamilton and the Hamilton Centre for Kidney Research, Hamilton, Ontario, L8N 4A6, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 December 2021

Revised 20 May 2022

Accepted 30 May 2022

Available online 2 July 2022

关键词

内质网应激

代谢

凋亡

细胞存活

PHLDA1

摘要

普列克底物蛋白同源物样结构域家族A成员1(PHLDA1)是多作用的胞内蛋白,属于进化上保守的普列克底物蛋白同源相关结构域家族。最初,PHLDA1的小鼠同源基因——T细胞死亡相关51基因(TDAG51)——因其在T细胞杂交瘤中活化诱导的细胞凋亡中的作用而被发现。近年来,由于PHLDA1与肥胖症、脂肪性肝病、糖尿病、动脉硬化和癌症有关,因此受到越来越多的关注。越来越多的证据也证实,PHLDA1在内质网应激信号通路中作为细胞凋亡、自噬和增殖的关键介质发挥作用。本文综述了PHLDA1基因及蛋白调控、定位和功能方面的现有知识。本文重点介绍了PHLDA1促凋亡和抗凋亡,进而导致代谢性疾病的作用。

© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

代谢性疾病包括多种人类疾病,从癌症到脂代谢失调。脂代谢紊乱是肥胖症、2型糖尿病(T2DM)、非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)和心血管疾病(CVD)的主要原因。这些疾病紊乱的病因主要是由营养过剩和久坐生活方式引起的细胞内内质网(ER)应激和炎症。内质网的功能众所周知,包括钙调控和脂质生成,以及蛋白质合成、折叠和成熟[1]。

新生多肽的不当折叠通常会导致其在内质网腔内积聚,从而产生内质网应激现象。内质网应激作为一种代偿机制引起多种质量控制信号级联反应,包括未折叠蛋白反

应(UPR)激活、自噬和内质网相关降解(ERAD)机制,以维持内质网内稳态[2–3]。在哺乳动物细胞中未折叠蛋白反应由三种相互关联但独立的跨膜蛋白介导:需肌醇酶1 α (IRE1 α)、转录激活因子6(ATF6)和RNA依赖性蛋白激酶(PKR)样内质网激酶(PERK)。正常情况下,这些蛋白质需要与几种钙依赖性伴侣蛋白[包括78 kDa(GRP78)和94 kDa(GRP94)的葡萄糖调节蛋白]结合。内质网中错误折叠蛋白的积累导致这些伴侣蛋白从同源配体移位到内质网腔中成为积累的未折叠蛋白。三种跨膜蛋白释放这些伴侣蛋白会导致几个信号级联反应的激活,而这些信号级联反应会引起伴侣蛋白表达增加、蛋白降解和细胞凋亡。

* Corresponding author.

E-mail address: austinr@taari.ca (R.C. Austin).

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: *Engineering* 2023, 20(1): 9–18

引用本文: Tamana Yousof, Jae Hyun Byun, Jack Chen, Richard C. Austin. Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 1 (PHLDA1): A Multifaceted Cell Survival Factor that Drives Metabolic Disease. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.05.014>.

大量报道称慢性未折叠蛋白反应激活和这些通路的失调会导致各种人类疾病和代谢紊乱[4–14]。有人认为4-苯基丁酸(4-PBA)等化学伴侣蛋白可以缓解小鼠内质网应激引起的代谢性疾病,并且多项临床试验正在针对肥胖、糖尿病和其他代谢性疾病进行研究[15–16]。总的来说,尽管慢性未折叠蛋白反应激活与疾病进展之间存在既定关系,但内质网应激诱导基因和普列克底物蛋白同源物样结构域家族A成员1(PHLDA1)在代谢性疾病中的独特作用尚未完全阐明。

2. 术语

小鼠同源基因——T细胞死亡相关基因51(TDAG51)最初是基于它在凋亡抗原1(APO1/Fas)介导的T细胞凋亡中的促凋亡作用而被鉴定[17]。最终,由于TDAG51与PHLDA1的人类同源物具有高度的序列同源性,且编码蛋白N端区的基因变异很小,因此其被归类为PHLDA的成员[18]。尽管TDAG51主要与细胞死亡有关,但PHLDA1这个名称本身就强调其多方面的功能作用。正如同家族的其他成员一样,其不仅仅只有凋亡相关作用。在本文中,仅使用统一术语PHLDA1,不同物种则添加小写的前缀,即hPHLDA1表示人类同源物,mPHLDA1表示小鼠同源物。

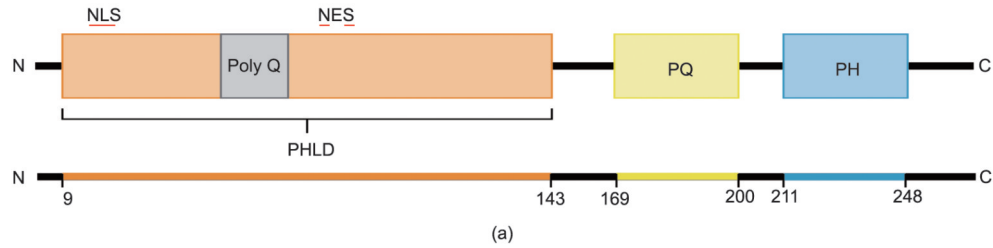
3. 人类 PHLDA1 基因

hPHLDA1基因位于染色体12q15(已知编码核糖体和核小体蛋白的区域)上,其中还有一些转录因子[19]。hPHLDA1基因的启动子区域已被定位到开放阅读框上游2210个核苷酸的区域,其中近端转录区的大部分启动子活性位于起始密码子上游582个核苷酸处[20]。该核苷酸区域具有双向活性,通过离子霉素(一种用于增加细胞内钙水平,从而引起凋亡和自噬的药物)的刺激,确定在293T细胞中相应逆转录物的表达情况[20]。此后,有研究表明,长链非编码RNA(lncRNA)、microRNA(miRNA)和环状RNA(circRNA)干扰可以抑制PHLDA1基因的表达。最近,由PHLDA1反义链编码的885个碱基对(bp)lncRNA转录物ENST00000552367被确定为PHLDA1转录物的潜在负调控因子[21]。在妊娠期糖尿病诱导的巨大胎儿中,该lncRNA的转录物高出14倍,从而导致PHLDA1转录物显著减少[21]。另一项研究发现了另一种能够抑制PHLDA1基因的lncRNA,即缺氧诱导因子1 α 反

义RNA2。研究表明,这种抑制lncRNA被认为是在子痫前期人类滋养细胞中赖氨酸特异性去甲基酶1介导的PHLDA1基因转录表观遗传抑制的支架[22]。另一项研究表明,PHLDA1基因是miR-101的直接靶基因[23]。虽然miR-101 mimics会显著抑制PHLDA1,但circ_0027599/miR-101抑制了miR-101,从而使PHLDA1的表达恢复[23]。Wang等[23]报道了可以通过circ_0027599/miR-101调控PHLDA1,从而抑制胃癌的生存和转移。虽然lncRNA SNHGR1抑制miR-194(PHLDA1阻遏物),但会增加胶质瘤中PHLDA1的表达[24]。还需要进一步的研究来确定非编码RNA调控PHLDA1表达及其在代谢性疾病和癌症中的结果的普遍性。

4. 蛋白质结构

全长hPHLDA1信使RNA(mRNA)转录物由1955个核苷酸组成,包含两个可能的起始序列[17,25]。有证据表明,第二个内部起始序列是编码较短的44 kDa hPHLDA1蛋白的主要翻译起始位点[20,25]。hPHLDA1蛋白由260个氨基酸组成,其中PHLDA1的N端的一半包含该蛋白的结构性PHLD区。它类似于一个独特的分裂PHLD,其中7个 β 折叠和一个 α 螺旋被15个氨基酸的多聚谷氨酰胺(poly Q)重复中断在第三和第四个 β 折叠之间[图1(a)、(b)] [26]。PHLD区后接富含脯氨酸-谷氨酰胺(PQ)重复序列区和C端富含脯氨酸-组氨酸(PH)重复序列[图1(a)、(b)] [17]。mPHLDA1蛋白包含261个氨基酸,与hPHLDA1一样具有89.4%的序列保守性[图1(c)]。据报道,富含PQ/PH蛋白的表达参与了神经元的转录调控和细胞凋亡[25]。研究表明,果蝇中具有富含PQ/PH重复序列的蛋白质具有核苷酸结合能力,这表明PHLDA1可能也具有转录活性,目前尚在研究[27]。此外,发现与全长hPHLDA1相比,hPHLDA1富含PQ/PH区的过表达是细胞毒性的一大诱因[28]。相反,在人胚肾细胞(HEK293)和小鼠胚胎成纤维细胞(MEFs)中,PHLDA1的PHLD与热休克蛋白相互作用以防止细胞死亡[28]。脯氨酸-谷氨酰胺区可能有几种功能不同的PHLDA1异构体。据推测,脯氨酸-谷氨酰胺区的存在导致基因组不稳定,从而随着蛋白长度的改变,蛋白功能发生改变,正如多种poly Q蛋白的观察结果[29]。脯氨酸-谷氨酰胺区的存在强调了在检查PHLDA1在癌症和其他代谢性疾病中的表达时,需要准确报告PHLDA1长度。可以通过设计功能分析来识别该蛋白的特异性片段,以研究PHLDA1的不同异构体长度。深入研究PHLDA1基因的各种异构体



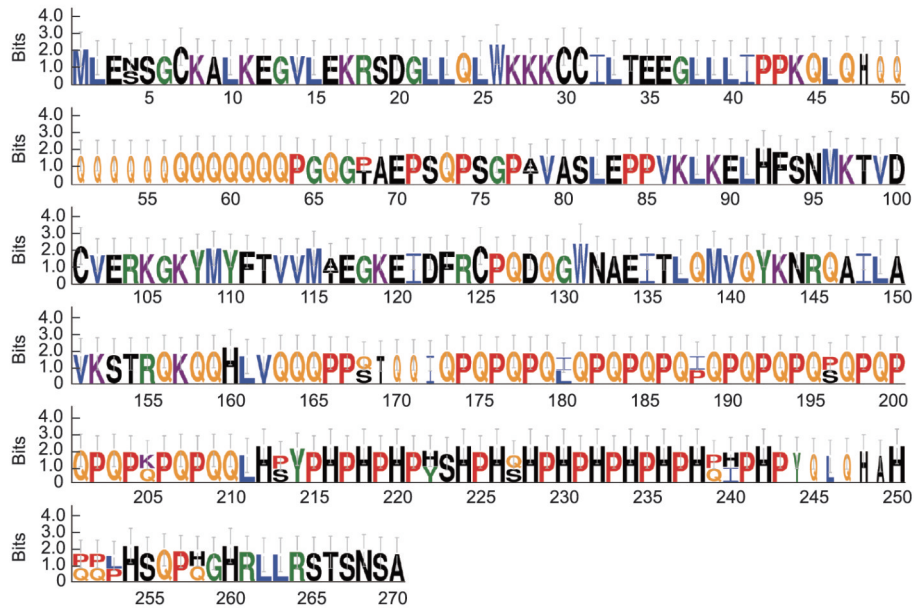
(a)

```

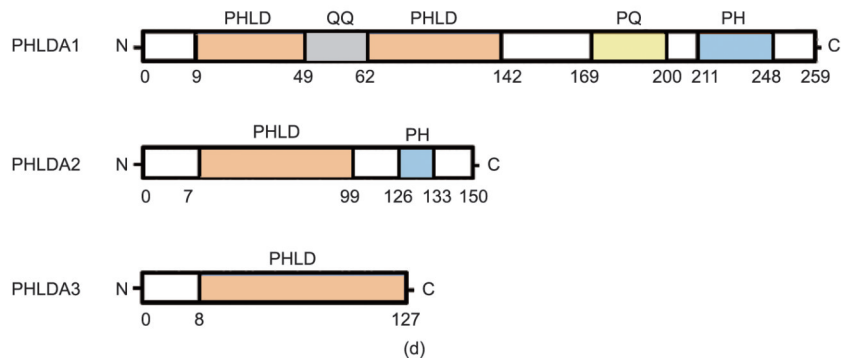
1  MLESSGCKAL  KEGVLEKRS D  GLLQLWKKKC  LILTEEGLLL  IPPKQLQHQQ  QQQQQQQQQ
61  QQQPGQGPQE  PSQPSGPAVA  SLEPPVKLKE  LHFSNMKTVD  CVERKGYMY  FTVVMAEGKE
121 IDFRCPQDQG  WNAEITLQMV  QYKNRQAILA  VKSTRQKQQH  LVQQQPPSQP  QPQPQLQPQP
181 QPQPQPQPQP  QSQPQPQPQP  KPQPQLHPY  PPHPHPHSH  PSHPHPHPH  PPHPQIPHPH
241 PQPHSQPHGH  RLLRSTNSA

```

(b)



(c)



(d)

图1. PHLDA1氨基酸序列及其与家族成员PHLDA2和PHLDA3的比较。(a) hPHLDA1蛋白示意图。hPHLDA1由260个氨基酸组成，N端PHLD（橘黄色）横跨133个氨基酸。PHLDA1包含三个另外的重要区域：富谷氨酰胺连接肽（poly Q）（灰色）、富脯氨酸-谷氨酰胺（PQ）重复序列（黄色）和C端富脯氨酸-组氨酸（PH）区（蓝色）。(b) hPHLDA1的氨基酸编码序列，相应区域有下划线。(c) 使用WebLogo 3.4和Clustal多序列比对生成的PHLDA1人类同源物和小鼠同源物之间的序列显示相似性。这堆字母代表序列中的每个位置。每堆字母的总高度表明该位置的序列保守性（以位为单位），而字母的高度反映了该位置对应氨基酸的相对频率。(d) PHLDA家族成员。

和突变可以理清其促凋亡和抗凋亡作用的差异。

经典的普列克底物蛋白同源结构域被认为具有将蛋白质靶向到含有磷脂酰肌醇磷酸 (PIP) 的膜双分子层并促进蛋白质-蛋白质相互作用的能力[26,30]。普列克底物蛋白同源结构域通常有两个正交的 β 折叠结构,每个 β 折叠结构由四个 β 链、三个可变环和一个C端 α 螺旋组成,无论主氨基酸序列是否发生变化[30]。虽然在PHLDA1中发现了分裂的普列克底物蛋白同源结构域,但多项生化研究已经确定,具有分裂普列克底物蛋白同源结构域的蛋白质保留了经典普列克底物蛋白同源结构域的构象[31–33]。1999年,基于PHLDA1与PHLDA2 (IPL/Tssc3)和PHLDA3 (Tih1)的预测结构模体和共有序列一致性超过50%,它们均被列为普列克底物蛋白同源性相关的新家族成员[图1(d)] [18]。虽然相较PHLDA2和PHLDA3家族成员,对PHLDA1的研究较少,但最近对PHLDA家族成员之间的功能作用进行了比较[34]。在过去的十年中,得出的一个普遍结论是成员之间的功能冗余,特别是涉及p53和Akt丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶1 (AKT)通路。此外,PHLDA1和PHLDA3都是p53的直接靶点,尚未证明PHLDA2是p53的直接靶点[35–36]。也证明了PHLDA1和PHLDA3通过PHLD与膜磷脂酰肌醇磷酸结合的能力,这是维持细胞骨架组织的重要相互作用[35,37–38]。

到目前为止,PHLDA1的晶体结构尚未解析,其结构信息主要基于序列预测。使用Phyre2蛋白折叠识别服务器将PHLDA1的PHLD与信号蛋白[磷脂酰肌醇3激酶 (PI3K) 增强子 (PIKE)]的分裂普列克底物蛋白同源结构域联系起来,置信度为96.6% (图2) [39]。PIKE是一种用于磷酸肌醇3激酶信号转导的完整Rho鸟苷三磷酸酶 (GTPase),能够通过其分裂普列克底物蛋白同源结构域与磷酸肌醇3激酶结合[40]。PIKE有几种异构体,包括PIKE-L、PIKE-A和PIKE-S;然而,已知只有PIKE-L和PIKE-S主要位于细胞核[40]。此外,对PIKE-L的分裂普列克底物蛋白同源结构域进行生化分析,发现有一个功能性核定位序列模体[41]。相反,PIKE-A的序列分析发现了一个截断的核定位信号,且其只位于细胞质中[41]。鉴于PIKE与PHLDA1具有高度的序列同源性,可以利用PIKE来模拟和预测PHLDA1中PHLD的功能作用。

5. 组织表达和细胞定位

基础PHLDA1 mRNA和蛋白质表达已经在大量哺乳动物组织中得到证实。人体组织样本的Northern印迹分析显示,PHLDA1 mRNA在肺和胰腺中高表达,在大脑、

心脏、胎盘、肝脏和肾脏中中等表达[42–44]。据报道,mPHLDA1蛋白在小鼠肺和肝脏组织中高表达,在胸腺和脂肪组织中中等表达[45]。

癌症中PHLDA1的表达改变已被广泛研究[46]。在大多数癌症中,PHLDA1的表达降低;但在结直肠癌和骨肉瘤病例中并非如此[34,46]。Chiu等[47]发现PHLDA1在结直肠癌中高表达,这与其他癌症中的PHLDA1表达情况正相反。PHLDA1在整个肠道隐窝基底的细胞中正常表达[48]。然而,相较于正常肠上皮细胞,小鼠和人类结直肠癌肿瘤过度表达PHLDA1 mRNA [49]。通过小肠和大肠原发性腺瘤和癌瘤的免疫组化 (IHC) 染色对这些结果进行了进一步验证[48]。癌细胞系中PHLDA1表达降低表明化学抗性和对细胞死亡的不同易感性,这将在本文中进一步讨论[50]。

PHLDA1在人体组织中的亚细胞定位差异很大,可能会影响该蛋白的功能。在人脐带静脉内皮细胞 (HUVECs) 中,PHLDA1定位于细胞外周,在同型半胱氨酸治疗后核周定位增加[42]。此外,PHLDA1的核周定位与同型半胱氨酸诱导细胞死亡增加相关[42]。PHLDA1的定位和功能因细胞类型而异。在转移性黑色素瘤中观察到PHLDA1的强细胞质染色,这会导致抗凋亡和生长失调[51]。同样,PHLDA1的内源性表达和强迫表达主要在T细胞的细胞质和核仁中,并且会导致蛋白质合成受抑制[52]。大量研究表明,PHLDA1定位可能与多种组织和细胞依赖性功能作用有关。

6. PHLDA1及其在内质网应激和细胞存活中的作用

PHLDA1基因的表达与其他经典内质网应激反应基因的表达相似[53–54]。在使用大量内质网应激诱导剂 (包括毒胡萝卜素、衣霉素、法尼醇、二硫苏糖醇和环孢菌素) 后,PHLDA1的表达水平显著上调,而使用减弱内质网应激的药物,如salubrinal和1,2-双(邻氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸 (BAPTA),则会降低PHLDA1的表达 (图3) [42,55–56]。此外,之前的报道表明,PHLDA1是蛋白毒性应激下热休克因子1 (HSF-1) 的诱导靶点[28]。研究表明,HSF-1直接与mPHLDA1的N端PHLD结合,并显著减弱mPHLDA1的凋亡功能[28]。

使用同型半胱氨酸诱导的模型来表征PHLDA1和ER应激之间的关联[42]。同型半胱氨酸处理增加PHLDA1表达,并导致培养的内皮细胞中脱离诱导的细胞凋亡或失巢

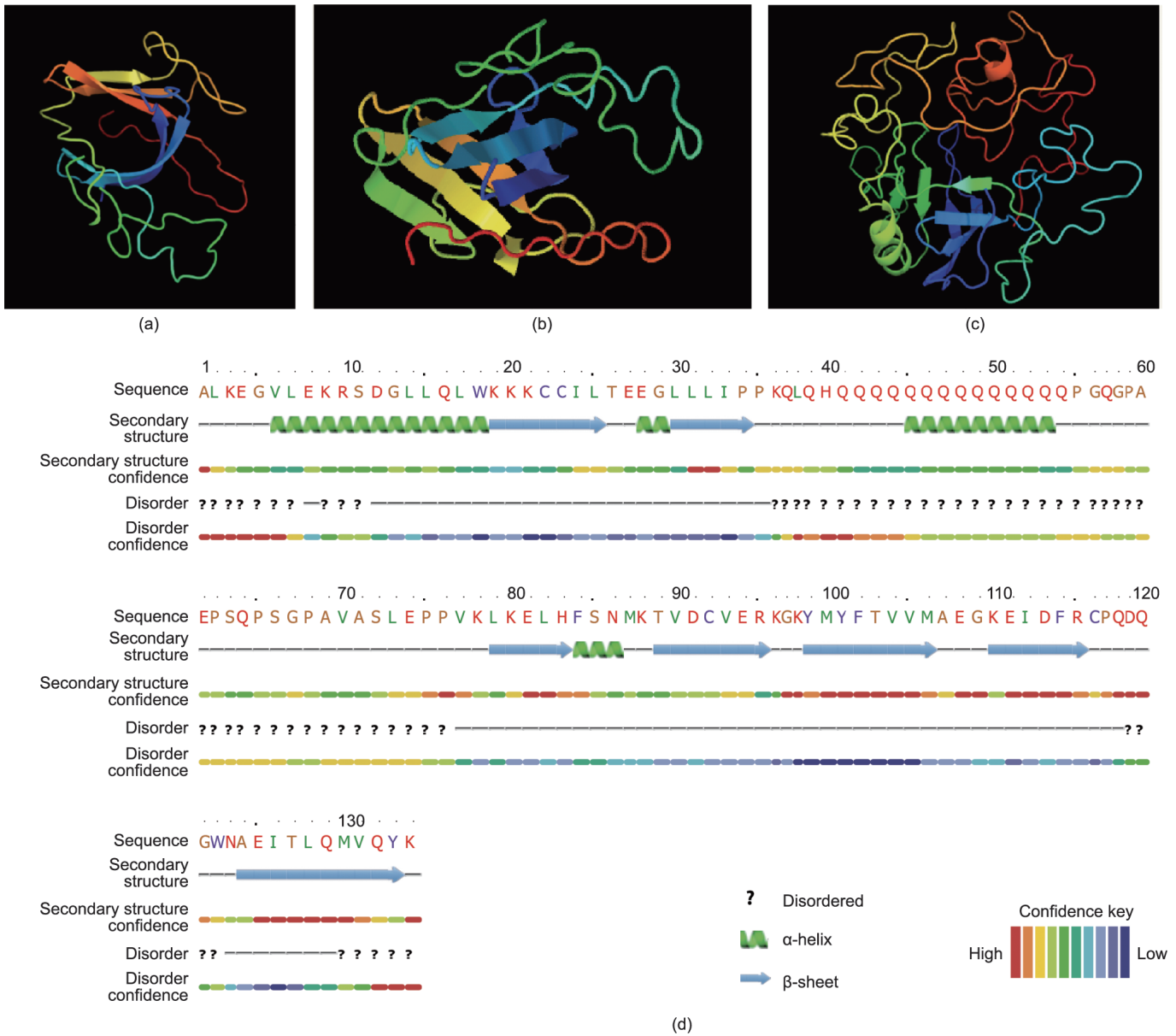


图2. 使用Phyre2的PHLDA1蛋白折叠预测模型(置信区间用颜色刻度表示)。无序区域用“?”符号表示, α 螺旋结构用绿色螺旋表示, β 折叠结构用蓝色箭头表示。(a)、(b)利用PIKE的分裂脯氨酸-组氨酸区域和Phyre2蛋白折叠识别服务器提供的PHLDA1中PHLD的三维(3D)模型。hPHLDA1残基9~141的查询匹配86%的序列, 置信度为96.9%。显示了模型的两个不同视图。(c)使用Phyre2预测的全长PHLDA1的三维模型大面积无序区域松散地围绕着结构化的 β 折叠核心。(d)来自Phyre2的PHLDA1中PHLD的二级结构和无序预测结果。PHLD中可见7个 β 折叠结构, 在第二和第三个 α 螺旋结构之间有一个大的N端 α 螺旋和二级 α 螺旋, 破坏了经典普列克底物蛋白同源结构域的7个 β 折叠结构[39]。

凋亡[42]。小鼠胚胎成纤维细胞使用衣霉素(*N*-糖基化抑制剂)和内质网应激诱导剂治疗后, 在mRNA和蛋白质水平上PHLDA1的表达提高; 然而, 在这个模型中并没有将细胞死亡作为结果进行研究[42]。

充分证实在未折叠蛋白反应的各个分支中PERK通路可以促进真核翻译起始因子2 α (eIF2 α)的磷酸化作用, 从而减弱新生蛋白合成[57–62]。研究发现eIF2 α 磷酸化位点的突变对于mPHLDA1表达至关重要, 进而证明在小鼠胚胎成纤维细胞中eIF2 α 的磷酸化作用可以促进mPHL-

DA1的表达[42,63]。为了支持这些研究结果, 使用salubrinal(选择性eIF2 α 抑制剂)18h后, 在HK-2肾近端小管细胞系中的hPHLDA1的表达显著下调[55]。此外, 由于研究证明细胞质PHLDA1定位可以强烈抑制293T细胞中的蛋白质翻译, 因此hPHLDA1是PERK通路中的重要因子[52]。研究也证明, PHLDA1的过表达与PERK通路的下游效应子CHOP(有效的细胞死亡诱导物)同时定位[64]。PHLDA1的缺失通过减弱CHOP介导损伤来保护小鼠免受衣霉素诱导肾小管损伤[64]。累积的证据进一步证

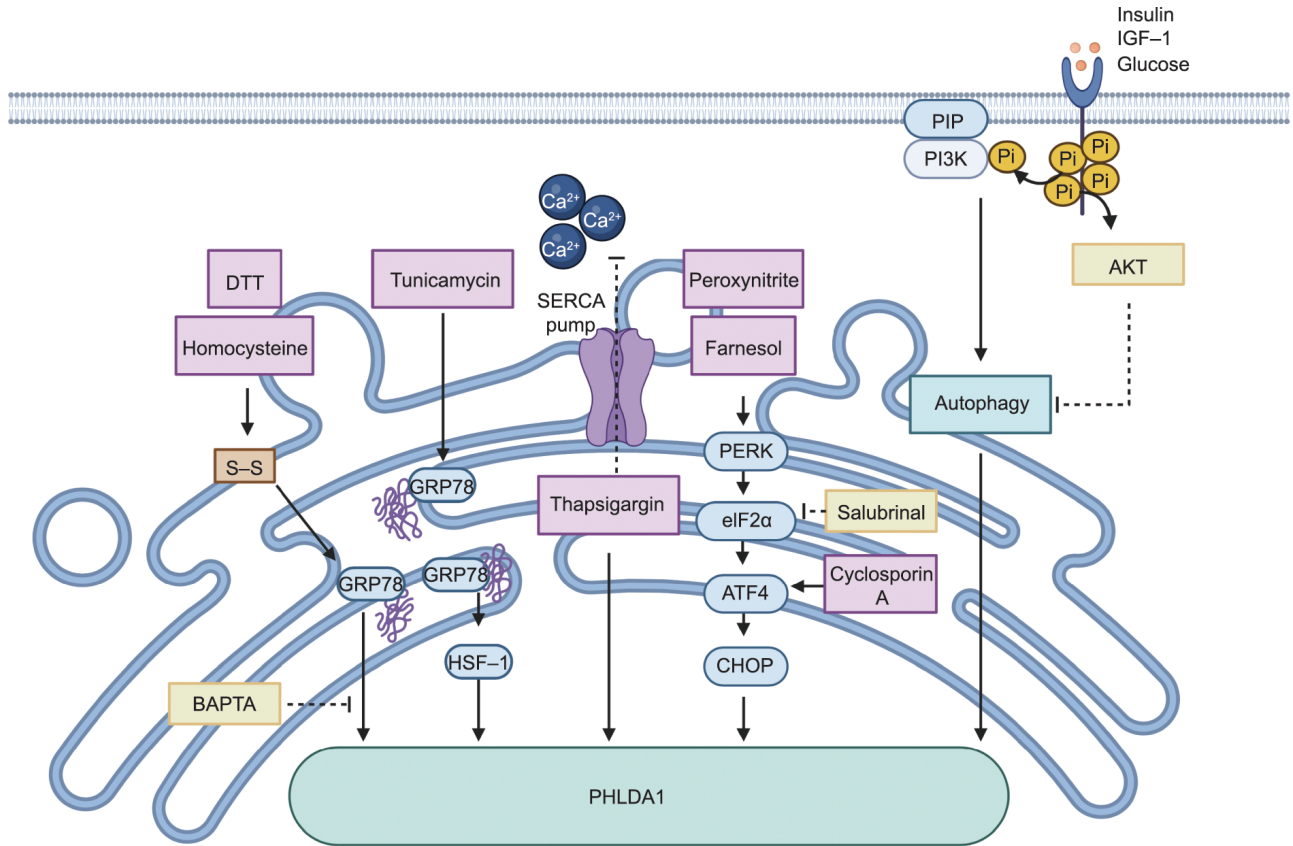


图3. 内质网应激和自噬药物激活 PHLDA1。尖箭头表示激活，而不连续平直线表示抑制。内质网应激通常由错误折叠蛋白的积累激活。内质网应激诱导剂二硫苏糖醇（DTT）和同型半胱氨酸可破坏二硫键（表示为 S-S），导致蛋白适应不良。其他内质网应激诱导剂（如衣霉素）可通过抑制 N-糖基化促使错误折叠蛋白聚集。内质网应激也可以通过抑制细胞内钙转运激活：毒胡萝卜素抑制肌浆内质网钙腺苷三磷酸酶（SERCA）泵，从而直接消耗内质网钙，导致 PHLDA1 的内质网应激激活。未折叠蛋白反应的 PERK 通路是一种代偿性反应，旨在恢复蛋白质内稳态和调节细胞死亡通路。PERK 通路可通过过氧亚硝酸盐、法尼醇和环孢菌素 A 激活。在 PERK 通路下游，真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α) 是细胞死亡的重要调节因子，可用 salubrinal 减弱。研究已经证明，抑制 eIF2 α 可以降低 PHLDA1 的表达。高水平的葡萄糖、胰岛素和胰岛素生长因子 1 (IGF-1) 激活受体酪氨酸激酶，进而刺激 PI3K 和 PIP 结合。已经证明 PHLDA1 的表达是由 PI3K 和雷帕霉素诱导自噬引起，而这种刺激可能被 AKT 活性抑制。HSF-1：热休克因子 1；CHOP：C/EBP 同源蛋白，一种有效的细胞死亡诱导物；Pi：磷酸盐。

明了 PHLDA1 作为 PERK 激活的下游效应子与 eIF2 α 和 CHOP 一起调节蛋白质翻译和细胞死亡途径的潜在作用。

尽管大量研究已经证明 PHLDA1 与细胞凋亡之间存在关系，但这种关系的性质在不同的组织和物种中变化极大。通常，PHLDA1 的上调不促凋亡，表明该蛋白具有相对复杂的内稳态作用。最初认为 PHLDA1 的促凋亡特性发生在第一凋亡信号介导的凋亡过程中[17]。PHLDA1 的上调与激活诱导细胞死亡（AICD）相关，最初在 T 细胞受体抗 AICD T 细胞杂交瘤群的研究中证明了这一点[17]。研究发现这一独特的细胞群缺乏 PHLDA1 的表达，表明该蛋白存在于 T 细胞受体介导的细胞死亡通路中，并促使其分类为促凋亡蛋白[17]。后来，*mPHLDA1* 缺乏 (*mPHLDA1*^{-/-}) 小鼠的体内研究发现，*mPHLDA1* 是第一凋亡信号介导 T 细胞凋亡的非必需成分[65]。在缺少 *mPHLDA1* 的情况下，未观察到 T 细胞 AICD、免疫系统、

生理机能或整体器官发育的变化[65]。另一项研究进一步证实了 *hPHLDA1* 表达与人 T 细胞 AICD 无关[66]。上述相互矛盾的研究结果表明，在最初的体外研究和体内研究之间，*mPHLDA1* 在 AICD 中的作用存在差异。

早期研究表明，在各种细胞系（如精母细胞、小鼠胚胎成纤维细胞、HeLa 细胞和海马细胞）中 PHLDA1 表达与细胞死亡呈正相关[25,28,67]。值得注意的是，PHLDA1 的短暂表达降低了 H19-7 海马细胞的细胞存活率，这为 PHLDA1 可能介导凋亡过程提供了证据。在另一项实验中，H19-7 海马细胞微量注射 PHLDA1 特异性中和抗体，提高了总体细胞存活率和增殖[25]。证明黑色素瘤来源细胞系中的 PHLDA1 表达与细胞生长和菌落形成的减少呈正相关，剪切半胱天冬酶 9 和剪切多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶活性的增加也证明了这一点[51]。同样，PHLDA1 转染成 HEK293 和 Mel-Rif 细胞，诱导半胱天冬酶 9 依赖性凋

亡，从而抑制生长和菌落形成[51]。

与此相反，通过胰岛素生长因子1 (IGF-1) 依赖性机制证明了成纤维细胞中 mPHLDA1 的抗凋亡作用。靶向 mPHLDA1 的小干扰 RNA (siRNA) 削弱了 IGF-1 从血清饥饿诱导凋亡中拯救成纤维细胞的能力[68]。研究证明，在胚胎成纤维细胞中 mPHLDA1 可以抵抗活性氧相关的应激[69]。此外，在 Ca9-22 细胞中通过 siRNA 敲低 *PHLDA1*，激活的半胱天冬酶3表达增加，表明 PHLDA1 具有抑制凋亡的作用[70]。在条件性尤文肉瘤 (*EWS*) /Friend 白血病病毒整合位点1 (*FLII*) 基因敲入胚胎的 MEF 细胞中，*EWS/FLII* 的表达导致细胞凋亡[71]。然而，研究证明，在这些细胞中，*PHLDA1* 通过直接结合 *PHLDA1* 启动子而被 *EWS/FLII* 直接抑制[72]。表 1 [17,25,28,51,67–70,72–75]根据细胞类型和状态总结了 PHLDA1 的促凋亡和抗凋亡功能。

与凋亡相对应的是自噬途径，这是一个分解代谢过程，可以将降解的细胞内容物作为可再生能源循环利用[76]。许多疾病中的自噬失调已被广泛研究[77]。雷帕霉素是一种众所周知的自噬激活剂和雷帕霉素 (mTOR) 抑制剂的机制性靶标，经证明可以上调 T-47 乳腺细胞中 PHLDA1 的表达。在该模型中，沉默 *PHLDA1* 基因显著减少了雷帕霉素诱导的自噬和凋亡[73]。最近，神经母细胞瘤细胞中 *PHLDA1* 基因的沉默导致自噬转录和蛋白表达显著减少，进一步证实了 PHLDA1 作为自噬诱导物的作用

[74]。hPHLDA1 介导自噬调控的证据有限，需要进一步的研究。总之，目前的证据表明 PHLDA1 可以促进自噬。将 PHLDA1 严格划分为促凋亡蛋白或抗凋亡蛋白，未能涵盖其其他生理作用，如其与分化和调节过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 表达的新联系。

7. PHLDA1 通过 PPAR γ 负抑制介导脂肪细胞分化和白色脂肪组织扩张

代谢性疾病可以表现为过量营养摄入导致白色脂肪组织通过脂肪细胞增生和肥大的病理性扩张[45,78]。以前的研究发现，PHLDA1 与脂肪细胞中肥胖的转录组特征呈负相关[79]。此外，12 周龄肥胖大鼠下丘脑中神经肽 Y-Y5 受体的抑制导致脂肪组织中 PHLDA1 的上调，并由于腹膜后和附睾白色脂肪组织的减少而导致体重下降，这支持了脂肪组织中 PHLDA1 的表达可以防止肥胖的观点[80]。

在脂肪组织中，PHLDA1 还参与前体脂肪细胞分化的新调节作用[45]。之前的一项研究发现，在 3T3-L1 前体脂肪细胞微阵列分化早期，*mPHLDA1* 表达上调[81]。在 3T3-L1 分化过程中，*mPHLDA1* 的 mRNA 表达在分化 2 h 内增加，但在第 8 个小时急剧减少[45,81]。同时，mPHLDA1 蛋白表达在分化后 4 天一直升高，并在第 14 天减少[45]。*PHLDA1* 转录物和蛋白水平的升高表明其在早期前脂肪细胞调节中起关键作用。为了支持这一假设，在脂肪

表1 PHLDA1 表达与多种细胞的细胞存活有关

Cell type	<i>PHLDA1</i> expression level in disease	Effect on cell survival
T-cell hybridoma	↓	↓ Apoptosis [17]
H19-7 hippocampal cells	Neutralizing antibody ↓	↓ Apoptosis, ↑ cell survival and proliferation [25]
Spermatocytes	↓	↓ Apoptosis [67]
MEFs	HSP suppression ↓	↓ Apoptosis [28]
Ca9-22	Silencing ↓	↑ Apoptosis [70]
MEF-EWS/FLI1	↓	↑ Apoptosis [72]
Oral cancer cell lines and oral keratinocytes	Silencing ↓	↑ Apoptosis [70]
IMR-32 neuroblastoma cells	Silencing ↓	↓ Autophagy [74]
HeLa	Forced overexpression ↑	↑ Apoptosis [28]
HeLa-Hsp40	Forced overexpression ↑	↓ Apoptosis [28]
Melanoma cell lines	↑	↓ Cell growth and colony formation, ↓ apoptosis [51]
T47D breast cancer cells	Rapamycin-induced ↑	↑ Apoptosis and autophagy [73]
NIH-3T3 (NWTb3)	IGF-1-induced ↑	↓ Apoptosis [68]
MEFs	↑	↓ Reactive oxygen species [69]
SKBR3 breast cancer cells	Forced overexpression ↑	↓ Cell growth and colony formation [75]
HEK293	Forced overexpression ↑	↓ Cell growth and colony formation, ↑ apoptosis [51]
Mel-Rif	Forced overexpression ↑	↓ Cell growth and colony formation, ↑ apoptosis [51]

HSP: heat shock protein.

形成过程中 *mPHLDA1*^{-/-} 小鼠的脂质积聚和合成增加，导致附睾白色脂肪组织显著扩大，尽管它们的食物摄入量与野生型对照小鼠差不多[45]。在脂肪形成过程中，*mPHLDA1* 与 *PPAR* γ 呈负相关，*mPHLDA1* 下调与 *PPAR* γ 上调相关，脂肪细胞扩增增加[45]。此外，*mPHLDA1* 的基因敲除和 siRNA 沉默均导致前脂肪细胞分化过程中 *PPAR* γ 激活加快，这表明 *PHLDA1* 可能能够通过抑制 *PPAR* γ 转录活性来调节脂肪组织扩张[45]。此后，*mPHLDA1* 作为一种新型 *PPAR* γ 负调节因子出现。被动表达 *mPHLDA1* 导致随后的 *PPAR* γ 结合，使 3T3-L1 脂肪细胞中 *PPAR* γ 驱动的 *aP2* 转录激活和 *PPAR* γ -类视黄醇 X 受体 α (*RXR* α) 异二聚体受到抑制[82]。*PHLDA1* 表达仍然是健康前脂肪细胞分化和调节的关键组成部分，而在分化的脂肪细胞中 *PHLDA1* 水平较低，表明 *PHLDA1* 的下调可能与过度脂肪扩张有关，正如 *mPHLDA1*^{-/-} 小鼠的观察结果[45]。

8. *PHLDA1* 水平下降与肝脏脂肪变性和损伤有关

肥胖的特征是代谢稳态的慢性功能障碍，通常是出现其他代谢性疾病的前兆，如葡萄糖耐受不良、胰岛素抵抗，以及一般沉积在肝脏和脂肪库的全系统脂质积聚增加。最常见的肥胖合并症包括 2 型糖尿病、心血管疾病和非酒精性脂肪性肝病[83–84]。研究发现，各种肥胖模式，包括高脂肪饮食、四氯化碳和瘦素缺乏 (*ob/ob*)，都会导致肝脏 *PHLDA1* 蛋白表达的直接缺失[45]。更具体地说，在 *ob/ob* 小鼠中肝脏 *mPHLDA1* mRNA 和蛋白质的有害消耗与 DNA 高甲基化有关[85]。这项研究还发现，小发夹 RNA (shRNA) 体内敲除 *mPHLDA1* 可以增加肝脏脂滴的大小[85]。这些研究结果进一步证实了最初在 *mPHLDA1*^{-/-} 小鼠中观察到的表型，即全身 *mPHLDA1* 表达的缺失通过激活固醇调节元件结合蛋白 1 (SREBP1) 目的基因表达导致肝脏甘油三酯显著增加[45]。根据这些研究结果，与正常健康对照小鼠相比，低 *PHLDA1* 水平最近被视为非酒精性脂肪性肝炎 (NASH) 的标志[86]。相反，*PHLDA1* 在维持肝脏稳态中的作用与其家族成员 *PHLDA3* 的作用截然相反，*PHLDA3* 通过促进内质网应激的 IRE1-X 盒结合蛋白 1 (XBP1) 轴而使肝损伤加快[87]。根据这些结果，可能出现 *PHLDA1* 和 *PHLDA3* 在其对肝损伤的反应中具有相反甚至可能拮抗的作用；然而，这种直接的相互作用还有待证明。

作为 *PHLDA1* 在肥胖和肝脏代谢中的稳态作用的延

伸，*PHLDA1* 缺失导致小鼠胰岛素抵抗和葡萄糖耐受不良[45]。迄今为止，尚未对糖尿病患者的 *PHLDA1* 表达进行检测。然而，最近的一份报告发现在 *PHLDA1* 调控序列上有胰岛素反应性磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 结合位点，因此将 *mPHLDA1* 归类为胰岛素反应性基因[88]。据报道，在癌症中 *PHLDA1* 对 AKT 信号传递有抑制作用。在肥胖和糖尿病的条件下研究这些相互作用很重要。越来越多的证据证实 *PHLDA1* 作为脂肪组织质量、葡萄糖稳态和肝脏代谢的必要调节因子的功能。

9. *PHLDA1* 在动脉硬化、炎症和血管钙化中的作用

动脉粥样硬化是一种进行性疾病，其特征是由脂质、钙沉积物和各种纤维成分组成的斑块积聚，导致动脉狭窄[89]。免疫细胞和慢性炎症在动脉硬化进展的整个过程中也有重要作用。单核细胞通过受损的内皮细胞壁从血流渗入内膜，随后分化为巨噬细胞。这些巨噬细胞的作用主要是通过吞噬作用代谢脂质，将其转化为泡沫细胞[90]。这些巨噬细胞中低密度脂蛋白 (LDL) 的过饱和及长时间的内质网应激导致凋亡性细胞死亡，促使坏死核心的形成[91]。促炎细胞因子和趋化因子的释放，以及血管平滑肌细胞 (VSMC) 的迁移和细胞外基质的分泌，有助于形成包裹粥样斑块的纤维帽[92]。血管钙化的存在是晚期动脉硬化的重要指标，即血管壁上形成羟基磷灰石结晶，降低动脉弹性，改变动脉硬化斑块的稳定性[93–94]。动脉硬化病变的纤维帽中存在的微钙化引起局部应力，导致纤维帽破裂[95]。与此相反，较大的钙沉积物可提供适度的斑块稳定性，并通过承担一部分机械负荷来减少纤维帽上的应力[96]。

新的证据表明 *PHLDA1* 在心血管疾病中起着至关重要的作用 (图 4)。心血管疾病病例对照研究发现，*PHLDA1* 基因突变与心血管疾病和心肌梗死显著相关[54]。在 *mPHLDA1* 和载脂蛋白 E (*ApoE*) 缺陷 (*mPHLDA1*^{-/-}/*ApoE*^{-/-}) 小鼠中，下调 *PHLDA1* 可通过调节凋亡、胆固醇外溢和过氧化物氧化还原蛋白 1 表达来防止动脉粥样硬化病变进展[54]。研究发现，相同背景下 *ApoE*^{-/-} 缺陷小鼠 *PHLDA1* 基因缺失可通过增强细胞对氧化应激和内质网应激的保护作用，防止动脉粥样硬化病变的生长和坏死区域的发展[54]。此外，观察到 *mPHLDA1*^{-/-}/*ApoE*^{-/-} 小鼠病变中 *PPAR* γ 依赖性反向胆固醇转运增加 (图 4) [54]。*mPHLDA1*^{-/-}/*ApoE*^{-/-} 小鼠的主动脉根有较小的动脉硬化病

变, 与年龄匹配的 *ApoE*^{-/-} 对照小鼠相比, PPAR γ 的表达和核定位显著增加[54]。研究发现, PPAR γ 在腹膜巨噬细胞的胆固醇逆向转运中发挥作用, 特别是动脉硬化病变的巨噬细胞[97]。与野生型细胞相比, 培养的 *mPHLDA1*^{-/-} 腹腔巨噬细胞经低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 处理 48 h 后油红 O 染色显著减少, 表明潜在的胆固醇外排机制增强[54]。根据这些观察结果, 与野生型腹膜细胞相比, 分离的 *mPHLDA1*^{-/-} 腹腔巨噬细胞经 PPAR γ 拮抗剂 GW9662 处理后有相似的总胆固醇水平[54]。综上所述, 这些研究结果表明 *mPHLDA1* 在胆固醇的促进和转运中也可能发挥作用。

研究表明, 在人血管内皮细胞中 *hPHLDA1* 的过表达可以导致脱落介导程序性细胞死亡或失巢凋亡[42]。同时, 也有证据表明, *mPHLDA1* 在高同型半胱氨酸血症条件下的动脉硬化进展中起支持作用。饲喂高同型半胱氨酸饮食 4 周的 *ApoE*^{-/-} 小鼠的主动脉根在动脉硬化病变的坏死区域内 *mPHLDA1* 表达显著[54]。总的来说, 这些研究结果表明 *mPHLDA1* 表达与动脉硬化的发生/进展密切相关, 这通过上调细胞死亡和巨噬泡沫细胞的形成来实现。

研究表明, 脂多糖 (LPS) 处理小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞中 *mPHLDA1* 表达升高[42]。同样, 从 *mPHLDA1*^{-/-} 小鼠分离的腹腔巨噬细胞的脂多糖诱导巨噬细胞趋化蛋白 1 水平明显低于野生型对照细胞[98]。此外, 在

肺挫伤小鼠模型中, 肺挫伤是急性肺损伤和呼吸窘迫综合征的危险因素, 使用 siRNA 下调 *mPHLDA1* 减少了中性粒细胞浸润和其他炎症因子, 如白细胞介素 (IL) -1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF) - α 、C-C 模体配体 (CCL) -2、CCL-12 和 toll 样受体 (TLR) -2 [99]。

研究表明, 人和小鼠血管平滑肌细胞缺乏 *PHLDA1* 时, 无机磷酸盐 (Pi) 介导的血管壁内侧层羟基磷灰石矿物质沉积减少。机制上, *PHLDA1* 表达缺失使血管平滑肌细胞中发现的主要 Pi 转运蛋白 Pit-1 的表达减少, 从而细胞对羟基磷灰石结晶主要成分 Pi 的摄取减少[100]。这项研究还发现, 在维生素 D₃ 过量模型中 *mPHLDA1*^{-/-} 小鼠可以免受内侧血管钙化的影响。矿物质定量和茜素红染色显示, 与野生型对照小鼠比, *mPHLDA1*^{-/-} 小鼠主动脉中的矿物质沉积减少。原发性 *mPHLDA1*^{-/-} 血管平滑肌细胞中血管钙化的已知驱动因子的表达降低, 如碱性磷酸酶 (ALP)、Osterix (OSX)、*runt* 相关转录因子 2 (RUNX2) 和肌节同源盒基因 2 (MSX2) [100]。总的来说, 这些研究结果表明 *PHLDA1* 在 Pi 介导的血管内侧钙化的调节中起着关键作用。

10. 结论

近年来, 研究已经证明 *PHLDA1* 的两个同源物在多

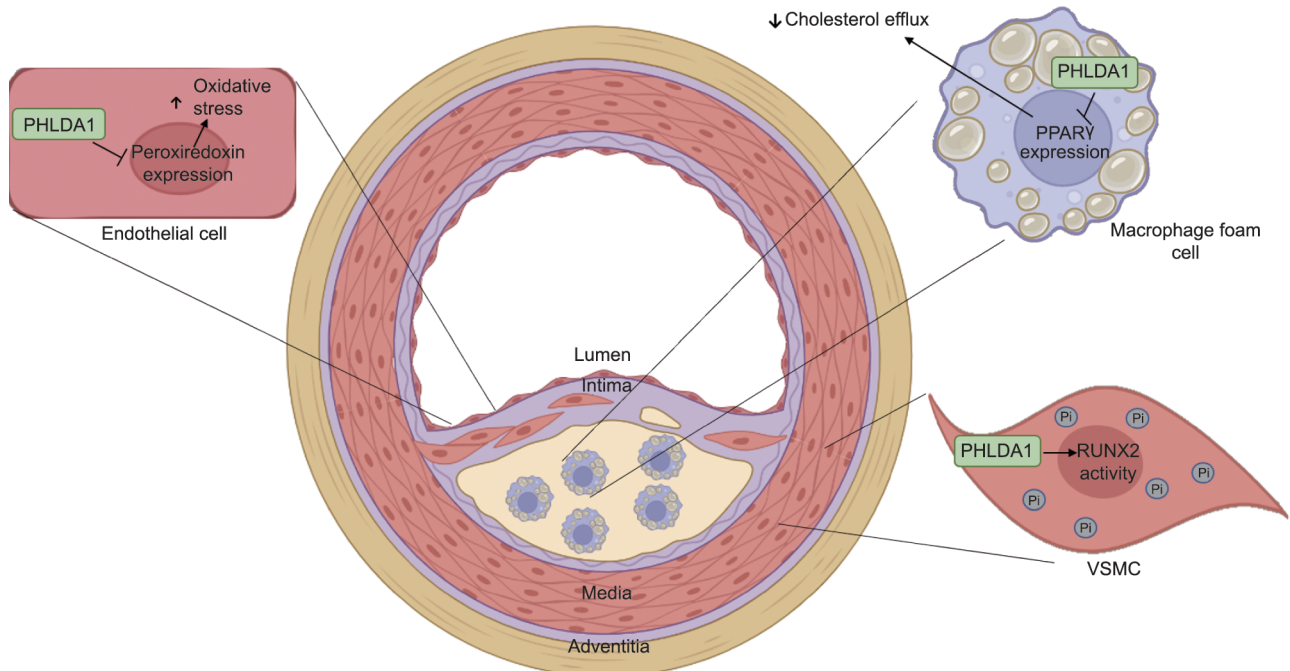


图 4. *PHLDA1* 在动脉硬化病变发展中的作用: 在内皮细胞中, *PHLDA1* 抑制过氧化物氧化蛋白的表达并增强氧化应激——动脉硬化病变形成和发展的已知因素。*PHLDA1* 表达升高也会抑制 PPAR γ 表达, 从而减少胆固醇外排, 增加巨噬泡沫细胞胞内胆固醇积聚。众所周知, 在血管平滑肌细胞中 *PHLDA1* 可以促进 *runt* 相关转录因子 2 (RUNX2) 的转录活性和细胞内 Pi 的积聚, 并有助于血管钙化。

种病理生理条件下发挥关键作用。本文综述的证据表明, *PHLDA1* 具有促凋亡和抗凋亡的作用, 取决于细胞类型和状态。尽管 *PHLDA1* mRNA 及其翻译蛋白都可以通过各种治疗和刺激进行调节, 但这种调节的影响与癌症和脂质紊乱 (包括动脉粥样硬化进展、肥胖症和脂肪性肝病) 有关。尽管 *PHLDA1* 作为 *PPAR γ* 的负调控因子在肥胖症和脂肪性肝病方面是有益的, 但在动脉粥样硬化中却是有害的, 在动脉粥样硬化中, *PPAR γ* 的功能是胆固醇运输所必需的。未来旨在探索 *PHLDA1* 异构体和突变的功能作用的研究可能会揭示特定的治疗靶点。文献还应关注在 *PHLDA1* 表达存在或缺失的情况下, 其他 *PHLDA* 家族成员是否具有代偿作用, 以及这可能如何促进疾病进展。根据这些重要发现, *PHLDA1* 是几种疾病的关键调控因子; 因此, 进一步阐明其作用将有助于开发针对这种未被充分认识含有 *PHLD* 的细胞蛋白的新型治疗方式。

Acknowledgements

This work was supported in part by research grants to Richard C. Austin from the Heart and Stroke Foundation of Ontario (T-6146), the Heart and Stroke Foundation of Canada (G-13- 0003064 and G-15-0009389), and the Canadian Institutes of Health Research (74477). Financial support from St. Joseph's Healthcare Hamilton is acknowledged. Richard C. Austin is a Career Investigator of the Heart and Stroke Foundation of Ontario and holds the Amgen Canada Research Chair in the Division of Nephrology at St. Joseph's Healthcare and McMaster University.

Authors' contribution

Tamana Yousof and Jack Chen generated figures. Tamana Yousof, Jae Hyun Byun, and Jack Chen wrote the manuscript. Tamana Yousof, Jae Hyun Byun, Jack Chen, and Richard C. Austin revised the manuscript.

Compliance with ethics guidelines

Tamana Yousof, Jae Hyun Byun, Jack Chen, and Richard C. Austin declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

References

- [1] Mukherjee A, Morales-Scheihing D, Butler PC, Soto C. Type 2 diabetes as a protein misfolding disease. *Trends Mol Med* 2015;21(7):439–49.
- [2] Kozutsumi Y, Segal M, Normington K, Gething MJ, Sambrook J. The presence of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* 1988;332(6163):462–4.
- [3] Gething MJ, Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 1992;355(6355):33–45.
- [4] Ghemrawi R, Battaglia-Hsu SF, Arnold C. Endoplasmic reticulum stress in metabolic disorders. *Cells* 2018;7(6):63.
- [5] Sozen E, Ozer NK. Impact of high cholesterol and endoplasmic reticulum stress on metabolic diseases: an updated mini-review. *Redox Biol* 2017;12:456–61.
- [6] Cao SS, Luo KL, Shi L. Endoplasmic reticulum stress interacts with inflammation in human diseases. *J Cell Physiol* 2016;231(2):288–94.
- [7] Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol* 2012;197(7):857–67.
- [8] Yazıcı D, Sezer H. Insulin resistance, obesity and lipotoxicity. In: Engin A, editor. *Advances in experimental medicine and biology*. Cham: Springer; 2017. p. 277–304.
- [9] Zhang XQ, Xu CF, Yu CH, Chen WX, Li YM. Role of endoplasmic reticulum stress in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2014;20(7):1768–76.
- [10] Sun RQ, Wang H, Zeng XY, Chan SM, Li SP, Jo E, et al. IRE1 impairs insulin signaling transduction of fructose-fed mice via JNK independent of excess lipid. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852(1):156–65.
- [11] Kuo TF, Tatsukawa H, Matsuura T, Nagatsuma K, Hirose S, Kojima S. Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways. *J Cell Physiol* 2012;227(3):1130–7.
- [12] Kawasaki N, Asada R, Saito A, Kanemoto S, Imaizumi K. Obesity-induced endoplasmic reticulum stress causes chronic inflammation in adipose tissue. *Sci Rep* 2012;2(1):799.
- [13] Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation* 2007;116(11):1226–33.
- [14] Cominacini L, Garbin U, Mozzini C, Stranieri C, Pasini A, Solani E, et al. The atherosclerotic plaque vulnerability: focus on the oxidative and endoplasmic reticulum stress in orchestrating the macrophage apoptosis in the formation of the necrotic core. *Curr Med Chem* 2015;22(13):1565–72.
- [15] Erbay E, Babaei VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, et al. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med* 2009;15(12):1383–91.
- [16] Huang A, Young TL, Dang VT, Shi Y, McAlpine CS, Werstuck GH. 4-phenylbutyrate and valproate treatment attenuates the progression of atherosclerosis and stabilizes existing plaques. *Atherosclerosis* 2017;266:103–12.
- [17] Park CG, Lee SY, Kandala G, Lee SY, Choi Y. A novel gene product that couples TCR signaling to Fas(CD95) expression in activation-induced cell death. *Immunity* 1996;4(6):583–91.
- [18] Frank D, Mendelsohn CL, Ciccone E, Svensson K, Ohlsson R, Tycko B. A novel pleckstrin homology-related gene family defined by *Ipl/Tssc3*, *TDAG51*, and *Tih1*: tissue-specific expression, chromosomal location, and parental imprinting. *Mamm Genome* 1999;10(12):1150–9.
- [19] Kuske MDA, Johnson JP. Assignment of the human *PHLDA1* gene to chromosome 12q15 by radiation hybrid mapping. *Cytogenet Cell Genet* 2000;89(1–2):1.
- [20] Meier-Noorden M, Flindt S, Kalinke U, Hinz T. A CpG-rich bidirectional promoter induces the T-cell death-associated gene 51 and downregulates an inversely oriented transcript during early T-cell activation. *Gene* 2004;338(2):197–207.
- [21] Shi Z, Zhao C, Long W, Ding H, Shen R. Microarray expression profile analysis of long non-coding RNAs in umbilical cord plasma reveals their potential role in gestational diabetes-induced macrosomia. *Cell Physiol Biochem* 2015;36(2):542–54.
- [22] Wu D, Yang N, Xu Y, Wang S, Zhang Y, Sagnelli M, et al. lncRNA HIF1A antisense RNA 2 modulates trophoblast cell invasion and proliferation through upregulating *PHLDA1* expression. *Mol Ther Nucleic Acids* 2019;16:605–15.
- [23] Wang L, Shen J, Jiang Y. Circ_0027599/*PHLDA1* suppresses gastric cancer progression by sponging miR-101-3p. *Cell Biosci* 2018;8(1):58.
- [24] Liu L, Shi Y, Shi J, Wang H, Sheng Y, Jiang Q, et al. The long non-coding RNA SNHG1 promotes glioma progression by competitively binding to miR-194 to regulate *PHLDA1* expression. *Cell Death Dis* 2019;10(6):463.

- [25] Gomes I, Xiong W, Miki T, Rosner MR. A proline- and glutamine-rich protein promotes apoptosis in neuronal cells. *J Neurochem* 1999;73(2):612–22.
- [26] Lemmon MA. Pleckstrin homology domains: two halves make a hole? *Cell* 2005;120(5):574–6.
- [27] Cai J, Lan Y, Appel LF, Weir M. Dissection of the *Drosophila* paired protein: functional requirements for conserved motifs. *Mech Dev* 1994;47(2):139–50.
- [28] Hayashida N, Inouye S, Fujimoto M, Tanaka Y, Izu H, Takaki E, et al. A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. *EMBO J* 2006;25(20):4773–83.
- [29] Totzeck F, Andrade-Navarro MA, Mier P. The protein structure context of polyQ regions. *PLoS One* 2017;12(1):e0170801.
- [30] Lemmon MA, Ferguson KM. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J* 2000;350(Pt 1):1–18.
- [31] Yan J, Wen W, Xu W, Long JF, Adams ME, Froehner SC, et al. Structure of the split PH domain and distinct lipid-binding properties of the PH-PDZ supramodule of a-syntrophin. *EMBO J* 2005;24(23):3985–95.
- [32] Wen W, Liu W, Yan J, Zhang M. Structure basis and unconventional lipid membrane binding properties of the PH-C1 tandem of rho kinases. *J Biol Chem* 2008;283(38):26263–73.
- [33] Walliser C, Retlich M, Harris R, Everett KL, Josephs MB, Vatter P, et al. Rac regulates its effector phospholipase Cc2 through interaction with a split pleckstrin homology domain. *J Biol Chem* 2008;283(44):30351–62.
- [34] Fuselier TT, Lu H. PHLD class proteins: a family of new players in the p53 network. *Int J Mol Sci* 2020;21(10):3543.
- [35] Chen Y, Takikawa M, Tsutsumi S, Yamaguchi Y, Okabe A, Shimada M, et al. PHLDA1, another PHLDA family protein that inhibits Akt. *Cancer Sci* 2018; 109(11):3532–42.
- [36] Kawase T, Ohki R, Shibata T, Tsutsumi S, Kamimura N, Inazawa J, et al. PH domain-only protein PHLDA3 is a p53-regulated repressor of Akt. *Cell* 2009; 136(3):535–50.
- [37] Saxena A, Morozov P, Frank D, Musalo R, Lemmon MA, Skolnik EY, et al. Phosphoinositide binding by the pleckstrin homology domains of Ipl and Tih1. *J Biol Chem* 2002;277(51):49935–44.
- [38] Maffucci T, Falasca M. Specificity in pleckstrin homology (PH) domain membrane targeting: a role for a phosphoinositide-protein co-operative mechanism. *FEBS Lett* 2001;506(3):173–9.
- [39] Kelley LA, Sternberg MJE. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat Protoc* 2009;4(3):363–71.
- [40] Ahn JY, Ye K. PIKE GTPase signaling and function. *Int J Biol Sci* 2005;1(2): 44–50.
- [41] Yan J, Wen W, Chan LN, Zhang M. Split pleckstrin homology domain-mediated cytoplasmic-nuclear localization of PI3-kinase enhancer GTPase. *J Mol Biol* 2008;378(2):425–35.
- [42] Hossain GS, van Thienen JV, Werstuck GH, Zhou J, Sood SK, Dickhout JG, et al. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. *J Biol Chem* 2003;278(32):30317–27.
- [43] Ohyama M, Terunuma A, Tock CL, Radonovich MF, Pise-Masison CA, Hopping SB, et al. Characterization and isolation of stem cell-enriched human hair follicle bulge cells. *J Clin Invest* 2006;116(1):249–60.
- [44] Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol* 2010;28(12): 1248–50.
- [45] Basseri S, Lhoták Š, Fullerton MD, Palanivel R, Jiang H, Lynn EG, et al. Loss of TDAG51 results in mature-onset obesity, hepatic steatosis, and insulin resistance by regulating lipogenesis. *Diabetes* 2013;62(1):158–69.
- [46] Nagai MA. Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer. *Biomed Rep* 2016;4(3):275–81.
- [47] Chiu ST, Hsieh FJ, Chen SW, Chen CL, Shu HF, Li H. Clinicopathologic correlation of up-regulated genes identified using cDNA microarray and realtime reverse transcription-PCR in human colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2):437–43.
- [48] Sakthianandeswaren A, Christie M, D'Andreti C, Tsui C, Jorissen RN, Li S, et al. PHLDA1 expression marks the putative epithelial stem cells and contributes to intestinal tumorigenesis. *Cancer Res* 2011;71(10):3709–19.
- [49] Segditsas S, Sieber O, Deheragoda M, East P, Rowan A, Jeffery R, et al. Putative direct and indirect Wnt targets identified through consistent gene expression changes in APC-mutant intestinal adenomas from humans and mice. *Hum Mol Genet* 2008;17(24):3864–75.
- [50] Fearon AE, Carter EP, Clayton NS, Wilkes EH, Baker AM, Kapitonova E, et al. PHLDA1 mediates drug resistance in receptor tyrosine kinase-driven cancer. *Cell Rep* 2018;22(9):2469–81.
- [51] Neef R, Kuske MA, Pröls E, Johnson JP. Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. *Cancer Res* 2002;62(20):5920–9.
- [52] Hinz T, Flindt S, Marx A, Janssen O, Kabelitz D. Inhibition of protein synthesis by the T cell receptor-inducible human TDAG51 gene product. *Cell Signal* 2001;13(5):345–52.
- [53] Dickhout JG, Hossain GS, Pozza LM, Zhou J, Lhoták S, Austin RC. Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: implications in atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25(12):2623–9.
- [54] Hossain GS, Lynn EG, Maclean KN, Zhou Ji, Dickhout JG, Lhoták Š, et al. Deficiency of TDAG51 protects against atherosclerosis by modulating apoptosis, cholesterol efflux, and peroxiredoxin-1 expression. *J Am Heart Assoc* 2013;2(3):e000134.
- [55] Carlisle RE, Heffernan A, Brimble E, Liu L, Jerome D, Collins CA, et al. TDAG51 mediates epithelial-to-mesenchymal transition in human proximal tubular epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 2012;303(3):F467–81.
- [56] Joo JH, Liao G, Collins JB, Grissom SF, Jetten AM. Farnesol-induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response. *Cancer Res* 2007;67(16):7929–36.
- [57] Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999;397(6716):271–4.
- [58] Deng J, Harding HP, Raught B, Gingras AC, Berlanga JJ, Scheuner D, et al. Activation of GCN2 in UV-irradiated cells inhibits translation. *Curr Biol* 2002; 12(15):1279–86.
- [59] Hara K, Yonezawa K, Weng QP, Kozłowski MT, Belham C, Avruch J. Amino acid sufficiency and mTOR regulate p70 S6 kinase and eIF-4E BP1 through a common effector mechanism. *J Biol Chem* 1998;273(23):14484–94.
- [60] Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, et al. Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2a. *Mol Cell Biol* 2002;22(21):7405–16.
- [61] Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC. Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell* 2006;21(4):521–31.
- [62] Owen CR, Kumar R, Zhang P, McGrath BC, Cavener DR, Krause GS. PERK is responsible for the increased phosphorylation of eIF2a and the severe inhibition of protein synthesis after transient global brain ischemia. *J Neurochem* 2005; 94(5):1235–42.
- [63] Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 2001;7(6):1165–76.
- [64] Carlisle RE, Mohammed-Ali Z, Lu C, Yousof T, Tat V, Nademi S, et al. TDAG51 induces renal interstitial fibrosis through modulation of TGF- β receptor 1 in chronic kidney disease. *Cell Death Dis* 2021;12(10):921.
- [65] Rho J, Gong S, Kim N, Choi Y. TDAG51 is not essential for Fas/CD95 regulation and apoptosis in vivo. *Mol Cell Biol* 2002;22(4):1276.
- [66] Oberg HH, Sipos B, Kalthoff H, Janssen O, Kabelitz D. Regulation of T-cell death-associated gene 51 (*TDAG51*) expression in human T-cells. *Cell Death Differ* 2004;11(6):674–84.
- [67] Liu F, Xu ZL, Qian XJ, Qiu WY, Huang H. Expression of Hsf1, Hsf2, and Phlda1 in cells undergoing cryptorchid-induced apoptosis in rat testes. *Mol Reprod Dev* 2011;78(4):283–91.
- [68] Toyoshima Y, Karas M, Yakar S, Dupont J, Helman L, LeRoith D. TDAG51 mediates the effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell survival. *J Biol Chem* 2004;279(24):25898–904.
- [69] Park ES, Kim J, Ha TU, Choi JS, Soo Hong K, Rho J. TDAG51 deficiency promotes oxidative stress-induced apoptosis through the generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *Exp Mol Med* 2013;45(8):e35.
- [70] Murata T, Sato T, Kamoda T, Moriyama H, Kumazawa Y, Hanada N. Differential susceptibility to hydrogen sulfide-induced apoptosis between PHLDA1-overexpressing oral cancer cell lines and oral keratinocytes: role of PHLDA1 as an apoptosis suppressor. *Exp Cell Res* 2014;320(2):247–57.
- [71] Sohn EJ, Li H, Reidy K, Beers LF, Christensen BL, Lee SB. EWS/FLI1 oncogene activates caspase 3 transcription and triggers apoptosis in vivo. *Cancer Res* 2010;70(3):1154–63.
- [72] Boro A, Prêtre K, Rechfeld F, Thalhammer V, Oesch S, Wachtel M, et al. Smallmolecule screen identifies modulators of EWS/FLI1 target gene expression and cell survival in Ewing's sarcoma. *Int J Cancer* 2012;131(9): 2153–64.
- [73] Moad AIH, Muhammad TS, Oon CE, Tan ML. Rapamycin induces apoptosis when autophagy is inhibited in T-47D mammary cells and both processes are

- regulated by Phlda1. *Cell Biochem Biophys* 2013;66(3):567–87.
- [74] Durbas M, Pabisz P, Wawak K, Wis'niewska A, Boratyn E, Nowak I, et al. GD2 ganglioside-binding antibody 14G2a and specific aurora A kinase inhibitor MK-5108 induce autophagy in IMR-32 neuroblastoma cells. *Apoptosis* 2018;23(9–10):492–511.
- [75] Li G, Wang X, Hibshoosh H, Jin C, Halmos B. Modulation of *ErbB2* blockade in *ErbB2*-positive cancers: the role of *ErbB2* mutations and PHLDA1. *PLoS One* 2014;9(9):e106349.
- [76] Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011;147(4):728–41.
- [77] Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* 2008;132(1):27–42.
- [78] Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, et al. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 2008;57(9):2438–44.
- [79] Font-Clos F, Zapperi S, La Porta CAM. Integrative analysis of pathway deregulation in obesity. *NPJ Syst Biol Appl* 2017;3:1–10.
- [80] Qiu J, Ni YH, Chen RH, Ji CB, Liu F, Zhang CM, et al. Gene expression profiles of adipose tissue of obese rats after central administration of neuropeptide Y-Y5 receptor antisense oligodeoxynucleotides by cDNA microarrays. *Peptides* 2008;29(11):2052–60.
- [81] Burton GR, Nagarajan R, Peterson CA, McGehee Jr RE. Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* 2004;329:167–85.
- [82] Kim S, Lee N, Park E-S, Yun H, Ha TU, Jeon H, et al. T-cell death associated gene 51 is a novel negative regulator of PPARc that inhibits PPARc–RXRa heterodimer formation in adipogenesis. *Mol Cells* 2021;44(1):1–12.
- [83] Henry NG, Paul RM. The obesity, metabolic syndrome, and type 2 diabetes mellitus pandemic: part I. Increased cardiovascular disease risk and the importance of atherogenic dyslipidemia in persons with the metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus. *J CardioMetab Syndr* 2009;4 (2):113–9.
- [84] Liu W, Baker RD, Bhatia T, Zhu L, Baker SS. Pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(10):1969–87.
- [85] Zhang P, Chu T, Dedousis N, Mantell BS, Sipula I, Li L, et al. DNA methylation alters transcriptional rates of differentially expressed genes and contributes to pathophysiology in mice fed a high fat diet. *Mol Metab* 2017;6(4):327–39.
- [86] Liao S, He He, Zeng Y, Yang L, Liu Z, An Z, et al. A nomogram for predicting metabolic steatohepatitis: the combination of NAMPT, RALGDS, GADD45B, FOSL2, RTP3, and RASD1. *Open Med* 2021;16(1):773–85.
- [87] Han CY, Lim SW, Koo JH, Kim W, Kim SG. PHLDA3 overexpression in hepatocytes by endoplasmic reticulum stress via IRE1–XBP1s pathway expedites liver injury. *Gut* 2016;65(8):1377–88.
- [88] Budi EH, Hoffman S, Gao S, Zhang YE, Derynck R. Integration of TGF- β -induced Smad signaling in the insulin-induced transcriptional response in endothelial cells. *Sci Rep* 2019;9(1):16992.
- [89] Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Atherosclerosis Nat Rev Dis Primers* 2019;5(1):56.
- [90] Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol* 2013;13(10):709–21.
- [91] Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011;145(3):341–55.
- [92] Watson MG, Byrne HM, Macaskill C, Myerscough MR. A two-phase model of early fibrous cap formation in atherosclerosis. *J Theor Biol* 2018;456:123–36.
- [93] Trion A, van der Laarse A. Vascular smooth muscle cells and calcification in atherosclerosis. *Am Heart J* 2004;147(5):808–14.
- [94] Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008;117(22):2938–48.
- [95] Vengrenyuk Y, Carlier S, Xanthos S, Cardoso L, Ganatos P, Virmani R, et al. A hypothesis for vulnerable plaque rupture due to stress-induced debonding around cellular microcalcifications in thin fibrous caps. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(40):14678–83.
- [96] Huang H, Virmani R, Younis H, Burke AP, Kamm RD, Lee RT. The impact of calcification on the biomechanical stability of atherosclerotic plaques. *Circulation* 2001;103(8):1051–6.
- [97] Oliver Jr WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, et al. A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(9):5306–11.
- [98] Jiao HW, Jia XX, Zhao TJ, Rong H, Zhang JN, Cheng Y, et al. Up-regulation of TDAG51 is a dependent factor of LPS-induced RAW264.7 macrophages proliferation and cell cycle progression. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2016;38(2):124–30.
- [99] Wang S, Zhang H, Wang An, Huang D, Fan J, Lu Lu, et al. PHLDA1 promotes lung contusion by regulating the Toll-like receptor 2 signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 2016;40(5):1198–206.
- [100] Platko K, Lebeau PF, Gyulay G, Lhoták Š, MacDonald ME, Pacher G, et al. *TDAG51* (T-cell death-associated gene 51) is a key modulator of vascular calcification and osteogenic transdifferentiation of arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020;40(7):1664–79.