

· 综 述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.18.040

钙网蛋白在自然流产中的相关性研究*

熊焱强, 邓小月 综述, 李志英[△] 审校

(三峡大学仁和医院妇产科, 湖北宜昌 443002)

[关键词] 钙网蛋白; 自然流产; 发病机制

[中图分类号] R714.21

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)18-2565-03

自然流产(spontaneous abortion)是指妊娠在 28 周前自行终止,胎儿体质量不足 1 000 g 者。自然流产占有妊娠总数的 10%~15%,且 80%是发生在妊娠 12 周内的流产即早期自然流产^[1-2]。其发病原因非常复杂,涉及妇产科学、遗传学、流行病学、职业医学、免疫学、血液及内分泌学等多个学科,据统计 40%的自然流产原因不明^[3-6],而且自然流产的复发风险随着流产次数的增加而增大^[7]。近年来研究发现钙网蛋白(Calreticulin, CRT)与自然流产的诸多原因密切相关,可能在自然流产中起到重要作用。CRT 是一种结构和功能具有高度保守性的 Ca²⁺ 结合蛋白,在 Ca²⁺ 平衡、抗原的提呈、血管的发生、心脏发育的调节及细胞凋亡等生命过程中发挥着重要的作用。近期研究发现, CRT 在自然流产者蜕膜和绒毛细胞中表达上调,与自然流产的众多因素密切相关,但二者之间的关系尚待深入研究。本文分析近年来研究 CRT 与自然流产的文献,对两者的相关性进行综述。

1 自然流产病因

虽然人们一直在积极寻找自然流产的病因,但至今对其确切发病机制仍未形成定论,学术假说较多。1998 年, Kokuwa^[8]首次提出自然流产病因假说:绒毛及蜕膜组织凋亡的增加可能是自然流产的重要发病机制之一。(1)现有的研究已经证实了自然流产患者绒毛及蜕膜组织中存在大量的凋亡现象,因此,目前对绒毛和蜕膜组织细胞凋亡的研究主要集中于凋亡的基因调控^[9]。(2)血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在受精卵着床过程中发挥着重要作用,并且参与了妊娠期间胎盘生长过程中血管的形成,现有的研究认为 VEGF 表达下降是流产发生的原因之一^[10]。(3)孕激素(progesterone, P)与孕激素受体(progesterone receptor, PR)的正常平衡表达是正常妊娠维持的重要条件, PR 在蜕膜组织中表达下降可能与流产的发生有关。(4)Wnt/ β -catenin 信号通路可能也与自然流产相关^[11]。以上观点已成为目前研究自然流产发病机制的主流,而 CRT 在细胞凋亡、血管生成和蛋白的合成加工过程中均起到重要作用^[12]。因此,推测 CRT 可能在妊娠中绒毛及蜕膜组织细胞凋亡和子宫滋养血管生成等过程中发挥作用,从而引起早期流产的发生。

2 CRT 的结构和功能

CRT 是一种结构和功能具有高度保守性的 Ca²⁺ 结合蛋白,主要定位于细胞内质网,在细胞核和细胞膜上也有少量分布^[13]。人类 CRT 基因位于第 19 号染色体(p13.2-p13.3),存在于除红细胞外的所有细胞中,含 N、P、C 3 个结构域。N 结构域因其具有抑制血管内皮细胞增殖、抗血管生成的功能又被

称为血管生成抑制因子 vasostatin,该结构域是 CRT 的分子伴侣功能区。P 结构域富含脯氨酸,为高亲和力、低容量钙结合位点^[14]。C 结构域末端有 KDEL 序列,可靶向性引导 CRT 定位于内质网并参与内质网中钙的存储。作为公认的多功能分子伴侣, CRT 在 Ca²⁺ 平衡、抗原的提呈、血管的发生、心脏发育的调节、新生蛋白质的加工与折叠及细胞凋亡中发挥着重要的作用,并与多种人类疾病发生、发展及预后密切相关^[12,15]。同样, CRT 在正常妊娠和自然流产的生理病理过程中也起到重要作用。

3 CRT 在自然流产中的作用

近年来研究表明, CRT 的表达水平与生理妊娠和病理妊娠都密切相关,妊娠子宫 CRT 的表达水平明显高于未孕且在病理妊娠中 CRT 的表达量更高。Cheng 等^[16]研究发现, CRT mRNA 在妊娠小鼠子宫内膜中的表达明显增高,且随着妊娠天数的增加呈逐渐升高趋势。且孕妇血浆中 CRT 的表达约为未孕者的 5 倍,先兆子痫患者血浆中 CRT 的表达又高出正常孕妇 50%^[17-18]。这些都说明 CRT 与正常妊娠和异常妊娠之间关系密切。Shi 等^[18]研究发现,在将 CRT 表达载体转染入人绒毛膜细胞 JEG-3 细胞系中后,细胞的增殖和分化受到抑制,而能促进细胞凋亡。因此,可以推测 CRT 在自然流产的绒毛和蜕膜组织中的高表达可能是自然流产的原因之一。

3.1 CRT 抑制血管生长而导致自然流产 VEGF 是血管生成最重要的调节因子,在早期妊娠中起着至关重要的作用,包括刺激滋养层细胞的增殖、胚胎血管发育、母体和子宫中胎儿的血细胞生长^[19]。有研究发现,早期自然流产患者蜕膜组织中 VEGF 表达较正常早期妊娠明显降低^[20]。在自然流产患者蜕膜组织中,细胞内质网处于应激状态中,大量误折叠或未折叠的蛋白堆积于内质网急需折叠,此时对分子伴侣的需求量增加, CRT 的合成也相应增加, CRT 的 vasostatin 片段可以专一而有效地抑制内皮细胞的增生,使新生血管无法生成,抑制蜕膜血管的重建,从而引发自然流产^[21-23]。这些研究都表明了,在早期妊娠中 CRT 可以通过抑制血管生成而导致自然流产的发生。

3.2 CRT 影响心脏发育而导致自然流产 CRT 属于心脏胚胎基因家族,在心脏发育过程中基因转录活化、蛋白表达升高。而 CRT 基因过度表达则出现心脏传导障碍,以致出现难治性心力衰竭而死亡; Zhang 等^[24]发现扩张型心肌病大鼠模型及心肌细胞缺氧/富氧模型中, CRT 出现高表达并与心肌细胞的凋亡呈正相关。而 CRT 基因敲除可损伤心脏发育而导致胚胎死亡,但是这种 CRT 缺失引起的心室肌纤维形成受损且此变

* 基金项目:湖北省卫生计生西医药一般项目(WJ2015MB178);湖北省重点实验室(三峡大学)开放基金资助项目(2015KZL06);三峡大学研究生创新基金资助项目(2015CX101)。 作者简介:熊焱强(1992-),在读硕士研究生,主要从事妇科肿瘤与病理产科的研究。 [△] 通讯作者, E-mail: zhiying9628@126.com。

化可以被 CRT 的表达升高所恢复^[25]。Papp 等^[26]研究证明, CRT 的异常表达可导致心律失常并伴随信号传导相关蛋白的表达失衡。综上可知, 妊娠期 CRT 的异常表达可以引起胎儿心脏发育异常和心脏电信号传导阻滞而引起流产, 这也可能为自然流产发生的机制之一。

3.3 CRT 介导内质网应激与自然流产 氧化应激是指活性氧生成和抗氧化防御系统之间的不平衡状态。越来越多的证据表明, 在病理性妊娠尤其是自然流产中存在着氧化应激, 且氧化应激可以导致复发性流产^[27]。Gao 等^[28]认为早期流产的原因是氧化应激诱发了内质网(endoplasmic reticulum, ER)应激, 而 CRT 又是 ER 应激过程中非常关键的分子伴侣。Zhang 等^[29]研究发现, ER-CRT-Ca²⁺ 稳态在猪卵母细胞成熟及胚胎发育过程中发挥着重要作用, Ca²⁺ 的紊乱将抑制胚泡的发生、发展。该研究认为, 一定程度的 ER 应激能激活保护机制如分子伴侣 CRT 表达而抵抗应激, 但如果长期或过度 ER 应激, 则保护机制失衡, 触发 ER 相关性细胞死亡途径, 最终则导致流产。因此, CRT 表达的上调介导内质网应激的异常在自然流产的发生过程中也起到了较大作用。

3.4 CRT 启动胎盘细胞凋亡与自然流产 细胞凋亡是生物个体最基本的生理过程, 属于细胞主动程序性死亡, 一般不引起炎症反应。正常妊娠过程中存在着凋亡与增殖的平衡状态, 但早期自然流产患者的绒毛组织存在过多细胞凋亡, 能否有效清除凋亡细胞, 对个体发育、组织修复和再造以及保持机体内环境的稳定至关重要^[30]。新近的研究提示, CRT 是细胞膜上介导凋亡识别、吞噬非常重要的配体分子, CRT 丢失是凋亡细胞不能被识别及吞噬的主要原因^[31]。另一方面, CRT 在凋亡细胞的清除方面发挥着重要作用, 自然流产及凋亡现象的存在进一步诱发机体对凋亡细胞的清除, 从而避免自身免疫性疾病和局部炎症的发生。有研究提示, CRT 外翻可能是细胞凋亡最早的特征性表现。细胞发生凋亡时, CRT 在细胞膜表面聚集、高表达, 成为即将被吞噬的信号传递给树突状细胞, 从而启动凋亡细胞的吞噬过程^[32]。本课题组前期研究中发现, CRT 及 Caspase-3 在早期自然流产蜕膜及绒毛组织中表达高于正常早孕组, 而稽留流产组蜕膜及绒毛组织中的表达水平又均高于先兆流产组; 且 CRT 与 Caspase-3 表达水平呈正相关^[33]。综上可知, CRT 的高表达可以激活机体内吞噬细胞对蜕膜和绒毛细胞的识别、处理, 通过免疫杀伤诱导凋亡进而引起流产。

4 展 望

自然流产的病因十分复杂, 现有的假说都无法完全解释自然流产的发病机制。尽管目前已有大量临床研究和动物实验研究证实了 CRT 的异常表达与自然流产的多种机制存在着联系, 如血管生成、内质网应激、心脏发育和胎盘细胞凋亡等, 但是具体分子作用机制仍有待发现。CRT 与自然流产的几个关键问题有待进一步研究: (1) CRT 对生殖生理的调控及妊娠维持等作用的具体分子机制; (2) CRT 的异常表达与早期自然流产之间是否存在因果关系, 以及其作用机制; (3) CRT 在生殖医学和孕产妇保健中的应用前景; (4) CRT 在自然流产早期预判和治疗中应用研究。作者认为可以将 CRT 表达的异常作为检测是否有自然流产危险的一种分子标志物和保胎治疗的新靶点, 为自然流产的临床诊疗提供一个新思路。

参考文献

[1] Madjunkova S, Volk M, Peterlin B, et al. Detection of thrombophilic mutations related to spontaneous abortions by a multiplex SNaPshot method[J]. Genet Test Mol Bi-

omarkers, 2012, 16(4): 259-264.

- [2] 谢幸, 苟文丽. 妇产科学[M]. 8 版, 北京: 人民卫生出版社, 2013: 47-51.
- [3] Perez N, Peterlin B, Volk M, et al. A critical update on endothelial nitric oxide synthase gene variations in women with idiopathic recurrent spontaneous abortion: genetic association study, systematic review and meta-analyses [J]. Mol Hum Reprod, 2015, 21(5): 466-478.
- [4] Zhang Y, Yang C, Fu S, et al. Different expression of NOD2 in decidual stromal cells between normal and unexplained recurrent spontaneous abortion women during first trimester gestation[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(12): 8784-8790.
- [5] Marinescu IP, Foarfă MC, Pirlog MC, et al. Prenatal depression and stress - risk factors for placental pathology and spontaneous abortion[J]. Rom J Morphol Embryol, 2014, 55(3 Suppl): 1155-1160.
- [6] Qian ZD, Huang LL, Zhu XM. An immunohistochemical study of CD83- and CD1a-positive dendritic cells in the decidua of women with recurrent spontaneous abortion [J]. Eur J Med Res, 2015, 20(1): 1-7.
- [7] Maesawa Y, Yamada H, Deguchi M, et al. History of biochemical pregnancy was associated with the subsequent reproductive failure among women with recurrent spontaneous abortion[J]. Gynecol Endocrinol, 2015, 31(4): 306-308.
- [8] Kokawa K, Shikone T, Nakano R. Apoptosis in human chorionic villi and decidua in normal and ectopic pregnancy[J]. Mol Hum Reprod, 1998, 4(1): 87-91.
- [9] 马亦良, 黄娟, 白军. 胎盘细胞凋亡与早流产关系研究[J]. 延安大学学报(医学科学版), 2014, 12(1): 22-25.
- [10] Amirchaghmaghi E, Rezaei A, Moini A, et al. Gene expression analysis of VEGF and its receptors and assessment of its serum level in unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. Cell, 2015, 16(4): 538-545.
- [11] Li S, Li N, Zhu P, et al. Decreased β -catenin expression in first-trimester villi and decidua of patients with recurrent spontaneous abortion[J]. J Obstet Gynaecol Res, 2015, 41(6): 904-911.
- [12] Jiang Y, Dey S, Matsunami H. Calreticulin: roles in cell-surface protein expression[J]. Membranes (Basel), 2014, 4(3): 630-641.
- [13] Qiu Y, Michalak M. Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(3): 531-538.
- [14] Garg AD, Nowis D, Golab J, et al. Immunogenic cell death, DAMPs and anticancer therapeutics; an emerging amalgamation[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1805(1): 53-71.
- [15] Feng M, Chen JY, Weissman-Tsukamoto R, et al. Macrophages eat cancer cells using their own calreticulin as a guide: Roles of TLR and Btk[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(7): 2145-2150.
- [16] Cheng SQ, He JL, Dong YL, et al. Characterization of calreticulin expression in mouse endometrium during embryo implantation[J]. Biol Res, 2009, 42(4): 505-516.

- [17] Gu VY, Wong MH, Stevenson JL, et al. Calreticulin in human pregnancy and pre-eclampsia [J]. *Mol Hum Reprod*, 2008, 14(5):309-315.
- [18] Shi Z, Hou W, Hua X, et al. Overexpression of calreticulin in pre-eclamptic placentas: effect on apoptosis, cell invasion and severity of pre-eclampsia [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 63(2):183-189.
- [19] Crafts TD, Jensen AR, Blocher-Smith EC, et al. Vascular endothelial growth factor: therapeutic possibilities and challenges for the treatment of ischemia [J]. *Cytokine*, 2014, 71(2):385-393.
- [20] Xu XH, Du CG, Li HH, et al. Association of VEGF genetic polymorphisms with recurrent spontaneous abortion risk: a systematic review and meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4):e0123696.
- [21] Toledo V, Ramirez G, Valck C, et al. Comparative in vivo antiangiogenic effects of calreticulin from *Trypanosoma cruzi* and *Homo sapiens* [J]. *Biol Res*, 2010, 43(3):287-289.
- [22] López NC, Valck C, Ramirez G, et al. Antiangiogenic and antitumor effects of *Trypanosoma cruzi* Calreticulin [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4(7):e730-738.
- [23] Kajdaniuk D, Marek B, Borgiel-Marek H, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-part 1: in physiology and pathophysiology [J]. *Endokrynol Pol*, 2011, 62(5):444-455.
- [24] Zhang M, Wei J, Li Y, et al. Novel distribution of calreticulin to cardiomyocyte mitochondria and its increase in a rat model of dilated cardiomyopathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 449(1):62-68.
- [25] Xu FF, Liu XH. Calreticulin Translocation Aggravates Endoplasmic Reticulum Stress-associated Apoptosis during Cardiomyocyte Hypoxia/Reoxygenation [J]. *Chin J Physiol*, 2015, 48(1):1-6. doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.18.041
- [26] Papp S, Dziak E, Opas M. Embryonic stem cell-derived cardiomyogenesis: a novel role for calreticulin as a regulator [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(7):1507-1515.
- [27] Ishii T, Miyazawa M, Takanashi Y, et al. Genetically induced oxidative stress in mice causes thrombocytosis, splenomegaly and placental angiodyplasia that leads to recurrent abortion [J]. *Redox Biol*, 2014, 2(3):679-685.
- [28] Gao HJ, Zhu YM, He WH, et al. Endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress in decidual cells: a possible mechanism of early pregnancy loss [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(9):9179-9186.
- [29] Zhang DX, Li XP, Sun SC, et al. Involvement of ER-calreticulin-Ca²⁺ signaling in the regulation of porcine oocyte meiotic maturation and maternal gene expression [J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(5):462-471.
- [30] Henson PM, Hume DA. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27(5):244-250.
- [31] Sukkurwala AQ, Martins I, Wang Y, et al. Immunogenic calreticulin exposure occurs through a phylogenetically conserved stress pathway involving the chemokine CX-CL8 [J]. *Cell Death Differ*, 2014, 21(1):59-68.
- [32] De BM, Wiersma VR, Helfrich W, et al. The ever-expanding immunomodulatory role of calreticulin in cancer immunity [J]. *Front Oncol*, 2015, 5(25):35-40.
- [33] 方仙桃, 李志英, 张秋玲, 等. 自然流产蜕膜及绒毛组织中钙网蛋白的表达及意义 [J]. *现代妇产科进展*, 2014, 23(12):987-989.

(收稿日期:2016-01-22 修回日期:2016-04-16)

磷脂酰肌醇-3-激酶信号通路调控炎症介质表达机制的研究进展*

贾圣男¹, 史家欣^{2#} 综述, 李小民^{1△} 审校

(徐州医学院附属连云港医院:1. 急诊科;2. 呼吸内科, 江苏连云港 222000)

[关键词] 磷脂酰肌醇-3-激酶信号通路; 炎症介质; 研究进展

[中图分类号] R392.32

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)18-2567-04

炎症性疾病是临床多发常见疾病,如病原体感染引起的感染性疾病,非病原体感染引发的自身免疫性疾病,以及一些肿瘤的流行病学也与长期慢性炎症持续状态关系密切。抗炎与促炎是感染及非感染性炎症性疾病的两个对立面,两者调节的平衡与否推进着疾病的进展,最终影响疾病的结局。因此,研究疾病的促炎与抗炎平衡及其调节机制可为临床疾病的发病机制理清思路,指导疾病的诊断、治疗。

1 磷脂酰肌醇-3-激酶简介

磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphoinositide 3-kinases, PI3K),在

静息状态下,是一种位于细胞质的脂质激酶,当细胞表面 G 蛋白、小 G 蛋白偶联受体等被激活后,胞内酪氨酸基序磷酸化,从而募集胞质内 PI3K 至细胞膜,活化的 PI3K 使膜磷脂磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PI-4,5-P₂)磷酸化生成磷脂酰肌醇-3,4,5-,三磷酸(PI-3,4,5-P₃),磷脂酰-3-磷酸(PIP₃)作为第二信使,与含有普列克同源结构域(pleckstrin homology domain, PH)特异蛋白结合并使其活化,将信号传递至下游蛋白^[1]。哺乳动物 PI3K 依据脂质特性和结构不同分为 3 个亚型, I 类、II 类和 III 类,其中 I 类又包含 IA 与 IB, IA 由 p85 调节亚单位

* 基金项目:国家自然科学基金(青年基金)资助项目(81300052);中国博士后科学基金资助项目(2015M570420);江苏省卫生计生委资助课题(H201558)。 作者简介:贾圣男(1989-),住院医师,硕士研究生,主要从事脓毒症炎症反应的研究。 # 共同第一作者:史家欣(1979-),主治医师,博士后,主要从事急性呼吸窘迫综合征炎症机制的研究。 △ 通讯作者, E-mail:lyglxml@163.com。