

文章编号: 1004-0374(2011)03-0283-03

# 钙网蛋白与神经系统病变

罗 飞, 柳长柏\*

(三峡大学分子生物学研究所, 宜昌 443002)

**摘 要:** 钙网蛋白 (calreticulin, CRT) 是内质网中的一种多功能的分子伴侣, 在协助蛋白质正确折叠和维持细胞  $\text{Ca}^{2+}$  稳态 ( $\text{Ca}^{2+}$  信号) 中发挥重要作用。近来的研究发现, 钙网蛋白与神经系统病变包括阿尔茨海默氏病、帕金森病等有密切关系。

**关键词:** 钙网蛋白; 神经系统病变; 阿尔茨海默氏病; 帕金森病

**中图分类号:** Q513; R742.5      **文献标识码:** A

## Calreticulin and nervous system diseases

LUO Fei, LIU Chang-Bai\*

(Institute of Molecular Biology, China Three Gorges University, Yi Chang 443002, China)

**Abstract:** Calreticulin(CRT) is a kind of multi-functional protein in endoplasmic reticulum(ER), which plays important roles in a variety of cellular processes including  $\text{Ca}^{2+}$  signaling/ homeostasis and protein folding. Recent studies show that CRT is closely relevant with nervous system diseases, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease.

**Key words:** calreticulin; nervous system diseases; Alzheimer's disease; Parkinson's disease

钙网蛋白 (calreticulin, CRT) 是内质网中的一种多功能分子, 在细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  信号、维持  $\text{Ca}^{2+}$  循环与稳定和协助蛋白质正确折叠中发挥重要作用。Ostwald 和 MacLennan<sup>[1]</sup> 于 1974 年从兔肌细胞的肌浆网中分离出此蛋白。Smith 和 Koch<sup>[2]</sup> 及 Fliegel 等<sup>[3]</sup> 分别在 1989 年克隆其全长基因。此后二十多年的研究发现, 钙网蛋白在分子伴侣、细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的调节与转运、细胞黏附、基因表达与调控、糖皮质激素出核转运、心脏发生、脂肪生成、肿瘤、抑制血管生成、免疫原性细胞死亡、伤口愈合、阿尔茨海默氏病、自身免疫疾病等方面都发挥着重要的生物学作用<sup>[4]</sup>。近年来不少研究发现, 钙网蛋白与神经系统病变 (包括阿尔茨海默氏病、帕金森病等) 有密切关系, 本文综述了此蛋白在分子生物学及神经系统病变研究中的进展。

### 1 钙网蛋白的结构和亚细胞定位

人类钙网蛋白基因位于第 19 号染色体 (p13.2-p13.3), 由 9 个外显子和 8 个内含子构成, 其编码基因长度为

1 254 bp, 编码由 417 个氨基酸组成的、相对分子质量为 46.6 k 的酸性蛋白。CRT 具有特殊的功能结构域, 包括高度保守的 N 区、富含脯氨酸的 P 区和酸性的 C 区, 作为分子伴侣, 这些区域分别与底物结合, 可大量结合  $\text{Ca}^{2+}$ , 参与  $\text{Ca}^{2+}$  在内质网中的储存以及在网内滞留信号中发挥作用。

钙网蛋白分布于高等生物除红细胞之外的所有细胞中。由于其 C 端含有内质网 (ER) 滞留信号序列 KDEL, 人们一度认为它仅存在于 ER 之中, 后来研究发现 CRT 还存在于细胞核、核膜、细胞膜表面以及细胞外基质中。在某些生理、病理情况下, 其亚细胞定位也会发生改变, 如在已分化的组织中 (如心脏和脑组织), CRT 的表达是减少的, 而在低分化的组织 (胚胎) 中其表达是上调的<sup>[5,6]</sup>。在凋亡

收稿日期: 2010-08-25; 修回日期: 2010-09-18

基金项目: 湖北省教育厅自然科学研究重点项目 (d200713004)

\*通讯作者: E-mail: cblu@ctgu.edu.cn

应激反应条件下, CRT 通过磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 相关性  $Ca^{2+}$  依赖途径向胞质中聚集增加。在 S-nitrosothiol 和 caspase 依赖途径的调节下, CRT 与 PS 向细胞膜聚集成簇, 共同信号分子参与了凋亡细胞的清除<sup>[7,8]</sup>。这表明 CRT 的表达变化以及亚细胞定位改变参与不同的生物学功能。

## 2 钙网蛋白的基因和启动子

目前已知的有两种 CRT 蛋白亚型 (CRT-1 和 CRT-2)。除哺乳动物有核细胞以外, CRT-1 还表达于植物中, 并在高等植物的  $Ca^{2+}$  信号、蛋白质折叠、生长发育、应激调节等方面起着重要的作用<sup>[9]</sup>; CRT-2 的生物学功能及其启动子的调节目前不太清楚。

Persson 等<sup>[10]</sup> 研究显示, CRT-2 的表达产物只在睾丸组织中检测到而在其他组织中几乎不表达; Christensen 等<sup>[11]</sup> 也指出, 从植物提取的钙网蛋白 (拟南芥属) 在钙网蛋白缺失的小鼠胚胎成纤维细胞内具调节内质网中  $Ca^{2+}$  浓度和协助蛋白质折叠的功能, 提示钙网蛋白的基本生物学功能相对保守。

Sontheimer 研究组最早分析了人类钙网蛋白基因的启动子。他们发现其核苷酸序列与鼠 CRT 有 68% 的同源性。体外实验 (报告基因分析与 ChIP 分析) 发现, 鼠 CRT 启动子区内含有许多转录因子的结合位点, 如 Nkx2.5、COUP-TF1、GATA6、MEF2C、EVI-1 和 PPAR 等。在细胞增殖分化过程中, 这些转录因子在 CRT 的表达调控中起着重要作用。脑组织中 CRT 基因转录调控机制目前不太清楚。TESS (Transcription Element Search System) 分析表明, 小鼠 CRT 启动子区含神经元特异转录因子的结合位点, 如 Olf-1 和 HES1, 提示这些转录因子可能调节脑组织中 CRT 的表达。

## 3 钙网蛋白与神经系统病变

1992 年, Abe 等<sup>[12]</sup> 通过原位杂交技术检测, 在成年小鼠的脑组织中发现, 钙网蛋白广泛表达于不同种类的神经元中; 有趣的是, 胚鼠脑组织中的表达量比成年小鼠的表达要丰富得多<sup>[13]</sup>, 提示 CRT 可能在脑发育早期发挥着重要的生物学功能。已有资料显示, 内质网分子伴侣在维持蛋白质正确折叠和阻止神经元细胞的细胞毒性中起着重要的作用<sup>[14]</sup>。CRT 作为内质网分子伴侣中的一个重要成员, 与许多神经系统病变密切相关。

### 3.1 CRT与阿尔茨海默氏病

阿尔茨海默氏病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种常见的神经系统退行性病变, 其神经病理特征是细胞外淀粉样蛋白沉积 (又称老年斑, senile plaque) 以及细胞内纤维缠结。淀粉样蛋白前体 (amyloid precursor protein, APP) 异常剪切后形成与神经细胞损伤有关的淀粉样蛋白沉积, 但是  $\beta$ -淀粉样蛋白导致的这种病理生理学改变的确切机制目前不甚明了<sup>[15]</sup>。

Joerchel 等<sup>[16]</sup> 通过体外实验与临床检测发现,  $\beta$ -淀粉样蛋白可能是通过影响 AD 患者脑内一系列蛋白的结构完整性与功能, 从而导致 AD 的发生与发展。而钙网蛋白作为与 APP 密切相关的分子伴侣直接或间接地参与了 AD 的病理进程。Erickson 等<sup>[17]</sup> 通过蛋白质印迹法对 AD 患者脑脊液检测发现, 内质网中的分子伴侣 CRT (以及 ERp57) 作为载体蛋白, 可能通过使淀粉样蛋白保持溶解状态而阻止其沉积; 而 CRT 通过分泌途径对未成熟的淀粉样前蛋白进行质量控制<sup>[18]</sup>, 即提示 CRT 对 APP 的成熟有着重要生理学意义。同时, 通过抗体封闭神经元内经典补体途径的抑制剂 CRT, 补体 C1q 就可以诱导氧化神经毒性与神经死亡<sup>[19,20]</sup>。这就说明 CRT 通过防止淀粉样蛋白沉积而对 AD 有保护作用。Taguchi 等<sup>[21]</sup> 研究显示, AD 患者脑组织中 CRT 的 mRNA 表达降低, 在一定程度上支持 CRT 在 AD 患者脑组织中的低表达可能部分参与了 AD 的病理学进程。

### 3.2 CRT与帕金森病

帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 是以静止性震颤、肌肉僵直、运动迟缓、步态功能障碍等为主要临床表现的老年多发病。PD 典型的病理特征是黑质致密部多巴胺能神经元进行性丢失、胞质内出现路易小体样蛋白质包涵体蓄积, 其发病机制并不明了, 但 Licker 等<sup>[22]</sup> 研究显示, 氧化应激、线粒体功能障碍、兴奋毒性、铁沉积、炎症反应等, 与 PD 的发生发展密切相关。Dukes 等<sup>[23]</sup> 通过多巴胺诱导的内质网应激反应 (ER stress response) 发现, 内质网中包括钙网蛋白在内的大部分分子伴侣表达上调, 提示 CRT 上调相关的错构蛋白反应 (unfolded protein response) 可能在 PD 的细胞损伤中起负面影响。Lees 等<sup>[24]</sup> 认为在 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 预处理的多巴胺能神经细胞中 CRT 是时间依赖性表达上调, 神经毒素治疗下的多巴胺能神经细胞死亡与 CRT 相关, 可能是 CRT 表达的上调传递细胞压

力耐受以及细胞死亡信号。而 CRT 在内的分子伴侣对多巴胺能神经细胞死亡的直接作用以及 PD 发生发展的病理生理学过程的相关性有待进一步探讨。

近年来报道, 内质网的应激反应是机体处理内质网中错误折叠的蛋白质蓄积的一种防御体系, 这种应激反应与一些神经变性疾病和脑缺血症有关, 这包括有阿尔茨海默氏病、帕金森病、马查多-约瑟夫病 (Machado-Joseph disease, MJD) 等<sup>[14-24]</sup>。钙网蛋白作为内质网应激反应中协助蛋白质正确折叠的重要分子伴侣, 其在神经细胞表达的改变直接或间接地参与了这些疾病的病理进程。

#### 4 结语

总之, 内质网是蛋白质的“加工厂”, 而 CRT 是内质网中的“纠察队”, CRT 作为内质网中协助蛋白质正确折叠的分子伴侣在其中发挥着重要的生物学功能。蛋白质在内质网中未折叠或错误折叠是不可避免的, 在正常的生理条件下, 这些蛋白质会经过重新折叠、泛素/蛋白酶降解等途径以维持细胞内环境的稳定; 而病理条件下, 这些蛋白质在细胞中的蓄积, 如神经细胞, 则会引起许多神经系统病变。CRT 在神经细胞中表达的改变则是这些蛋白质蓄积的一个重要原因, 最终引发神经元内细胞死亡信号。那么, 维持神经细胞内钙网蛋白的稳定表达, 也许可以作为治疗神经系统病变的一个新的方向。

#### [参 考 文 献]

- [1] Ostwald TJ, MacLennan DH. Isolation of a high affinity calcium binding protein from sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1974, 249(3): 974-9
- [2] Smith MJ, Koch GL. Multiple zones in the sequence of calreticulin (CRP55, calreticulin, HACBP), a major calcium binding ER/SR protine. *EMBO J*, 1989, 8(12): 3581-6
- [3] Fliegel L, Burns K, MacLennan DH, et al. Molecular cloning of the high affinity calcium-binding protein(calreticulin) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 1989, 264(36): 21522-8
- [4] Qiu Y, Michalak M. Transcriptional control of the calreticulin gene in health and disease. In *J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(3): 531-8
- [5] Langdown ML, Holness MJ, Sugden MC. Effects of prenatal glucocorticoid exposure on cardiac calreticulin and calsequestrin protein expression during early development and in adulthood. *Biochem J*, 2003, 371(Pt1): 61-9
- [6] Luczynski W, Kowalczyk O, Ilendo E, et al. Upregulation of antigen-processing machinery components at mRNA level in acute lymphoblastic leukemia cells after CD40 stimulation. *Ann Hematol*, 2007, 86(5): 339-45
- [7] Tarr JM, Young PJ, Morse R, et al. A mechanism of release of calreticulin from cells during apoptosis. *J Mol Biol*, 2010, 7(16): 1-14
- [8] Kuraishi T, Manaka J, Kono M, et al. Identification of calreticulin as a marker for phagocytosis of apoptotic cells in *Drosophila*. *Exp Cell Res*, 2007, 313(3): 500-10
- [9] Jia XY, He LH, Jing RL, et al. Calreticulin: conserved protein and diverse functions in plants. *Physiol Plantarum*, 2009, 136(2): 127-38
- [10] Persson S, Rosenquist M, Sommarin M. Identification of a novel calreticulin isoform (Crt2) in human and mouse. *Gene*, 2002, 297(1-2): 151-8
- [11] Christensen A, Svensson K, Persson S, et al. Functional characterization of *Arabidopsis* Calreticulin1a: a key alleviator of endoplasmic reticulum stress. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(6): 912-24
- [12] Abe H, Watanabe M, Goto K, et al. Localization of gene expression of calreticulin in the brain of adult mouse. *Brain Res Mol Brain Res*, 1992, 14(4): 337-43
- [13] Zhang X, Szabo E, Michalak M, et al. Endoplasmic reticulum stress during the embryonic development of the central nervous system in the mouse. *Int J Dev Neurosci*, 2007, 25(7): 455-63
- [14] Kudo T, Kanemoto S, Hara H, et al. A molecular chaperone inducer protects neurons from ER stress. *Cell Death Differ*, 2008, 15(2): 364-75
- [15] Walsh DM, Selkoe DJ. Aβ oligomers—a decade of discovery. *J Neurochem*, 2007, 101(5): 1172-84
- [16] Joerchel S, Raap M, Bigl M, et al. Oligomeric β-amyloid(1-42) induces the expression of Alzheimer disease-relevant proteins in cholinergic SN56.B5.G4 cells as revealed by proteomic analysis. *Int J Dev Neurosci*, 2008, 26(3-4): 301-8
- [17] Erickson RR, Dunning LM, Olson DA, et al. In cerebrospinal fluid ER chaperones ERp57 and calreticulin bind β-amyloid. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 322(1): 50-7
- [18] Johnson RJ, Xiao G, Shanmugaratnam J, et al. Calreticulin functions as a molecular chaperone for the β-amyloid precursor protein. *Neurobiol Aging*, 2001, 22(3): 387-95
- [19] Luo X, Weber GA, Zheng J, et al. C1q-calreticulin induced oxidative neurotoxicity: relevance for the neuropathogenesis of Alzheimer's disease. *J Neuroimmunol*, 2003, 135 (1-2): 62-71
- [20] Lynch NJ, Schneider H, Sim RB, et al. *In vivo* pharmacokinetics of calreticulin S-domain, an inhibitor of the classical complement pathway. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(4): 415-22
- [21] Taguchi J, Fujii A, Fujino Y, et al. Different expression of calreticulin and immunoglobulin binding protein in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol*, 2000, 100(2):153-60
- [22] Licker V, Kövari E, Hochstrasser DF, et al. Proteomics in human Parkinson's disease research. *J Proteomics*, 2009, 73(1):10-29
- [23] Dukes AA, Van Laar VS, Cascio M, et al. Changes in endoplasmic reticulum stress proteins and aldolase A in cells exposed to dopamine. *J Neurochem*, 2008, 106(1): 333-46
- [24] Lee YM, Park SH, Chung KC, et al. Proteomic analysis reveals upregulation of calreticulin in murine dopaminergic neuronal cells after treatment with 6-hydroxydopamine. *Neurosci Lett*, 2003, 352 (1):17-20