

DOI: 10.13376/j.cblls/2025016

文章编号: 1004-0374(2025)02-0140-07

RCN3生物学功能与在肺损伤修复疾病中的研究进展

石小倩, 王振艳, 靳嘉巍*

(首都医科大学附属北京朝阳医院, 临床医学研究室, 北京 100043)

摘要: Reticulocalbin 3 (RCN3) 广泛表达于人体所有组织中, 在生理代谢、肺发育、急慢性呼吸疾病、心脑血管疾病及多种肿瘤中均发挥调控作用, 尤其是在肺损伤修复相关疾病中发挥重要调控作用。近年来, RCN3 因其生物学功能多样性受到人们的广泛关注。本文对 RCN3 的生物学功能以及在肺纤维化、急性呼吸窘迫综合征、慢性阻塞性肺疾病中的研究进展和分子机制进行综述, 为今后 RCN3 辅助临床诊断及作为临床治疗新靶点提供参考依据。

关键词: Reticulocalbin 3; 肺发育; 肺纤维化; 急性呼吸窘迫综合征; 慢性阻塞性肺疾病

中图分类号: {Q71}; R563 **文献标志码:** A

Biological function of RCN3 and advances in the repair of lung injury

SHI Xiao-Qian, WANG Zhen-Yan, JIN Jia-Wei*

(Medical Research Center, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100043, China)

Abstract: Reticulocalbin 3 (RCN3) is widely expressed in all tissues of the human body, which plays a regulatory role in lung development, acute and chronic respiratory diseases, cardiovascular and cerebrovascular diseases, physiological metabolic processes and a variety of tumors, especially in lung injury repair related diseases. In recent years, RCN3 has attracted much attention due to its biological function diversity. In this paper, the biological function of RCN3 and its research progress and molecular mechanism in pulmonary fibrosis, acute respiratory distress syndrome, and chronic obstructive pulmonary disease were reviewed, so as to provide reference for RCN3 as a target for auxiliary clinical diagnosis and clinical treatment in the future.

Key words: Reticulocalbin 3; lung development; pulmonary fibrosis; acute respiratory distress syndrome; chronic obstructive pulmonary disease

Reticulocalbin 3 (RCN3) 是定位于分泌途径的内质网 (ER) 腔蛋白, 属于 Ca^{2+} -binding protein of 45 kDa (Cab45)/Rcn/ER Ca^{2+} -binding protein of 55 kDa (ERC55)/Calumenin (CREC) 家族^[1]。RCN3 广泛表达于人体组织, 在多种器官发育和生理病理过程中发挥重要作用^[2-3]。近年来, 随着对 RCN3 的生物学特性及其在多种生理代谢过程和心脑血管疾病、肿瘤中的研究, 发现 RCN3 在肺损伤修复疾病的发生发展中发挥重要调节作用, 具有重要临床意义。本文对相关研究进展进行综述, 为深入了解相关分子机制以及寻找潜在的治疗靶点, 并为急慢性呼吸疾病的治疗和预后评估提供重要依据。

1 RCN3属于CREC家族

人 RCN3 基因是一个单拷贝基因, 位于第 19 号染色体上, 包含 7 个外显子, 翻译起始位点 (ATG) 位于第二个外显子上, 分布在 10 kb 的染色体范围内, 编码一个 328 个氨基酸的多肽。RCN3 蛋白在人、小鼠和大鼠中高度保守, 人和小鼠的氨基酸序列同源性高达 93%。RCN3 蛋白包含 N 端信号肽序列、

收稿日期: 2024-08-09

基金项目: 北京市自然科学基金青年项目(7214233);
首都医科大学科研培育基金(PYZ22083)

*通信作者: E-mail: jiawei@ccmu.edu.cn

6个EF-hand结构域和C端的HDEL内质网定位信号^[4-5]。研究表明, CREC家族包括Reticulocalbin、ERC-55及其剪切体、Cab45及其剪切体和迄今已知存在15种剪切体的Calumenin蛋白^[1]。

CREC家族蛋白的共同特征是所有成员都含有多个EF hand结构域(可多达7个), 蛋白的C末端都有一个内质网定位信号HDEL/KDEL; 大部分家族蛋白定位于哺乳动物内质网的分泌途径, 对钙离子具有结合活性, 可能参与钙离子活性调节。研究发现, 一些CREC蛋白可定位于细胞质和分泌到细胞外, 例如Cab45-C和ERC55-C定位于细胞质基质, Calumenin-15则在细胞质基质和细胞核之间穿梭^[6], Cab45-S能分泌到细胞外^[7-8], 部分Reticulocalbin可分布在细胞表面^[9]。这些不同细胞定位的蛋白亚型极大丰富了CREC家族的生物学功能, 研究发现其功能主要与分泌途径中的钙离子依赖过程相关, 其功能失调与多种疾病相关。

2 RCN3的生物学功能

RCN3是通过生物信息学预测发现的基因, 迄今一系列研究发现其在多种器官发育、生理代谢、心脑血管疾病及肿瘤中均发挥重要调控作用。

2.1 器官发育

RCN3在肺围产期肺泡发育中起着关键作用^[4]。RCN3在小鼠体内广泛表达, 其中肺组织表达量最高, 主要在肺泡二型上皮细胞(alveolar epithelial cells type II, AECII)、支气管上皮细胞以及肺微血管内皮细胞中表达; 小鼠胚胎第17.5天(囊状期初), 肺组织中的RCN3表达显著增加, 但出生后肺内RCN3表达明显降低, 提示RCN3与肺围产期发育有关。RCN3基因全身敲除(knockout, KO)小鼠出生后半小时内, 渐进性地出现如呼吸困难、深腹式呼吸、身体紫绀等表征, 最后呼吸衰竭而亡, 此表征类似于新生儿呼吸窘迫综合征(neonatal respiratory distress syndrome, NRDS), 提示RCN3与肺的异常发育有关; 但是, RCN3缺失并不影响其他器官的发育。进一步研究发现, RCN3基因缺失主要导致围产期肺泡发育异常, 但不影响早期肺发育。小鼠肺发育过程中的肺泡化进程具有与人类相似的时序性, 但与人类胚胎肺发育所不同的是, 新生小鼠肺组织仅完成大体形态发生, 出生后3~5天才开始肺泡化, 相当于人类妊娠期36周至出生后数年, 因此其可很好地模拟早产儿出生后肺泡的发育过程。

进一步研究发现, RCN3基因缺失可导致小鼠

肺泡二型上皮细胞发育成熟障碍, 这些细胞中糖原颗粒过度积累, 肺泡内的表面活性物质和脂质合成分泌受阻, 导致新生小鼠出生后肺泡扩张障碍、呼吸功能不全。在小鼠胚胎第18.5天时, RCN3-KO胎鼠中肺泡表面活性物质A和D(pulmonary surfactant A/D, SP-A/D)及磷脂转运蛋白(ATP binding cassette subfamily A member 3, ABCA3)表达降低, 板层小体数目减少, 磷脂酰胆碱显著降低。此外, RCN3-KO胎鼠肺中RCN1和RCN2的mRNA水平及蛋白表达水平无显著变化, 提示RCN1和RCN2不能弥补RCN3缺失导致的肺发育异常。以上结果表明, RCN3在肺围产期肺泡发育中, 特别是肺泡二型上皮细胞成熟过程中起着决定性的作用。

RCN3不仅参与肺发育过程, 还参与原始卵泡发育。原始卵泡形成代表了胚胎生殖器官发育的关键阶段, 而原始卵泡向初级卵泡的转变决定了雌性动物是否会发情或排卵。Xu等^[10]通过蛋白质表达谱分析发现, 在猪妊娠期g55阶段, RCN3蛋白表达比g90阶段显著升高。另外, 近年研究发现, RCN3是出生后肌腱发育关键调节因子: RCN3通过调节胶原纤维生成和肌腱细胞成熟参与肌腱发育, 肌腱中RCN3缺失可导致肌腱厚度降低、肌腱细胞成熟异常和机械性能下降^[11]。

2.2 生理代谢、心脑血管疾病与肿瘤

迄今一系列针对疾病模型的生物信息学与分子生物学研究发现, RCN3参与多种生理代谢过程以及心脑血管疾病和肿瘤发病过程。早期Tsuji等^[5]发现人RCN3蛋白严格定位于内质网中, 具有钙离子结合活性, 且可以选择性地与成对碱性氨基酸裂解酶PACE4的前体蛋白(pro-paired basic amino acid-cleaving enzyme 4, pro-PACE4)发生瞬时相互作用, 但不与成熟PACE4相互作用; 在细胞内加入钙离子抑制剂可导致细胞内pro-PACE4-RCN3蛋白复合体积聚, 并抑制PACE4的成熟; RCN3蛋白和pro-PACE4在细胞内共表达可以增强PACE4的生物合成和分泌; 以上结果表明, RCN3作为分子伴侣以依赖钙离子的方式参与蛋白质成熟。其次, 谷氨酰胺酶在高等生物中活性较高, 参与能量代谢、氨转运和神经递质谷氨酸的再生。有研究通过对谷氨酰胺酶缺失小鼠大脑中的蛋白质进行质谱分析发现, 与野生小鼠相比, 其RCN3蛋白表达显著降低^[12]。另外, 一项对猪背阔肌和比目鱼肌的单细胞RNA测序分析表明肌细胞分为RCN3⁺卫星细胞(satellite cells, SCs)等六大类, 且RCN3⁺SCs为类间充质干

细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 子集, 参与嘧啶和 GDP 岩藻糖的生物合成过程^[13]。

在生理代谢方面, Loomis 等^[14]通过全基因组关联分析 (genome-wide association study, GWAS) 对约 1 万例白人和黑人研究发现, RCN3 基因中一个新型错义突变 (D262E) 与果糖胺和总糖化白蛋白水平显著相关, 而果糖胺是评价糖尿病控制情况的一个良好指标。He 等^[15]对欧洲、非洲、东亚等人群进行遗传关联分析 (约 6 万例) 发现, RCN3 的低频、罕见突变与血压变化密切相关。Zhang 等^[16]对苯并芘 (benzopyrene, BaP) 诱导的小鼠精子 DNA 损伤模型 (100 mg·kg⁻¹·d⁻¹, 60 d) 进行转录组和蛋白质组学分析发现, RCN3 的表达显著降低。Liu 等^[17]对 6 组瘢痕和正常皮肤组织进行高分辨率蛋白质组学分析发现, RCN3 在瘢痕组织中显著高表达。一项回顾性观察性研究发现, 结缔组织病相关性肺疾病 (connective tissue disease-associated interstitial lung disease, CTD-ILD) 患者血清中 RCN3 水平显著升高, 且与疾病严重程度呈正相关, 提示血清 RCN3 水平可能是诊断 CTD-ILD 的潜在生物标志物^[18]。

在心脑血管疾病方面, Li 等^[19]通过 RNA 表达谱测序发现, 创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 小鼠模型额叶中 RCN3 显著高表达, 与 TBI 患者外周血单核细胞中的 RCN3 变化趋势一致; 同时, RCN3 受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线下面积 (area under ROC, AUC) 为 0.962, 提示 RCN3 可作为预测 TBI 进展的潜在标志分子。Choi 等^[20]通过液相色谱-质谱联用检测发现, RCN3 能够作为潜在生物标志物预测间充质干细胞治疗阿尔茨海默病的效果。

在肿瘤方面, 一项基于肿瘤基因组图谱 (The Cancer Genome Atlas, TCGA) 的生物信息学泛癌 (pan-cancer) 分析研究发现, RCN3 在多种肿瘤中高表达, 与不良预后、较差总生存期 (overall survival, OS) 密切相关; 且其与免疫抑制基因的相关性提示, RCN3 可以作为预测癌症免疫治疗效果的潜在分子标志物^[21]。He 等^[22]发现, RCN3 是预测恶性胶质瘤不良生存率的标志分子, 且敲降 RCN3 可能通过抑制细胞增殖、神经球发生和胶质瘤干细胞自我更新, 从而提高胶质瘤小鼠模型的生存率。Zhou 等^[23]通过单细胞多组学测序发现, RCN3 可作为结肠癌预后差的生物标志物。Cai 等^[24]研究发现, RCN3 能够促进食管鳞状细胞癌的发展并提高癌细胞顺铂抗性。

3 RCN3与肺损伤修复相关疾病

肺损伤与修复失调在常见急、慢性呼吸疾病发生发展过程中起到重要作用, 包括急性肺损伤、急性呼吸窘迫综合征、肺间质纤维化和慢性阻塞性肺疾病。越来越多的研究表明, RCN3 与肺损伤修复调控密切相关, 参与这些疾病的发生发展过程, 并与临床预后密切相关。

3.1 RCN3与肺间质纤维化

特发性肺间质纤维化 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 是一种慢性、进行性肺疾病, 其特征是细胞外基质异常沉积, 导致广泛的肺重塑。由于致病机制不清, 尚缺乏有效的治疗措施, 诊断后生存期仅 2~5 年。吡非尼酮和尼达尼布作为目前治疗纤维化的两种抗纤维化药物, 虽然可减缓 IPF 患者的疾病进展, 但个体差异大, 疗效不一致, 且未能降低死亡率。引起 IPF 的原因很多, 目前已知的主要原因是肺泡上皮细胞受到反复损伤刺激, 启动应激反应且伴随各种促炎因子和促纤维化介质的释放, 导致肺成纤维细胞被激活, 从而启动异常的损伤修复过程, 表现为进行性和不可逆的肺间质纤维化。RCN3 在肺损伤后肺泡上皮细胞和成纤维细胞的应激和调控过程中均发挥重要作用。

3.1.1 肺泡上皮细胞RCN3与肺纤维化

肺泡上皮细胞 RCN3 在 IPF 发生和发展过程中发挥重要调控作用^[25]。首先, 博来霉素 (0.045 U/只) 气管给药建立 C57BL/6J 小鼠肺纤维化模型, 发现与对照组 (生理盐水) 相比, 其肺泡上皮细胞 RCN3 在博来霉素诱导第 7 天后表达显著上调。然后, 通过 Cre/Loxp 方法培育肺泡二型上皮细胞特异性条件敲除 RCN3 转基因小鼠 (CKO-AECII-RCN3), 对成年期 (两月龄) CKO-AECII-RCN3 小鼠喂食多西环素 8 周 (四月龄) 诱导特异性 RCN3 基因敲除, 发现其肺部结构和功能与对照组无异, 但表现出更高的死亡率 (40% 和 85% 的小鼠分别在博来霉素诱导后 14 和 21 d 死亡), 而 95% 的对照小鼠在博来霉素诱导后 21 d 存活。进一步研究发现, CKO-AECII-RCN3 小鼠较对照组小鼠肺部表现出增强的间质性纤维化, 且这种形态学上加重的肺纤维化与纤维化相关基因的高表达一致, 这些基因包括 α -肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、I 型胶原蛋白 $\alpha 1$ (collagen I $\alpha 1$) 和 I 型胶原蛋白 $\alpha 2$ (collagen I $\alpha 2$), 以及转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF $\beta 1$) 和结缔组织生长因子 (connective tissue growth

factor, CTGF)。同时, 与对照组小鼠对比, 博来霉素诱导 CKO-AECII-RCN3 小鼠肺部发生增强的炎症反应和细胞凋亡, 提示在肺泡二型上皮细胞中 RCN3 在博来霉素诱导时通过表达上调发挥保护作用, 抑制损伤修复失调导致的肺纤维化。在体外使用博来霉素处理多西环素诱导后的 CKO-AECII-RCN3 小鼠的肺泡二型上皮细胞, 发现葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78kD, GRP78) 和 X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1) 的表达显著升高, 提示 RCN3 缺失增强了肺泡二型上皮细胞对内质网应激的易感性。同时, 博来霉素处理小鼠肺泡上皮细胞 MLE15 后, 与对照组相比, RCN3 敲降组凋亡反应加剧且 GRP78 和 XBP1 的 mRNA 水平显著升高, 提示 RCN3 缺失导致肺泡二型上皮细胞对内质网应激和细胞凋亡更加敏感, 进而促进肺泡上皮细胞损伤, 加剧肺纤维化。此外, RCN3 缺失的肺泡上皮细胞 MLE15 表现出显著钝化的伤口愈合能力。以上结果提示, RCN3 在肺泡上皮细胞中的缺失提高了博来霉素诱导肺纤维化的易感性——肺泡上皮细胞 RCN3 主要通过抑制内质网应激诱导的细胞凋亡来拮抗博来霉素诱导的肺纤维化。

3.1.2 肺成纤维细胞RCN3与肺纤维化

鉴于 RCN3 在成纤维细胞中高表达, 而成纤维细胞的异常持续激活是导致肺纤维化的核心因素, 因此本节阐述成纤维细胞中 RCN3 在肺纤维化中的作用和调控机制^[26]。分析临床收集的肺纤维化患者肺组织标本发现, 与正常肺组织对比, 肺纤维化患者肺组织中 α -SMA 阳性区域显著高表达 RCN3 蛋白, 且主要分布在激活的成纤维细胞中, 而正常肺组织中 RCN3 蛋白阳性区域主要分布于肺泡, 特别是肺泡二型上皮细胞中; 且敲除肺纤维化患者肺组织原代分离成纤维细胞中的 RCN3 基因后, α -SMA 和 I 型胶原蛋白的表达下调, 提示 RCN3 在成纤维细胞激活过程中起关键作用。在成纤维细胞特异性基因敲除小鼠 (CKO-FSP-RCN3) 中, 博来霉素诱导的肺纤维化显著减轻, 表现为肺部纤维化病灶和肺实质形成减少, 肺组织内总胶原蛋白含量减少, α -SMA、I 型胶原蛋白和细胞周期蛋白 D1 的蛋白水平及转录水平均下降, 且小鼠肺功能障碍得到显著缓解, 提示 RCN3 通过促进成纤维细胞活化推动纤维化进程。

进一步研究发现, 肺损伤修复中的重要调控细胞因子 TGF β 1 可增强肺成纤维细胞中 RCN3 和

GRP78 的表达; 内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸酯 (4-phenylbutyric acid, 4-PBA) 显著抑制 TGF β 1 诱导的 RCN3 和 GRP78 表达上调, 表明 TGF β 1 诱导肺成纤维细胞 RCN3 表达上调与内质网应激相关。敲降成纤维细胞中的 RCN3 发现, TGF β 1 诱导的 α -SMA、I 型胶原蛋白和细胞周期蛋白 D1 表达被抑制, 提示 RCN3 表达水平下调能够抑制 TGF β 1 对成纤维细胞的激活作用。细胞增殖实验也表明, RCN3 表达下调显著抑制了 TGF β 1 对成纤维细胞增殖和细胞迁移修复的激活。以上结果提示, RCN3 表达上调在 TGF β 1 诱导的肺成纤维细胞激活过程中至关重要。过表达 RCN3 可诱导人正常肺成纤维细胞 (NHLF) 活化, 且吡非尼酮与尼达尼布能够抑制这种活化; 同时, 过表达 RCN3 能够抑制两种抗纤维化药物对 TGF β 1 的拮抗作用, 提示 RCN3 上调可以拮抗吡非尼酮与尼达尼布对肺间质疾病的治疗效果。

转录组测序分析发现, 敲降成纤维细胞 RCN3 后, TGF β I 型受体 (TGF β R1) 表达显著下调, 提示 RCN3 在 TGF β 信号转导中发挥潜在调控作用。进一步研究发现, 敲降 RCN3 抑制 TGF β 1 诱导的 Smad3 (TGF β 经典型通路)、AKT 和 Stat3 (TGF β 非经典型通路) 的磷酸化; 过表达 RCN3 促进 Smad3 磷酸化, 而 TGF β R1 抑制剂 LY2109761 能够抑制这种激活现象。以上结果提示, RCN3 可能通过调节 TGF β R1 表达激活 TGF β 信号通路, 进而促进 TGF β 1 诱导的 (损伤修复中) 成纤维细胞的过度激活。敲降 RCN3 显著抑制胞浆蛋白和细胞膜上的 TGF β R1 蛋白表达, 而过表达 RCN3 可促进 TGF β R1 转录, 提示 RCN3 参与 TGF β R1 的转录水平调控。综上, RCN3 通过 TGF β 1-TGF β R1-RCN3 正反馈环持续激活 TGF β 信号通路。

通过生物素标记 (biotin identification, BioID) 发现, TGF β 1 可诱导 EZH2 (enhancer of zeste homolog 2, 表观遗传甲基化转移酶) 与 RCN3 相互作用, 且生物膜干涉实验 (bio-layer interferometry, BLI) 评估两者亲和力解离常数 (KD) 为 1.54 μ mol/L, 提示 RCN3 与 EZH2 直接相互作用, 且存在浓度依赖性。免疫荧光实验表明, 敲降 RCN3 后细胞核内 EZH2 表达水平显著升高, 而过表达 RCN3 后细胞核内 EZH2 表达水平降低; 此外, TGF β 1 刺激和过表达 RCN3 均促进 RCN3-EZH2 在细胞质中的共定位。进一步研究发现, 敲降或过表达 RCN3 后, TGF β R1 启动子区组蛋白 3 第 27 位赖氨酸 3 甲基化 (H3K27me3)

水平显著降低或升高；同时，染色质免疫共沉淀实验 (chromatin immunoprecipitation assay, ChIP) 证实，敲降 RCN3 后 H3K27me3 及 EZH2 水平显著降低。以上结果提示，细胞质内 RCN3-EZH2 互作抑制细胞核内 EZH2 表达，同时通过减弱 H3K27me3 抑制效应促进 TGF β R1 转录，导致细胞膜及胞质中 TGF β R1 蛋白增多，从而持续激活 TGF β 信号通路。

综上所述，肺损伤后 RCN3 表达上调，与胞质内 EZH2 的相互作用增强，通过减弱 H3me3K27 抑制效应促进 TGF β R1 表达，进而持续激活 TGF β 信号通路，从而激活成纤维细胞，促进细胞增殖和迁移修复，导致肺纤维化加剧。以上结果揭示了 TGF β 1-TGF β R1-RCN3 正反馈环在肺纤维化发病机制中的决定性作用，并为 TGF β 信号通路引入一种新的调控机制。由于肺损伤修复过程包括肺泡上皮细胞损伤、肺成纤维细胞激活以及损伤修复和间质重塑，RCN3 可能通过在上皮细胞和成纤维细胞中发挥不同的作用来促进整个修复过程。然而，IPF 患者中异常的纤维化重塑很大程度上是由于成纤维细胞的过度激活导致的，因此肺成纤维细胞中 RCN3 的上调可能是转向不平衡间质重塑的重要触发因素。靶向 RCN3 的基因治疗可能是未来治疗肺纤维化、改善肺功能障碍、缓解疾病进展的一种新方法。

3.2 RCN3与急性呼吸窘迫综合征

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种由肺内或肺外原因引起的一种临床综合征，临床表现以顽固性低氧血症为显著特征，具有较高的致死率，预后差。在急性肺损伤后正常修复过程中，激活的肺泡二型上皮细胞通过分泌细胞因子促进成纤维细胞增殖和活化，RCN3 在肺损伤急性期发挥调控作用^[27]。

首先，脂多糖 (10 mg/kg) 气管给药建立 C57BL/6J 小鼠肺损伤模型发现，其肺泡上皮细胞中的 RCN3 在脂多糖诱导 24 h 后表达显著上调。在体外，低浓度脂多糖 (0.1、0.5 μ g/mL) 刺激小鼠肺泡上皮细胞 MLE12 也能促进 RCN3 和炎症通路相关因子 NF- κ B (nuclear factor kappa-B) p65 表达上调；而高浓度脂多糖 (10、20 μ g/mL) 诱导后，RCN3 和 NF- κ B p65 表达无改变，GRP78 表达上调，提示肺泡上皮细胞 RCN3 可能通过 NF- κ B 信号通路而非内质网应激调控肺损伤后炎症反应。进一步在肺上皮细胞特异性 RCN3 基因敲除小鼠 (CKO-AECII-RCN3) 中发现，RCN3 缺失可减轻脂多糖诱导的急性肺损伤，即肺

泡形态学破坏、炎症细胞浸润和肺水肿均减轻。同时，CKO-AECII-RCN3 小鼠肺泡灌洗液中白介素 1 β (interleukin-1 beta, IL-1 β) 分泌急剧下降，且肺组织中 NF- κ B p65 表达显著降低，提示肺泡上皮缺失 RCN3 能够减缓脂多糖诱导的急性肺损伤。进一步研究发现，CKO-AECII-RCN3 小鼠肺组织中 NF- κ B 下游调控基因包括 IL-1 β 、白介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor, TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein, MCP1) 和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3)，转录水平均下调，提示 RCN3 缺失可能减轻了 NLRP3 介导的炎症反应。体外实验也证实，敲降 RCN3 能够抑制低浓度脂多糖 (0.5 μ g/mL) 诱导的 MLE12 细胞的炎症反应、NF- κ B p65 的磷酸化以及 NLRP3 的表达，但对 GRP78 表达无影响。此外，为探究 RCN3 在脓毒症引起的急性肺损伤 /ARDS 中是否也有调控作用，通过腹腔注射相同剂量的脂多糖建立脓毒症模型发现，CKO-AECII-RCN3 与野生型小鼠表现为无差异肺损伤和炎症反应，提示 RCN3 在脂多糖诱导的肺泡上皮模型的炎症反应中发挥调控作用，而在脓毒症导致的肺泡上皮屏障失调中无作用。以上结果提示，在肺泡上皮细胞中，RCN3 在脂多糖应激后发挥正向调控作用——通过介导 NF- κ B/NLRP3/炎症小体信号轴促进肺泡炎症反应和肺损伤。

3.3 RCN3与慢性阻塞性肺疾病

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 简称慢阻肺，是一种常见的呼吸系统慢性疾病，在全球范围内患病率和死亡率都很高，并呈明显上升趋势^[28]。COPD 的病理改变主要表现为慢性支气管炎和肺气肿，而肺气肿发生的分子机制尚未完全阐明，目前研究显示肺组织修复功能障碍是其重要的发病机制之一，RCN3 在肺气肿发生发展过程中发挥调控作用^[29]。

研究发现 COPD 患者肺组织中 RCN3 显著高表达，并与患者肺功能指标 FEV1%pred 呈负相关，提示 RCN3 可能参与 COPD 的发生。通过慢性 (6 个月) 香烟烟雾暴露 (cigarette smoking, CS) 诱导小鼠 COPD 模型发现，CS 组小鼠肺组织中 RCN3 表达显著升高，且 GRP78 和细胞凋亡标志分子 Caspase3 表达上调。同时，通过猪胰蛋白酶 (porcine pancreatic elastase, PPE, 0.3 U) 气管给药建立 C57BL/6J 小鼠肺气肿模型发现，PPE 诱导 4 周后小鼠肺组织中 RCN3 表达显著升高，且 GRP78、Caspase3、I 型胶原蛋

白和基质金属蛋白酶9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 表达上调。以上结果提示, RCN3 在 CS (轻度肺气肿) 和 PPE (中重度肺气肿) 模型中的表达均上调, 可能与内质网应激诱发的细胞凋亡相关。进一步研究发现, 与对照小鼠相比, PPE 气管给药仅诱导 CKO-AECII-RCN3 小鼠产生减轻的肺气肿表型: 肺泡扩张程度较低, 肺泡壁破损程度较轻, 肺泡壁变薄, 肺泡间隔断裂融合形成的肺大疱的数量较少, 炎症细胞浸润较少, 且肺组织中 GRP78、I 型胶原蛋白和 MMP-9 表达显著下调。提示肺泡上皮细胞 RCN3 可能通过诱导 MMP 表达促进肺气肿的发生, 而抑制 AECII 中 RCN3 的表达对减轻 PPE 诱导的肺气肿是有益的, 为肺气肿治疗提供了新靶点。

表 1 对 RCN3 在肺损伤修复疾病中的主要分子机制进行了总结。

4 展望

综上所述, RCN3 是一个在肺发育、生理代谢过程、成年肺损伤修复相关疾病、心脑血管疾病及多种肿瘤中均发挥调控作用的蛋白。在肺成纤维细胞中, TGF β 1-TGF β R1-RCN3 正反馈环在肺纤维化发病机制中具有决定性作用, 且是 TGF β 信号通路的一种新型调控机制, 因此靶向 RCN3 的基因治疗可能是未来治疗肺纤维化、改善肺功能障碍、缓解疾病进展的一种新方法。目前还需要进一步探究 RCN3 在不同疾病中的作用机制, 以期为新药研发及临床治疗提供更多依据。

表1 RCN3在肺损伤修复疾病中的主要分子机制

疾病	不同细胞类型中RCN3表达	主要分子机制	文献
肺纤维化	肺泡上皮细胞中RCN3表达升高	减轻内质网应激诱导的细胞凋亡来拮抗博来霉素诱导的肺纤维化	[25]
	肺成纤维细胞中RCN3表达升高	RCN3与EZH2相互作用增强, 通过减弱H3me3K27抑制效应促进TGF β R1表达, 进而持续激活TGF β 信号通路, 促进肺纤维化	[26]
急性呼吸窘迫综合征	肺泡上皮细胞中RCN3表达升高	介导NF- κ B/NLRP3/炎症小体信号轴, 促进肺泡炎症反应和肺损伤	[27]
慢性阻塞性肺疾病	肺组织中RCN3表达升高	可能通过诱导内质网应激和基质金属蛋白酶表达促进肺气肿的发生	[29]

[参 考 文 献]

- [1] Honoré B. The rapidly expanding CREC protein family: members, localization, function, and role in disease. *Bioessays*, 2009, 31: 262-77
- [2] Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science*, 2015, 347: 1260419
- [3] Karlsson M, Zhang C, Méar L, et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. *Sci Adv*, 2021, 7: eabh2169
- [4] Jin J, Li Y, Ren J, et al. Neonatal respiratory failure with retarded perinatal lung maturation in mice caused by reticulocalbin 3 disruption. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2016, 54: 410-23
- [5] Tsuji A, Kikuchi Y, Sato Y, et al. A proteomic approach reveals transient association of reticulocalbin-3, a novel member of the CREC family, with the precursor of subtilisin-like proprotein convertase, PACE4. *Biochem J*, 2006, 396: 51-9
- [6] Feng H, Chen L, Wang Q, et al. Calumenin-15 facilitates filopodia formation by promoting TGF- β superfamily cytokine GDF-15 transcription. *Cell Death Dis*, 2013, 4: e870
- [7] Chen L, Xu S, Liu L, et al. Cab45S inhibits the ER stress-induced IRE1-JNK pathway and apoptosis via GRP78/BiP. *Cell Death Dis*, 2014, 5: e1219
- [8] Gronborg M, Kristiansen TZ, Iwahori A, et al. Biomarker discovery from pancreatic cancer secretome using a differential proteomic approach. *Mol Cell Proteom*, 2006, 5: 157-71
- [9] Cooper CR, Bianca G, Freddie P, et al. Novel surface expression of reticulocalbin 1 on bone endothelial cells and human prostate cancer cells is regulated by TNF- α . *J Cell Biochem*, 2010, 104: 2298-309
- [10] Xu M, Che L, Yang Z, et al. Proteomic analysis of fetal ovaries reveals that primordial follicle formation and transition are differentially regulated. *Biomed Res Int*, 2017, 69: 1-11
- [11] Park N, Shetye S, Bogush I, et al. Reticulocalbin 3 is involved in postnatal tendon development by regulating collagen fibrillogenesis and cellular maturation. *Sci Rep*, 2021, 11: 10868
- [12] Bae N, Wang Y, Li L, et al. Network of brain protein level changes in glutaminase deficient fetal mice. *J Proteomics*,

- 2013, 80: 236-49
- [13] Ma L, Meng Y, An Y, et al. Single-cell RNA-seq reveals novel interaction between muscle satellite cells and fibro-adipogenic progenitors mediated with FGF7 signalling. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2024, 15: 1388-403
- [14] Loomis SJ, Li M, Maruthur NM, et al. Genome-wide association study of serum fructosamine and glycated albumin in adults without diagnosed diabetes: results from the atherosclerosis risk in communities study. *Diabetes*, 2018, 67: 1684-96
- [15] He KY, Kelly TN, Wang H, et al. Rare coding variants in RCN3 are associated with blood pressure. *BMC Genomics*, 2022, 23: 148
- [16] Zhang C, Ma Y, Liu W, et al. Transcriptomic and proteomic features of a mouse model of sperm DNA damage induced by benzo(a)pyrene. *Reprod Toxicol*, 2024, 126: 108596
- [17] Liu J, Yang C, Zhang H, et al. Quantitative proteomics approach reveals novel biomarkers and pathological mechanism of keloid. *Proteomics Clin Appl*, 2022, 16: e2100127
- [18] Ding F, Yang L, Wang Y, et al. Serum Rcn3 level is a potential diagnostic biomarker for connective tissue disease-associated interstitial lung disease and reflects the severity of pulmonary function. *BMC Pulm Med*, 2023, 23: 68
- [19] Li Y, Li N, Luan C, et al. Identification of novel key markers that are induced during traumatic brain injury in mice. *Peer J*, 2023, 11: e15981
- [20] Choi Y, Shin S, Son HJ, et al. Identification of potential biomarkers related to mesenchymal stem cell response in patients with Alzheimer's disease. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14: 178
- [21] Ding J, Meng Y, Han Z, et al. Pan-cancer analysis of the oncogenic and immunological role of RCN3: a potential biomarker for prognosis and immunotherapy. *Front Oncol*, 2022, 12: 811567
- [22] He Y, Alejo S, Johnson J. et al. Reticulocalbin 3 is a novel mediator of glioblastoma progression. *Cancers*, 2023, 15: 2008
- [23] Zhou Y, Bian S, Zhou X, et al. Single-cell multiomics sequencing reveals prevalent genomic alterations in tumor stromal cells of human colorectal cancer. *Cancer Cell*, 2020, 38: 818-28
- [24] Cai R, Wang P, Zhao X, et al. Reticulocalbin3: a Ca²⁺ homeostasis regulator that promotes esophageal squamous cell carcinoma progression and cisplatin resistance. *Cancer Sci*, 2022, 113: 3593-607
- [25] Jin J, Shi X, Li Y, et al. Reticulocalbin 3 deficiency in alveolar epithelium exacerbated bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2018, 59: 320-3
- [26] Wu M, Wang Z, Shi X, et al. TGFβ1-RCN3-TGFBR1 loop facilitates pulmonary fibrosis by orchestrating fibroblast activation. *Respir Res*, 2023, 24: 222
- [27] Shi X, An X, Yang L, et al. Reticulocalbin 3 deficiency in alveolar epithelium attenuated LPS-induced ALI via NF-κB signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2021, 320: L627-39
- [28] Singh D, Agusti A, Anzueto A, et al. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive lung disease: the GOLD science committee report 2019. *Eur Respir J*, 2019, 53: 1900164
- [29] Zhang Q, Wang T, Jin J, et al. Rcn3 suppression was responsible for partial relief of emphysema as shown by specific type II alveolar epithelial cell Rcn3 CKO mouse model. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*, 2021, 16: 147-58