

钙腔蛋白的生物学功能及其与心血管疾病关系

杨吉猛 王 晖

【摘要】 钙腔蛋白在内质网具有分子伴侣功能,能抑制心肌肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶和 ryanodine 受体 2 活性及肝脏凝血因子 II、VII、IX、X 的合成,从而与 Ca^{2+} 稳态、心肌兴奋-收缩偶联及凝血系统的调控紧密相关;钙腔蛋白还可被分泌至细胞外参与动脉粥样硬化的发生、斑块钙化和血栓形成的病理进程。该文针对钙腔蛋白及其与心血管疾病关系进行综述,以期对心血管疾病治疗提供新途径。

【关键词】 钙腔蛋白;凝血;动脉硬化

doi:10.3969/j.issn.1673-6583.2014.04.004

钙腔蛋白(calumenin)是新近发现的一种位于哺乳动物体内的低亲和力钙结合蛋白,在内质网/肌浆网和高尔基体均有表达,属于 CREC 家族;其成员包括 reticulocalbin、ERC-55、reticulocalbin-3、Cab45 和钙腔蛋白,分别由 RCN1、RCN2、RCN3、SDF4 和钙腔蛋白编码,均具有独特的螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix)多重 EF-hand 结构^[1-2]。钙腔蛋白在内质网具分子伴侣功能,参与调控信号转导并可作为分泌蛋白在细胞外参与疾病的发展进程。本文就钙腔蛋白的结构、分布、生物学功能及其相关的心血管疾病的研究进展进行综述。

1 钙腔蛋白结构

钙腔蛋白由 315 个氨基酸组成,相对分子质量 37 000,其氨基末端有 19 个氨基酸序列,羧基末端为 4 个独特的内质网滞留信号氨基酸序列 HDEF。通过变异剪接,钙腔蛋白产生 2 个变异剪接体,钙腔蛋白-1 和钙腔蛋白-2 均由钙腔蛋白基因编码。

小鼠钙腔蛋白基因位于 6 号染色体,由 6 个外显子和 5 个内含子组成。钙腔蛋白-1 和 2 变异剪接体的氨基酸序列具有 92%的一致性和 95%同源性,变异发生在第 1 和第 2 个 EF-hand 结构上^[3-4]。

人类钙腔蛋白基因位于 7q32 染色体,由 7 个外显子组成。普通人群已发现该基因至少有 23 个单

核苷酸多态性(重复、插入或缺失);多态性位于基因的 3'-非翻译区,可导致所编码的钙腔蛋白活性发生改变。

2 在组织和细胞中的分布

钙腔蛋白最初在小鼠心脏组织中发现。近来研究证实,钙腔蛋白-1/2 剪接体在神经肌肉和心脏等组织中均有表达,功能亦具有多样性。钙腔蛋白在心脏中高表达,在成年小鼠心肌细胞中表达较胚胎期和新生期明显降低,并维持在相对较低的稳态水平^[5]。钙腔蛋白在大脑多个区域也相对高表达,同样,在发育的早期阶段最高,成年期呈相对低表达^[6]。该表达模式与内质网中其他分子伴侣蛋白,如钙网蛋白、糖调节蛋白 78、糖调节蛋白 94、蛋白质二硫化物异构酶和内质网蛋白 57 相似。

在亚细胞水平,钙腔蛋白被确定在体细胞多个区域沿内质网和部分高尔基体集中或弥漫分布。兔骨骼肌细胞分析显示,钙腔蛋白大量出现在骨骼肌肌浆网连接段^[7]。在心肌细胞和 HL-1 细胞中,钙腔蛋白染色清楚显示其位于心肌细胞沿 Z 线和纵轴处。

3 生物学功能

钙腔蛋白能显著抑制内质网/肌浆网上膜蛋白维生素 K 环氧化物还原酶(VKOR)、 γ -羧化酶及 ryanodine 受体(RyR)和 Ca^{2+} -ATP 酶(SERCA2)等蛋白酶活性;同时,钙腔蛋白也可被释放到细胞外发挥生物学效应。

3.1 在兴奋-收缩偶联中的作用

心肌、骨骼肌内质网/肌浆网中 Ca^{2+} 转运功能,是兴奋-收缩偶联的中心环节。免疫细胞化学分析

基金项目:江苏省自然科学基金(BK2012648)

作者单位:210029 南京医科大学第一附属医院心脏科(杨吉猛);215228 苏州,江苏盛泽医院心脏科(王 晖)

通信作者:王 晖,Email: wangnuo@188.com

发现,钙腔蛋白与 SERCA2a 和钙释放通道 RyR2 在心肌内质网/肌浆网中共表达,并与心肌肌浆网钙循环紧密相关。通过与配体的结合,钙腔蛋白能抑制肌浆网 SERCA2a 和钙释放通道 RyR2 活性,从而调节心肌细胞内钙浓度。在 Ca^{2+} 浓度为毫摩尔水平时,钙腔蛋白 -2 即可与 RyR 结合,直接调控钙释放。钙腔蛋白也是心肌细胞 SERCA2a 的重要调节因子,可通过抑制 SERCA2 活性抑制钙循环。在心肌细胞中,封闭钙腔蛋白基因而不改变其他钙调节相关蛋白的表达水平可以促进钙循环,增加 SERCA2 的活性,改变 SERCA2 对钙的亲和力,提高大鼠心肌细胞钙瞬变幅度、缩短 Ca^{2+} 达峰时间 and 减少舒张期 Ca^{2+} 降低 50% 时程^[8]。而钙腔蛋白在心肌、骨骼肌细胞中过表达,则可减少去极化诱导的肌浆网 Ca^{2+} 释放和导致钙容量增加^[9]。

3.2 对维生素 K 依赖性 γ -羧基化的调控

还原型维生素 K 是维生素 K 依赖性凝血因子 γ -羧基化的必需辅助因子。凝血因子 II、VII、IX、X 前体以及骨钙素的氨基末端谷氨酸需经 γ -谷氨酰羧化酶羧化后才具有生物活性,进而在 Ca^{2+} 参与下,发生级联血液凝固反应。

凝血因子 II、VII、IX、X 的 γ -羧基化在细胞内质网中完成,维生素 K 循环中无活性的氧化型维生素 K,需经 VKOR 还原为有活性的还原型维生素 K,才能使维生素 K 依赖性凝血因子不断活化。研究证实,钙腔蛋白是 VKOR 的调控蛋白,通过抑制后者的活性来减少维生素 K 依赖性的 γ -羧基化,从而阻断凝血因子 II、VII、IX、X 和基质 GLA 蛋白的激活^[10]。

3.3 细胞外作用

与 CREC 家族其他成员不同,钙腔蛋白-1/2 羧基末端包含一个 HDEF 序列而不是 HDEL。由于 HDEF 序列不是有效的内质网滞留信号,因此钙腔蛋白也可作为分泌性蛋白分泌到细胞外发挥生物学效应,参与多种疾病的发病机制。Vorum 等^[11]首先观察到人类钙腔蛋白可由内质网分泌至细胞外。血清淀粉样 P 成分为首个被确认的钙腔蛋白配体,提示钙腔蛋白可能参与免疫保护反应以及淀粉样变性的病理过程^[12]。活化后的血小板也可释放出钙腔蛋白,参与动脉粥样硬化斑块和血栓及肺动脉高压的形成^[13-14]。但其分泌过程及调控机制尚不清楚。Wang 等^[15]利用实时动态系统观察了钙

腔蛋白-1/2 进入内膜系统后的胞内转运和分泌过程。实验结果显示进入分泌途径的钙腔蛋白-1/2,一部分直接转运到细胞边缘并立即分泌到细胞外,而另一部分会聚集在细胞伪足尖端,再批量分泌。

4 钙腔蛋白与心血管疾病

4.1 冠状动脉粥样硬化和血栓形成

血小板活化是动脉粥样硬化发生和血栓形成的重要发病机制之一。研究发现经凝血酶等激活后,血小板可释放其胞质中的钙腔蛋白,作为分泌性蛋白,钙腔蛋白可能通过自分泌和旁分泌方式参与粥样硬化斑块和血栓形成的病理机制。免疫组化分析显示,在人类有动脉粥样硬化斑块的血管壁可检测到钙腔蛋白存在,而正常血管段则未发现钙腔蛋白的表达^[13]。进一步的研究发现,动脉粥样硬化斑块中的钙腔蛋白可与同样由活化血小板所释放的血小板反应素-1 组成复合物,参与纤维凝块的形成^[16],提示钙腔蛋白可能是血管内血栓形成的重要条件因素。另外,双向聚丙烯酰胺凝胶电泳发现,钙腔蛋白可影响成纤维细胞的表型,促其转化为肌成纤维细胞,参与动脉粥样硬化病灶的形成^[17]。临床研究也证实,钙腔蛋白基因多态性与急性冠脉综合征短期预后相关。钙腔蛋白 A29809G 等位基因可显著降低心血管事件的发生率^[18]。

4.2 冠状动脉钙化

粥样硬化动脉钙化是一个受基因调控的主动性代谢过程,受基质 Gla 蛋白、骨保护蛋白、端粒、碱性磷酸酶、I 型胶原及骨形态发生蛋白-2 等基因/蛋白的调控^[19]。基质 Gla 蛋白是维生素 K 依赖性蛋白。最初由牛骨骼中分离出来,其活化需要 γ -羧基化参与,主要分布在软骨、骨髓和动脉壁。在血管壁,基质 Gla 蛋白由血管平滑肌细胞、巨噬细胞和内皮细胞合成,能阻止骨形态发生蛋白-2 对血管平滑肌细胞向成骨细胞的转化,是软骨内骨形成和血管内异位钙化的重要调节因子,能够保护血管免于钙化。因此,在缺乏基质 Gla 蛋白大鼠主动脉,可发生完全骨化^[20]。

Krüger 等^[21]研究发现,华法林能诱导血管钙化的发生,而钙腔蛋白和华法林作用位点均定位于 VKOR。因此,动脉硬化斑块中的钙腔蛋白可通过阻滞维生素 K 依赖性 γ -羧基化,即基质 Gla 蛋白活性,促进血管的钙化。Hernandez-Romero 等^[18]的研究表明,钙腔蛋白 A29809G 等位基因携带者冠

状动脉钙化风险和心血管事件发生率显著降低。

4.3 扩张型心肌病

扩张型心肌病是导致心力衰竭和猝死的重要原因。约 30% 的患者具有遗传变异,主要由编码心肌细胞的细胞骨架蛋白和肌小节等蛋白的基因发生突变引起。通过对候选基因筛查和连锁分析,已成功定位了 20 余个基因位点,并不断有新的基因位点被发现及证实。Grzeskowiak 等^[22]对 10 例中度充血性心力衰竭的扩张型心肌病患者心肌活检组织进行了一次大规模基因表达谱分析,结果发现,与健康捐助者比较,钙腔蛋白基因表达显著增加。但钙腔蛋白在发病中的具体作用机制还有待于进一步研究。

4.4 心血管病抗凝治疗

钙腔蛋白对维持凝血系统的正常稳态具关键性调控作用。钙腔蛋白、VKOR 和 γ -羧基化系统共表达于肝细胞内质网。钙腔蛋白表达增加可抑制 VKOR 和 γ -羧化酶活性及凝血因子的活化,而钙腔蛋白基因沉默则可导致 VKOR、 γ -羧化酶活性增加,并促进 VKOR 依赖的相关凝血因子的合成^[10]。

华法林是目前使用最广泛的心脏瓣膜置换术后和房颤患者的抗凝药物,主要通过抑制肝脏 VKOR 活性,进而抑制维生素 K 依赖性凝血因子的 γ -羧基化及激活。动物实验发现,在华法林抵抗大鼠肝细胞微粒体中,钙腔蛋白过度表达,高表达的钙腔蛋白能抑制 VKOR 及维生素 K 依赖性羧基化系统活性,同时可抵抗华法林对 VKOR 活性的抑制作用^[23]。多项临床研究也表明,钙腔蛋白基因多态性与华法林剂量个体差异密切相关,可以导致华法林耐受或出血并发症^[24-25]。Vecsler 等^[26]报道 1 例携带钙腔蛋白(rs2290228)突变等位基因的患者,需服用华法林的剂量高达 20 mg/d。

5 结语

综上所述,钙腔蛋白能减少骨骼肌和心肌细胞去极化诱导的 Ca^{2+} 释放,增加钙的贮备能力,参与细胞内 Ca^{2+} 稳态调控;同时,在维持凝血系统正常稳态中也具有关键性调控作用;另外,钙腔蛋白可作为分泌蛋白在细胞外参与疾病的发展进程。

钙腔蛋白在心脏中高表达,提示该基因在心脏生理病理过程中发挥一定作用。然而可能这方面研究处于起步阶段,国内尚未见此研究,国外文献也仅报道钙腔蛋白随特发性扩张型心肌病病程进展而表达增加。因此,钙腔蛋白参与心脏疾病的

发病机制还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Feng H, Chen L, Wang Q, et al. Calumenin-15 facilitates filopodia formation by promoting TGF-beta superfamily cytokine GDF-15 transcription[J]. Cell Death Dis, 2013, 4:e870.
- [2] Honore B. The rapidly expanding CREC protein family: members, localization, function, and role in disease[J]. Bioessays, 2009, 31(3):262-277.
- [3] Suzuki N, Ban S, Itoh E, et al. Calcium-dependent structural changes in human reticulocalbin-1[J]. J Biochem, 2014, 155(5):281-293.
- [4] Jung DH, Kim DH. Characterization of isoforms and genomic organization of mouse calumenin[J]. Gene, 2004, 327(2):185-194.
- [5] Lee JH, Kwon EJ, Kim Do H. Calumenin has a role in the alleviation of ER stress in neonatal rat cardiomyocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 439(3):327-332.
- [6] Vasiljevic M, Heisler FF, Hausrat TJ, et al. Spatio-temporal expression analysis of the calcium-binding protein calumenin in the rodent brain[J]. Neuroscience, 2012, 202:29-41.
- [7] Jung DH, Mo SH, Kim DH. Calumenin, a multiple EF-hands Ca^{2+} -binding protein, interacts with ryanodine receptor-1 in rabbit skeletal sarcoplasmic reticulum [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 343(1):34-42.
- [8] Sahoo SK, Kim T, Kang GB, et al. Characterization of calumenin-SERCA2 interaction in mouse cardiac sarcoplasmic reticulum[J]. J Biol Chem, 2009, 284(45):31109-31121.
- [9] Sahoo SK, Kim do H. Calumenin interacts with SERCA2 in rat cardiac sarcoplasmic reticulum[J]. Mol Cells, 2008, 26(3):265-269.
- [10] Wajih N, Hutson SM, Wallin R. siRNA silencing of calumenin enhances functional factor IX production[J]. Blood, 2006, 108(12):3757-3760.
- [11] Vorum H, Hager H, Christensen BM, et al. Human calumenin localizes to the secretory pathway and is secreted to the medium[J]. Exp Cell Res, 1999, 248(2):473-481.
- [12] Vorum H, Jacobsen C, Honore B. Calumenin interacts with serum amyloid P component[J]. FEBS Lett, 2000, 465(2-3):129-134.
- [13] Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions[J]. Blood, 2004, 103(6):2096-2104.
- [14] Terrier B, Tamby MC, Camoin L, et al. Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2008, 177(10):1128-1134.

- 8SV/neo[J]. PLoS One, 2013,8(11): e79598.
- [15] Burd CE, Jeck WR, Liu Y, et al. Expression of linear and novel circular forms of an INK4/ARF-associated non-coding RNA correlates with atherosclerosis risk [J]. PLoS Genet, 2010,6(12): e1001233.
- [16] Jarinova O, Stewart AF, Roberts R, et al. Functional analysis of the chromosome 9p21. 3 coronary artery disease risk locus [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2009, 29 (10): 1671-1677.
- [17] Harismendy O, Notani D, Song X, et al. 9p21 DNA variants associated with coronary artery disease impair interferon-gamma signalling response[J]. Nature, 2011, 470 (7333): 264-268.
- [18] Hinterseher I, Tromp G, Kuivaniemi H. Genes and abdominal aortic aneurysm[J]. Ann Vasc Surg, 2011,25(3): 388-412.
- [19] Leung A, Trac C, Jin W, et al. Novel long noncoding RNAs are regulated by angiotensin II in vascular smooth muscle cells [J]. Circ Res, 2013,113(3): 266-278.
- [20] Sun L, Goff LA, Trapnell C, et al. Long noncoding RNAs regulate adipogenesis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013, 110(9): 3387-3392.
- [21] Xu B, Gerin I, Miao H, et al. Multiple roles for the non-coding RNA SRA in regulation of adipogenesis and insulin sensitivity [J]. PLoS One, 2010,5(12): e14199.
- [22] Troy A, Sharpless NE. Genetic “Inc”-age of noncoding RNAs to human disease[J]. J Clin Invest, 2012,122(11): 3837-3840.
- [23] Helgadottir A, Thorleifsson G, Manolescu A, et al. A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction[J]. Science, 2007,316(5830): 1491-1493.
- [24] Scheuermann JC, Boyer LA. Getting to the heart of the matter: long non-coding RNAs in cardiac development and disease [J]. EMBO J, 2013,32(13): 1805-1816.
- [25] Podlowski S, Bramlage P, Baumann G, et al. Cardiac troponin I sense-antisense RNA duplexes in the myocardium[J]. J Cell Biochem, 2002,85(1): 198-207.
- [26] Ahmed W, Ali IS, Riaz M, et al. Association of ANRIL polymorphism (rs1333049;C>G) with myocardial infarction and its pharmacogenomic role in hypercholesterolemia [J]. Gene, 2013,515(2): 416-420.
- [27] Tsai PC, Liao YC, Lin TH, et al. Additive effect of ANRIL and BRAP polymorphisms on ankle-brachial index in a Taiwanese population[J]. Circ J, 2012,76(2): 446-452.
- [28] Ishii N, Ozaki K, Sato H, et al. Identification of a novel non-coding RNA, MIAT, that confers risk of myocardial infarction [J]. J Hum Genet, 2006,51(12): 1087-1099.

(收稿:2013-12-18 修回:2014-06-03)

(本文编辑:梁英超)

(上接第 222 页)

- [15] Wang Q, Feng H, Zheng P, et al. The intracellular transport and secretion of calumenin-1/2 in living cells [J]. PLoS One, 2012,7(4):e35344.
- [16] Hansen GA, Vorum H, Jacobsen C, et al. Calumenin but not reticulocalbin forms a Ca^{2+} -dependent complex with thrombospondin-1. A potential role in haemostasis and thrombosis[J]. Mol Cell Biochem, 2009,320(1-2):25-33.
- [17] Ostergaard M, Hansen GA, Vorum H, et al. Proteomic profiling of fibroblasts reveals a modulating effect of extracellular calumenin on the organization of the actin cytoskeleton[J]. Proteomics, 2006, 6(12):3509-3519.
- [18] Hernandez-Romero D, Ruiz-Nodar JM, Marin F, et al. CALU A29809G polymorphism in coronary atherothrombosis: Implications for coronary calcification and prognosis[J]. Ann Med, 2010, 42(6):439-446.
- [19] Gizard F, Heywood EB, Findeisen HM, et al. Telomerase activation in atherosclerosis and induction of telomerase reverse transcriptase expression by inflammatory stimuli in macrophages[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011,31 (2):245-252.
- [20] Luo G, Ducey P, McKee MD, et al. Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein [J]. Nature, 1997, 386(6620):78-81.
- [21] Krüger T, Oelenberg S, Kaesler N, et al. Warfarin induces cardiovascular damage in mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(11): 2618-2624.
- [22] Grzeskowiak R, Witt H, Drungowski M, et al. Expression profiling of human idiopathic dilated cardiomyopathy [J]. Cardiovasc Res, 2003, 59(2):400-411.
- [23] Wallin R, Hutson SM, Cain D, et al. A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat[J]. FASEB J, 2001,15 (13):2542-2544.
- [24] Gonzalez-Conejero R, Corral J, Roldan V, et al. The genetic interaction between VKORC1 c1173t and calumenin a29809g modulates the anticoagulant response of acenocoumarol[J]. J Thromb Haemost, 2007,5(8): 1701-1706.
- [25] Daly AK. Optimal dosing of warfarin and other coumarin anticoagulants: the role of genetic polymorphisms[J]. Arch Toxicol, 2013, 87(3):407-420.
- [26] Vecsler M, Loebstein R, Almog S, et al. Combined genetic profiles of components and regulators of the vitamin K-dependent gamma-carboxylation system affect individual sensitivity to warfarin[J]. Thromb Haemost, 2006,95(2): 205-211.

(收稿:2014-02-25 修回:2014-05-22)

(本文编辑:金谷英)