

· 综述 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.23.043

原钙黏蛋白 20 研究进展*

陈 骏 综述,胡国华[△] 审校

(重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016)

关键词:基因;原钙黏蛋白 20;基因表达;突触形成;抑癌基因

中图分类号:Q291

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)23-3088-03

原钙黏蛋白(proto-cadherin, Pcdh)是由 Shintaro 等在使用钙黏蛋白细胞外(extracellular cadherin, EC)结构域来鉴定钙黏蛋白家族新成员时,意外发现了编码钙黏蛋白 EC 域的 PCR 扩增产物片段,这些钙黏蛋白的 EC 结构域与经典钙黏蛋白的 EC 结构域明显不同,于是就称它们为原钙黏蛋白。Pcdh 是一种带有亲同种抗原结合活性的跨膜蛋白,主要在神经系统中表达,在其他器官中低表达,如肺、肾。原钙黏蛋白超家族成员是由几个至 110 个胞外氨基酸钙黏蛋白重复序列组成的多样化细胞表面分子^[1-3]。原钙黏蛋白 20(proto-cadherin20)又称为原钙黏蛋白 13,它与原钙黏蛋白 1、原钙黏蛋白 7、原钙黏蛋白 9、原钙黏蛋白 11 一并属于非成簇原钙黏蛋白 $\delta 1$ 超家族^[4],原钙黏蛋白 20 基因位于染色体 13q21.2 位置,具有 6 个细胞外钙黏蛋白区域,1 个跨膜区域以及 1 个胞子尾区^[5]。目前,对于原钙黏蛋白 20 的研究还处于初级阶段,具体研究表明可能参与嗅感觉神经元的形成,以及骨癌疼痛相关兴奋性突触的形成,参与人亨廷顿病(huntington disease, HD)的发展,并且在非小细胞肺癌中作为抑癌基因起作用。

1 原钙黏蛋白 20 在神经系统中的作用

1.1 原钙黏蛋白 20 在嗅觉神经元的表达 鼻腔嗅觉神经轴集中嗅球的 1 000 多种不同的气味受体表达类型所收集的信号,而后整合于 2~3 个嗅神经纤维元,这一过程有多种类型的调控分子参与。Lee 等^[6]研究发现,原钙黏蛋白 20 具体表现在新分化的嗅觉神经轴发育过程中。除了一些小的嗅觉神经元外,原钙黏蛋白 20 在成年人嗅觉系统中表达降低。通过间接免疫荧光染色发现,原钙黏蛋白 20 在未成熟嗅觉神经系统的嗅上皮(olfactory epithelium, OE)早期分化表达是增加的,而在发育成熟的 OE 中表达下降。为了进一步证实原钙黏蛋白 20 的表达是随着嗅觉神经系统的成熟而降低的, Lee 等借助 Chen 等^[7]的研究模式,利用嗅蛋白-白喉毒素受体(olfactory marker protein promoter-diphtheria toxin receptor, OMP-DTR)转基因小鼠去除嗅觉神经系统后,白喉毒素(diphtheria toxin, DT)50 ng/g 体质量注入小鼠腹腔,刺激嗅上皮神经再生。2 周后观察,相对于对照组,原钙黏蛋白 20 在 OE 中表达明显升高,和出生后早期观察到原钙黏蛋白 20 的变化是一致的,原钙黏蛋白 20 这种表达的差异性,暗示原钙黏蛋白 20 神经细胞轴突的形成及轴突连接的建立起着重要作用。但是,意外的研究表明,原钙黏蛋白 20 在成熟老鼠嗅感觉神经系统的一小片区域,嗅球(olfactory bulb, OB)的腹侧区持续表达。

King 等^[8]对昆虫的研究表明,天蛾的嗅觉受体表达具有性别的二态性。Halem 等^[9]进一步研究表明在哺乳动物中,嗅

觉系统对行为及生理反应的调节也具有性别的二态性。Lee 等应用间接免疫荧光观察到,原钙黏蛋白 20 在嗅球的分布也具有性别差异性。在成熟的雄性小鼠中,原钙黏蛋白 20 在嗅小球神经纤维广泛并且高表达,而在成熟雌性小鼠的嗅小球神经纤维中,其表达受到明显抑制且范围受到限制。原钙黏蛋白 20 这种性别表达差异性,提供了一个新的生物学标记,为进一步深入研究其在嗅觉系统中嗅觉功能的性别二态性功能及作用奠定基础。

1.2 原钙黏蛋白 20 通过促进脊髓背角的兴奋性突触形成,并促进骨癌痛 骨癌患者及骨转移癌患者主要的症状表现为中度至重度的骨癌疼痛,因其机制的不清楚而导致对症治疗的相对比较困难。近期的研究表明,神经元突触的可塑性与骨髓致敏和骨癌疼痛有关。

根据已有的研究, Kim 等^[4,10]证实,原钙黏蛋白家族在神经元的生长、发育过程中扮演着非常重要的角色,如神经元的迁移、神经电路的形成,突触的可塑性,以及神经系统疾病,如孤独症和智力缺陷。Ke 等^[11]通过 RT-PCR 研究骨癌相关的非成簇的原钙黏蛋白家族成员基因表达的差异性。结果显示在所有非成簇原钙黏蛋白中,只有原钙黏蛋白 20 在罹患骨癌痛模型小鼠的脊髓背角的表达显著升高,其余成员均无明显变化。应用荧光双标技术,观察到原钙黏蛋白 20 定位于骨癌老鼠脊髓背角神经元。在骨癌细胞接种的小鼠模型中,随着接种细胞的时间增加(7~21 d),RNA 和蛋白水平的原钙黏蛋白 20 表达相应增多,暗示原钙黏蛋白 20 可能参与了骨癌痛的发展过程。

为进一步深入研究原钙黏蛋白 20 在骨癌痛中发挥的功能, Ke 等^[11]进而用携带有原钙黏蛋白 20 RNA 干扰病毒注射至罹患骨癌痛模型小鼠的脊髓背角,敲降原钙黏蛋白 20 使其表达下降,利用实时荧光定量 PCR 及蛋白免疫印迹技术进行验证,并于接种骨癌细胞 3、6、9、12、15、18、21 d 后观察小鼠关于疼痛相关行为的变化。结果证实,敲降原钙黏蛋白 20 能逆转骨癌小鼠的疼痛相关行为(肢体使用次数及活动相关的保护行为)。通过透射电子显微镜法定量检测到,敲降原钙黏蛋白 20 的骨癌小鼠同侧脊髓背角突触形成数量较未敲降小鼠明显减少,表明原钙黏蛋白 20 对于骨癌痛突触形成及兴奋性突触发生至关重要。在体外细胞实验中,敲降神经元细胞原钙黏蛋白 20 基因的表达,能显著抑制神经元细胞轴突的长度和分支的个数,以及抑制突触的形成。综上所述,原钙黏蛋白 20 可能通过促进兴奋性突触的形成来参与骨癌疼痛形成的相关机制。

1.3 原钙黏蛋白 20 与亨廷顿病的关系 HD 是一种神经功

* 基金项目:国家临床重点专科建设项目经费资助(卫办医政函[2012]649 号);重庆市自然科学基金重点基金资助项目(CSTC2012jjB10015)。

作者简介:陈骏(1987-),住院医师,主要从事头颈肿瘤的基础与临床研究。 [△] 通讯作者, Tel:(023)89012945; E-mail:hghcq@sina.com。

能失调性疾病,其以人 Huntingtin(HTT)基因突变导致的大脑皮层和纹状体神经元细胞选择性死亡为特征^[12]。纹状体富集基因的表达差异在 HD 已得到一致的认识^[13-14]。Becanovic 等^[15]为进一步研究 HD 发病机制,应用 YAC128 转基因小鼠模型(完全表达 HTT 基因的小鼠)进行全基因组表达谱分析,该转基因小鼠具有和人 HD 相似的神经病理及行为缺陷^[16]。对 24 个月大的 YAC128 小鼠与对照小鼠比较,结果显示包括原钙黏蛋白 20 在内 13 个基因在 RNA 水平上有明显表达异常。为进一步描述随着 HD 进展而相应的基因表达的变化,应用实时定量 PCR 分别对 3、6、9、12、24 个月大 YAC128 小鼠在基因 mRNA 水平上的变化进行检测,上述基因在 3~24 个月各个时期的变化不一致,而原钙黏蛋白 20 在除了第 6 个月时,其余各时期的表达量都明显增加。

早期 Kim 等^[10]研究表明,原位杂交实验中,包括原钙黏蛋白 20 的原钙黏蛋白在大脑皮层特定区域早期突触连接的建立起着重要作用。紧接着对上述 YAC128 小鼠有异常变化的 13 个基因对人 HD 的脑组织与非亨廷顿患者脑组织进行了全基因组表达谱分析,结果显示包括原钙黏蛋白 20 在内的 5 个基因表达有明显差异,然而在 HD 患者脑组织中原钙黏蛋白 20 表达量明显下降,这与在 YAC128 转基因小鼠所检测到的结果不一致,上述结果提示,原钙黏蛋白 20 与 HD 的发展有一定相关性,可能与损伤突触连接有一定相关性,但是如何发挥作用还需要进一步研究。

2 原钙黏蛋白 20 与非小细胞肺癌

近期的研究表明,基因定位于染色体 13q21 位置的原钙黏蛋白(pcdh8, pcdh9, pcdh10, pcdh17)^[17-20],通过基因启动子甲基化和(或)细胞突变导致基因表达下调或失活,重新表达上述基因能抑制肿瘤细胞的生长、增殖及迁移能力,并被报道作为抑癌基因而起作用^[4]。关于原钙黏蛋白 20, Imoto 等^[21]对 20 个非小细胞肺癌细胞株做了比较基因组杂交及半定量 PCR 技术分析显示,原钙黏蛋白 20 在非小细胞肺癌细胞株中表达频繁下调(10/19, 52.6%),而在正常肺组织中正常表达。提示原钙黏蛋白 20 可能在非小细胞肺癌中起作用。通过甲基化特异性 PCR(methylation-specific polymerase chain reaction, MSP)方法检测基因的甲基化状态,发现非小细胞肺癌组织中原钙黏蛋白 20 甲基化率高达 54.2%(32/59),而正常肺组织中甲基化率明显降低。紧接着用去甲基化药物 5-氮-2'-脱氧胞苷和曲古抑菌素作用后,原钙黏蛋白 20 表达上调,进一步证实原钙黏蛋白 20 在非小细胞肺癌中的表达下调与该基因启动子甲基化有相关性。

为明确原钙黏蛋白 20 启动子甲基化状态与非小细胞肺癌发病机制的关系, Imoto 等利用 MSP 分析了 59 例非小细胞肺癌样本的临床病理特征以及原钙黏蛋白 20 启动子甲基化程度。从年龄、性别、吸烟史、组织学类型以及肿瘤分期上做统计学分析,结果没有相关性(年龄 $P>0.9999$, 性别 $P=0.4541$, 吸烟史 $P=0.3105$, 组织学类型 $P=0.3562$)。但是,原钙黏蛋白 20 启动子高甲基化状态与上述 59 例患者的总体预后有着显著的联系。分析 39 例处于肿瘤分期 I 期的患者原钙黏蛋白 20 启动子甲基化程度与预后的关系,差异有统计学意义($P=0.0211$),以及 59 例患者总体预后与原钙黏蛋白 20 启动子甲基化程度,差异有统计学意义($P=0.0493$),提示原钙黏蛋白 20 启动子甲基化程度可能作为非小细胞肺癌一个独立的预后因素。体外实验进一步证实原钙黏蛋白 20 在非小细胞肺癌中作为抑癌基因起作用,原钙黏蛋白 20 的过表达能明显抑制非

小细胞肺癌细胞系 ABC-1、A549 的生长及克隆形成能力。上述研究结果表明,原钙黏蛋白 20 基因在非小细胞肺癌中作为一个抑癌基因起作用,并可作为一个独立的预后因素。

3 结 语

目前,原钙黏蛋白家族的研究还处于初步阶段,原钙黏蛋白在脊椎动物脑组织中表达的多样性引起了人们极大的研究兴趣,具有非常复杂的分子多样性,在神经元发育和突触形成中起到重要的作用。作为非成簇原钙黏蛋白一员的原钙黏蛋白 20,目前的研究刚刚起步,以上研究已初步证明原钙黏蛋白 20 在神经系统的生长、发育及神经突触的形成等方面起着重要作用。具体主要参与嗅觉系统的生长发育过程,并与嗅觉系统的性别二态性相关,促进脊髓背角骨痛疼痛相关兴奋性突触的形成,在非小细胞肺癌中,原钙黏蛋白 20 基因启动子区因高甲基化而失活,作为抑癌基因起作用。对于原钙黏蛋白 20 蛋白结构、功能,表达调控、生物学功能的深入研究将会为进一步揭示其在动物复杂的神经系统发育过程中的作用,为人类相关疾病的基础研究及临床治疗奠定基础。

参考文献:

- [1] Nollet F, Kools P, Van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members[J]. *J Mol Biol*, 2000, 299(3): 551-572.
- [2] Hulpiau P, Van Roy F. Molecular evolution of the cadherin superfamily[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(2): 349-369.
- [3] Hulpiau P, Van Roy F. New insights into the evolution of metazoan cadherins[J]. *Mol Biol Evol*, 2011, 28(1): 647-657.
- [4] Kim SY, Yasuda S, Tanaka H, et al. Non-clustered protocadherin[J]. *Cell Adh Migr*, 2011, 5(2): 97-105.
- [5] Redies C, Vanhalst K, Roy Fv. delta-Protocadherins: unique structures and functions[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(23): 2840-2852.
- [6] Lee W, Cheng TW, Gong Q. Olfactory sensory neuron-specific and sexually dimorphic expression of protocadherin 20[J]. *J Comp Neurol*, 2008, 507(1): 1076-1086.
- [7] Chen H, Kohno K, Gong Q. Conditional ablation of mature olfactory sensory neurons mediated by diphtheria toxin receptor[J]. *J Neurocytol*, 2005, 34(1-2): 37-47.
- [8] King JR, Christensen TA, Hildebrand JG. Response characteristics of an identified, sexually dimorphic olfactory glomerulus[J]. *J Neurosci*, 2000, 20(6): 2391-2399.
- [9] Halem HA, Cherry JA, Baum MJ. Vomeronasal neuroepithelium and forebrain Fos responses to male pheromones in male and female mice[J]. *J Neurobiol*, 1999, 39(2): 249-263.
- [10] Kim SY, Chung HS, Sun W, et al. Spatiotemporal expression pattern of non-clustered protocadherin family members in the developing rat brain[J]. *Neuroscience*, 2007, 147(4): 996-1021.
- [11] Ke C, Li C, Huang X, et al. Protocadherin20 promotes excitatory synaptogenesis in dorsal horn and contributes to bone cancer pain[J]. *Neurpharmacology*, 2013, 75: 181-

190

- [12] Macdonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes[J]. *Cell*, 1993, 72(6): 971-983.
- [13] Desplats PA, Kass KE, Gilmartin T, et al. Selective deficits in the expression of striatal-enriched mRNAs in Huntington's disease[J]. *J Neurochem*, 2006, 96(3): 743-757.
- [14] Thomas EA. Striatal specificity of gene expression dysregulation in Huntington's disease[J]. *J Neurosci Res*, 2006, 84(6): 1151-1164.
- [15] Becanovic K, Pouladi MA, Lim RS, et al. Transcriptional changes in Huntington disease identified using genome-wide expression profiling and cross-platform analysis[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(8): 1438-1452.
- [16] Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, et al. A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration[J]. *Neuron*, 1999, 23(1): 181-192.
- [17] Yu JS, Koujak S, Nagase S, et al. PCDH8, the human homolog of PAPC, is a candidate tumor suppressor of breast cancer[J]. *Oncogene*, 2008, 27(34): 4657-4665.
- [18] Tayrac M, Etcheverry A, Aubry M, et al. Integrative genome-wide analysis reveals a robust genomic glioblastoma signature associated with copy number driving changes in gene expression[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2009, 48(1): 55-68.
- [19] Ying J, Li H, Seng TJ, et al. Functional epigenetics identifies a protocadherin PCDH10 as a candidate tumor suppressor for nasopharyngeal, esophageal and multiple other carcinomas with frequent methylation [J]. *Oncogene*, 2006, 25(7): 1070-1080.
- [20] Haruki S, Imoto I, Kozaki K, et al. Frequent silencing of protocadherin 17, a candidate tumour suppressor for esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(6): 1027-1036.
- [21] Imoto I, Izumi H, Yokoi S, et al. Frequent silencing of the candidate tumor suppressor PCDH20 by epigenetic mechanism in non-small-cell lung cancers [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(9): 4617-4626.

(收稿日期: 2014-02-24 修回日期: 2014-04-18)

p38 MAPK 信号通路与慢性阻塞性肺疾病

丁丽综述, 江涛[△]审校

(重庆医科大学附属第一医院呼吸内科, 重庆 400016)

关键词:慢性阻塞性肺疾病; p38 丝裂原活化蛋白激酶; 治疗**中图分类号:** R563**文献标识码:** A**文章编号:** 1671-8348(2014)23-3090-03

慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种具有气流受限特征的可以预防和治疗的疾病,气流受限不完全可逆、呈进行性发展^[1],与患者气道对香烟烟雾等有害气体或有害颗粒的异常炎症反应有关。该病的肺功能损害不可逆转,且呈进行性加重,并可引起肺外的多系统临床表现^[2]。在发展中国家, COPD 的发病率及患病率、病死率在不断增加,预计到 2020 年左右,将成为全球第 3 大死亡原因^[3]。MAPKs 是一类丝/苏氨酸蛋白激酶,是信号从细胞表面传导到细胞核内部的重要传递者,介导了多种细胞生理过程。p38 丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)作为 MAPK 家族中的重要成员,参与了对多种炎症细胞因子和应激信号的传导,在 COPD 的发生、发展中有着重要作用。

1 p38 MAPK 信号传导途径

1.1 p38 MAPK 的发现及分布 1993 年 Brewster 等^[4]发现了这个由 360 个氨基酸组成的相对分子质量 38×10^3 的蛋白, 1994 年 Han 等^[5]分离并克隆出该蛋白质,并命名为 p38 MAPK。目前,在哺乳动物中已发现 p38 α 、p38 β 、p38 γ 和 p38 δ 4 个亚型。他们在各组织中表达稍有差异。p38 α 在各种组织

中广泛存在,在肺中, α 亚型表达于平滑肌细胞、上皮细胞、免疫细胞; p38 β 在脑组织中含量最多; p38 γ 主要存在于骨骼肌; p38 δ 则多见于肺、肾、肠、唾液腺的表皮细胞及睾丸、胰腺、肾上腺、垂体和小肠等处。

1.2 p38 MAPK 的生物学特性 p38 MAPK 主要介导细胞外信号转导到细胞核,参与应激条件下细胞的生长、分化、周期、凋亡、炎症反应等过程^[6-7]。p38 MAPK 通路可被多种细胞外信号激活,如应激刺激(H_2O_2 、缺氧、热休克、放射线、紫外线等)、脂多糖(LPS)、炎症因子(TNF- α 、IL-1、IL-6 等)及 G⁺ 细菌细胞壁成分。内源性 p38 MAPK 静息状态的细胞中的细胞质基质及细胞核中均有分布,当细胞收到不同应激刺激时, p38 MAPK 通过上游的一个双重特异性 MAP 激酶 MKK3/6 磷酸化 Thr180 和 Tyr182 (TGY Motif) 而活化,活化后的 p38 MAPK 进入细胞核,通过不同的下游靶点,包括蛋白激酶(MAPK 活化蛋白激酶 2/3, MK2; MAPK-interacting kinase 1/2, MNK1/2; p38-调节/活化蛋白激酶, PRAK/MK5)、转录因子(激活转录因子-2、ATF-2、CHOP/GADD153、肌肉增强因子 2、MEF2、Elk-1、p53 等),发挥多重功能。刺激消失后,活化的 p38 MAPK 回到细胞质基质,接受下一个刺激^[8]。