

· 综 述 ·

铅镉重金属与生殖内质网应激研究进展

刘康生¹, 顾平清¹, 钟天鹰¹ 综述, 陈文军² 审校

〔摘要〕 内质网(endoplasmic reticulum, ER)为蛋白质的修饰、折叠和细胞内的 Ca²⁺ 储存场所,在信号传导中起重要的作用,是维持内环境的重要组成部分。当内质网内的通路受干扰,如调节蛋白质折叠、翻译后修饰、脂质和类固醇合成、基因表达、细胞代谢、钙信号和错误折叠蛋白在 ER 腔的聚集均会最终导致内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)。目前 ERS 在神经元、心肌、肝脏、胰腺细胞发病机制中研究较多,与生殖相关的重金属方面研究极少。因此对铅镉导致的生殖 ERS 的发生及其机制的研究,对预防病理妊娠、胎儿宫内生长受限以及胚胎学等相关疾病治疗新策略的发展和采取有效的预防措施具有重要意义。

〔关键词〕 内质网应激;生殖系统疾病;铅镉

〔中图分类号〕 R715 〔文献标志码〕 A doi:10. 3969/j. issn. 1672-271X. 2015. 04. 026

近年来发现内质网应激(ndoplasmic reticulum stress, ERS)是区别于线粒体途径且能独立导致细胞凋亡的一条新的通路。缺氧、缺血再灌注损伤、病毒感染等均可引发 ERS。内质网有很强的保持内环境稳态的能力,ERS 一旦发生就会立即激活自我调整的信号反应机制,以期恢复稳态。ERS 被普遍认为是细胞早期适应性反应。当 ERS 时间过久时,细胞代偿机制由凋亡机制取代,细胞进入凋亡^[1]。重金属(铅)能导致多器官、系统、组织及细胞产生病理变化,铅损伤除了对神经行为^[2]和免疫系统发生影响之外^[3],生殖系统也是铅作用的靶器官之一,近几年伴随不孕不育人数的激增,与环境中重金属影响如铅暴露不无关系^[4]。

目前研究发现,ERS 与一些疾病的发生和发展密切相关,心血管疾病、肿瘤等疾病的发生,均与 ERS 诱导的凋亡有关^[5-6]。因此,关于 ERS 与凋亡的关系研究备受关注,但与人类和动物生殖系统的研究还相对较少,本文就近年来的进展综述如下。

1 内质网相关未折叠蛋白反应信号通路组成和调控机理

目前研究认为,未折叠蛋白反应(UPR)通过上调分子伴侣蛋白、激活细胞内质网相关降解通路和抑制蛋白翻译来缓解 ERS。若 ERS 过于剧烈,UPR 将直接引发程序性死亡。UPR 信号通路主要由一个分子伴侣蛋白葡萄糖调节蛋白 GRP78/Bip 和三

个感受蛋白肌醇酶 I(IRE1)、蛋白激酶样内质网激酶(protein kinase R-like ER kinase, PERK)、转录激活因子 6(ATF6)介导的信号通路组成(图 1)^[7]。

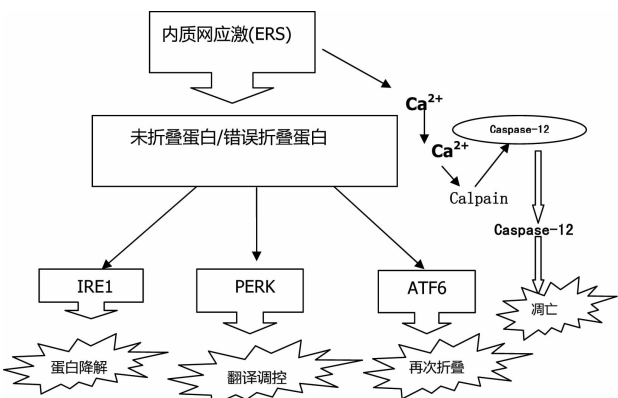


图 1 内质网 UPR 信号通路流程图

其中 IRE1 普遍存在于酵母和哺乳动物细胞中,具有丝/苏氨酸蛋白激酶活性,而 PERK 和 ATF6 则只存在于哺乳动物细胞。在哺乳动物细胞中,IRE1a 信号通路在 UPR 引起细胞保护性机制与细胞凋亡之间的转换中发挥重要的作用,其介导的 X-盒结合蛋白 1(XBP-1)剪接诱导的 UPR 能够促进细胞的生存,但激活的 IRE1a、胞浆的酶结构域招募接头分子,与凋亡信号调节激酶 1(ASK1)共同形成 IRE1-TRAF2-ASK1 复合物,从而激活氨基末端激酶(C-jun N-terminal kinase, JNK)^[8-9]。近来研究表明, JNK 可以阻止或促进细胞死亡,这取决于强度激活的时间。持续活化 PERK 通路可诱导 C/EBP 同源蛋白(CHOP)的积聚,促使细胞死亡。在一些细胞中,CHOP 直接诱导 Bcl 蛋白家族凋亡成员 BIM 的

作者单位: 1. 210004 江苏南京,江苏省南京妇幼保健院检验科;2. 230032 安徽合肥,安徽医科大学公共卫生学院
通讯作者: 陈文军, E-mail: Wenjuncheng@163.com

转录。PERK-CHOP-BIM 信号轴可以使连接内质网中蛋白质的错误折叠的凋亡机制激活。在 UPR 中, ATF6 不同于 IRE1 和 PERK 的调控途径, ATF6 是 ATF/CREB (cAMP response-element-binding) 转录因子家族成员,是通过外壳蛋白复合物 II (COP II) 从内质网转运到高尔基体内。ATF6 与内质网腔内蛋白 (BIP) 结合停留在内质网内。在 ERS 状态下, ATF6 会减少,但具体进展还需进一步研究。ATF6 信号通路调控涉及一个被称为调节膜内蛋白水解 (RIP) 的机制 (蛋白质到高尔基体内的水解过程)。在经历转运后,其活化的 N 端转运到细胞核内并诱导内质网分子伴侣、X 盒结合蛋白 1 (XBP1\CHOP) 等的转录表达^[10]。

Caspase-12 是半胱天冬酶家族中唯一仅在 ERS 通路中活化定位于内质网的分子,普遍认为 Caspase-12 是 ERS 的特异性凋亡分子^[11]。在没发生 ERS 时, Caspase-12 以无活性酶原状态分布于内质网膜上。当发生 ERS 时, IRE1 α 激活肿瘤坏死因子受体相关因子 TRAF2 并将 Caspase-12 剪切活化,进而激活 Caspase 家族的其他信号蛋白,引起经典 Caspase 途径介导的细胞凋亡^[12]。由于人体细胞缺乏 Caspase-12 基因 (基因突变),其介导细胞凋亡作用被为同源物的 Caspase-4 替代,并对 ERS 反应是特异性的^[13-14]。通常情况下, GRP78 与 Caspase-12 以复合体存在于内质网膜上,一定程度上抑制了细胞凋亡,但当 ERS 发生时, GRP78 的解离使 Caspase-12 活化进而引发细胞凋亡的激活,形成相应的特异性蛋白。Wu 等^[15]在食管癌细胞 EC109 中首次证实,腺甘可通过 CHOP 和 Caspase-4 通路诱导癌细胞凋亡。

2 ERS 与生殖相关通路研究

Xu 等^[16]在小鼠孕第 8 天腹腔注射 200 个 RH 速殖子,感染小鼠在孕 14 天后开始出现感染症状,但是多数在孕 16 d 仍然存活。通过荧光定量 PCR 和蛋白免疫印迹分析,发现了感染组中, ERS 标记物,如 GRP78, CHOP 和 Caspase-12, JNK/ASK1 信号上调或激活,而以 NAC 预处理可抑制上述基因的表达或信号通路的激活。2011 年乌兰等^[17]探讨了胎盘组织中 ERS 相关蛋白——钙联蛋白 (calnexin, CNX) mRNA 及蛋白表达与子痫前期发病的关系,发现轻中度子痫前期患者组 CNX mRNA 表达水平高于正常足月妊娠组 [分别为 (1.32 ± 0.06) 、 (3.42 ± 0.11) 与 (0.54 ± 0.04)], 并且 CNX 蛋白表达水平也高于正常足月妊娠组 [分别为 (1.57 ± 0.23) 、

(2.11 ± 0.53) 与 (0.57 ± 0.11)], 提示了 ERS 可能是子痫前期发病机制之一。有文献^[18]探讨了 ERS 介导的细胞凋亡在子宫内膜异位症 (EM) 发病中的作用,结果发现 EM 患者异位和在位子宫内膜细胞凋亡率均显著低于正常子宫内膜,且异位子宫内膜细胞凋亡率显著低于在位子宫内膜; EM 患者异位和在位子宫内膜 GRP78 和 GRP94, Caspase-3, 12 mRNA 及蛋白表达水平均显著低于正常子宫内膜,异位子宫内膜 GRP78 和 GRP94, Caspase-12, 3 mRNA 及蛋白表达水平亦显著低于在位子宫内膜,认为 EM 患者子宫内膜细胞凋亡减少, ERS 介导的细胞凋亡途径下调可能是 EM 发病的机制之一。

子痫前期中, miRNA-101 可通过调控内质网蛋白 ERp44 的表达来调控胎盘滋养细胞的凋亡过程^[19]。在 HTR-8/SVneo (滋养细胞) 中过表达 miRNA-101 后, ERp44 的表达显著下调, 封闭 miRNA-101 后, 细胞凋亡数量增加。各种生理和病理学条件导致内质网腔中未折叠或错误折叠蛋白质的积累, 会引发 ERS。通过 RNA 深度测序, 发现 ERS 胁迫下, HeLa 细胞中 hsa-miR-423-5p 的表达上调, 而 hsa-miR-452-5p 的表达下调, 以 Western blotting 实验证实 CDKN1A 是 hsa-miR-423-5p 的靶基因, 推测 microRNA 通过调控它们的靶基因, 在 ERS 的适应性反应中协同作用^[20]。

3 铅与生殖 ERS 的相关研究

3.1 睾丸间质细胞 睾酮激素的主要来源于睾丸间质细胞, 睾酮水平取决于细胞本身的反应。有研究^[21]显示 ERS 特异诱导剂胡萝卜素和衣霉素显著诱导了小鼠睾丸间质细胞的凋亡, 且呈浓度和时间依赖性。GRP78 mRNA 的表达水平在培养 24 h 显著上升, 48 h 呈下降趋势。CHOP 和 Caspase-12 mRNA 的表达水平随凋亡率的增加显著上升。ERS 通过 CHOP Caspase-12 信号通路参与小鼠睾丸间质细胞的凋亡过程^[22]。铅镉也可以在不同细胞类型中诱发 ERS, 可以上调小鼠睾丸细胞 GRP78 等 ERS 相关蛋白, 并上调 CHOP 的表达并激活 Caspase-12, 从而导致系膜细胞凋亡。

3.2 胚胎细胞。细胞凋亡是铅致胎盘损伤的重要机制之一。Smad4 及 S100B 蛋白在孕期不同阶段于铅暴露下大鼠胎盘中的表达与孕末期血铅水平密切相关, 在铅致胎盘细胞凋亡的发生发展中具有重要作用^[23]。王云英等^[24]认为血铅水平与胎盘组织中 NF-KB 表达和细胞凋亡指数显著相关 (相关系数分别为 0.663 和 0.641), 铅暴露引起 NF-KB 表达异常

可能是胎盘细胞失衡和胚胎发育异常的重要机理之一。斑马鱼由于具有成熟周期短、繁殖率高、传代周期短、产卵时间长、胚胎透明以及鱼种发育遗传背景清晰等优点,非常适用于铅的生殖毒性等远期效应的观察,2014 年殷健^[25]研究重金属铅对斑马鱼成鱼和胚胎的影响,发现铅会引起斑马鱼胚胎心率减慢,体长减小,铅对斑马鱼成鱼和胚胎氧化应激、细胞凋亡的发生、毒性作用机制均与丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号转导通路相关。

3.3 卵巢 铅蓄积于卵巢可使皮质区变薄,成熟卵泡、生长卵泡减少,卵泡内上皮细胞核固缩、线粒体肿胀、崩解等。铅可抑制卵母细胞第一极体的释放,影响卵母细胞的存活率并可降低体外受精率和卵母细胞数量;亦破坏卵母细胞减数分裂进行,降低卵母细胞的受精能力,影响小鼠的正常生殖功能^[26]。尹娇娇^[27]研究表明,ERS 参与了山羊颗粒细胞凋亡进程,表皮生长因子(EGF)通过下调 ATF4、ATF6、CHOP mRNA 水平的表达,对 ERS 诱导的山羊颗粒细胞凋亡具有显著的抑制作用。

3.4 衣霉素(TM)诱导卵巢和胚胎 ERS 实验 衣霉素可通过影响蛋白质的糖基化,使内质网中未成熟蛋白堆积而诱发 ERS。丁晓等^[28]以 TM 诱导卵巢 ERS,以卵巢玻璃化冻存流程中前培养 1 h 作为参考,对 ERS 伴侣蛋白 GRP78 表达水平进行检测,显示各浓度 TM 诱导的卵巢 GRP78 表达均高于对照组,以 TM 达 5 $\mu\text{g/mL}$ 时影响最为显著,随后随着浓度增加表达逐渐稳定并略有下降;而对作用 3 h 后 CHOP 表达检测显示,随着 TM 浓度的增加,CHOP 缓慢上升并与 10、20 和 30 $\mu\text{g/mL}$ 组持续高浓度表达,说明在保护因子无法缓解 ERS 时,CHOP 上升介导细胞走向凋亡。李昕昕等^[29]利用 TM 处理胚胎激发 ERS,应用显微注射 mRNA 方法实现基因过表达,通过注射特异的反义寡核苷酸实现基因封闭,发现 XBP1 剪切随 IRE1 α 过表达及封闭而增加或减少,以 TM 处理导致胚胎发育畸形,XBP1 剪切增加,而封闭 XBP1 可部分挽救发育畸形;封闭 IRE1 α 亦可明显挽救发育畸形,XBP1 剪切恢复,但具体作用机制需进一步研究。

3.5 其他 有研究^[30]表明,铅暴露组 ERS 使凋亡 Caspase-12 mRNA 蛋白表达增加,凋亡指数(AI)在实验组明显上升。铅暴露组中胎盘滋养层细胞发生纤维蛋白沉积,线粒体肿胀,数量减少,内质网肿胀,空泡形成,同时使胎盘细胞发生凋亡,增加 Caspase-12 mRNA 表达,促进了 ERS。

4 镉与生殖 ERS 的相关研究

4.1 睾丸间质细胞、胚胎细胞 Lian 等^[31]的文献研究表明,胎盘发育损伤和胎儿生长发育迟缓与胎盘 ERS 有关。有研究^[25]阐述重金属镉对斑马鱼成鱼和胚胎的 96 h 半数致死浓度(96 h-LC50)分别为 24.341 mg/L 和 46.67 mg/L,而胚胎孵育抑制作用的 96 h 半数致畸浓度(96 h-EC50)为 42.499 mg/L。重金属镉引起斑马鱼胚胎心率减慢,体长减小;镉对斑马鱼成鱼和胚胎均具有明显的毒性作用,能够诱导氧化应激、细胞凋亡及免疫毒性的发生,其毒性作用机制与 MAPKs 信号转导通路相关^[32]。Wang 等^[33]发现,孕期母体镉暴露明显升高窝胎鼠指(趾)部和尾部畸形率,显著降低胎鼠身长、活胎重和胎盘重,胎盘迷路层的平均血窦区域明显减少。以镉处理的小鼠胎盘迷路层增殖细胞核抗原(PCNA)阳性增殖细胞数较对照组明显减少,TUNEL(TdT 介导 dUTP 缺口末端标记)阳性细胞数亦较对照组显著增多,孕期母体以镉处理 8 h 后,小鼠胎盘组织 GRP78 和 ATF4 mRNA 水平明显升高,且胎盘组织 GRP78、pERF2 α 和 CHOP 蛋白表达显著上调,提示孕期镉暴露会显著诱导小鼠胎盘 ERS。

4.2 卵巢 有文献^[34]探讨了镉对卵巢细胞凋亡的诱导作用,病理检测可见随镉剂量的增加,卵泡闭锁率逐渐升高,与对照组相比差异明显;96 h 对照组凋亡率上升为 10.20%,而高、中、低各组分别为 21.41%、15.88%、12.47%,表明各组均有不同程度凋亡。镉对小鼠卵巢颗粒细胞的凋亡具有促进作用并有剂量的效应关系,镉对卵巢卵泡的发育有促进闭锁的作用,增加了闭锁卵泡构成比;同时镉能使小鼠卵巢颗粒细胞中的丙二醛(MDA)增加和超氧化物歧化酶(SOD)活性的降低,镉增强卵巢颗粒细胞 p53 蛋白的表达,p53 基因参与了小鼠卵巢颗粒细胞凋亡的调控。

5 讨论和展望

本文对 ERS 与生殖疾病及铅镉重金属与生殖 ERS 的相关进行描述。一方面,铅镉诱导 ERS 有其共同特点,在剂量与效应关系或者时间与效应关系都呈先上升后下降的方向;另一方面,ERS 引起的程序性死亡机制是通过 CHOP 和 Caspase-12 等介导的。目前对于 ERS 受铅镉影响机制研究以体外动物研究为主,选择铅镉的靶器官或靶细胞进行相关的体内研究很少,值得进一步深入探讨。

【参考文献】

- [1] Glembotski CC. Endoplasmic reticulum stress in the heart[J]. *Circ Res*, 2007, 101(10): 975-984.
- [2] 匡晓宁, 雷洁, 古桂雄. 铅对新生大鼠生长发育的影响[J]. *东南国防医药*, 2007, 9(4): 283-285.
- [3] 刘康生, 黄蓉, 薛满红, 等. 学龄前儿童血铅水平与免疫指标的相关性[J]. *东南国防医药*, 2013, 15(6): 626-627.
- [4] Meeker JD, Rossano MG, Protas B, et al. Cadmium, lead, and other metals in relation to semen quality: human evidence for molybdenum as a male reproductive toxicant[J]. *Environ Health Perspect*, 2008, 116(11): 1473-1479.
- [5] Kassan M, Galan M, Partyka M, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in cardiac damage and vascular endothelial dysfunction in hypertensive mice[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(7): 1652-1661.
- [6] Liu D, Zhang M, Yin H. Signaling path ways involved in endoplasmic reticulum stress induced neuronal apoptosis[J]. *Int J Neurosci*, 2013, 123(3): 155-162.
- [7] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(7): 519-529.
- [8] Malhotra JD, Kaufman RJ. The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response[J]. *Semin Cell Dev Bio*, 2007, 18(6): 716-731.
- [9] Luo D, He Y, Zhang H, et al. AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(18): 11905-11912.
- [10] Ye J, Rawson RB, Komuro R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs[J]. *Mol Cell*, 2000, 6(6): 1355-1364.
- [11] Chen YH, Wu XD, Yao ST, et al. Calcineurin is involved in cardioprotection induced by ischemic postconditioning through attenuating endoplasmic reticulum stress[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(20): 3334-3340.
- [12] Kim EM, Shin EJ, Choi JH, et al. Matrix metalloproteinase-3 is increased and participates in neuronal apoptotic signaling downstream of caspase-12 during endoplasmic reticulum stress[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(22): 16444-16452.
- [13] Liu D, Zhang M, Yin H. Signaling path ways involved in endoplasmic reticulum stress induced neuronal apoptosis[J]. *Int J Neurosci*, 2013, 123(3): 155-162.
- [14] Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78[J]. *FEBS Lett*, 2002, 5(14): 122-128.
- [15] Wu L, Wei B, Guo Y, et al. Apoptosis induced by adenosine involves endoplasmic reticulum stress in EC109 cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 10(38): 921-928.
- [16] Xu X, Liu T, Zhang A. Reactive oxygen species-triggered trophoblast apoptosis is initiated by ER stress via activation of caspase-12, CHOP and the JNK pathway in *Toxoplasma gondii* infection in mice[J]. *Infect Immun*, 2012, 80(6): 2121-2132.
- [17] 乌兰, 石中华, 王小青. 胎盘内质网应激相关蛋白 Calnexin 与子痫前期发病的关系[J]. *江苏医药*, 2011, 37(16): 1895-1896.
- [18] 欧阳煜宏, 李晨阳, 姚瑾, 等. 内质网应激介导的细胞凋亡在子宫内膜异位症发病中的作用研究[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2012, 28(3): 218-221.
- [19] 常玉华, 李坤. 子痫前期患者胎盘中 miRNA-101 和内质网蛋白 ERp44 的表达和意义[J]. *中国生化药物杂志*, 2014, 34(6): 38-43.
- [20] Dai LM, Huang C, Chen L. Altered expression of microRNAs in the response to ER stress[J]. *Sci Bull*, 2015, 60(2): 202-209.
- [21] 张卓. 内质网应激诱导小鼠睾丸间质细胞凋亡的作用研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2014.
- [22] Ji YL, Wang H, Meng C, et al. Melatonin alleviates cadmium-induced cellular stress and germ cell apoptosis in testes[J]. *J Pineal Res*, 2011, 52(1): 71-79.
- [23] 曲宝明. 细胞凋亡、Smad4 及 S100B 蛋白在孕期铅暴露大鼠胎盘中的表达及意义[J]. *中国预防医学杂志*, 2012, 13(5): 347-349.
- [24] 王云英, 胡海燕, 徐风森. 孕期铅水平对胎盘组织 NF- κ B 表达和细胞凋亡的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2013, 21(2): 32-33.
- [25] 殷健. 重金属对斑马鱼的毒性效应及作用机制研究[D]. 北京: 北京协和医科大学, 2014.
- [26] 曹卉. 铅对小鼠卵泡颗粒细胞凋亡的影响[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2010(6): 23-24.
- [27] 尹娇娇. EGF 通过内质网应激通路调控山羊卵泡颗粒细胞凋亡的作用研究[D]. 西安: 西北农林科技大学, 2014.
- [28] 丁晓, 颜贝, 陈杰, 等. 小鼠卵巢内质网应激模型的建立及诱导凋亡的研究[J]. *宁夏医科大学学报*, 2013, 35(7): 743-746.
- [29] 李昕昕, 冯娇娇. 影响非洲爪蟾胚胎发育[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2011, 31(10): 1399-1402.
- [30] Wang YY, Hu HY, Li H, et al. Effect of Lead exposure on placental cellular apoptosis and endoplasmic reticulum stress in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(9): 1744-1747.
- [31] Lian IA, Loset M, Mundal SB, et al. Increased endoplasmic reticulum stress in decidual tissue from pregnancies complicated by fetal growth restriction with and without pre-eclampsia[J]. *Placenta*, 2011, 32(11): 823-829.
- [32] Wang L, Gallagher EP. Role of Nrf2 antioxidant defense in mitigating cadmium-induced oxidative stress in the olfactory system of zebrafish[J]. *Toxicol Appl pharmacol*, 2013, 266(2): 177-186.
- [33] Wang Z, Wang H, Xu ZM. Cadmium-induced teratogenicity: association with ROS-mediated endoplasmic reticulum stress in placenta[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 259(2): 236-247.
- [34] 周新华. 镉对小鼠卵巢颗粒细胞凋亡作用及相关影响因素的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2006.

(收稿日期: 2015-04-13; 修回日期: 2015-04-21)

(本文编辑: 张仲书)