

# 钙蛋白酶和钙蛋白酶抑制系统在雌性生殖调控中的研究进展

朱桂玉 (泰山学院生物与酿酒工程学院, 山东泰安 271021)

**摘要** 钙蛋白酶-钙蛋白酶抑制蛋白系统在多种细胞中发挥作用, 在雌性生殖系统中其对卵母细胞、子宫与胎盘的调控也起着重要作用。对该系统在雌性生殖调控中的作用的研究进展进行了综述, 为进一步了解该系统奠定基础。

**关键词** 钙蛋白酶; 钙蛋白酶抑制蛋白; 雌性生殖调控

**中图分类号** S813.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)13-03918-02

## Research Progress of Calpain/Calpastatin System in the Female Reproduction Regulation

ZHU Gui-yu (Department of Biology Science and Technology, Taishan University, Tai'an, Shandong 271021)

**Abstract** Calpain/calpastatin system is a large family and takes important roles in the cells normal function. In female reproduction, the calpain/calpastatin system is involved in the development of oocyte, uterus and placenta. Thus, this paper summarized the characteristics and functions of calpain/calpastatin regulation in the female reproduction.

**Key words** Calpain; Calpastatin; Female reproduction regulation

钙蛋白酶(Calpain)是一个依赖于  $Ca^{2+}$  的半胱氨酸蛋白酶(通过半胱氨酸位点水解蛋白), 它水解的蛋白能在一系列生理生化反应中发挥作用, 包括细胞骨架的形成、细胞增殖、信号传导、细胞凋亡与坏死、细胞内物质运输、蛋白的合成和降解等。

### 1 钙蛋白酶和钙蛋白酶抑制蛋白

在人类中, 钙蛋白酶家族共有 14 个成员, 在其众多成员中钙蛋白酶 1(calpain-1/ $\mu$ -calpain) 和钙蛋白酶 2(calpain-2/m-calpain) 研究的最为深入<sup>[1]</sup>。

Calpain 的众多成员按其表达规律可大致分为 2 类: 第一类是在各种细胞中组成性表达的, 包括 calpain-1, 2, 5, 7, 10, 13 和 15; 其余的只在某一种或几种细胞中表达, 包括 calpain-3, 6, 8, 9, 11 和 12<sup>[2]</sup>。

Calpain 的活性可以被一种特异的钙蛋白酶抑制蛋白(Calpastatin)所调控, 而迄今所确定的 Calpastatin 的唯一作用就是抑制 Calpain 的活性。Calpastatin 是由唯一一个基因编码的, 但是它却能运用不同位置的启动子以及选择性剪切产生十几种异构体, 最后翻译成分子量为 17~100 kD 的各种蛋白<sup>[1]</sup>。

近年来, 随着对 Calpain 和 Calpastatin 系统在生殖发育中的研究的逐步深入, 人们发现 Calpain-calpastatin 系统对卵母细胞的发育、子宫、胎盘作用及一些常见雌性生殖疾病等有重要作用。笔者对 Calpain-calpastatin 系统在雌性生殖发育过程中的调控机制进行了综述。

### 2 雌性生殖系统中钙蛋白酶-钙蛋白酶抑制蛋白的调控

#### 2.1 钙蛋白酶-钙蛋白酶抑制蛋白在卵母细胞中的调控

最早的关于 Calpain-calpastatin 系统在卵母细胞中的报道于 1989 年。Watanabe 等发现非洲爪蟾的卵母细胞在发育成熟过程中产生 1 种 c-mos 原癌基因蛋白(pp39mos), 在受精或者第二次减数分裂(MII)完成后, 这种蛋白立刻被

Calpain 水解掉, 说明 Calpain 能水解 c-mos 癌蛋白从而促进减数分裂的完成<sup>[3]</sup>。大鼠卵母细胞发育成熟过程中 Calpain 的表达是上升的, 进行受精或孤雌激活时其表达出现瞬间下降, 然后在原核形成时又恢复到原来的水平<sup>[4]</sup>。Santella 等将 Calpain 蛋白注射到发生减数分裂停滞的星鱼的卵母细胞中, 在一定程度上恢复了生发泡破裂(Germinal vesical breakdown), 对减数分裂具有促进作用<sup>[5]</sup>。

Ben-Aharon 等首次对 Calpain-calpastatin 蛋白在卵母细胞内的分布进行了系统研究, 采用免疫荧光技术探测到 calpain-1 和 calpain-2 主要分布在卵母细胞的皮质部分, 而 Calpastatin 在细胞膜上有大量分布<sup>[6]</sup>。由于人的卵母细胞来源有限, Ben-Aharon 所在的研究组又利用大鼠的卵母细胞进行了进一步试验, 研究了 Calpain-calpastatin 系统在卵母细胞发育和受精以及孤雌激活过程中的作用。与人类的研究结果类似, calpain-1 和 calpain-2 主要分布在大鼠卵母细胞的皮质和纺锤体中<sup>[7]</sup>, 通过 Western 方法发现卵母细胞中有 2 种 Calpastatin 蛋白, 一种是 110 kD 的肌肉型, 主要分布在细胞膜和纺锤体上; 另一种是 77 kD 的红细胞型, 主要在皮质中呈簇状分布<sup>[8]</sup>。当发生受精或者孤雌激活时, calpain-2 由皮质转移到细胞膜和纺锤体附近, 而 calpain-1 无明显变化。与此同时, 分布在细胞膜上的肌肉型的 Calpastatin 蛋白(110 kD) 迅速释放到细胞皮质中, 分布在纺锤体上的保持不变, 红细胞型的 Calpastatin 蛋白(77 kD) 没有变化。calpain-2 和 Calpastatin(110 kD) 在成熟的卵母细胞中的互补分布以及它们在受精和孤雌激活时相反的移动, 从另一方面证明了 Calpastatin 对 Calpain 的抑制, Calpain 为了避免 Calpastatin 对它的抑制, 而移动到没有 Calpastatin 的地方去发挥它的蛋白水解能力, 从而顺利完成受精或者孤雌激活过程。calpain-1 和 Calpastatin(77 kD) 在激活过程中没有变化, 说明它们未参与受精和激活过程, 但可能会在 calpain-2 和 Calpastatin(110 kD) 缺乏时起到补充的作用。进一步的研究发现, 卵母细胞激活过程中细胞骨架蛋白  $\alpha$ -spectrin 被 Calpain 降解, Calpain 的抑制因子 Calpetin 能抑制这个降解过程, 从而抑制减数分裂<sup>[7-8]</sup>。

**基金项目** 山东省自然科学基金项目(ZR2013CQ002)。

**作者简介** 朱桂玉(1976-), 女, 山东泰安人, 讲师, 博士, 从事动物繁殖与遗传育种研究。

**收稿日期** 2014-04-14

最新的研究发现, Calpain - calpastatin 系统可能参与了卵母细胞和卵丘细胞的互作。Zhu 等采用差异显示的方法对有卵丘细胞包裹的猪卵母细胞和无卵丘细胞包裹的裸卵中差异表达的基因进行了筛选, 发现 *Calpastatin* 基因在正常的卵母细胞中的表达量比裸卵中的表达量要高, 并运用 RT - PCR 进行了验证, 说明 *Calpastatin* 在卵母细胞和卵丘细胞之间的互作中发挥了重要作用, 由于裸卵的发育能力远远低于正常卵, 因此 *Calpastatin* 还有可能作为标记对生存能力强的卵母细胞进行选择<sup>[9]</sup>。

**2.2 钙蛋白酶 - 钙蛋白酶抑制蛋白在子宫以及胎盘的调控** 胎盘是人类各种体细胞组织中比较容易获得的, 因此最早的关于分离人类 Calpain 和 Calpastatin 蛋白的试验是以胎盘为材料进行的。Kubota 等第 1 次从人类胎盘中分离到 calpain - 2 蛋白, 并证明该蛋白在 250 mmol/L  $Ca^{2+}$  浓度时达到最大活性, 并能被亮肽素 (Leupeptin)、抗痛素 (Antipain) 和一种内源蛋白所抑制<sup>[10]</sup>。该研究组又接着从胎盘中分离到了 calpain - 1 蛋白, 发现 calpain - 1 和 calpain - 2 在胎盘中表达量非常高且基本相同 (3 ~ 4 mg calpain - 1 和 4 ~ 5 mg calpain - 2/1000 g 胎盘组织), 同时还发现它们在不同  $Ca^{2+}$  浓度下表现出最大活性<sup>[11]</sup>。Samis 等对大鼠子宫中 calpain - 2 的表达进行了研究, 发现在妊娠前、妊娠过程中和产后 calpain 的表达基本维持恒定, 子宫在生育过程中变化非常剧烈, 受到各种激素和神经的调控, 而 calpain - 2 的表达量较高且保持不变, 说明其在整个生育周期中发挥了重要的作用<sup>[12]</sup>。Thompson 等用 Western 方法在人胎盘中检测到了 2 条 calpastatin 蛋白条带, 1 条为 70 kD 左右的红细胞型 calpastatin, 另 1 条为 48 ~ 51 kD 左右, 似乎是胎盘所特有的<sup>[13]</sup>。

### 3 钙蛋白酶 - 钙蛋白酶抑制蛋白与某些雌性生殖疾病的关系

在不孕妇女的血清中发现一种能引起精子凝集反应的蛋白, 用这种蛋白作为抗体在睾丸 cDNA 表达文库中筛选到 calpastatin 基因, 说明 calpastatin 的抗原抗体反应与不孕不育有一定的关系, 有可能作为抗精子抗体的检测标记应用到不孕不育的检测和治疗中<sup>[14-15]</sup>。

雌性动物胎盘内有一类绒毛外滋养细胞, 一部分侵入子宫内, 另一部分在子宫胎盘螺旋动脉内, 如果这类细胞生长发育不完全, 扩散不充分, 就容易造成母体的血液无法高效进入胎盘, 造成先兆子痫 (妊娠高血压综合症)。试验表明, 绒毛外滋养细胞扩散过程中需要前列腺素 E2 蛋白 (PGE2) 的激活, 而此环节需要  $Ca^{2+}$  浓度的升高和 Calpain 蛋白的激活, 因此 Calpain 蛋白在绒毛外滋养细胞扩散中有重要作用<sup>[16]</sup>。Saarela 等对 calpain - 10 基因中的 1 个 SNP 位点 (G43 A) 在先兆子痫患者和正常人群中进行了相关分析, 发现该位点与兆子痫患没有相关性<sup>[17]</sup>。

Escobar - Morreale 等对 calpain - 10 基因中的 3 个多态位点 (SNP43、SNP44 和 SNP45) 与高雄激素症妇女进行了相关性分析, 发现 SNP43 和 SNP45 分别与妇女血清中的雄激素

水平和妇女多毛症呈显著相关<sup>[18]</sup>。

### 4 钙蛋白酶 - 钙蛋白酶抑制蛋白在动物繁殖中的研究

Gladney 等在一个具有较高排卵率、胚胎成活率以及产仔数的猪品系和一般品系的卵泡内细胞进行了基因差异表达的分析, 采用 mRNA 差异显示方法筛选出了 *calpain 4* 基因, 发现它在繁殖能力高的品系中表达量比一般个体要低, 并采用 Northern 验证了该差异表达, 说明 *calpain 4* 基因的表达可能影响到母猪的繁殖能力<sup>[19]</sup>。Garcia 发现了奶牛中 calpastatin 基因外显子 3 中的 2 个错义突变与产奶周期和妊娠率有显著相关<sup>[20]</sup>, 说明可将 *calpain* 基因作为重要繁殖性状的候选基因应用到动物选育中。

### 5 展望

随着对 Calpain - calpastatin 在生殖系统中的研究的逐渐深入, 有望对这个系统在生殖调控方面的功能和发挥作用的具体机制有更准确了解, 在临床上可以利用它们作为药物的靶位点, 为治疗相关疾病提供新途径, 还可以运用到动物生产实践中, 提高动物的繁殖力。

### 参考文献

- [1] GOLL D E, THOMPSON V F, LI H, et al. The calpain system[J]. *Physiol Rev*, 2003, 83: 731 - 801.
- [2] PANDURANGAN M, HWANG I, ORHIRBAT C, et al. The calpain system and diabetes[J]. *Pathophysiology*, 2014[Epub ahead of print].
- [3] WATANABE N, VANDE WOUDE G F, IKAWA Y, et al. Specific proteolysis of the c - mos proto - oncogene product by calpain on fertilization of Xenopus eggs[J]. *Nature*, 1989, 342: 505 - 511.
- [4] MALCOV M, BEN - YOSEF D, GLASER T, et al. Changes in calpain during meiosis in the rat egg[J]. *Mol Reprod Dev*, 1997, 48: 119 - 126.
- [5] SANTELLA L, DE RISO L, GRAGNANELLO G, et al. Separate activation of the cytoplasmic and nuclear calcium pools in maturing starfish oocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 252: 1 - 4.
- [6] BEN - AHARON I, BEN - YOSEF D, AMIT A, et al. Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system in the human oocyte[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83: 1807 - 1813.
- [7] BEN - AHARON I, HAIM K, SHALGI R, et al. Expression and possible involvement of calpain isoforms in mammalian egg activation[J]. *Reproduction*, 2005, 130: 165 - 175.
- [8] HAIM K, BEN - AHARON I, SHALGI R. Expression and immunolocalization of the calpain-calpastatin system during parthenogenetic activation and fertilization in the rat egg[J]. *Reproduction*, 2006, 131: 35 - 43.
- [9] ZHU G, FENG S, LI J, et al. Comparison of gene expression patterns between porcine cumulus-oocyte complexes and naked oocytes[J]. *South African Journal of Animal Science*, 2007, 37: 57 - 63.
- [10] KUBOTA S, OHSAWA N, TAKAKU F. Purification of a calcium-activated neutral proteinase from human placenta[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1984, 802: 379 - 383.
- [11] SHASTRI R, ANANDARAJ M P. A low-calcium-requiring calcium-activated neutral proteinase from human placenta[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 873: 260 - 266.
- [12] SAMIS J A, BACK D W, GRAHAM E J, et al. Constitutive expression of calpain II in the rat uterus during pregnancy and involution[J]. *Biochem J*, 1991, 276 (Pt 2): 293 - 299.
- [13] THOMPSON V F, SALDANA S, CONG J, et al. The calpain system in human placenta[J]. *Life Sci*, 2002, 70: 2493 - 2508.
- [14] WEI S G, WANG L F, MIAO S Y, et al. Expression of the calpastatin gene segment during spermiogenesis in human testis; an in situ hybridization study[J]. *Arch Androl*, 1995, 34: 9 - 12.
- [15] LI S, GOLDBERG E. A novel N-terminal domain directs membrane localization of mouse testis - specific calpastatin[J]. *Biol Reprod*, 2000, 63: 1594 - 1600.
- [16] NICOLA C, TIMOSHENKO A V, DIXON S J, et al. EPI receptor-mediated migration of the first trimester human extravillous trophoblast; the role of intracellular calcium and calpain[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90: 4736 - 4746.

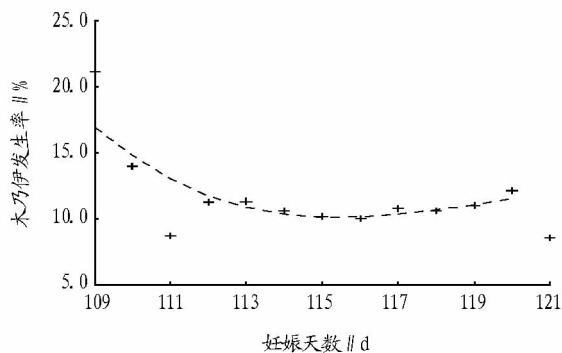


图6 木乃伊出现概率与妊娠天数的相关性分析

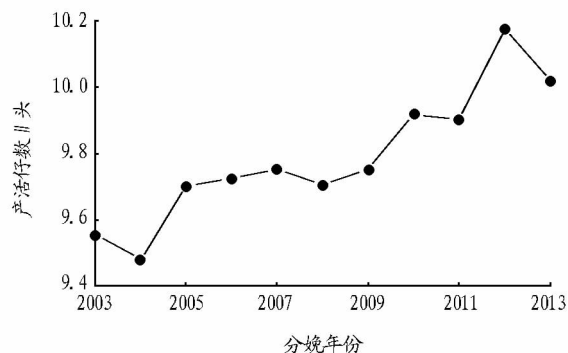


图7 各分娩年份产活仔数的最小二乘均值

传相关<sup>[8-9]</sup>,而该研究也表明妊娠天数与其他主要繁殖性状表型间呈极显著负相关。因此,该群体中育种工作的实施在产活仔数等繁殖性状上获得了持续的遗传进展,这可以从表型的年度变化上体现出来。因此,繁殖性状的持续改良及二者之间的遗传及表型负相关可能是导致妊娠天数持续降低的主要原因。

关于胎次对繁殖性状影响的报道很多,胎次对母猪的总产仔数、产活仔、初生窝重、21日龄窝重等性状均有显著影响<sup>[10-11]</sup>,初产母猪的繁殖性能较经产母猪差<sup>[12]</sup>。该研究中对妊娠天数的研究表明胎次因素对妊娠天数有极显著影响。妊娠天数随胎次的逐渐缩短可能与其他繁殖性状在经产母猪中表现较好有关。

死胎是造成养猪生产经济损失的重要原因之一。胚胎在妊娠后期死亡会形成死胎,而在妊娠开始35d后死亡均会形成木乃伊<sup>[13]</sup>。如果环境温度超过30℃,就会严重影响母猪的繁殖性能,产生死胎的概率增加<sup>[14-15]</sup>。笔者对出现死

胎概率分析表明妊娠天数增加或减少都会提高死胎概率,而木乃伊出现则可能引起妊娠天数减少,这在养猪生产上要引起足够重视。

妊娠天数是在养猪生产中较容易记录的性状,它并不是猪育种的重要目标性状,但是受季节、胎次等因素影响显著,而且与总产仔数、产活仔数、初生窝重等重要经济性状有极显著负相关。因此,该性状可作为养猪生产的间接指标,应给予重视。

#### 参考文献

- [1] SASAKI Y, KOKETSU Y. Variability and repeatability in gestation length related to litter performance in female pigs on commercial farms[J]. Theriogenology, 2007, 68(2): 123-127.
- [2] 刘敬顺, 陈赞谋, 王青来, 等. 母猪死胎和木乃伊风险因素分析[J]. 广东农业科学, 2013(10): 113-116.
- [3] 任文辉. 撒坝母猪断奶至配种间隔时间对繁殖、妊娠天数的影响分析[J]. 云南畜牧兽医, 2006(2): 20.
- [4] OMTVEDT I T, STRANISLAW C M, WHATLEY J A Jr. Relationship of Gestation Length, Age and Weight at Breeding, and Gestation Gain to Sow Productivity at Farrowing[J]. J Anim Sci, 1965, 24: 531-535.
- [5] CHEN C Y, GUO Y M, ZHANG Z Y, et al. A whole genome scan to detect quantitative trait loci for gestation length and sow maternal ability related traits in a White Duroc x Erhualian F2 resource population[J]. Animal, 2010, 4(6): 861-866.
- [6] TEAM R C. R: A language and environment for statistical computing[K]. Vienna, Austria; R Foundation for Statistical Computing, 2013.
- [7] BERTOLDO M, HOLYOAKE P K, EVANS G, et al. Follicular Progesterone Levels Decrease During the Period of Seasonal Infertility in Sows[J]. Reproduction in Domestic Animals, 2011, 46(3): 489-494.
- [8] IMBOONTE N, KUHAADOMLARP P. Genetic Associations between Stillbirth, Total Number of Piglets Born and Gestation Length in a Commercial Pig Farm[J]. Thai Journal of Veterinary Medicine, 2012, 42(2): 165-172.
- [9] RYDHMER L, LUNDEHEIM N, CANARIO L. Genetic correlations between gestation length, piglet survival and early growth[J]. Livestock Science, 2008, 115(2/3): 287-293.
- [10] 韩盛利, 王希彪, 潘玉春, 等. 影响母猪繁殖性状的固定效应分析[J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(2): 213-216.
- [11] 罗海彬, 李平华. 长白猪不同胎次对繁殖性状的影响[J]. 畜禽业, 2010(1): 20-21.
- [12] 陈海燕, 朱海平, 叶选怡, 等. 影响外来猪种繁殖性状若干因素的研究[J]. 上海交通大学学报, 2003, 21(3): 73-76.
- [13] VAN DER LENDE T, VAN RENS B. Critical periods for foetal mortality in gilts identified by analysing the length distribution of mummified foetuses and frequency of non-fresh stillborn piglets[J]. Animal Reproduction Science, 2003, 75(1/2): 141-150.
- [14] PELTONIEMI O A, LOVE R J, HEINONEN M, et al. Seasonal and management effects on fertility of the sow: a descriptive study[J]. Anim Reprod Sci, 1999, 55(1): 47-61.
- [15] AUVIGNE V, LENEVEU P, JEHANNIN C, et al. Seasonal infertility in sows: a five year field study to analyze the relative roles of heat stress and photoperiod[J]. Theriogenology, 2010, 74(1): 60-66.

(上接第3919页)

- [17] SAARELA T, HILTUNEN M, HELISALMI S, et al. Polymorphisms of interleukin-6, hepatic lipase and calpain-10 genes, and preeclampsia[J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 2006, 128: 175-179.
- [18] ESCOBAR-MORREALE H F, PERAL B, VILLUENDAS G, et al. Common single nucleotide polymorphisms in intron 3 of the calpain-10 gene influence hirsutism[J]. Fertil Steril, 2002, 77: 581-587.

- [19] GLADNEY C D, BERTANI G R, JOHNSON R K, et al. Evaluation of gene expression in pigs selected for enhanced reproduction using differential display PCR and human microarrays: I. Ovarian follicles[J]. J Anim Sci, 2004, 82: 17-31.
- [20] GARCIA M D, MICHAL J J, GASKINS C T, et al. Significant association of the calpastatin gene with fertility and longevity in dairy cattle[J]. Anim Genet, 2006, 37: 304-305.