

caspase 在疾病与组织损伤中的作用

赵 锐, 官大威, 杜 宇

(中国医科大学法医学院, 辽宁 沈阳 110001)

【关键词】法医病理学; caspase; 疾病; 组织损伤

【文献标识码】A 【文章编号】1001-5728(2004)01-0058-03

半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 (cysteiny aspartate specific proteinase), 简称 caspase, 由 14 个家族成员组成 (caspase-1 ~ caspase-14)。这类蛋白酶与细胞凋亡形态学特征变化 (如胞膜空泡形成、核膜裂解、染色质聚集和边聚及 DNA 断裂等) 以及一些生化改变关系密切^[1]。而细胞凋亡在正常情况下是生理性的自我消亡过程, 在胚胎的发育, 生物体内环境稳态的维持以及多细胞对外来和内在伤害方面的防御均起着非常重要的作用。而凋亡过程的紊乱可能与许多疾病发生有直接或间接的关系, 如肿瘤、自身免疫性疾病、退行性神经病变及局部损伤等^[2]。

1 caspase 家族的结构、分类及激活途径

1.1 caspase 的结构与分类

在结构上, caspase 成员在氨基酸序列、空间结构、作用底物及酶的特异性方面存在相似性。正常时, 它们均以无活性的酶原形式存在, 分子内含 3 个结构域: 1 个氨基末端的前结构域 (prodomain), 1 个大亚基和 1 个小亚基^[3]。根据功能和结构同源性的不同, caspase 可分为三类: 凋亡启动因子 (apoptotic initiators)、凋亡执行因子 (apoptotic executioners) 和炎症介导因子 (inflammatory mediators)^[3]。凋亡启动因子由 caspase-2、caspase-8、caspase-9 和 caspase-10 组成, 位于凋亡过程上游, 其作用部位存在于细胞表面和线粒体, 均有长的氨基末端前结构域, 在识别和激活下游半胱氨酸天冬酶过程中起重要作用。凋亡执行因子由 caspase-3、caspase-6 和 caspase-7 组成, 其共同特征为均有短的氨基末端前结构域, 作用其特异性底物并导致细胞凋亡。炎症介导因子由 caspase-1, -4, -5, -11 组成, 是炎症的重要调节因子^[3], caspase-1 为最早发现的 CED-3 人类同源物, 又称白介素-1 β 转化酶 (interleukin-1 β converting enzyme, ICE), 其作用是将白介素-1 β 转化为活性形式并介导炎症。

1.2 caspase 家族的激活途径

caspase 家族的活化通常由外源性和内源性两个途径组成。外源性途径始于细胞表面死亡受体, 细胞表面死亡受体属于肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、神经生长因子 (nerve growth factor, NGF) 超家族, 如 Fas/TNFR1 (TNF receptor-1)。TNFR1 和 Fas 胞浆部分都有 1 个 68-氨基酸区域

被称为死亡域 (death domain, DD); 在胞浆内有两种能与 Fas 及 TNFR 相结合的蛋白, 即 Fas 相关死亡结构域 (Fas associated death domain, FADD) 和 TNFR 相关死亡结构域 (TNFR associated death domain, TRADD), 其各自羧基末端含有一段由 208 个氨基酸组成的死亡域, 此区可与 Fas 或 TNFR1 的死亡域 (DD) 相结合。在 FADD 的氨基端还有一段起调节作用的功能区, 为介导调节信号所必需, 称死亡效应域 (Death effector domain, DED)。在外源性途径中, 由于各种细胞凋亡信号的刺激, FasL (Fas ligand) 和 TNF- α 作用于相应的受体, 使得内源性 FADD 的死亡域和 Fas 的死亡域发生直接的作用, 生成 FasL-Fas-FADD 凋亡复合物而使细胞凋亡。而 TRADD 通过和 DD 间的相互作用, 与 TNFR1 直接结合, 间接地使 TNFR1 与 FADD 相结合形成 TNF- α -TNFR-TRADD-FADD 复合物。复合物形成后, FADD 的 DED 即和 caspase-8 酶原或 caspase-10 酶原结合^[4], 使 caspase 酶原活化成为活性 caspase。然后, 活化的 caspase 激活下游的 caspase-3, -6, -7, 最终导致细胞凋亡。

内源性细胞凋亡途径始于线粒体, 当受到凋亡信号刺激后, 线粒体释放细胞色素 C 到胞浆。细胞内存在一种凋亡细胞蛋白酶激活因子 (Apoptosis Protease Activating Factor-1, Apaf-1), 该因子与线虫的 CED-4 具有高度同源性, 它们的分子内均含有一个半胱氨酸蛋白酶募集域 (caspase recruitment domain, CARD), CARD 可直接与 caspase 结合。当细胞色素 C 释入胞浆后, 细胞色素 C 和 Apaf-1 结合, 在 dATP 存在的条件下, 通过半胱氨酸蛋白酶募集域的作用, Apaf-1 和 caspase-9 酶原结合, 使 caspase-9 酶原活化成为活性 caspase-9, 然后激活下游的效应半胱氨酸蛋白酶如 caspase-2, -3, -6, -7, -8, -10 而启动细胞凋亡。另外, 除上述两条途径外, 尚其他的凋亡途径存在, 仍需进一步研究证实。

2 caspase 家族成员在疾病中的作用

2.1 caspase 与肿瘤的关系

肿瘤的发生不仅是细胞增殖和分化异常的疾病, 同时也是凋亡异常的疾病。大量体内外的研究表明, 肿瘤的发生、发展与肿瘤细胞的凋亡现象相关共存, 与细胞凋亡速度密切相关。诸多资料表明在许多肿瘤细胞的凋亡中有 caspase 的活化。Seki 用化疗药顺铂诱导人骨肉瘤细胞株凋亡发现 caspase-3, -6, -8 均被活化^[5]。Turnuen 等在 39 例胆囊癌中发现有 30 例表达 caspase-6, 其表达率为 77%^[6]。

2.2 caspase 与疾病的病因和疾病治疗

临床上的许多种疾病与 caspase 密切相关, 因此研究 caspase

【基金项目】国家自然科学基金资助项目 (30271347)、教育部留学归国基金资助项目 (教外留司 [2000] 367 号)

【作者简介】赵锐 (1978 -), 男, 辽宁本溪人, 硕士研究生, 主要从事皮肤损伤愈合机制的研究。

case 的作用对临床上疾病的诊断和治疗提供了新的思路。已证明 caspase 与白血病、自身免疫性疾病、某些皮肤病、脑血管疾病、心血管疾病、消化、泌尿系统的疾病有关。研究表明在 AIDS 中, 结合了 HIV-1 膜蛋白的 CD⁺4 和 CD⁺8 T 淋巴细胞可诱导 caspase-3、-6 的活化, 促使 T 细胞凋亡, 失去其生物学功能^[7]。因此尝试利用 caspase 的抑制剂治疗临床上的疾病将对未来的临床用药提供广阔的前景。caspase 抑制剂抑制细胞凋亡的发生对缺氧一再灌注脑损伤、缺氧一再灌注心肌损伤、败血症诱导的肝损伤、细菌性脑膜炎等疾病均有治疗作用。心肌梗死后用 caspase 抑制剂 Z-VAD-fmk 处理, 可见梗死面积缩小, 急性功能参数改善^[8]; caspase 抑制剂 Z-VAD-fmk 可以改善脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤, 提高生存率^[9]。应用抑制 caspase-1 表达的转基因鼠制作脑挫裂伤模型, 观察发现小鼠脑挫裂伤损伤面积减小, 还发现在伤前应用 caspase-1 选择性阻滞剂 IVAD-fmk 或非选择性阻滞剂 Ac-YVAD-fmk, 也可使小鼠脑挫裂伤面积减小^[10]。Hara 等建立大鼠缺血模型并给予 caspase-3 特异性蛋白抑制剂观察到实验动物神经功能明显改善, 脑水肿减轻, 神经元细胞凋亡减少^[11]。目前, caspase 蛋白酶抑制剂在动物实验中已显示出较好的应用前景, 但距临床应用还有较大距离。

3 caspase 在组织损伤中的作用

在组织损伤和炎症过程中, 中性粒细胞和其他的滞留细胞通过凋亡机制, 在膜完整的情况下被巨噬细胞识别和清除, 从而避免继发的炎症反应, 在执行细胞凋亡和促进创面愈合过程中 caspase 发挥重要的作用。已证明 caspase 与中枢神经损伤、皮肤损伤、其他内脏损伤和炎症反应等有关。在损伤学中具有重要的应用价值。

caspase 在创伤性脑损伤、脑缺血-再灌注损伤、脊髓损伤中发挥重要作用, 对法医学鉴定具有一定的指导意义。在损伤学方面, 细胞凋亡是脑损伤后引起的继发性损害的重要原因, 特别是迟发性神经元的坏死机制可能与细胞凋亡有关。近年的研究发现, caspase 在神经细胞凋亡中起重要作用。caspase 在脑外伤病理过程中的重要作用已被不同动物模型证实。Yakoevlev 等最早研究 caspase 在创伤性脑外伤中的作用。利用大鼠侧方液压脑外伤模型观察到, 在大鼠的大脑皮质及海马区 caspase-1、caspase-3 的活性和片段化 DNA 含量均升高; 切割蛋白质 DEVD 位点的活性增强; 脑室内给予特异性 caspase-1 抑制剂 IDEVD-fmk 治疗, 3 日后脑组织内 DNA 分解片段减少, 2 周后大鼠运动功能明显提高^[12]。Clark 等运用大鼠脑挫伤并缺血动物模型, 证实 caspase-3 类酶活性增高, 脑实质内注入 caspase-3 抑制剂 IDEVD-fmk 治疗后, 脑挫伤面积缩小, 但行为缺陷改变不明显, 考虑可能与 IDEVD-fmk 的用量或用药的方式有关。研究表明创伤性脑外伤后, 不仅 caspase-3 在神经细胞凋亡中起重要作用, caspase-1 的作用也不容忽视^[13]。Clark 等比较了人脑外伤后脑组织和非脑外伤死亡患者进行尸检获得的脑组织中 caspase-3 表达情况, 发现脑外伤后脑组织 caspase-3 的表达比非外伤组明显升高^[14]。在法医鉴定学方面, caspase 在判断损伤程度和损伤时间上有着不容忽视的作用。陶陆阳等报道, 脑损伤后 caspase-1 的阳性表达细胞的面积和脑挫伤的程度有关, 并且 caspase-1 的表

达增强可辅助诊断 1~14 小时的脑挫伤, 在判断脑损伤时间上有一定的价值^[15]。杨新宇等报道额顶区皮质、海马区大鼠神经元中 caspase-3 mRNA 蛋白水平表达与打击程度有关, 重度打击组其表达强度明显高于中度打击组^[16]。在脊髓损伤中, 研究表明损伤区和损伤周边区有 caspase 的表达, 脊髓损伤很早就出现 caspase-3、-9 的蛋白表达的增强并持续到损伤后 3 天。同样对 15 例脊髓损伤致死的病人的组织学检查发现在脊髓损伤区周围白质有一个明显的 caspase-3 的表达带^[17], 这对生前脊髓损伤的判定及损伤时间的推断提供良好的依据。

其次, caspase 在皮肤损伤愈合机制中发挥重要作用。Guan DW 等证明皮肤损伤愈合过程中成纤维细胞和巨噬细胞表面均有 Fas/ FasL 表达^[18]。杜宇等研究表明小鼠皮肤切创愈合过程中, 中性粒细胞、巨噬细胞、成纤维细胞中有 caspase-6、-7 的表达, 并呈时间规律性变化, 表明 caspase 家族在损伤愈合过程中执行细胞凋亡的重要作用, 并有望作为皮肤损伤时间判定的一个客观指标^[19]。在深度烫伤 3 小时创面真皮组织中表达 caspase-3 mRNA 的细胞明显增多, 在 3 小时达到高峰, 随后略有减少, 伤后 3 天又开始增加, 于第 7 天再次达到最高峰, 随后再次减低^[20]。最近的研究表明损伤愈合过程中凋亡的调节对瘢痕的建立和病理性瘢痕的发展起重要作用, 在病理性瘢痕和疤痕疙瘩中 caspase-3 较正常对照组织的活性增强^[21]。

再次, 在心肌缺血-再灌注损伤、心肌炎、心肌梗死等均可见 caspase-3 的激活, 还有证明 caspase-3 在心肌梗死后的非梗死心肌的重建中发挥重要作用^[7]。在肺损伤、肝损伤、肠缺血一再灌注等损伤和炎症中均有 caspase 的表达增强^[8,9,22]。充分说明了 caspase 家族成员在组织损伤中发挥重要作用并具有广阔的研究前景。

另外, caspase 还可以证明微细的损伤的存在。有报道称在一例 47 岁的缢死案例中, 肉眼和一般的组织学染色并没有发现相应部位有损伤改变, 但在颈部和喉部的皮下骨骼肌中发现 caspase-8 的损伤后的早期表达并且 caspase-8 的表达只存在于缢索接触的部位^[23]。

4 caspase 作用的研究前景

在机体疾病、损伤、炎症等因素的刺激下, 细胞存在凋亡现象, 并有 caspase 家族成员的激活。在疾病研究中 caspase 的表达可能存在器官差异、各家族成员表达水平的不同, 不同疾病的病变部位、同一疾病的不同程度都可能存在着一定的差异, 而 caspase 执行细胞凋亡的作用对疾病治疗和愈后影响还需进一步的探讨; 在炎症损伤、药物、缺血缺氧等条件的作用下, 损伤组织中 caspase 家族成员的表达是一个级联的过程, 有一定的时间规律性, 并执行不同的功能, 单一成员的激活和表达也有时间规律性, 而且不同程度的损伤其家族成员的激活存在一定的差异, 据此可以通过检测 caspase 家族成员在特定组织器官的表达水平而达到辅助推断损伤时间、判断损伤程度或认定死因的目的, 但 caspase 家族的不同成员的表达与不同组织损伤程度和损伤时间的关系还有待进一步的研究, 因此 caspase 在损伤程度和损伤时间上的判定有广阔的应用前景。值得提出的是某些 caspase 家族成员可以在一些微细而肉眼观察不到的损伤组织中有表达, 这也为法医实践

中解决一些实际问题提供了有力的工具。目前在某些疾病或器官、组织损伤中,对 caspase 作用的研究还处于初级阶段, caspase 与疾病病因、损伤程度的关系及其对治疗疾病、判断损伤程度、推断损伤时间等方面还无定论,其具体的实际应用价值还有待深层次的探讨。因此, caspase 家族在疾病病因学和损伤学中的应用前景非常广阔。

【参 考 文 献】

- [1] Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, *et al.* A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 β processing in monocytes [J]. *Nature*, 1992, 356 (6372): 768 - 774.
- [2] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, 267 (15203): 1456 - 1462.
- [3] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within [J]. *Science*, 1998, 281 (5381): 1312 - 1316.
- [4] Vincenz C, Dixit VM. Fas-associated death domain protein interleukin-1 β -converting enzyme 2 (FLICE2), an ICE/CED-3 homologue, is proximally involved in CD95 and p55-mediated death signaling [J]. *J Biol Chem.*, 1997, 272 (10): 6578 - 6583.
- [5] Seki K, Yoshikawa H, Shiiki K, *et al.* Cisplatin (CDDP) specifically induces apoptosis via sequential activation of caspase-8, -3 and -6 in osteosarcoma [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000, 45 (3): 199 - 206.
- [6] Turuner N, Paakko P, Soini Y. Apoptosis in gallbladder carcinomas and dysplasias, its relation to the expression of caspase-3, -6, -8 and apoptosis regulating protein bcl-2 and Bax [J]. *Histol Histopathol*, 2000, 15 (1): 53 - 60.
- [7] Cicala C, Arthos J, Rubbert A, *et al.* HIV-1 envelope induces activation of Caspase-3 and cleavage of focal adhesion kinase in primary human CD⁺4 T cells [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97 (3): 1178 - 1183.
- [8] Huang JQ, Radinovic S, Rezaiefar P, *et al.* In vivo myocardial infarct size reduction by a caspase inhibitor administered after the onset of ischemia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 402 (1-2): 139 - 142.
- [9] Kawasaki M, Kuwano K, Hagimoto N, *et al.* Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute injury in mice by a caspase inhibitor [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157 (2): 597 - 603.
- [10] Fink KB, Andrews LJ, Butler WE, *et al.* Reduction of post-traumatic brain injury and free radical production by inhibition of the caspase-1 cascade [J]. *Neurosci*, 1999, 94 (4): 1213 - 1218.
- [11] Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, *et al.* Inhibitor of ICE family proteases reduced ischemic and excitotoxic neuronal damage [J]. *Proc Natl Acad*, 1997, 94: 2007.
- [12] Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, *et al.* Activation of CPP32-like caspase contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury [J]. *J Neurosci*, 1997, 17 (19): 7415 - 7424.
- [13] Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, *et al.* Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurochem*, 2000, 74 (2): 740 - 753.
- [14] Clark RS, Chen [J], Watkins SC, *et al.* Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rat [J]. *J Neurosci*, 1997, 17 (23): 9172 - 9182.
- [15] 陶陆阳, 陈溪萍, 丁梅, 等. 实验性脑挫伤后 caspase-1 表达的研究 [J]. *法医学杂志*, 2003, 19 (1): 4 - 7.
- [16] 杨新宇, 杨树源, 张建宁, 等. 急性脑创伤后神经元 caspase-3 表达、激活及作用的实验研究 [J]. *中华神经外科学杂志*, 2002, 18 (6): 375 - 378.
- [17] Emery E, Aldana P, Bunge MB, *et al.* Apoptosis after traumatic human spinal cord injury [J]. *J Neurosurg*, 1998, 89 (6): 911 - 920.
- [18] Guan DW, Ohshima T, Kondo T. Expression of Fas and FasL during the skin wound healing process in mice [J]. *Histochem J*, 2000, 32: 85 - 91.
- [19] 杜宇, 官大威, 赵锐. 小鼠皮肤切创愈合过程中 caspase-6, -7 表达的免疫组织化学研究 [J]. *中国法医学杂志*, 2003, 18 (5): 259 - 261.
- [20] 程飏, 付小兵, 盛志勇, 等. 碱性成纤维细胞生长因子对肌成纤维细胞的作用及其对创面愈合的影响 [J]. *中华医学杂志*, 2002, 82 (17): 1187 - 1191.
- [21] Akasaka Y, Ishikawa Y, Ono I, *et al.* Enhanced Expression of Caspase-3 in hypertrophic scar and keloid; Induction of caspase-3 and apoptosis in keloid fibroblast in vitro [J]. *Lab Invest*, 2000, 80 (3): 345 - 357.
- [22] Abbate A, Biondi-Zoccai GG, Bussani R, *et al.* Increased myocardial apoptosis in patients with unfavorable left ventricular remodeling and early symptomatic post-infarction heart failure [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 41 (5): 753 - 760.
- [23] Klir P, Toupalik P, Bouska I, *et al.* Detection of caspase as a sign of tissue damage [J]. *Soud lek*, 2001, 46 (4): 48 - 50.

(收稿日期: 2003 - 12; 修回日期: 2004 - 01)

欢迎订购 《中国法医学杂志》 2003 年合订本

每本定价: 75.00 元 (含邮寄费), 欲购者请直接汇款至: 北京 3817 信箱 中国法医学学会; 邮编: 100038。