

①

## Caspase-3 与心肌缺血/再灌注损伤

胡章乐, 马礼坤

(安徽省立医院心血管内科, 合肥 230001)

**[摘要]** Caspase-3 是一种与细胞凋亡密切相关的蛋白酶。心肌缺血/再灌注过程可通过诱导氧化应激状态和促进死亡受体及配体的表达激活 Caspase-3, 引起心肌细胞凋亡, 加重心肌损伤。某些药物能抑制缺血/再灌注诱导的心肌细胞凋亡, 减轻心肌损伤, 其心肌保护作用也涉及 Caspase-3 活性的抑制。

**[关键词]** Caspase-3; 凋亡; 缺血/再灌注; 损伤

**[中图分类号]** R541.4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-2588(2007)03-0208-03

## Caspase-3 and myocardial injury after ischemia/reperfusion

HU Zhang-le, MA Li-kun

(Department of Cardiology, Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China)

**[Abstract]** Caspase-3 is an important proteinase and reported to relate intimately with cell apoptosis. By inducing high oxidative stress state and enhancing expression of death receptors and ligands, ischemia/reperfusion leads to the activation of caspase-3, resulting in cardiomyocyte apoptosis and then aggravation of myocardial injury. Some drugs exert their myocardial protection role by preventing cardiomyocyte apoptosis, with the inhibition of caspase-3 activity.

**[Key words]** Caspase-3; apoptosis; ischemia/reperfusion; injury

[Int J Pathol Clin Med, 2007, 27(3):0208-03]

及时疏通闭塞的冠状动脉, 恢复正常血供, 是临床上治疗急性心肌梗死的有效措施。然而, 实验和临床研究证实, 缺血心肌再灌注可进一步加重缺血心肌损伤, 这种现象称缺血/再灌注损伤。细胞凋亡可能在心肌缺血/再灌注损伤中起重要作用<sup>[1]</sup>。基于 Caspase-3 在凋亡中的中心角色, 目前认为 Caspase-3 与心肌缺血/再灌注损伤密切相关。

### 1 Caspase-3 的生物学特性

Caspase 是半胱氨酸天冬氨酸酶(cysteine aspartase)的缩写。“C”和“aspase”分别代表半胱氨酸蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶的活性, 后者具有在天冬氨酸后切断肽键的能力, 是这一类蛋白酶家族最独特的催化特性<sup>[2]</sup>。目前, 已发现至少有 14 种具有上述特点的酶, 这些酶合称 Caspase 家族。

人类 Caspase-3 基因定位于 4 号染色体, 编码一个由 277 个氨基酸残基组成的多肽, 即分子量为 32

kD 的 Caspase-3 前体——酶原 proCaspase-3。pro-Caspase-3 与线虫细胞凋亡所必需的细胞死亡基因 (cell death gene, CED)-3 蛋白具有最高的同源性<sup>[3]</sup>。Caspase-3 属于 Caspase 家族中的效应子 Caspase, 主要作用是对底物蛋白质进行酶解, 直接介导凋亡实施。

### 2 Caspase-3 的激活机制

蛋白酶原 proCaspase-3 是细胞内合成和分泌的 Caspase-3 的前体形式, 无生物学活性。在各种信号的刺激下, proCaspase-3 经两大途径激活生成有活性的 Caspase-3<sup>[3]</sup>。

**2.1 死亡受体途径** 死亡受体为位于细胞膜表面的某种蛋白质, 能与携带凋亡信号的专一性配体结合并迅速将凋亡信号转导到细胞内而诱导细胞凋亡, 属于肿瘤坏死因子受体基因超家族成员<sup>[4]</sup>。死亡受体与其相应配体结合导致受体寡聚化, 通过死

①收稿日期:2006-09-27 修回日期:2007-02-06

作者简介:胡章乐(1981-),男,安徽池州人,硕士研究生,主要从事心血管内科方面的研究。

亡受体的死亡区域(death domain, DD)间相互作用将细胞内的接头蛋白募集到细胞膜,诱导细胞凋亡。目前了解较多的死亡受体主要有 Fas 和 TNFR1,其相应的配体分别为 FasL 和 TNF- $\alpha$ 。

**2.1.1 FasL/Fas 途径** Fas 与其配体 FasL 结合,形成 Fas/FasL 复合物,随后 Fas 发生寡聚化,形成三聚体。三聚体形式的 Fas 的 C 末端“死亡域”(DD)结合细胞内 Fas 受体相关死亡域蛋白(Fas receptor associated death domain protein, FADD) C 末端的 DD,形成 Fas/FADD 复合物。Fas/FADD 复合物通过同时存在于 FADD 和 proCaspase-8 (FADD like ICE, FLICE) 的死亡效应区域(dead effect domain, DED)之间的相互作用而募集 proCaspase-8,形成细胞内死亡诱导信号复合体(DISC),激活 Caspase-8。Caspase-8 可以直接活化 proCaspase-3 生成 Caspase-3;Caspase-8 还能分解释放促凋亡蛋白 Bid,从而诱导细胞色素 c 从线粒体释放到胞浆中,通过细胞色素 C 激活 Caspase-3<sup>[5]</sup>。

**2.1.2 TNF- $\alpha$ /TNFR1 途径** TNF- $\alpha$  与 TNFR1 结合使其三聚化,并且诱导 DD 的簇集,随后簇集的 DD 受体与 TNFR1 相关死亡结构(TNFR1-associated death domain, TRADD)的 DD 相结合。TNFR1 通过 TRADD 和 FADD 结合后激活 Caspase-8,通过 Caspase-8 直接或间接激活 Caspase-3<sup>[4]</sup>。TNFR1 通过 TRADD 和 FADD 结合后,还能通过激活 JNK/SPK 途径而活化 Caspase-3<sup>[6]</sup>。

**2.2 线粒体途径** 线粒体通透转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)是位于线粒体外膜间的多蛋白孔道,包括己糖激酶、外周苯二氮草受体、亲环素 D 等<sup>[7]</sup>。MPTP 开放一方面大量离子进入线粒体基质内导致基质内高渗环境形成,线粒体肿胀、外膜破裂导致线粒体内膜跨膜电位逐渐消失,外膜通透性增加;另外,内膜内容物(细胞色素 C、凋亡诱导因子等)通过高通透性的外膜释放入胞浆<sup>[8]</sup>。在 dATP/ATP 一定比例条件下细胞色素 C 与凋亡蛋白酶活化因子-1 (apoptotic protease activating factor -1, Apaf-1) 和 proCaspase-9 形成复合物而活化 Caspase-9,进而激活 Caspase-3<sup>[9]</sup>。氧化应激等因素可诱导 MPTP 开放<sup>[10]</sup>。

### 3 Caspase-3 与细胞凋亡

Caspase-3 可以通过作用于下游的多种底物,导致细胞特征性的形态学改变、诱导细胞凋亡:(1)切割 PARP(poly ADP-ribose polymerase),激活核酸内切

酶,降解核小体间的 DNA,导致形态学上的 DNA 梯带的出现;(2)在 Caspase-9 的协助下,进入细胞核剪切 Caspase 激活的 DNA 酶抑制剂(inhibitor of caspase-activated DNase, ICAD),导致 CAD 从复合物中的释放,降解 DNA;(3)剪切核纤层蛋白(Lamin A)导致细胞核骨架破坏,染色质边集、核膜皱缩;(4)剪切胞衬蛋白(Fodrin),引起细胞骨架解离,导致凋亡小体的形成。Caspase-3 还能够剪切抗凋亡蛋白 Bcl-2<sup>[3]</sup>。另外,Caspase-3 还能够通过激活 Caspase-6,9 间接作用上述底物并促进 Caspase-3 的生成。

### 4 Caspase-3 与心肌缺血/再灌注损伤

缺血/再灌注时心肌 Caspase-3 呈高活性状态。Black 等<sup>[11]</sup>发现 SD 大鼠缺血/再灌注区域心肌 Caspase-3 的表达显著升高,且定位于凋亡的心肌细胞。Okamura 等<sup>[12]</sup>的研究显示,缺血/再灌注 SD 大鼠的缺血危险区 Caspase-3 的表达显著升高、凋亡的心肌细胞数量明显增加。家兔缺血/再灌注后心肌 Caspase-3 活性显著提高,凋亡细胞明显增多<sup>[13]</sup>。在缺血/再灌注的人的右心房心肌组织,Caspase-3 活性明显增加,凋亡细胞数量也明显增多<sup>[14]</sup>。这些结果均提示心肌缺血/再灌注时 Caspase-3 呈高表达活性状态,且凋亡明显增多。

众多研究提示,缺血/再灌注可能通过促进高氧化应激状态以及死亡受体及其配体表达从而激活 Caspase-3 的两大活化途径,提高心肌 Caspase-3 的活性:(1)死亡受体及配体表达增加。Kajstura 等<sup>[15]</sup>发现梗死后 2 h 大鼠心肌 Fas 蛋白表达明显增加。另外,大鼠心肌缺血/再灌注后,Fas mRNA 和 Fas 蛋白表达均增加。培养的乳鼠心肌细胞缺氧/复氧模型及离体灌注的心肌缺血/再灌注的研究均发现有心肌细胞凋亡和 Fas,FasL 表达的明显增加。Onimaru 等<sup>[16]</sup>发现,离体鼠心脏在缺血/再灌注后,TNF- $\alpha$  水平显著增高;在心肌缺血/再灌注后的 SD 大鼠,其 TNF- $\alpha$  水平显著升高<sup>[17]</sup>。提示缺血/再灌注促进心肌 TNF- $\alpha$  的生成。(2)氧化应激激活。心肌缺血/再灌注时氧化应激呈高度激活状态已成为共识,而氧化应激是诱导 MPTP 开放的重要因素。

### 5 Caspase-3 抑制剂与缺血/再灌注心肌保护

许多药物可以直接抑制 Caspase-3 活性或通过阻抑激活途径间接抑制其活性而阻断凋亡进程,发挥保护缺血/再灌注心肌的作用。

**5.1 Caspase 抑制剂** 人工合成的 Caspase 抑制剂主要有选择性抑制剂及非选择性抑制剂。研究显

示,在缺血前和再灌注时给予 Caspase-3 的特异性抑制剂 Ac-DEVD-cmk 能够显著抑制 Caspase-3 的活性、减少凋亡细胞的数量、缩小梗死心肌的面积<sup>[18]</sup>。非选择性抑制剂也能通过抑制 Caspase-3 的活性保护缺血/再灌注的心肌<sup>[19]</sup>。

**5.2 抗氧化剂** 具有抗氧化活性的调脂药普罗布考预处理的家兔在缺血/再灌注后,其心肌细胞 Caspase-3 活性及凋亡心肌细胞数明显降低<sup>[13]</sup>。抗氧化剂 C-phycoyanin 能够抑制心肌细胞 Caspase-3 活性,减少凋亡心肌细胞的数量,缩小缺血/再灌注后梗死心肌的面积<sup>[20]</sup>。

**5.3 MPTP 开放抑制剂** 环孢素 A 能够与线粒体基质中的受体亲环素 D 结合阻断 MPTP 开放。在环孢素 A 预处理后的缺血/再灌注心肌, Caspase-3 活性显著下降、凋亡细胞数明显减少<sup>[21]</sup>。

综上所述,心肌缺血/再灌注可能通过诱导高氧化应激状态及促进死亡受体表达进而活化线粒体和死亡受体途径激活 Caspase-3,降解细胞 DNA 蛋白,导致心肌细胞凋亡,加重心肌损伤。药物保护缺血/再灌注心肌的研究是目前药物领域的研究热点之一,而这些药物对 Caspase-3 活性及凋亡影响及其机制的探讨也是一个重要的研究方向。

#### 参 考 文 献

[1] Eefting F, Rensing B, Wigman J P, et al. Role of apoptosis in reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3):414-426.

[2] Nicholson D W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death[J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(11):1028-1042.

[3] Fan T J, Han L H, Cong R S, et al. Caspase family proteases and apoptosis[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(11):719-727.

[4] Lavrik I, Golks A, Krammer P H. Death receptor signaling[J]. *J Cell Sci*, 2005, 118(Pt 2):265-267.

[5] Kim T H, Zhao Y, Barber M J, et al. Bid-induced cytochrome c release is mediated by a pathway independent of mitochondrial permeability transition pore and Bax[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(50):39474-39481.

[6] Ashkenazi A, Dixit V M. Death receptors: signaling and modulation[J]. *Science*, 1998, 281(5381):1305-1308.

[7] Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death[J]. *Biochem J*, 1999, 341(Pt 2):233-249.

[8] Kroemer G, Reed J C. Mitochondrial control of cell death[J]. *Nat Med*, 2000, 6(5):513-519.

[9] Halestrap A, Kerr P, Javadov S, et al. Elucidating the molecular

mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1366(1-2):79-94.

[10] Di Lisa F, Canton M, Menaba R, et al. Mitochondria and reperfusion injury - the role of permeability transition[J]. *Basic Res Cardiol*, 2003, 98(4):235-241.

[11] Black S C, Huang J Q, Rezaiefar P, et al. Co-localization of the cysteine protease Caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1998, 30(4):733-742.

[12] Okamura T, Miura T, Takemura G, et al. Effect of Caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(3):642-650.

[13] Ruixing Y, Al-Ghazali R, Wenwu L, et al. Pretreatment with probucol attenuates cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia/reperfusion[J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2006, 66(7):549-558.

[14] Vohra H A, Galinanes M. Effect of the degree of ischaemic injury and reoxygenation time on the type of myocardial cell death in man: role of caspases[J]. *BMC Physiol*, 2005, 5(3):14.

[15] Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats[J]. *Lab Invest*, 1996, 74(1):86-107.

[16] Onimaru S, Nakamura K, Kariyazono H, et al. Inhibitory effects of edaravone on the production of tumor necrosis factor-alpha in the isolated heart undergoing ischemia and reperfusion[J]. *Heart Vessels*, 2006, 21(2):108-115.

[17] Oh W S. Effect of fentanyl on TNF-alpha and IL-1beta levels during global ischemia/reperfusion in rats[J]. *Int J Tissue React*, 2002, 24(1):11-21.

[18] Mocanu M M, Baxter G F, Yellon D M. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2000, 130(2):197-200.

[19] Kovacs P, Bak I, Szendrei L, et al. Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts[J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2001, 364(6):501-507.

[20] Khan M, Varadharaj S, Ganesan L P. C-phycoyanin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 MAPK and ERK signaling[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(5):H2136-2145.

[21] 谢俊然, 郁丽娜, 骆荣华, 等. 环孢素 A 对缺血-再灌注大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2005, 21(12):838-840.

XIE Jun-ran, YU Li-na, LUO Rong-hua, et al. Effects of cyclosporin A on cardiomyocyte apoptosis after ischemia-reperfusion in rats[J]. *J Clin Anesthesiol*, 2005, 21(12):838-840.