

[文章编号] 1000-4718(2009)07-1438-04

· 综述 ·

# Calpain 与心肌细胞凋亡\*

李明辉, 陈瑞珍

(复旦大学附属中山医院, 上海市心血管病研究所, 卫生部病毒性心脏病重点实验室, 上海 200032)

## Calpain and cardiomyocyte apoptosis

LI Ming-hui, CHEN Rui-zhen

(Key Laboratory of Viral Heart Disease, Ministry of Public Health, Shanghai Institute of Cardiovascular Diseases, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China. E-mail: chen.ruizhen@zs-hospital.sh.cn)

**【ABSTRACT】** Cardiomyocytes apoptosis plays a crucial role in the pathologic process of some ischemic and non-ischemic heart diseases. Since the discovery of the calpain family, more and more studies have demonstrated their close relationship with cell apoptosis. In addition to the consideration of their unique distribution in the cardiomyocytes, we are enthralled by their implication of a novel direction for both the diagnosis and the treatment of various heart diseases.

**【关键词】** 卡配因; 心肌细胞; 细胞凋亡

**【KEY WORDS】** Calpain; Cardiomyocytes; Apoptosis

**【中图分类号】** R363

**【文献标识码】** A

细胞凋亡在维持机体生理稳态和生长发育中发挥着重要作用,同时也参与了众多疾病的病理过程。在诸多缺血性及非缺血性心脏疾病的病理过程中,心肌细胞凋亡扮演着重要角色<sup>[1]</sup>。在转基因小鼠中,抑制心肌细胞凋亡可以改善心脏的功能,降低原发性心肌病的死亡率<sup>[2]</sup>;而各种心脏疾病最终所致的慢性心功能不全常常伴随着心肌细胞凋亡现象,当延缓心功能不全时则发现心肌细胞的凋亡被抑制<sup>[3]</sup>。

心肌细胞凋亡存在两条经典途径:外源性和内源性途径,前者由 Fas、TNFR1 等细胞表面死亡受体通过与细胞外凋亡诱导信号特异性结合而引发;后者由线粒体介导,通常由缺血、缺氧、缺血后再灌注和氧化应激等病理因素诱导。近年来对 calpain 家族的研究发现,它们与细胞凋亡的关系密切,尤其是与两种凋亡途径中的相关信号转导过程密切相关,又由于其在心肌细胞中的特殊分布,从而引起广泛的关注。

### 1 Calpain 家族的生物学特点

Calpain 家族是一类存在于细胞质中的  $Ca^{2+}$  依赖性的半胱氨酸蛋白酶。迄今为止,已经在哺乳动物细胞内先后发现了 14 种 calpain 家族蛋白酶。u-calpain 和 m-calpain 是最早被发现也是研究较清楚的两个 calpain 家族成员。u-calpain 和 m-calpain 均是由 1 个 28 kD 亚基和 1 个 80 kD 亚基组成的异二聚体,两种蛋白酶之间序列同源性达到 55% - 65%,其区别只在于被激活时所需要的  $Ca^{2+}$  浓度的不同,前者在微摩尔水平而后者在毫摩尔水平。

Calpain 家族的底物众多,包括多种细胞骨架蛋白和参与细胞内信号转导的激酶及磷酸化酶,在细胞内发挥多种生理作用<sup>[4]</sup>,如细胞运动、细胞周期调节、基因表达调节及细胞凋亡等。Calpain 的作用受到其内源性特异性抑制剂 calpastatin 的调节。Calpain-calpastatin 蛋白酶系统的异常,可参与多种疾病的病理过程:如肌肉萎缩、癌症、阿尔茨海默氏病、心脏缺血-再灌注损伤、动脉粥样硬化、糖尿病等<sup>[5]</sup>。

[收稿日期] 2008-01-21

[修回日期] 2008-05-26

\* [基金项目] 国家重点基础研究发展计划资助项目 (No. NBRPC 2007CB512003); 国家自然科学基金资助项目 (No. NSFC30772021)

△通讯作者 E-mail: chen.ruizhen@zs-hospital.sh.cn

## 2 Calpain 在心肌细胞内的分布

Calpain 在心肌细胞内主要存在于肌小节的 Z 带,且与内源性抑制剂 calpastatin 共定位 (colocalization)<sup>[4]</sup>。Calpastatin 通过其 C 末端的 1、4 结构域结合 Calpain,抑制其活性,同时通过其特定的氨基酸序列调节  $\text{Ca}^{2+}$  通道的启闭,调控 calpain 的活性<sup>[6]</sup>。一般情况下,calpastatin 的活性大于 calpain 的活性,以保证生理状态的维持<sup>[4]</sup>。

此外,calpain 还被发现出现于内质网、线粒体膜、核膜等细胞内膜结构上,可能与其生理功能的发挥有关<sup>[7,8,14]</sup>。至于是否存在 calpain 从肌小节 Z 带部位到以上细胞内膜结构部位的转移及具体的转移机制尚不清楚。

## 3 Calpain 在启动心肌细胞凋亡中的作用

### 3.1 Calpain 在维持心肌细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 超载中的作用

各种病理因素,如细胞膜损伤、氧化应激、缺血、缺氧等,均可引起心肌细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高,形成  $\text{Ca}^{2+}$  超载,起始对心肌细胞的损伤过程。1 项关于兔心脏缺血预处理的体内实验发现,缺血预处理可以通过加强胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  及  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$  的活性而起到保护心肌的作用<sup>[9]</sup>。而 Insete 等<sup>[10]</sup>在大鼠的心脏缺血再灌注模型中发现,Calpain 能够在再灌注早期被激活,继而可以切割将  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  锚定于细胞骨架上的 fodrin 蛋白及 ankyrin 蛋白,致使  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$  脱离胞膜,丧失功能,从而使  $[\text{Na}^+]_i$  无法恢复,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  持续上升,进一步恶化细胞内的离子环境,加重  $\text{Ca}^{2+}$  超载的程度,激活更多的 Calpain,形成恶性循环,起始对细胞的损伤过程。

### 3.2 Calpain 对凋亡调节相关基因产物的调节作用

P53 等凋亡调节相关基因产物,能够诱导 DNA 受损且无法修复的细胞的凋亡。Kubbutat 等<sup>[11]</sup>发现 P53 蛋白中有 calpain 切割位点,calpain 可以影响 P53 蛋白的稳定性,从而可能参与受损细胞凋亡的起始。而另 1 项体外实验中通过应用 calpain 抑制剂、基因敲除、calpastatin 过表达等方法抑制 calpain 活性,发现同时抑制了 DNA 损伤细胞中 P53 蛋白的活性,继而阻止了 P53 蛋白下游的一系列凋亡信号转导途径<sup>[12]</sup>。近期 1 项研究则发现另一种 P53 家族成员 P73 蛋白,在体外也受到 calpain 类似的调节作用<sup>[13]</sup>。但是,calpain 对这些凋亡调节基因产物的具体调节机制尚不明了,尚需进一步的研究工作。

## 4 Calpain 在促进心肌细胞凋亡中的作用

### 4.1 Calpain 在心肌细胞外源性凋亡途径中的作用

心肌细胞外源性凋亡途径中的死亡受体依赖性途径,如 Fas、DR4/5、TNFR1 等,通过激活细胞内 caspase 家族相关成员,诱导心肌细胞的凋亡。这就是经典的外源性细胞凋亡途径,主要由 caspases 介导。

Caspases 是细胞内一类天冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶,按其在诱导细胞凋亡中的作用不同分为起始 caspases (如: caspase - 8、9、10) 和效应 caspases (如: caspase - 3、6、7),它们的最终激活,将引起细胞的不可逆性死亡。

在小鼠 HL-1 心肌细胞系中研究 TNF- $\alpha$  诱导的凋亡时发现 Calpain 可激活特异性定位于内质网的 caspase - 12,作为起始 caspase,激活效应 caspase - 3,引起心肌细胞的凋亡<sup>[14]</sup>。而在大鼠脑缺血模型中,一种新型的钙调素抑制剂 DY - 9760e 可通过阻止 caspase - 3 对 Calpastatin 的降解,继而抑制 calpain 的活性,发挥对脑组织的保护作用<sup>[15]</sup>;最新的研究则显示,DY - 9760e 以类似的机制同样对缺血心脏产生保护作用<sup>[16]</sup>。

Yamashima<sup>[17]</sup>通过引入 cathepsin,提出了包括 3 个蛋白酶体系的级联瀑布反应: calpain 致 cathepsin 释放,cathepsin 介导 caspase 激活,caspase 降解 calpastatin 增强 calpain 活性。

因此,通过 calpastatin,在 calpain 家族与 caspase 家族之间形成了一种互动机制。心肌细胞内 calpain 家族与 caspase 家族之间的这种交互作用 (crosstalk),在一定病理因素的作用下,形成恶性循环,从而加速细胞的凋亡过程。

### 4.2 Calpain 在心肌细胞内源性凋亡途径中的作用

内源性凋亡途径依赖于线粒体的作用。由于在心肌细胞分化的过程中死亡受体依赖性的外源性凋亡途径的作用逐渐减弱,因而线粒体在心肌细胞凋亡中扮演着更为重要的角色。在缺氧、缺血、氧化应激和缺血 - 再灌注损伤等病理情况下,心肌细胞内线粒体受损,释放细胞色素 - c (Cyt C),从而激活其下游的 caspase - 9 和 caspase - 3,导致细胞凋亡。同时,线粒体释放内源性核酸酶 G、凋亡诱导因子 (AIF) 进入胞质,后者再结合到胞核内,继而引起 DNA 的破坏,心肌细胞凋亡<sup>[18]</sup>。

Carpi 等<sup>[7]</sup>在 HL-1 心肌细胞中的研究发现,  $\text{Ca}^{2+}$  超载时,线粒体膜电位降低的同时伴随着 Calpain 活性的上调,通过 calpain 抗体标记染色发现 calpain 出现在线粒体的位置,提示 calpain 引起了线粒体功能的异常。

体外实验研究已发现,calpain 能切割 Bcl - 2 家族促凋亡成员 Bax,产生 18kD 活性片段,后者促进线

粒体 Cyt C 的释放,介导细胞凋亡<sup>[19]</sup>。说明 Bcl - 2 家族成员介导了 calpain 在细胞内源性凋亡途径中的作用。

Bcl - 2 家族位于线粒体外膜,是细胞凋亡途径中重要的信号转导分子。包括抗凋亡成员(如:Bcl - 2、Bcl - XL)及促凋亡成员(如:Bax、Bad、Bid),在细胞凋亡过程中,抗凋亡成员减少,促凋亡成员增加,促成细胞的凋亡。Bcl - 2 家族成员中许多都是 calpain 的底物<sup>[20]</sup>。

在大鼠和兔的心脏缺血 - 再灌注损伤模型中,Chen 等<sup>[21]</sup>发现,缺血再灌注时心肌组织内 calpain 被激活,继而切割活化 Bid,后者使线粒体外膜通透性增加,释放 Cyt C,促成细胞的凋亡;而这一过程不依赖于 caspase 的作用。

近期 1 项对肝脏和神经细胞离体线粒体的研究发现:m - calpain 可将 Bid 切割成高活性状态,使线粒体外膜通透性增加,calpain 进入线粒体内外膜间隙,直接切割线粒体内凋亡诱导因子(AIF)在内膜外侧的锚定点,使 AIF 从线粒体释放至胞质,进而促进细胞的凋亡<sup>[22]</sup>。

### 5 展望

Calpain 对心肌细胞凋亡的作用主要表现在对凋亡途径的调节。在各种病理状态下,calpain 被过度激活,一方面参与病理状态的维持与加重;另一方面与内外源性凋亡信号转导途径相互作用,最终导致心肌细胞的凋亡。

由于心肌细胞属于终末期分化细胞,所以阻止病理状态下心肌细胞的凋亡对于诸多心脏疾病的治疗与预后具有重要意义。体内、体外、基础、临床的许多研究都发现了各种 calpain 抑制剂能够通过抑制心肌细胞凋亡起到良好的心脏功能保护作用;而另外一些研究则提示了某些心血管药物如:ACEI、他汀类调脂药物等的药理作用之一,正是通过调节 calpain 进而调节细胞的凋亡而发挥其心血管保护作用<sup>[23,24]</sup>。总之,虽然在 calpain 参与心肌细胞凋亡的具体机制方面依然面临着许多问题,但仍然为各种心脏疾病的诊断和治疗指出了新的方向。

### [参 考 文 献]

[1] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor [J]. *Circulation*, 1998, 97(3):276 - 281.

[2] Hayakawa Y, Chandra M, Miao WF, et al. Inhibition of cardiac myocyte apoptosis improves cardiac function and abolishes mortality in the peripartum cardiomyopathy of G alpha q transgenic mice [J]. *Circulation*, 2003, 108

(24): 3036 - 3041.

[3] Sadoshima J, Montagne O, Wang Q, et al. The MEKK1 - JNK pathway plays a protective role in pressure overload but does not mediate cardiac hypertrophy [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(2): 271 - 279.

[4] Goll DE, Thompson VF, Li H, et al. The Calpain system [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(3): 731 - 801.

[5] Carragher NO. Calpain inhibition: A therapeutic strategy targeting multiple disease states [J]. *Curr Pharm Des*, 2006, 12(5): 615 - 638.

[6] Saud ZA, Minobe E, Wang WY, et al. Calpastatin binds to a calmodulin - binding site of cardiac Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 364(2): 372 - 377.

[7] Carpi A, Venerando R, Miotto G, et al. Calpain and mitochondrial dysfunction in Ca<sup>2+</sup> overloaded cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2007, 42(6): S105.

[8] Tremper - Wells B, Vallano ML. Nuclear calpain regulates Ca<sup>2+</sup> - dependent signaling via proteolysis of nuclear Ca<sup>2+</sup>/calmodulin - dependent protein kinase type IV in cultured neurons [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(3): 2165 - 2175.

[9] Yorozuya T, Adachi N, Dote K, et al. Enhancement of Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> - ATPase and Ca<sup>2+</sup> - ATPase activities in multi - cycle ischemic preconditioning in rabbit hearts [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2004, 26(5): 981 - 987.

[10] Insete J, Garcia - Dorado D, Hernando V, et al. Calpain - mediated impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> - ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia [J]. *Circ Res*, 2005, 97(5): 465 - 473.

[11] Kubbutat MH, Vousden KH. Proteolytic cleavage of human p53 by calpain: a potential regulator of protein stability [J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(1): 460 - 468.

[12] Sedarous M, Keramaris E, O' Hare M, et al. Calpains mediate p53 activation and neuronal death evoked by DNA damage [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(28): 26031 - 26038.

[13] Munarriz E, Bano D, Sayan AE, et al. Calpain cleavage regulates the protein stability of p73 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(3): 954 - 960.

[14] Bajaj G, Sharma RK. TNF - alpha - mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase - 12 and calpain [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(4): 1558 - 1564.

[15] Han F, Shirasaki Y, Fukunaga K. DY - 9760e is neuroprotective in rat microsphere embolism: Role of the cross - talk between calpain and caspase - 3 through calpastatin [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 317(2): 529 - 536.

trical synapses; a dynamic signaling system that shapes the activity of neuronal networks [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1662(1-2): 113-137.

- [7] LeBeau FE, Traub RD, Monyer H, et al. The role of electrical signaling via gap junctions in the generation of fast network oscillations [J]. *Brain Res Bull*, 2003, 62(1): 3-13.
- [8] Banaclocha MA. Neuromagnetic dialogue between neuronal minicolumns and astroglial network: a new approach for memory and cerebral computation; Neuromagnetic dialogue between neuronal minicolumns and astroglial network: a new approach for memory and cerebral computation [J]. *Brain Res Bull*, 2007, 73(1-3): 21-27.
- [9] Draguhn A, Traub RD, Schmitz D, et al. Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus *in vitro* [J]. *Nature*, 1998, 394(6689): 189-192.
- [10] Towers SK, LeBeau FE, Gloveli T, et al. Fast network oscillations in the rat dentate gyrus *in vitro* [J]. *J Neurophysiol*, 2002, 87(2): 1165-1168.
- [11] Maier N, Guldenagel M, Sohl G, et al. Reduction of high-frequency network oscillations (ripples) and pathological network discharges in hippocampal slices from connexin 36-deficient mice [J]. *J Physiol*, 2002, 541(Pt2): 521-528.
- [12] Teubner B, Odermatt B, Guldenagel M, et al. Functional

expression of the new gap junction gene connexin 47 transcribed in mouse brain and spinal cord neurons [J]. *J Neurosci*, 2001, 21(4): 1117-1126.

- [13] Bruzzone R, Hormuzdi SG, Barbe MT, et al. Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13644-13649.
- [14] Buhl DL, Harris KD, Hormuzdi SG, et al. Selective impairment of hippocampal gamma oscillations in connexin-36 knock-out mouse *in vivo* [J]. *J Neurosci*, 2003, 23(3): 1013-1018.
- [15] Traub RD, Spruston N, Soltesz I, et al. Gamma-frequency oscillations: a neuronal population phenomenon, regulated by synaptic and intrinsic cellular processes, and inducing synaptic plasticity [J]. *Prog Neurobiol*, 1998, 55(6): 563-575.
- [16] Markram H, Lubke J, Frotscher M, et al. Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs [J]. *Science*, 1997, 275(5297): 213-215.
- [17] Whittington MA, Traub RD, Faulkner HJ, et al. Recurrent excitatory postsynaptic potentials induced by synchronized fast cortical oscillations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(22): 12198-12203.
- [18] Spruston N. Axonal gap junctions send ripples through the hippocampus [J]. *Neuron*, 2001, 31(5): 669-671.

---

(上接第 1440 页)

- [16] Fukunaga K, Han F, Shioda N, et al. DY-9760e, a novel calmodulin inhibitor, exhibits cardioprotective effects in the ischemic heart [J]. *Cardiovasc Drug Rev*, 2006, 24(2): 88-100.
- [17] Yamashita T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates [J]. *Prog Neurobiol*, 2000, 62(3): 273-295.
- [18] Bahi N, Zhang J, Llovera M, et al. Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(32): 22943-22952.
- [19] Gao G, Dou QP. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kD fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death [J]. *J Cell Biochem*, 2000, 80(1): 53-72.

- [20] Gil-Parrado S, Fernandez-Montalvan A, Assfalg-Machleidt I, et al. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(30): 27217-27226.
- [21] Chen M, Won DJ, Krajewski S, et al. Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32): 29181-29186.
- [22] Polster BM, Basanez G, Etxebarria A, et al. Calpain I induces cleavage and release of apoptosis-inducing factor from isolated mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(8): 6447-6454.
- [23] 杨永健, 周兴文, 张鑫, 等. 血管紧张素转换酶抑制剂对梗死心肌组织钙蛋白酶的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(5): 868-871.
- [24] 程刚, 徐耕, 单江, 等. 钙依赖中性蛋白酶和半胱天冬酶-3 在辛伐他汀诱导大鼠血管平滑肌细胞凋亡中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2003, 19(9): 1189-1192.