

## · 综 述 ·

## Caspase 家族与心脏移植细胞凋亡

## Caspase Families and Apoptosis in Heart Transplantation

李小冰<sup>1</sup>, 刘岳文<sup>2</sup>, 邝兴义<sup>1</sup>

**摘 要:**目的 探讨移植心脏的功能状态和心脏细胞的凋亡速度及凋亡数量密切关系。caspase 蛋白酶家族对移植心脏细胞凋亡的影响。方法 通过综合国内外文献,对目前 caspase 酶原激活、效应机制等的研究进展概括总结,并对心脏移植中相关病理过程与 caspase 的激活进行阐述。结果 移植排斥、缺血再灌注损伤均可通过 caspase 的激活,诱发移植心脏细胞过度凋亡。结论 心脏移植时缺血一再灌注损伤及移植后的排斥反应等,均与细胞凋亡及其调控基因存在密切关系。

**关键词:**心脏移植;细胞凋亡;缺血一再灌注损伤;排斥反应

**中图分类号:**R 617

**文献标识码:**B

**文章编号:**1672-688X(2004)01-0076-03

近年来,随着分子生物学技术的发展,国内外对凋亡的研究不断深入,大量的实验和临床资料均表明细胞凋亡在心脏移植中具有重要的生物学意义,并且证明心脏移植过程中的重要环节,即缺血一再灌注损伤、移植后的排斥反应及免疫耐受等,均与细胞凋亡及其调控基因存在密切关系<sup>[1,2]</sup>。在人类细胞中,caspase 的超表达和激活均可引起细胞凋亡,因此又称死亡蛋白酶<sup>[3]</sup>。

## 1 caspase 蛋白酶家族

**1.1 caspase 蛋白酶家族的分类** 从1992年人类第1次纯化 caspase-1 克隆并测序其 cDNA<sup>[4]</sup>至今,已发现哺乳动物至少有14种 caspase 蛋白酶家族成员,按其家族成员公布时间,在 caspase 命名下对其统一命名和分类,目前已有 caspase-1 到 caspase-14 分类。根据它们之间大小亚单位序列的同源性以及功能,可分为3组<sup>[4]</sup>:①细胞因子处理组: caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 和 -14;②凋亡起始组: caspase-2, -8, -9, 和 -10;③凋亡效应组: caspase-3, -6 和 -7。

**1.2 caspase 酶原的激活** caspase 酶原至少可以通过3种方式激活:自活化、转活化和非 caspase 蛋白酶活化。在哺乳动物中,caspase 的活化主要是指 casp-8<sup>[5]</sup>和 casp-9 酶原(参与上激事件调节的 caspase,为凋亡起始因子 initiators)的激活,大量的遗传证据都支持激活 caspase 效应分子的级联模型,即活化的 caspase 蛋白酶(caspase activating proteases, CAPS)先激活启动因子,再由活化的启动因子激活级联下游的效应分子,最后 caspase 效应分子水解一系列底物,造成细胞生化性质的改变而入死亡共同通路。因此不同的死亡信号却能导致相同的细胞凋亡现象。与 caspase 有关的凋亡通路至少有以下3种:线粒体/细胞色素 C 通路,死亡受体通路和内质网通路。虽然特定的凋亡刺激因素可通过激活3种凋亡通路中的一

种而诱发凋亡,但目前认为,在某些情况下,这3种通路之间是相互联系的。

**1.3 caspase 蛋白酶家族的效应机制** 激活的 caspase 可通过以下方式发挥作用<sup>[6]</sup>:①直接导致细胞结构的破坏。其中核纤层(Lamin A)有利于保持细胞核固有形态,完整的核纤层使核内的染色质按一定的次序分布,激活的 caspase 可剪切核纤层,导致核纤层的塌陷,产生染色聚集浓缩。② caspase 可抑制 ICAD 的活性而释放出 CAD,后者发挥核酸酶的功能而导致 DNA 的断裂。③诱导细胞中出现“吃我”信号,从而促进被吞噬。④改变重要调控蛋白的功能与活性。

**1.4 细胞凋亡相关基因** 细胞凋亡是在基因控制下细胞的主动死亡,存在主动合成蛋白质的过程,细胞凋亡相关基因多是通过影响 caspase 的活性而起作用的。但可能由于细胞类型不同,细胞所处的状态不同,触发凋亡因素的性质不同,因而所触发的细胞内死亡信号传递通路不同。目前认为通过 caspase 蛋白酶而参与细胞凋亡的基因有10多个,主要是 bcl-2, P<sup>53</sup>, P<sup>55</sup>, C-myc 等。

## 1.5 caspase 蛋白酶的抑制剂

**1.5.1 病毒及内源性的 caspase 抑制剂** CrmA(细胞因子反应调节蛋白 A),最早发现的牛痘病毒产物,它能抑制 Casp-1, 即白介素 1 $\beta$  转化酶以及 caspase-8 的活性。Fugino 等通过建立异体移植排斥反应的体外模型发现,在转染 CrmA 基因后的移植细胞中由 Fas/FasL 介导的移植细胞凋亡受到有效抑制,而且 caspase-8, -3 的活性也明显降低。Gurevich 等研究表明,转染 CrmA 基因能够有效地抑制由 caspase-8 介导的心肌细胞凋亡,从而提高心肌细胞对缺氧的耐受能力。从结构上看,CmA 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂(serine protease inhibitor, sprpin),与经典的 sprpin 一样,CmA 作为假性底物以 LVAD 基因与有活性的酶结合而发挥抑制作用,但与其它 sprpin 不同的是,它能够抑制某些 caspase 的活性。

**1.5.2 P<sup>35</sup>蛋白** 是一种来源于杆状病毒的 caspase 抑制蛋

-6、-7、-8、-10 的活性。与 CmA 不同,  $P^{35}$  抑制 caspase 活性的机制与其 P1 位点(第 87 位天冬氨酸)被 caspase 水解后导致亚单位与 caspase 形成稳定的复合体有关。同时 XU 等通过研究  $P^{35}$  蛋白与人类 caspase-8 复合体的晶体结构发现, caspase-8 活性的抑制与二者之间形成的共价硫酯键结合(covalent thioester linkage)有直接联系。

**1.5.3 IAPs** Miller 等将不表达  $P^{35}$  蛋白的杆状病毒株感染细胞, 发现病毒仍能够产生一种蛋白而抑制宿主细胞凋亡, 将其命名为凋亡抑制分子(inhibitor of apoptosis, IAPs)。Deveaux 等研究表明, IAPs 在两条主要的细胞途径中都能阻断细胞凋亡: 在死亡受体途径中, IAPs 能通过其 BIR 区阻止 caspase-3、-7 活化。在线粒体途径中, IAPs 通过 3 种方式抑制凋亡: ①直接与 Pro-Caspase-9 作用干扰其加工过程。②IAPs 的 CARD 区与 Apaf-1 竞争结合阻断 caspase 活化; ③直接抑制活化的 caspase。

**1.5.4 Bcl-2 蛋白家族** 研究表明, 在 caspase 酶原激活的过程中和在此之前, Bcl-2 和 Bcl-x1 均可发挥其抗凋亡作用<sup>[7]</sup>, 例如: Bcl-2 或 Bcl-x1 的过表达可阻止 staurosporine 诱导的 Jurkat T 细胞凋亡, 以及 caspase-3、-7 的活化。

**1.5.5 人工合成 caspase 多肽抑制剂** caspase 作为半胱氨酸蛋白酶家族的一员, 能够被一些常用的半胱氨酸蛋白酶抑制剂如碘乙胺所抑制。这种抑制作用是通过与 caspase 蛋白活性中心的半胱氨酸残基结合实现的, 在特异性抑制 caspase 蛋白活性的多肽抑制剂中多数不仅针对单个 caspase 发挥作用。如 DEVD-CHD 可以抑制 caspase-3、-7、-8 的活性, I-VAD-CHO 则能有效的抑制 caspase-1、-3、-5、-7、-8、-9 的活性。随着研究的不断深入, 针对单一 caspase 蛋白的多肽抑制剂也不断地被发现, 如 AC-YVAD-CHD 和 AC-DMQD-CHD 能分别抑制 caspase-1、caspase-3 的活性, Z-IETD-FMK 能选择性抑制 caspase-8 的活性, 而 Z-LEHD-FMK 则仅能抑制 caspase-9 的活性。

**1.5.6 微量元素锌** 锌作为一种非常重要的微量元素, 得到全世界营养学界和医学界的公认。近年来研究表明, 锌可通过不同机制保护多种细胞免受各种因素诱发的凋亡<sup>[11]</sup>。锌的生物学作用广泛而复杂, 锌对细胞凋亡的影响也与许多因素有关, 有很多作用位点。普遍公认的是: 锌可能是在细胞凋亡后期通过抑制核酸内切酶的活性来实现对细胞凋亡的影响。Takana 用电子显微镜研究了高温诱导人肿瘤细胞凋亡时发现, 在培养细胞中加入  $ZnSO_4$  可抑制高温引起的肿瘤细胞凋亡, 其作用与加入  $ZnSO_4$  后肿瘤细胞核酸内切酶活性降低有关。随着对凋亡深入研究人们发现, 锌对细胞凋亡的作用不仅发生在细胞凋亡的晚期, 也可作用于细胞凋亡的早期。 $Zn^{2+}$  在线粒体改变前, 通过在某一水平干扰凋亡级联反应而发挥抗凋亡作用。这需要在一定浓度下,  $Zn^{2+}$  抑制 caspase-3 的  $IC_{50}$  为 0.1 mmol/L。目前, 关于锌抑制 caspase-3 机制可能为: Perry 等认为<sup>[9]</sup>, 锌与 caspase-3 蛋白酶暴露的氨基酸 His<sup>237</sup> 和 Cys<sup>285</sup> 有很高的吸附性。通过吸附而阻断 caspase-3 的活性。但也有学者<sup>[10]</sup>认为, 锌可能通过逆向阻断

## 2 缺血一再灌注损伤与移植心脏心肌细胞凋亡

心脏移植过程中, 早期移植植物存在缺血一再灌注(I/R)过程, 是影响的心脏移植植物早期及远期疗效的重要环节之一, 减轻缺血一再灌注损伤对于提高移植术后疗效至关重要。心外科对 I/R 的研究已开展多年, 但随着对凋亡的深入研究, 人们意识到凋亡在其中起了重要作用<sup>[11]</sup>。虽然目前关于心脏移植植物心肌细胞凋亡的确切机制尚不完全清楚, 但关于动物及人的器官移植中的细胞凋亡报道很多<sup>[12]</sup>。移植过程中由缺血一再灌注造成的氧化损伤、钙稳态失衡、以及线粒体损伤, 可通过相互作用形成“恶性网络”, 最终导致核酸内切酶与 caspase-3 的活化, 这是目前用来解释 I/R 在心脏移植中的可能作用机制。Musall-marcu 等发现, 在体外灌注的大鼠心脏, 早期即可发生心肌细胞凋亡, 并且抑制凋亡伴随着心功能的改善, 提示凋亡参与心功能衰竭过程<sup>[13]</sup>。更进一步的研究是 Fliss 等对大鼠进行再灌注实验, 发现持续缺血组心肌缺血 2.5 h 细胞凋亡明显; 而缺血 45 min 再灌注仅 1 h 细胞凋亡就非常明显, 并认为凋亡过程主要由再灌注加重的<sup>[14]</sup>。Gatti S 等<sup>[15]</sup>用  $\alpha$ -MSHL(一种内源性激素, 不导致明显的免疫抑制, 但可减轻缺血再灌注损伤)。对移植的大鼠心脏预处理发现: 受体的存活时间延长, 移植植物中的细胞凋亡显著减少。Kovacs 等对离体大鼠心脏缺血一再灌注模型, 应用选择性 caspase 阻断剂 AC-DEVD-fmk(阻断 caspase-3), Z-LEHD-fmk(阻断 caspase-9), 发现损伤心肌面积缩小, 缺血后的心肌功能提高<sup>[16]</sup>。目前从我们掌握的资料, 缺血再灌注损伤通过 caspase-3 途径, 导致的心肌细胞凋亡是影响移植心脏功能的重要环节, 通过选择性或非选择性 caspase 蛋白酶阻断剂, 可以明显延长移植植物存活, 减轻移植心肌细胞凋亡, 保护心功能。

## 3 排斥反应与移植心脏细胞凋亡

**3.1 急性排斥反应与移植心脏细胞凋亡** 急性排斥反应是同种异型器官移植中最常见的一种排斥反应, 发生率较高。一般而言急性排斥反应发生越早, 其临床表现越重。急性排斥反应常发生在免疫抑制突然停用、更换、减量或病原微生物感染等因素诱导下。细胞免疫应答在急性排斥反应中发挥主要作用, 其中细胞毒 T 细胞(CTL)介导的特异性细胞裂解或凋亡是造成损伤的重要机制。其中细胞凋亡发挥其生物学效应的机制可能与 3 个方面有关: ①通过颗粒胞吐途径即细胞毒性 T 细胞(CTL)攻击靶细胞: 当器官移植发生急性排斥时, 激活的 CTL 含有大量的颗粒并且将颗粒中的内容物胞吐到 CTL 和靶细胞之间的细胞间隙。穿孔素单体可插入靶细胞膜中, 在  $Ca^{2+}$  的作用下, 聚合为多聚体, 构成 5~20 nm 的圆柱形孔, 一方面使  $Na^+$ ,  $H_2O$  进入靶细胞内, 导致细胞裂解; 另一方面, CTL 分泌的颗粒酶可由穿孔素在靶细胞膜上构筑的小孔, 进入靶细胞。Gz-B 通过嗜细胞性粒酶诱导 caspase-10 和 caspase-7 活化, 从而激活凋亡途径导致 caspase-3 激活。同时还可通过活化多聚 ADP 核糖体蛋白酶以及 DNA 依赖性蛋白激酶等直接引发细胞凋亡。②Fas 途径: CTL 的细胞毒性作用

源,称为 Fas 配体 (FasL),当 FasL 与靶细胞上的 Fas 相互作用,可通过死亡信号转导而活化凋亡途径<sup>[17]</sup>。③通过 TNF 途径:CTL 分泌的 TNF- $\alpha$  可通过与靶细胞表面相应受体结合而显示细胞毒活性。其中膜型 TNF- $\alpha$  主要介导靶细胞凋亡<sup>[18]</sup>。

Szabolcs 等<sup>[19]</sup>将 Lewis 大鼠心脏移植到 Wistar 大鼠的腹部,作为实验组;Lewis 大鼠到 Lewis 大鼠心脏移植为对照组。结果发现,术后第 3 到第 5 天实验组心肌细胞凋亡数显著增加,与对照组差异显著。表明细胞凋亡在心脏移植排斥中存在,而且细胞凋亡与排斥反应程度相关。Koglin 等<sup>[20]</sup>在研究 CBA 小鼠对 C57BL/6 小鼠心脏移植急性排斥反应时,发现 caspase-1 转录水平增高,并且 TUNEL 阳性细胞在排斥反应时明显升高,在急性排斥反应中是慢性排斥反应的 2 倍以上。Szabolcs 等<sup>[21]</sup>通过对 30 例心脏移植排斥等级 3A/B (国际心肺移植学会标准)病人与 12 例移植排斥等级为零(标准同上)的病人右心室内膜活检发现,3A/B 级病人心肌细胞凋亡数是移植排斥等级为零级病人的 30 倍,提示细胞凋亡是人类心脏移植排斥反应心肌细胞死亡的主要方式。

### 3.2 慢性排斥反应(chronic rejection)与移植心脏细胞凋亡

慢性排斥反应(chronic rejection)的免疫学机制比较复杂,机制至今尚未明确。以往人们认为在慢性排斥反应中 IV 型超敏反应机制占主要地位。目前的研究表明,并非如此。最近有人提出慢性排斥反应中免疫学与非免疫学机制均存在,并且在心脏移植慢性排斥反应中,也存在心肌细胞凋亡现象。Fomigli 等在研究慢性排斥反应和移植血管病中发现 Fas 介导的细胞凋亡是慢性排斥反应中心脏损害的重要机制。Xu 等人<sup>[22]</sup>发现,慢性的心脏排斥病理过程中,凋亡存在于动脉壁和血管周围区域,微量法分析: caspase-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10 (尤其 caspase-8, -9, -10 上升显著)上升,在凋亡细胞中见到 Fas, FasL 的表达,认为凋亡细胞包括 T 细胞,单核细胞,和血管内皮细胞可能通过 Fas/ FasL 导致移植心脏细胞凋亡。

尽管如此,有关 caspase 仍有许多问题有待解决。首先,仍然需进一步阐明 caspase 上游基因和下游的作用底物,以及在不同种类细胞中的凋亡机制。其次,人们对凋亡尚无法实现精确调控,限制了它的应用。但是,我们相信,随着对 caspase 的深入研究,以及对有关疾病产生细胞凋亡独特机制的深入了解。不久的将来,随着 caspase 因子和拮抗因子制成药品推向市场,将为人类治疗移植相关疾病开辟新的领域。

### 参考文献:

- [1] Demetris AJ, Zebe T, Banner B. Morphology of solid organ allograft arteriopathy: Identification of proliferating intimal cell population [J]. *Transplant Proc*, 1989, 21: 3667~3672.
- [2] Salomon RN, Hughes CLW, Schoen FJ. Human coronary transplantation-associated arteriosclerosis. Evidence for a chronic immune reaction to activated graft endothelial cells. *AMJ Pathol*, 1991, 138: 791~796.
- [3] Thornbeny NA, Lazebnik Y. Caspase enemies within [J]. *Science*, 2002, 27(10): 33~36.
- [4] 童新, 孙志贤. Caspase 蛋白酶与细胞凋亡 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1998, 25(5): 418~421.
- [5] 易铁男. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展 [J]. *国外医学肿瘤学分册*, 2001, 28(1): 39~42.
- [6] Grunerfelder J, Miniati DN. Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorate ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allograft [J]. *Circulation*, 2001, 18: 202~206.
- [7] Emonet-Piccardi N, Richard MJ, Raranat JL, et al. Protective effects of antioxidants against UVA-induced DNA damage in human skin fibroblasts in culture [J]. *Free Radic Res*, 1998, 23(2): 95.
- [8] Pery DK, Smyth MJ, Stennicke HR, et al. Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease-caspase-3: a novel target for zinc in the inhibition of apoptosis [J]. *Biol Chem*, 1997, 272: 18530~18533.
- [9] Wolf CM, Eastman A. The temporal relationship between protein phosphatases, mitochondria, cytochrome release, and caspase activation in apoptosis [J]. *Exp cell Res*, 1999, 247: 505~513.
- [10] Katori M, Buew R, Key B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptosis pathway [J]. *Transplantation*, 2002, 72(2): 287~292.
- [11] Bergese SD, Klerotic SM, Weakly ME, et al. Apoptosis in murine cardiac grafts [J]. *Transplantation*, 1997, 67: 320~328.
- [12] Musal-Marcu S, Guater HE, Fugdutt BC, et al. Inhibition of apoptosis after ischemia via reperfusion in rat myocardium by cycloheximide [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1999, 31(5): 1073~1082.
- [13] Fliss H, Gatteringer D. Apoptosis in ischemia and reperfusion rat myocardium [J]. *Circ Res*, 1996, 79(5): 949~956.
- [14] Gattis Colombo G, Buff R, et al. Alpha-melanocytes stimulating hormone protects the allograft in experimental heart transplantation [J]. *Transplantation*, 2002, 14: 1678~1684.
- [15] Kovas P, Bak I, Szendrei L, et al. Non-specific Caspase inhibition reduce infarct size and improves Post-ischemic recovery in isolated ischemic/reperfused rat hearts [J]. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2001, 36(6): 501~507.
- [16] Chinnaiyan AM, Kouke M, Dixit VM, et al. FADD, a novel death domain contain protein interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis [J]. *Cell*, 1997, 81(4): 505~512.
- [17] 周光炎. 免疫学原理 [M]. 上海: 上海科技文献出版社, 2000.
- [18] Szabolcs M, Michler RE, Yang X, et al. Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection: relation to induction of nitric oxide synthase [J]. *Circulation*, 1996, 94: 1665~1673.
- [19] Koglin J, Russell ME. Alloimmune-mediated apoptosis: comparison in mouse model of acute and chronic cardiac rejection [J]. *Transplantation*, 1999, 67: 904~909.
- [20] Szabolcs M, Stefano Ravalli. Apoptosis and increased expression of induction of nitric oxide synthase in human allograft rejection [J]. *Transplantation*, 1998, 65: 804~812.
- [21] Xu B, Sakko L, Siachta CA, et al. Apoptosis in chronic rejection