

· 综述 ·

Caspase-3 与围产期缺氧缺血性脑损伤

汤亚南 综述 赵凤临 审校

(北京大学第三医院儿科 北京 100083)

[中图分类号] R714.7 Q55 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)01-0075-04

围产期缺氧缺血性脑损伤的病理过程同时存在坏死与凋亡。凋亡的机制及抗凋亡治疗成为近年来研究的热点。Caspase-3 是涉及细胞凋亡的蛋白酶,参与缺氧缺血性脑损伤的病理过程,Caspase-3 的研究为围产期缺氧缺血性脑损伤的治疗提供了新的思路。

1 围产期缺氧缺血性脑损伤的病理过程同时存在坏死与凋亡

细胞凋亡与细胞坏死是多细胞生物细胞死亡两种不同形式,在形态学、生化代谢、分子机制、结局和意义等方面都有本质的区别。在未发育成熟的脑组织中已存在导致细胞死亡的程序,而多种刺激,如缺氧缺血、放射线和兴奋性毒性等均可激活这一程序。

以往曾普遍认为,缺氧缺血后脑损伤主要是坏死的过程,Linnik 等^[1]首先对这一观点提出质疑并在局灶缺血小鼠动物模型中证实存在脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的原位缺口末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling,TUNEL)阳性的细胞。之后对不同动物的脑缺氧缺血模型进行形态学、组织化学和分子生物学的研究表明,凋亡与坏死机制均参与了神经元死亡的过程。

Renolleau 等^[2]在新生大鼠局灶性脑缺血再灌注模型中,发现了 TUNEL 着色阳性的细胞,且从再灌注后 4 h 到 30 d 这种细胞都持续存在。Scott 和 Hegyi^[3]在缺氧损伤后的人体证实了细胞死亡包括凋亡和坏死两种形式,在一些死产婴儿的脑中,甚至只发现了凋亡的现象。Stroemer 和 Rothwell^[4]认为在缺血损伤严重的区域中,坏死处于主要地位,而凋

亡发生在损伤较轻微的区域,并常在损伤后数天发生。

2 Caspase-3 是重要的 ICE 家族蛋白酶,在细胞凋亡中起重要作用

人们对细胞凋亡所涉及基因的认识主要来源于对秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) (简称线虫)的研究。目前至少已克隆出 15 个参与细胞凋亡各阶段的相关基因,称为“线虫死亡基因”(caenorhabditis elegans death gene, ced gene),其中特别值得注意的是促进细胞死亡的 ced-3, ced-4 和抑制细胞死亡的 ced-9。ced-3 和 ced-9 的 cDNA 克隆提示其蛋白产物 CED-3 和 CED-9 都有人类的同源体。

在细胞凋亡分子生物学的研究中,许多蛋白酶尤其是许多蛋白酶同源物的发现,使蛋白酶在细胞凋亡中的重要地位越来越为人类关注。目前已发现一类并已成为研究热点的是白细胞介素-1 β 转化酶(interleukin-1 β -converting enzyme, ICE)家族蛋白酶,该家族蛋白酶属于天冬氨酸特异的半胱氨酸蛋白酶(aspartate specific cysteine protease, ASCP)。由于哺乳类 ICE 家族蛋白酶与线虫主要死亡基因 ced-3 编码的蛋白 CED-3 约有 29% 氨基酸序列完全相同,两者为同源物,因此将二者归为同一家族,即 ICE/CED-3 家族,它们在细胞凋亡中起着关键作用。

鉴定新的人类 ICE/CED-3 蛋白酶家族成员的研究工作在近几年迅速发展;人类 ICE/CED-3 蛋白酶命名法则“创造出一个新词”caspase 作为这类系列化蛋白酶的总称和词根。其中“C”代表这类蛋

白酶半胱氨酸(cysteine)蛋白酶活性;“aspase”代表其具有在天冬氨酸(aspartic acid)之后切割蛋白的能力,是这一蛋白酶家族最与众不同的催化特性。Caspase是“半胱氨酸基天冬氨酸-特异性蛋白酶”(cysteiny aspartate specific proteinase)及半胱氨酸天冬氨酸酶(cysteine aspartase)的缩写。

ICE/CED-3蛋白酶有如下共同特点:均为天冬氨酸(Asp)特异的半胱氨酸(Cys)蛋白酶,均含有保守的五肽序列,即谷氨酰氨-丙氨酸-半胱氨酸-精氨酸-甘氨酰氨(Gln-Ala-Cys-Arg-Gly, QACRG),均以无活性的酶前体形式合成,常以异构体形式存在,裂解的最适序列为含Asp的四肽,酶的活性可受到调节。Caspase通常以无活性的蛋白酶原(procaspase)形式在细胞胞浆内合成和分泌。蛋白酶原由NH₂-末端区(prodomain)大亚基(p17-20)小亚基(p10-12)和大亚基连接区4个亚区组成,经蛋白水解,prodomain及连接区释放,大小亚基结合成一活性的异四聚体并暴露出底物识别、结合和催化所必需的氨基酸残基,形成活性的caspase。Caspase的作用特点是能识别底物裂解位点NH₂末端最少4个氨基酸并在天冬氨酸后裂解底物,使蛋白裂解具有高选择性^[5]。

Caspase是如何在细胞凋亡中发挥关键作用的,至今仍不十分清楚,但已有了可喜的研究进展。细胞凋亡时procaspase被激活,被caspase裂解的蛋白质参与细胞凋亡,特异性caspase抑制剂可阻止凋亡进展。故认为,凋亡的最后实施是通过caspase的激活而实现的。Caspase在细胞凋亡中的作用主要有3个:①灭活细胞凋亡发生的抑制剂;②直接破坏裂解细胞结构;③通过裂解特定功能区调节酶蛋白。

目前已发现ICE/CED-3蛋白酶家族成员至少有14个,按其发现顺序称为caspase-1~14,它们与所有细胞凋亡的发生有关,其中最关键的是caspase-3。Caspase-3又称半胱氨酸蛋白酶32(cysteine protease P32, CPP32),也称Yama或apopain。1994年Fernandes-Alnemri等在人Jurkat T细胞系中首先克隆出CPP32基因,分为CPP32 α 和CPP32 β ,两者的阅读框均由831个核苷酸组成,编码277个氨基酸,相对分子量约为32 Kd。人CPP32基因定位于染色体4q32~4q35.1处。正常情况下,caspase-3以无活性的酶原形式存在于哺乳动物多种组织和细胞内。人caspase-3酶原与CED-3蛋白有35%的一致性,58%的相似性,是已知哺乳动物中与CED-3相似性最高的一种。Caspase-3在免疫细胞、脑和胚胎起源的细胞中有高水平表达。目前认为,caspase-3酶原

上有4个酶切位点:Asp9, Asp28, Asp175和Asp181,后两个位点的切割产生p20和p11大小亚基,两者结合形成 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体,成为有活性的酶。

凋亡是蛋白酶级联切割的过程,不同的蛋白酶在凋亡不同阶段发挥功能。根据caspase在级联反应中的作用位置分为在上游调控其他caspase活化的始动caspase(caspase-1, 2, 4, 5, 8, 9, 10)和在下游直接介导凋亡实施的效应caspase(caspase-3, 6, 7, 14)^[6],其中caspase-3处于核心位置,发挥非常重要的作用,被称为死亡蛋白酶。不同的蛋白酶切割caspase-3酶原,激活caspase-3,活化的caspase-3进一步又切割不同的底物,导致蛋白酶级联切割放大,最终使细胞走向凋亡^[7]。

3 Caspase-3的激活参与了围产期缺氧缺血性脑损伤的过程

已有文献证实在脑组织损伤、缺血和发育中的凋亡过程可检测到caspase-3的活性增强,caspase-3抑制剂可阻滞凋亡发生。在正常的生长发育过程中,脑组织中即有一定水平的凋亡现象,Caspase参与了凋亡过程,Caspase-3mRNA在胚胎和新生大鼠脑中已有较高水平表达。Caspase-3基因缺陷小鼠在脑发育过程中应该发生的凋亡不能出现,使神经元过度增殖,造成发育畸形^[8]。而在围产期缺氧缺血性脑损伤后,出现大量凋亡细胞,同时也可见到caspase-3活性增强。

Nakajima等^[9]用免疫组化的方法,在7日龄缺氧缺血性脑损伤SD大鼠模型中,发现损伤侧脑组织的皮质、纹状体、海马和丘脑部位caspase-3活性增加,这些部位均为对缺氧缺血最为敏感的部位,而在对照侧脑组织只检测出少量呈现弱阳性反应的细胞。不同部位的时间变化规律有所差别,皮质和纹状体处检测caspase-3高峰在缺氧缺血后24~72 h,海马CA1区和背侧丘脑处的峰值在缺氧缺血后48 h。Caspase-3的前体为32 kDa,激活后分解为20 kDa或17 kDa的大亚基和12 kDa的小亚基。p17的水平代表着caspase-3的活性。作者同时用比免疫组化敏感性较弱而特异性较强的Western印迹方法检测p32和p17,在各个时间点、受损侧和对照侧的脑组织中均可测得p32,并且其水平没有明显的时间依赖的变化趋势,然而p17亚单位却随时间和部位的不同而有明显变化。在纹状体部位,缺氧缺血后24 h到7 d均可测得p17,在海马部位,p17在缺氧缺血后12 h出现,高峰是24~48 h,丘脑处的高峰在72 h到7 d,而任何时间点都未测出皮质部

位有 p17 表达。缺氧缺血后 caspase-3 活性亚单位的持续表达与细胞凋亡的形态学改变在时间上是一致的。

Zhu^[10]等在相同的缺氧缺血动物模型中,用免疫组化法检测 caspase-3 的活性亚单位 p17,在缺氧缺血侧脑组织发现大量阳性细胞,而对照侧只发现了极少量的细胞。皮质、海马、纹状体等部位的神经元均着色很深。在缺氧缺血后 3 h 就可检测到 p17,其高峰在 24 h,72 h 后逐渐下降。海马的 CA3 区和皮质部位的神经元 caspase-3 活性下降更为延迟。作者同时用双标记的方法研究 caspase-3 与 TUNEL 阳性细胞的关系,发现 TUNEL 阳性的细胞几乎也都表现为 caspase-3 的活性亚单位 p17 阳性。有较多细胞仅仅呈现 p17 阳性而 TUNEL 阴性,在缺氧缺血后 3 h,这种差别尤为显著,在缺氧缺血后 24~72 h,这种差别又逐渐缩小,说明 caspase-3 活性检测较 TUNEL 能更早反映凋亡现象。微管结合蛋白 2 (microtubule-associated protein 2, MAP2) 活性下降是反映神经元损伤的指标之一, caspase-3 活性增强与 MAP2 活性下降明显相关,表明 caspase-3 与神经元损伤的过程有密切的关系。Wang^[11]等的研究表明,新生大鼠缺氧缺血后损伤侧脑组织中 caspase-3 活性在 1 h 即明显升高(208%),24 h 达高峰(2563%),6 d 时仍有较高水平(169%)。

Nath 等^[12]于 7 日龄 SD 大鼠单侧纹状体后部注射 50 nmol N-甲基-D-天门冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)造成新生大鼠脑损伤模型中,用四肽荧光底物检测法发现与凋亡相关的 caspase-3 活性增高,损伤侧脑组织匀浆中 caspase-3 的底物水解作用增强。Caspase-3 活性在损伤后 6 h 明显增高,为原来的 130%,之后持续增高,到 24 h 接近原来的 200%,对照组未见显著变化,两组比较差异有显著性($P < 0.05$),表明了 NMDA 对新生大鼠的脑损伤中,有 caspase-3 激活的过程。另外,在对培养的神经元给予致凋亡刺激后,也常常导致 caspase-3 的激活。Vanderluit 等^[13]对新生 SD 大鼠运动神经元给予致凋亡刺激,原位杂交发现 caspase-3 mRNA 表达增强,Western 印迹发现 caspase-3 蛋白水平增高。之后作者对细胞给予 caspase-3 基因缺陷处理,使 caspase-3 不能表达,在第 4 天和第 7 天对比基因缺陷组和对照组神经元存活的情况,缺陷组存活神经元几乎是对照组的 3 倍,TUNEL 染色发现 caspase-3 缺陷的神经元核浓聚现象减轻。以上提示 caspase-3 基因缺陷似乎可延缓细胞死亡的过程。

神经元凋亡的分子机制目前尚未完全明确。Caspase 介导的蛋白酶水解级联过程起着至关重要的作用。小脑颗粒细胞的死亡信号传递顺序为: C-JUN 激活, RNA 合成, 线粒体膜电位丧失, caspase-3 蛋白酶激活和细胞核的变化。NMDA 诱导皮质神经元凋亡的研究结果提示, Ca^{2+} 内流、线粒体去极化发生于 caspase 激活的上游,而活性氧(reactive oxygen species, ROS)的形成和脂质过氧化可能位于 caspase 激活的下游。

4 Caspase-3 的研究为缺氧缺血性脑损伤的治疗提供了新的思路

围产期窒息的存活者多有中到重度脑损伤,导致严重的神经系统后遗症甚至死亡,但目前尚无十分有效的治疗措施^[14]。缺氧缺血后 caspase 激活、神经元凋亡是一个延迟发生的过程,为临床寻找有效的治疗药物提供了更广阔的时间窗,针对 caspase 设计的各种抑制剂对脑损伤的保护作用正日益受人重视。Caspase 的活性可被多种蛋白质分子抑制,如 p35, CrmA, 凋亡抑制蛋白(inhibitor-of-apoptosis proteins, IAP)家族、Bcl-2 家族和人工合成的四肽抑制剂等。IAP 家族、Bcl-2 家族和四肽抑制剂均证实可明显减轻缺氧缺血性脑损伤^[15]。Mercer 等^[16]在培养的 Neuro-2a 细胞中发现,神经元凋亡抑制蛋白(neuronal apoptosis inhibitory protein, NAIP)使 Ca^{2+} 诱导下的细胞凋亡损伤减轻, NAIP 转染的细胞,其存活率比对照组明显提高。Cheng 等^[17]观察到,缺氧缺血后脑室内或腹腔注射 caspase 抑制剂 BAF(boc-aspartyl (Ome)-fluoromethylketone)都可明显减轻 7 日龄缺氧缺血大鼠模型脑损伤的程度。在缺氧缺血后 7 d,纹状体、海马、皮质部位的脑组织均有不同程度的体积缩小,而注射 BAF 的大鼠在相同部位的体积缩小现象减轻了 50% 以上。对照组海马 CA1 区的神经元密度减少 50%,而 BAF 处理组只减少 20%。此外,利用转基因技术使脑内神经元中的 NAIP 或 Bcl-2 表达增加,也可减轻脑缺氧缺血性神经元损害。

Caspase-3 在缺氧缺血后脑损伤中起着重要作用,其抑制剂可减轻这种损伤作用,但 caspase-3 在凋亡分子机制中的详细机制尚未最终阐明, caspase-3 的有效抑制剂也正在寻找和研制之中。如何将实验室成果应用于临床,尚有大量问题亟待解决。总之, caspase-3 的研究为缺氧缺血性脑损伤的治疗提供了新的思路, caspase-3 新的抑制剂的开发为围产期缺氧缺血性脑损伤的患儿带来了新的希望。

[参 考 文 献]

- [1] Linnik MD, Zobrist RH, Hatfield MD. Evidence supporting a role for programmed cell death in focal cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1993, 24(12): 2002–2008.
- [2] Renolleau S, Aggoun-Zouaoui D, Ben-Ari Y, et al. A model of transient unilateral focal ischemia with reperfusion in the P7 neonatal rat: morphological changes indicative of apoptosis [J]. *Stroke*, 1998, 29(7): 1454–1460.
- [3] Scott RJ, Hegyi L. Cell death in perinatal hypoxic-ischaemic brain injury [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1997, 23(4): 307–314.
- [4] Stroemer RP, Rothwell NJ. Exacerbation of ischemic brain damage by localized striatal injection of interleukin-1 β in the rat [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1998, 18(8): 833–839.
- [5] Nunez G, Benedict MA, Hu Y, et al. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway [J]. *Oncogene*, 1998, 17(25): 3237–3245.
- [6] Stennicke HR, Salvesen GS. Properties of caspases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1387(1–2): 17–31.
- [7] Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Zangrilli J, et al. The Ced-3/interleukin 1 β converting enzyme-like homolog Mch6 and the lamin-cleaving enzyme Mch2 α are substrates for the apoptotic mediator CPP32 [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(43): 27099–27106.
- [8] Woo M, Hakem R, Soengas MS, et al. Essential contribution of caspase-3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes [J]. *Genes Dev*, 1998, 12(6): 806–819.
- [9] Nakajima W, Ishida A, Lange MS, et al. Apoptosis has a prolonged role in the neurodegeneration after hypoxic ischemia in the newborn rat [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(21): 7994–8004.
- [10] Zhu C, Wang X, Hagberg H, et al. Correlation between caspase-3 activation and three different markers of DNA damage in neonatal cerebral hypoxia-ischemia [J]. *J Neurochem*, 2000, 75(2): 819–829.
- [11] Wang X, Karlsson JO, Zhu C, et al. Caspase-3 activation after neonatal rat cerebral hypoxia-ischemia [J]. *Biol Neonate*, 2001, 79(3–4): 172–179.
- [12] Nath R, Scott M, Nadimpalli R, et al. Activation of apoptosis-linked caspases in NMDA-injured brains in neonatal rats [J]. *Neurochem Int*, 2000, 36(2): 119–126.
- [13] Vanderluit JL, Mcphall LT, Fernandes KJL, et al. Caspase-3 is activated following axotomy of neonatal facial motoneurons and caspase-3 gene deletion delays axotomy-induced cell death in rodents [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(10): 3469–3480.
- [14] Johnston MV. Hypoxic and ischemic disorders of infants and children [J]. *Brain Dev*, 1997, 19(4): 235–239.
- [15] Schulz JB, Weller M, Moskowitz MA. Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases [J]. *Ann Neurol*, 1999, 45(4): 421–429.
- [16] Mercer EA, Korhonen L, Skoglösa Y, et al. NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways [J]. *EMBO J*, 2000, 19(14): 3597–3607.
- [17] Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, et al. Caspase inhibitor afford neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(9): 1992–1999.

(本文编辑 刘丽旭)

· 消息 ·

《临床小儿外科杂志》获准刊号国内外发行

《临床小儿外科杂志》是经国家科学技术部、国家新闻出版总署审核批准,由湖南省科协主管,湖南省医学会主办,湖南省儿童医院出版的国家级小儿外科专业学术期刊,向国内外公开发行人,双月刊。国内刊号:CN43-1380/R。本刊内容以小儿外科临床与基础研究并重,反映我国小儿外科领域的最新进展与最新动态,探讨和解决临床问题,引导和推崇技术创新。读者对象主要为从事外科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究及广大医务人员和医学科技人员订阅!每期订价7.8元,全年定价46.8元。请直接来函与本刊编辑部联系订阅。

联系地址 湖南省长沙市梓园路82号《临床小儿外科杂志》编辑部 邮编 410007

电话/传真 0731-5383982 Email: eygk@163.com

《临床小儿外科杂志》编辑部