

caspase 基因与类风湿性关节炎易感性的关系

江雨霏 沈 波

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种自身免疫性疾病,滑膜炎持久反复发作,可导致关节内软骨和骨的破坏,关节功能障碍,最终残疾。RA 是一种常见病,分布于所有的种族和民族,病人遍及全球。所以 RA 一直受到人们的关注,但其发病机制尚未完全明确。已发现 RA 与滑膜细胞凋亡减弱密切相关,而 caspases 是一组在细胞凋亡过程中起关键作用的酶,可能与 RA 易感性有关。可是研究 caspase 蛋白容易受治疗的影响,所以针对 caspase 基因与 RA 易感性的关系的研究更值得注意,本文即针对此作出综述。

一、caspase 的结构、功能和作用机制

caspase 基因编码的蛋白为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (cysteiny aspartate specific protease, caspase), 是一类进化上高度保守的半胱氨酸蛋白酶家族^[1]。目前已发现的 caspases 已有 14 种,其中人类有 11 种: caspase 1 ~ caspase 10、caspase 13, 而 caspase 11、caspase 12、caspase 14 仅存在于鼠中^[2]。

1. caspase 的结构: caspase 与多数蛋白酶一样在胞内以无活性的酶原形式存在,酶原由 N-端前结构域 (prodomain)、大约 20kDa 的大亚基 (p20) 和大约 10kDa 的小亚基 (p10) 三部分组成。酶原的 prodomain 与 caspase 分子功能密切相关,长的 prodomain 往往含有明显的功能域,如死亡效应区域 (death effector domain, DED)、caspase 募集结构 (caspase recruitment domain, CARD) 等。这些功能域参与 caspase 分子之间的相互作用及 caspase 的活化及 caspase 分子的亚细胞定位等。

根据 prodomain 的结构和功能, caspase 被分为 3 组: (1) 炎症 caspases 由 caspase 1、caspase 4、caspase 5、caspase 11、caspase 12、caspase 13、caspase 14 组成, 主要参与细胞因子介导炎症反应^[3]。 (2) 启动子

caspases, 由 caspases 2、caspase 8、caspase 9、caspase 10 组成, 它包含可以使下游 caspases 自分裂和激活 N-末端作用区域^[4]。 (3) 效应子或执行者 caspases, 由 caspase 3、caspase 6、caspase 7 组成, 它只有 20 ~ 30 氨基酸, 缺乏 N-末端作用区域, 而且通过启动子 caspases 切割和激活^[4]。成熟 caspases 酶蛋白都须通过水解 prodomain 序列, 分别由两个 p20 亚基和两个 p10 亚基进行组装, 从而激活。每个 caspase 都具有两个活性中心: 一个 p20 亚基和一个 p10 亚基组成一个酶活性中心^[5]。

2. caspase 的功能: 凋亡是一种进化保守细胞的自杀程序, 通过这一程序一个细胞可以有秩序地消亡。caspase 是一组在细胞凋亡过程中起着关键作用的酶, 活化的 caspase 可水解底物, 并通过级联放大诱发凋亡。

根据起始激活的 caspase 不同, 凋亡激活的途径分为 3 种: (1) 第 1 种途径——死亡受体途径又分为两种: 1) caspase 8/ caspase 10 途径, 即细胞死亡信号 (如 FasL 和 TNF-2) 能够与细胞膜上的相关死亡受体 (Fas 和 TNFR-1) 特异性结合, 从而激活死亡受体。Fas 能够与 Fas 相关死亡区域 (Fas-associated death domain, FADD) 连接, 导致 FADD 聚集, DEDs 出现。FADD 的 DED 区与 caspase 8/caspase 10 酶原的 DED 结合, 形成凋亡诱导的信号复合体 (death-inducing signal complex, DISC), 激活 caspase 8/ caspase 10 的自身剪切, 启动 caspase 级联反应, 激活下游的 caspase 3、caspase 6、caspase 7, 最终导致细胞凋亡^[6,7]。 2) caspase 2 途径, 即死亡信号结合细胞膜上的死亡受体, 激活死亡受体, 释放 caspase 2, 关于 caspase 2 激活下游底物的过程目前仍然知之甚少^[8]。 (2) 第 2 种途径是线粒体途径, 即通过线粒体细胞色素 C 的释放来引发凋亡。线粒体释放细胞色素 C 有多种原因, 如 caspase 8 可以直接切割胞质的 Bid 前体, 形成截断的 Bid (truncated Bid, tBid), 激活的 tBid 转位到线粒体, 启动细胞色素 C 的释放^[9]。又如细胞受到压力 (如 DNA 破坏), 胞质中的前凋亡

基金项目: 浙江省医药卫生科技资助项目 (2007B225); 台州市科技计划资助项目 (072KY02)

作者单位: 317000 温州医学院附属台州医院检验科

通讯作者: 沈波, 主任技师, 电子信箱: shenbkz@yahoo.com.cn

蛋白将被激活,从而导致线粒体通透性转运孔(mitochondrion permeability transition pores, MPTPs)的开放,于是线粒体将释放细胞色素 C 至胞质中^[10]。线粒体途径也分为两类:①caspase 8 途径:线粒体释放细胞色素 C 至胞质后,切割 caspase 6 前体的 prodomain 使其激活,而 caspase 6 是唯一可以激活 caspase 8 的胞质 caspase,从而依照 caspase 8 的途径引发级联反应^[11];②caspase 9 途径:线粒体释放细胞色素 C 后,凋亡蛋白酶激活因子 1 (apoptotic protease activation factor 1, Apaf 1)在 dATP 或者 ATP 的存在条件下寡聚体化,与 caspase 9 酶原、dATP 和细胞色素 C 共同作用形成凋亡复合体 (apoptosome), Apaf 1 与 caspase 9 酶原通过 CARDs 相互作用以 1:1 的比例形成复合体,于是 caspase 9 得以激活,并且激活下游的 caspase 3、caspase 7。此过程中 caspase 3 还可以反过来激活 caspase 9 形成正反馈^[10,12]。(3)第 3 种途径是近年来发现的内质网途径:内质网途径和线粒体途径也有密切的联系,内质网 Ca^{2+} 释放能促进线粒体细胞色素 C 的释放,从而促进细胞凋亡^[13]。

这些不同的起始途径最终都导致效应子 caspases 的反应。caspase 3 是最重要的效应子 caspases 成员,它可以激活 caspase 6、caspase 7、Actin、Gas2、Fodrin、多聚 ADP-核糖聚合酶 (poly ADP-ribose polymerase, PARP) 等, caspase 6 可以激活 Lamin A 等, caspase 7 可以激活 PARP 等,从而引起细胞皱缩、DNA 降解等^[14]。

二、caspase 基因与 RA 易感性的关系

RA 是一种以持续滑膜组织炎症和关节破坏为特点的慢性炎症性自身免疫性疾病。成骨细胞增生与滑膜巨噬细胞、成纤维细胞和淋巴细胞的凋亡减弱的平衡可能是导致 RA 持续发展的一个机制。RA 患者成骨细胞的凋亡增加可能致关节周围骨损害,而类风湿滑膜细胞的凋亡削弱似乎导致滑膜组织增生^[15]。动物研究表明,在关节炎模型中,诱导滑膜细胞凋亡的增加,改善了滑膜组织的增生^[6,16]。

大鼠实验表明,缺乏 caspase 7 会导致凋亡减弱^[17]。基于 caspase 7 的在凋亡中的作用,它可能是自身免疫性疾病易感性的影响因素之一。但是由于 RA 患者接受不同的治疗,并且许多治疗可能影响到凋亡途径,因此直接研究 caspase 7 蛋白表达容易受到其影响。而 caspase 7 基因定位于 10q25.1-10q25.2^[18],已经发现其相邻区域 10q21 和 10q26 与 RA 的易感性有关^[19],于是近年来出现针对 caspase 7

与 RA 易感性的研究。

如今已经发现了许多不同的 caspase 7 亚型,它们都是通过对 procaspase 7 进行不同的剪切拼接而产生的。首先被提出的就是 caspase 7 亚型 α ,它是一个有 303 个氨基酸残基的多肽链,属于 caspase 7 的功能亚型。此外, caspase 7 亚型 β 是其最小的亚型,它与亚型 α 的 C 端不同,缺乏酶的活性位点,可能作为主要的 caspase 7 活性形式抑制剂^[20]。caspase 7 rs2227309 编码定位于蛋白的 C-末端,对非 β 亚型无影响,在 β 亚型产生 K249R 的改变,可能通过影响 β 亚型而影响 RA 的易感性。于是对 caspase 7 基因的研究集中在 rs2227309。

J. R. Garcl'a-Lozano 等对西班牙 RA 患者进行研究发现:RA 患者比正常人 caspase 7 rs2227309 出现 G 等位基因、GG 基因型的频率更高,并且 rs2227309 基因型为 GG 的患者 β 亚型相对表达量高。所以 GG 基因组的人可能由于 caspase 7 非功能亚型相对量高而有相对较低的凋亡活性。于是我们推断,RA 患者由于 caspase 7 rs2227309 GG 基因组可能性较高,表达的 caspase 7 非功能亚型 β 相对含量较高,抑制了 caspase 7 的活性,从而使凋亡减弱^[21]。

Vitor Hugo Teixeira 等以家系研究的方法对欧洲多国进一步验证,并未发现 caspase 7 rs2227309 SNP 与 RA 易感性的关系。随后表达分析发现,RA 患者的 caspase 7 α 和 β 亚型 mRNA 的表达均减少,且 caspase 7 β 亚型没有 α 亚型 mRNA 表达减少的明显。因此,与健康对照组相比,RA 患者的外周血细胞中,基于功能亚型 α 相对较低的含量,其细胞凋亡活性也降低。有报道显示 β 亚型可能是活性形式的主要抑制剂,其相对含量较高,也可能造成凋亡活性减弱^[22]。

目前并未出现关于其他 caspase 基因与 RA 易感性的相关性的研究。凋亡途径中的相关蛋白 caspase 8、caspase 3、Bid 等均已引起人们不同程度的关注,可是由于病人接受不同的治疗措施,其结果较容易受到干扰^[23-25]。

三、结论与展望

目前国外的研究中, caspase 7 与 RA 易感性的关系仍未得到一致的结果,其相关性还有待进一步证实。根据以往的结论,RA 患者 caspase 7 β 亚型的相对表达量较高,即非活性亚型比例较高,抑制了细胞凋亡活性,从而参与 RA 的发病。倘若我们验证了 caspase 7 rs2227309 基因多态性与 RA 易感性的关

系,我们可以证实该位点通过改变其非功能亚型的相对表达量而影响到 RA 的发病,从而起到及早预防、早期诊断的目的。倘若 caspase 7 rs2227309 基因多态性与 RA 易感性无关,caspase 7 非功能亚基相对量偏高也许是受到了其他相关基因位点或者 caspase 7 表达调控的影响,应该选取其他的基因位点进行进一步实验。

同时,我们还可以追溯 caspase 7 在凋亡途径中上游或者下游的因子,研究其编码基因或者表达与 RA 易感性的关系,以排除治疗对结果的影响,更加明确 RA 的危险因素。

参考文献

- 1 Launay S, Hermine O, Fontenay M, *et al.* Vital functions for lethal caspases[J]. *Oncogene*,2005,24(33):5137-5148
- 2 Nomura J, Matsumoto K, Iguchi - Ariga SM, *et al.* Mitochondria - independent induction of Fas - mediated apoptosis by MSSP[J]. *Oncol Rep*,2005,14(5):1305-1309
- 3 Cornelis S, Kersse K, Festjens N, *et al.* Inflammatory caspases: targets for novel therapies[J]. *Curr Pharm Des*,2007,13(4):367-385
- 4 Fuentes - Prior P, Salvensen G S. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition[J]. *Biochem J*, 2004,384(2):201-232
- 5 Earnshaw W C, Martins L M, Kaufmann S H. Mammalian caspases: structure, activation, substrates and functions during apoptosis[J]. *Annu Rev Biochem*,1999,68:383-424
- 6 Peng SL. Fas (CD95) - related apoptosis and rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology*,2006, 45(1):26-30
- 7 Korb A, Pavenstadt H, Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis[J]. *Apoptosis*,2009, 14(4):447-454
- 8 Read S H, Baliga B C, Ekert P G, *et al.* A novel apaf - 1 - independent putative caspase - 2 activation complex[J]. *Cell Biol*,2002, 159(5):739-745
- 9 Kuwana T, Mackey MR, Perkins G, *et al.* Bid, bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane[J]. *Cell*,2002, 111(3): 331-342
- 10 Fan TJ, Xia L, Han YR. Mitochondrion and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin*,2001, 33(1): 7-12
- 11 Cowling V, Downward J. Caspase - 6 is the direct activator of caspase - 8 in the cytochrome c - induced apoptosis pathway: Absolute requirement for removal of caspase - 6 prodomain[J]. *Cell Death Differ*,2002, 9(10): 1046-1056
- 12 Arnoult D, Gaume B, Karbowski M, *et al.* Mitochondrial release of AIF and EndoG requires caspase activation downstream of Bax/Bak - mediated permeabilization[J]. *EMBO J*,2003, 22(17): 4385 -

4399

- 13 Xie Q, Khaoustov VI, Chung CC, *et al.* Effect of tauroursodeoxycholic acid on ER stress - induced caspase - 12 activation. *Hepatology*, 2002,36(3):592-601
- 14 Sattar R, Ali SA, Abbasi A. Molecular mechanism of apoptosis: Prediction of three - dimensional structure of caspase - 6 and its interactions by homology modeling. *Biochem Biophys Res Commun*,2003, 308(3): 497-504
- 15 Stanczyk J, Ospelt C, Gay R E, *et al.* Synovial cell activation[J]. *Curr Opin Rheumatol*,2006,18(3):262-267
- 16 Zhang H, Gao G, Clayburne G S, *et al.* Elimination of rheumatoid synovium in situ using a Fas ligand gene scalpel[J]. *Arthritis Res Ther*,2005,7(6):R1235-1243
- 17 Lakhani SA, Masud A, Kuida K, *et al.* Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis [J]. *Science*,2006,311(5762):847-851
- 18 Tiso N, Pallavicini A, Muraro T, *et al.* Chromosomal localization of the human genes, CPP32, Mch2, Mch3, and Ich - 1, involved in cellular apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996,225(3): 983-989
- 19 Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, *et al.* Screening the genome for rheumatoid arthritis susceptibility genes A replication study and combined analysis of 512 multicase families[J]. *Arthritis Rheum*,2003, 48(4):906-916
- 20 Fernandes - Alnemri T, Tokahashi A, Armstrong R, *et al.* Mch3, a novel human apoptotic cysteine protease highly related to CPP32[J]. *Cancer Res*,1995,55(24):6045-6052
- 21 J. R. García - Lozano, B. Torres, O. Ferna'ndez, *et al.* Caspase 7 influences susceptibility to rheumatoid arthritis[J]. *Rheumatology*, 2007,46(8):1243-1247
- 22 Vitor Hugo Teixeira, Laurent Jacq, Sandra Lasbleiz, *et al.* Genetic and Expression Analysis of CASP7 Gene in a European Caucasian Population with Rheumatoid Arthritis[J]. *The Journal of Rheumatology*,2008, 35(10):1912-1918
- 23 H S Byun, J K Song, Y. R Kim, *et al.* Caspase - 8 has an essential role in resveratrol - induced apoptosis of rheumatoid fibroblast - like synovocytes[J]. *Rheumatology (Oxford)*,2008,47(3):301-308
- 24 Stanley T Parish, Jennifer E Wu, Rita B. Effros. Modulation of T Lymphocyte Replicative Senescence via TNF - {alpha} Inhibition: Role of Caspase - 3[J]. *J Immunol.* 2009,182(7):4237-4243
- 25 Samuel Garcia, Myriam Liz, Juan J Gomez - Reino, *et al.* Akt activity protects rheumatoid synovial fibroblasts from Fas - induced apoptosis by inhibition of Bid cleavage[J]. *Arthritis Res, Ther*, 2010,12(1):R33

(收稿:2010-07-05)