

钙蛋白酶与心血管疾病

叶婷婷 魏 盟

摘 要 钙蛋白酶(calpain)是重要的信号转导分子之一,它是细胞内 Ca^{2+} 依赖的半胱氨酸蛋白酶。calpain1 和 calpain2 在心血管疾病中发挥着重要功能。钙蛋白酶被 Ca^{2+} 激活后参与多种生物学功能,如促进细胞凋亡,参与心肌重构等,从而影响了多种心血管疾病的发生发展,如心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭、糖尿病心肌病、高血压、动脉粥样硬化等。

关键词 钙蛋白酶 心血管疾病 细胞凋亡

[中图分类号] R3

[文献标识码] A

随着人们生活水平的提高,心血管疾病的病死率逐渐增高,并成为全球关注的健康问题。钙蛋白酶(calpain)属于半胱氨酸蛋白水解酶超家族成员。生理状态下,calpain 参与多种钙离子调控的细胞程序,如信号转导,细胞增殖、分化、凋亡、细胞膜融合和血小板激活。在病理状态时,钙蛋白酶活性异常增强,参与了老年痴呆症、肌肉营养不良、缺血和外伤性脑损伤、癌症、白内障、休克、糖尿病等许多病变^[1]。在心血管疾病中,钙蛋白酶被过度激活后参与了心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭、糖尿病心肌病、高血压、动脉粥样硬化等多种心血管疾病的发生、发展。本文对钙蛋白酶在心血管疾病中的作用做一综述。

一、calpain 的结构及激活机制

calpain 是由 Gordon Guroff 等在 1964 年首次发现的^[2,3]。在人类基因组中,有 15 种基因 Capnn($n = 1, 2, 3, 5 \sim 16$)编码钙蛋白酶的同工酶,各种同工酶有不同的组织分布和功能。钙蛋白酶 1 和钙蛋白酶 2 在心血管疾病中发挥着重要功能,都是由 80kDa (由 Capn1 和 Capn2 基因分别编码)的催化亚基和 30kDa (由 Capn4 基因编码)的调节亚基组成。根据结构,催化亚基分为 4 个(I ~ IV)结构域,调节亚基分为 2 个(V ~ VI)结构域。结构域 I 和 II 是蛋白酶核心,包含了催化三联体的残基:该活性位点的半胱氨酸在结构域 I,组氨酸/天冬酰胺对在结构域 II。结构域 III 包含两个 Ca^{2+} 连接位点和 1 个磷脂结合结构,其中的 C 2 - 样结构域被认为是通过特殊的静电作用参与底物识别来调节钙蛋白酶活性。结构域 IV 有 5

个“EF 手型”(EF hand)结构,前 4 个“EF - 手型”结构含有 Ca^{2+} 结合位点,第 5 个“EF - 手型”结构参与钙蛋白酶的大、小亚基组成异质二聚体。结构域 V 包含参加疏水性的甘氨酸残留物簇,可能与膜的吸附有关。结构域 VI 和 IV 的“EF - 手型”结构相互作用形成异质二聚体,使大、小亚基连接在一起^[4,5]。

calpain1 和 2 通常以无活性的形式存在于细胞质中,细胞内 Ca^{2+} 水平增加后激活转位至细胞膜。calpain 通过 Ca^{2+} 激活的调节机制包括两个阶段。第 1 阶段:结构域的相互作用引起构象改变。 Ca^{2+} 和磷脂质连接到钙蛋白酶,引起 30kDa 的亚基从 80kDa 的分离。结构域 I 的自溶水解在激活期间发生。第 2 阶段:重排催化活性中心。通过结合两个钙离子到 II a 和 II b 结构子域,使 II a 和 II b 靠近在一起,形成一个功能性催化中心。第 2 个阶段的发生仅仅在第 1 阶段构象改变后引起。另外,研究发现 calpain1 在体外的激活不要求自溶或亚基解离^[3,4,6,7]。

二、calpain 与心血管疾病

1. calpain 与心肌缺血/再灌注损伤:心肌持续性缺血导致组织损伤和细胞死亡,早期再灌注能够减轻心肌缺血的损伤程度,但是缺血的心肌在血管开放后会导致严重的心律失常,心肌坏死面积扩大,心脏破裂甚至死亡。研究发现,在缺血再灌注心肌损伤过程中,心肌细胞内氧自由基增加、钠钾 ATP 酶激活、 Ca^{2+} 浓度异常升高,从而引起线粒体 calpain1 激活^[8]。激活的 calpain1 将 AIF 分裂成 t - AIF,随后转移到细胞核并通过激活多聚 ADP 核糖聚合酶而增加非 caspase 依赖的细胞凋亡。另外,在缺血再灌注过程中,线粒体中 calpain1 的激活增加的凋亡诱导因子的分裂,细胞中凋亡诱导因子的减少增加了心脏损伤^[9]。以上两个过程都可以被 MDL - 28170 阻

作者单位:200233 上海交通大学附属第六人民医院

通讯作者:魏盟,教授,主任医师,博士生导师,电子信箱:weimeng19571223@163.com

止^[10]。Chen 等^[11]在 30min 缺血和 2h 再灌注鼠和兔模型中发现,再灌注引起钙蛋白酶的激活,导致 Bid (BH3 家族的唯一成员)的分裂,进而 Bid 调节细胞色素 C 的释放能力丧失。细胞色素 C 的缺失导致线粒体无法执行氧化磷酸化并且增加活性氧产量。最后,与线粒体功能障碍有关的通透性转换孔不可逆地开放,这种开放与细胞死亡密切相关。

2. calpain 与高血压:高血压会引起血管内皮细胞损伤、血管平滑肌细胞增生、基质沉积,继而引起血管壁增厚和管腔狭窄。Letavernier 等^[12]制作了高表达钙蛋白酶抑制蛋白的转基因鼠模型,并将血管紧张肽 II 缓慢注入该转基因小鼠和野生小鼠体内诱导高血压。4 周以后在野生小鼠心脏和肾皮质内 NF- κ B 的活性大大增加。相比之下转基因小鼠上述表现明显减少。calpain 已被证明参与 NF- κ B 的激活过程,并认为钙蛋白酶抑制蛋白可能通过减少 NF- κ B 的激活,降低基质金属蛋白酶(MMP)活性或减少胶原纤维的沉淀来阻止血管的重构。Jiang 等^[13]在体外培养血管平滑肌细胞,发现过表达 calpain1 能够诱导转化生长因子- β 1/Smad 信号,引起弹性蛋白降解、碱性磷酸酶激活,降低钙化抑制剂、骨桥蛋白和骨连接素的表达。另外,MMP 和 calpain 的激活能够引起胶原 I 和 III 的沉积、血管壁的钙化。Sedding 等^[14]将血管平滑肌细胞暴露于体外周期性拉伸力,发现机械应力能使 calpain 活性增加。通过钙蛋白酶抑制蛋白或反义寡核苷酸阻止 calpain 激活可以增加张力诱导的 P53 表达和转录活性,导致细胞凋亡率的进一步增加。calpain 通过 P53 降解特性中和了平滑肌细胞过度凋亡,证明 calpain 是血管壁机械敏感度重构过程的关键调节者。

3. calpain 与心力衰竭:各种心脏疾病都能引起心力衰竭(HF),从而使心排出量不能满足机体的需求,产生一系列症状和体征。Yang 等^[15]对 39 例充血性心力衰竭患者和 38 例健康对照组进行了比较,发现在充血性心力衰竭患者的血浆和心脏中血管紧张肽 II 显著增加,与心室重构指数紧密相关。另外,心力衰竭的心室组织中 calpain 显著上调,calin/cabin1 的分裂增加,CaN 激活。Takahashi 等^[16]将鼠左冠状动脉结扎,第 2 周和第 8 周鼠左心室肌和右心室肌都出现了 m-calpain 的表达增高,并且在第 8 周后,血流动力学发生改变并显现慢性心力衰竭的症状。若从第 2 周起,口服 3mg/(kg·d) 群多普利或 1mg/(kg·d) 坎地沙坦至第 8 周,血流动力学改善。服药

的鼠第 8 周时 mu-calpain 和 m-calpain 都减少,右心室 calpastatin 含量增加,表明 calpain 参与了慢性心力衰竭的发展,群多普利和坎地沙坦能够抑制 calpains 的激活,保护心肌梗死后的心肌。Ahmad 等^[17]在 4h 右心室压力超负荷诱导右心力衰竭猪模型中发现,右心力衰竭与焦点黏附蛋白 talin 有关,使用 MDL-28170 抑制 calpain 能够改善右心室功能失调、保护右心室 talin。说明钙蛋白酶抑制可能为临床治疗急性肺心病提供新方法。

4. calpain 与糖尿病心肌病:近年,随着糖尿病发生率的增高,由糖尿病引起的心脏微血管病变和心肌代谢紊乱受到了人们的关注。Bajaj 等研究了半胱氨酸蛋白酶家族的两个成员 caspases 和 calpains 在细胞凋亡中的作用,发现在心肌细胞中,calpain1 在肿瘤坏死因子- α 引起的细胞凋亡中激活 caspase3 和多聚 ADP 核糖聚合酶,并且 calpain1 在钙离子超负荷后分裂细胞凋亡诱导因子^[18]。研究表明,Capn4 基因的敲除减少了糖尿病心脏中肿瘤坏死因子- α 和转化生长因子- β 1 的表达^[19,20]。Jian 等发现心肌细胞特性 Rac1 的缺失或使用 Rac1 蛋白抑制剂能够使糖尿病心肌梗死后心肌功能恢复的能力提高。Rac1 信号途径的中断阻止了 NADPH 氧化应激和活性氧(ROS)的产生,从而抑制 calpain 的激活。此外,通过 SOD2 超表达抑制线粒体 ROS 或通过钙蛋白抑制剂超表达抑制 calpain 活性能够使糖尿病心肌梗死损伤减少。Li 等^[19]在 STZ 诱发糖尿病鼠模型中,证明 calpain 的激活能够引起 I κ B 的降解和 NF- κ B 的激活,NF- κ B 转录到细胞核并转录促肥厚基因如 β -MHC,calpain 也能激活磷酸酶(calcineurin),引起心肌肥厚。研究显示,NF- κ B 与心肌纤维化、炎症有关。通过生理性钙蛋白酶抑制剂、钙蛋白酶-1 小干扰 RNA 或钙蛋白酶抑制剂的超表达,能阻碍高糖诱导的心肌细胞或高糖心脏的细胞凋亡。

5. calpain 与心肌梗死:冠状动脉闭塞,血流中断,部分心肌因严重的持久性缺血而发生坏死。可发生心律失常、休克或心力衰竭。Mani 等将小鼠分为两组,实验组静脉内给予 0.5mg/kg 体重 calpeptin,相同剂量每天皮下注射 1 次。对照组不予处理。4 天后将实验组、对照组制作心肌梗死模型。发现 calpeptin 处理组左心射血分数(EF)显著改善、舒张末期容积(EDV)较未处理组显著增加。此外,calpeptin 能够减少 calpain 和 caspase 的生成,抑制心肌梗死后心肌重构和功能障碍。研究表明,活化的 calpain 通过降

解 N - 钙黏蛋白来拆卸闰盘间的细胞 - 细胞黏附,并由此促进心肌梗死后心室重构。研究发现,心肌细胞特异性基因 *Capn4* 的敲除导致 calpain - 1 和 calpain - 2 表达的破坏,也能够抑制心肌的炎症和纤维化,并减少心肌梗死后心脏重塑和功能障碍^[20]。

三、展望

综上所述,calpain 的激活在诸多心血管疾病的 发生发展中发挥了重要作用,其作用机制主要通过促进心肌细胞凋亡,引起心肌细胞重构,促进血管重构及钙化等。并且已证实在细胞水平及动物模型上使用钙蛋白酶抑制剂能对心肌缺血/再灌注及高血压引起的血管损伤中起到良好的保护作用。但是 calpain 的病理生理意义及 calpain 在糖尿病心肌综合征中的作用仍未被证明。尽管上文中提到的研究没有进行系统的临床研究,也没有证据显示钙蛋白酶抑制剂能够用于治疗人类心脏疾病,但是随着对 calpain 研究的深入及病理生理作用的进一步阐明,calpain 作为心脏疾病的一个潜在靶点将有望在预防和治疗心脏疾病方面提供新思路。

参考文献

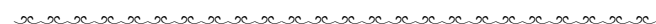
- 1 Saez ME, Ramirez - Lorca R, Moron FJ, *et al.* The therapeutic potential of the calpain family: new aspects [J]. *Drug Discov Today*, 2006, 11(19 - 20): 917 - 923
- 2 Sorimachi H, Hata S, Ono Y. Calpain chronicle - an enzyme family under multidisciplinary characterization [J]. *Proceedings of the Japan Academy: Series B*, 2011, 87(6): 287 - 327
- 3 Suzuki K, Hata S, Kawabata Y, *et al.* Structure, activation, and biology of calpain [J]. *Diabetes*, 2004, 53(Suppl 1): 12 - 18
- 4 Donkor I O. Calpain inhibitors; a survey of compounds reported in the patent and scientific literature [J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2011, 21(5): 601 - 636
- 5 Sorimachi H, Suzuki K. The structure of calpain [J]. *J Biochem*, 2001, 129(5): 653 - 664
- 6 Saido T C, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological - pathological involvement [J]. *Faseb J*, 1994, 8(11): 814 - 822
- 7 Goll DE, Thompson VF, Li H, *et al.* The calpain system [J]. *Physiol Rev*, 2003, 83(3): 731 - 801
- 8 Inserte J, Hernando V, Garcia - Dorado D. Contribution of calpains to myocardial ischaemia/reperfusion injury [J]. *Cardiovasc Res*,

2012, 96(1): 23 - 31

- 9 Chen Q, Paillard M, Gomez L, *et al.* Activation of mitochondrial mu - calpain increases AIF cleavage in cardiac mitochondria during ischemia - reperfusion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 415(4): 533 - 538
- 10 Singh RB, Dhalla NS. Ischemia - reperfusion - induced changes in sarcolemmal $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ are due to the activation of calpain in the heart [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(3): 388 - 397
- 11 Chen M, Won DJ, Krajewski S, *et al.* Calpain and mitochondria in ischemia/reperfusion injury [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32): 29181 - 29186
- 12 Letavernier E, Perez J, Bellocq A, *et al.* Targeting the calpain/calpastatin system as a new strategy to prevent cardiovascular remodeling in angiotensin II - induced hypertension [J]. *Circ Res*, 2008, 102(6): 720 - 728
- 13 Jiang LQ, Zhang J, Monticone RE, *et al.* Calpain - 1 regulation of matrix metalloproteinase 2 activity in vascular smooth muscle cells facilitates age - associated aortic wall calcification and fibrosis [J]. *Hypertension*, 2012, 60(5): 1192 - 1199
- 14 Sedding DG, Homann M, Seay U, *et al.* Calpain counteracts mechanosensitive apoptosis of vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo [J]. *Faseb J*, 2008, 22(2): 579 - 589
- 15 Yang D, Ma S, Tan Y, *et al.* Increased expression of calpain and elevated activity of calcineurin in the myocardium of patients with congestive heart failure [J]. *Int J Mol Med*, 2010, 26(1): 159 - 164
- 16 Takahashi M, Tanonaka K, Yoshida H, *et al.* Possible involvement of calpain activation in pathogenesis of chronic heart failure after acute myocardial infarction [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006, 47(3): 413 - 421
- 17 Ahmad HA, Lu L, Ye S, *et al.* Calpain inhibition preserves talin and attenuates right heart failure in acute pulmonary hypertension [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2012, 47(3): 379 - 386
- 18 Smith MA, Schnellmann RG. Calpains, mitochondria, and apoptosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 96(1): 32 - 37
- 19 Li Y, Ma J, Zhu H, *et al.* Targeted inhibition of calpain reduces myocardial hypertrophy and fibrosis in mouse models of type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2011, 60(11): 2985 - 2994
- 20 Ma J, Wei M, Wang Q, *et al.* Deficiency of *Capn4* gene inhibits nuclear factor - kappaB (NF - kappaB) protein signaling/inflammation and reduces remodeling after myocardial infarction [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(33): 27480 - 27489

(收稿日期:2014 - 05 - 24)

(修回日期:2014 - 06 - 19)



欢迎订阅

欢迎赐稿