

- 2009, 47(11): 3653-3662.
- [4] van der Sanden S, van der Avoort H, Lemey P, et al. Evolutionary trajectory of the VP1 gene of human enterovirus 71 genogroup B and C viruses [J]. J Gen Virol, 2010, 91 (Pt 8): 1949-1958.
- [5] Li L, He Y, Yang H, et al. Genetic characteristics of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 circulating from 1999 to 2004 in Shenzhen, People's Republic of China [J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(8): 3835-3839.
- [6] Huang S W, Kiang D, Smith D J, et al. Evolution of re-emergent virus and its impact on enterovirus 71 epidemics [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2011, 236(8): 899-908.
- [7] Zhang Y, Tan X, Cui A, et al. Complete genome analysis of the C4 subgenotype strains of enterovirus 71: predominant recombination C4 viruses persistently circulating in China for 14 years [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56341.
- [8] Yip C C, Lau S K, Zhou B, et al. Emergence of enterovirus 71 "double-recombinant" strains belonging to a novel genotype D originating from southern China: first evidence for combination of intratypic and intertypic recombination events in EV71 [J]. Arch Virol, 2010, 155(9): 1413-1424.
- [9] Yip C C, Lau S K, Woo P C, et al. Human enterovirus 71 epidemics: what's next? [J]. Emerg Health Threats J, 2013, 6: 19780.
- [10] Zhou F, Kong F, Wang B, et al. Molecular characterization of enterovirus 71 and coxsackievirus A16 using the 5' untranslated region and VP1 region [J]. J Med Microbiol, 2011, 60 (Pt 3): 349-358.
- [11] Zhang B, Wu X, Huang K, et al. The variations of VP1 protein might be associated with nervous system symptoms caused by enterovirus 71 infection [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14: 243.
- [12] Zhu J, Luo Z, Wang J, et al. Phylogenetic analysis of Enterovirus 71 circulating in Beijing, China from 2007 to 2009 [J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56318.
- [13] Nishimura Y, Lee H, Hafnstein S, et al. Enterovirus 71 binding to PSGL-1 on leukocytes: VP1-145 acts as a molecular switch to control receptor interaction [J]. PLoS Pathog, 2013, 9(7): e1003511.
- [14] Li R, Zou Q, Chen L, et al. Molecular analysis of virulent determinants of enterovirus 71 [J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26237.
- [15] Huang W, Wang Y F, Yu C K, et al. Mutations in VP2 and VP1 capsid proteins increase infectivity and mouse lethality of enterovirus 71 by virus binding and RNA accumulation enhancement [J]. Virology, 2012, 422(1): 132-143.
- [16] Chang G H, Lin L, Luo Y J, et al. Sequence analysis of six enterovirus 71 strains with different virulences in humans [J]. Virus Res, 2010, 151(1): 66-73.
- [17] 袁晓晶, 温红玲, 高峰, 等. 山东省肠道病毒 71 型分离株 SDLY11 全基因组序列分析 [J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 29(3): 232-235
- [18] Mcminn P, Lindsay K, Perera D, et al. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia [J]. J Virol, 2001, 75(16): 7732-7738.
- [19] Ooi M H, Wong S C, Podin Y, et al. Human enterovirus 71 disease in Sarawak, Malaysia: a prospective clinical, virological, and molecular epidemiological study [J]. Clin Infect Dis, 2007, 44(5): 646-656.

(编辑:杨丹)

(收稿日期:2014-09-11 修回日期:2014-11-08)

doi:10.13407/j.cnki.jpp.1672-108X.2016.01.021

• 综述 •

半胱天冬氨酸蛋白酶-3 与病毒性心肌炎心肌细胞凋亡

张芸娟 综述,董湘玉 审校 (兰州大学第二医院,甘肃兰州 730000)

[中图分类号]R725.4

[文献标识码]A

[文章编号]1672-108X(2016)01-0055-03

Relationship of Caspase-3 Levels and the Apoptosis in Viral Myocarditis

Zhang Yunjuan, Dong Xiangyu (The Second Hospital of Lanzhou University, Gansu Lanzhou 730000, China)

病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)为感染性心肌炎中最常见的一类心肌炎性病变,主要表现为心肌局灶性、弥漫性的间质炎性渗出,心肌纤维化或心肌细胞坏死,可伴有心包及心内膜的炎症改变。关于 VMC 心

肌损伤的致病机制,一直是众学者研究和讨论的热点课题之一。大致可以概括以下几方面:(1)病毒的直接损伤:病毒直接侵犯心肌细胞、病毒在心肌细胞内复制均是心肌受损的直接原因^[1]。(2)免疫病理机制:抗心肌

抗体产生于宿主对病毒特异的免疫应答,溶解被感染的心肌细胞^[2]。有学者在病毒性心肌炎、扩张型心肌病的患者体内均发现了心脏的自身抗体(如抗肌球蛋白 α 和 β 重链的抗体、抗线粒体蛋白抗体、抗肌膜抗体、抗膜受体抗体等)^[3]。(3)生化机制:VMC 患者急性期超氧化物歧化酶水平降低,恢复期升高,给予抗氧化剂治疗效果明显^[4],证明氧化自由基在心肌损伤的过程中起着重要的作用。心肌细胞的凋亡机制被认为可能是 VMC 发生、发展的另一重要致病机制。

心肌细胞能够在多种病理条件下发生细胞凋亡。Kytö V 等^[5]收集了芬兰 28 年间 33 个死于急性心肌炎的尸体并进行解剖研究,结果检测到了凋亡的 DNA 片段和活化的半胱天冬氨酸蛋白酶-3(cysteine containing aspartate specific protease, Caspase-3)。该研究发现,急性心肌炎致心力衰竭猝死的患者心肌细胞凋亡检测值远高于意外死亡而心脏停搏者,进一步证实 VMC 患者心肌细胞能够发生细胞凋亡,在 VMC 的病理发展过程中不仅存在着细胞凋亡的参与,更能够诱导心肌病变的加重。Saraste A 等^[6]等认为,病毒在心肌细胞的复制过程中导致了细胞凋亡的发生,因此在 VMC 的发病早期心肌细胞更易发生凋亡现象。心肌炎的发生过程中存在着细胞凋亡现象,这一点在 Zorc-Pleskovic R 等^[7]的临床病例对照研究报道中同样得到有力的证明。Binah O^[8]认为存在于淋巴细胞中的丝氨酸磷脂酶和孔道蛋白可以使靶细胞凋亡。另有研究^[9]认为, Fas/FasL 可以使 T 淋巴细胞与心肌细胞结合,导致心肌细胞离子通道紊乱,发生心肌细胞凋亡。

1 Caspase-3 为细胞凋亡的调控基因之一

细胞凋亡是指在个体发育的过程中,在一定的生理病理条件下,为了能够维持内环境的稳定、调控机体的发育,多细胞有机体通过完成一定的基因调控,使其细胞自动消亡的过程。细胞凋亡的过程是一个受多基因调控的级联反应过程,包括 p53、Bax、bcl-2、Fas 等原癌基因,其中最重要的就是 Caspase 级联。

Caspases 是参与细胞凋亡的一种重要的蛋白酶,它能够抑制细胞凋亡抑制物(I^{CAD})灭活而激活脱氧核糖核酸酶(CAD),最终使细胞的结构破坏,调节蛋白的功能丧失。在体外受病毒感染的心肌细胞中,作为细胞凋亡的调控基因之一, Caspase-3 能够找到被激活的证据,当体外应用药物抑制 Caspase 的活化,可以有效抑制细胞凋亡的发生。在体内应用 Caspase 抑制剂,可减少大约 40%~60% 心肌损伤的发生,被敲除 Caspase-3 基因的小鼠,生存率明显较对照组高。广谱的 Caspase 抑制剂能够明显降低 CD19⁺B 细胞中 CVB₃ 的负荷,能够有效抑制细胞内病毒的复制与病毒在细胞内的释放^[10]。

p53 为抑癌基因,它的蛋白是一种 DNA 受损的分子传感器,能诱导细胞增殖的停滞并促发细胞凋亡。野生

型 p53 可诱导细胞凋亡的发生,当细胞的 DNA 结构因生理和(或)病理原因受到损伤时, p53 蛋白的水平即增高,阻止细胞 DNA 的合成和细胞的分裂,此时细胞出现 G1 期停滞,此过程有利于受损的细胞及时启动自身的修复机制;当 DNA 损伤不能及时修复时, p53 蛋白会持续增高,发生细胞凋亡。

Bax 属于 bcl-2 基因家族,是编码 bcl-2 相关蛋白 X 的基因,常被 p53 基因诱导转录。VMC 模型小鼠心肌细胞的 Bax 基因表达在受病毒感染后第 4 天增加,细胞凋亡随之增加。其原因可大致归纳为:(1) Bax 的表达在 p53 的影响下上调,当 Bax 转移到线粒体的外膜后,细胞色素等效应因子被线粒体释放,激发细胞凋亡的线粒体调控途径。(2) 心肌细胞的 DNA 损伤信息刺激 p53 活性上升, p53 通过对 Bcl-2、Bax 表达的调节,降低了心肌细胞对凋亡刺激的耐力^[6]。以上结论表明, p53 在 mRNA 水平能同时激活 Bax 表达,抑制 Bcl-2 的表达; Bax、Bcl-2 的蛋白产物具有相反的作用, Bax 加速细胞凋亡, Bcl-2 促进细胞存活。

Fas/FasL 不仅在细胞介导的细胞毒作用(cell-mediated cytotoxicity, CMC)中发挥重要作用,还能通过向细胞传导凋亡信号,诱导受病毒感染的心肌细胞发生细胞凋亡来清除病毒并控制心肌的炎症反应,发挥其“双刃剑”作用。当心肌细胞的 DNA 受病毒损伤后,随着 p53 蛋白的水平升高, Fas/FasL(CD95L 或 CD128)通过 p53 基因依赖的方式表达, Fas 基因又在 p53 蛋白的作用下从心肌细胞的高尔基体转运至心肌细胞膜,激活 Fas 基因通过死亡域(death domain, DD)和含死亡结构域的 Fas 相关蛋白(fas associated protein with death domain, FADD)细胞凋亡的死亡受体(death receptor, DR)调控途径。

2 Caspase-3 参与心肌细胞凋亡的信号转导途径

Caspase-3 参与心肌细胞凋亡的信号转导途径主要包括:线粒体途径(外源性途径)和死亡受体途径(内源性途径)。在这两种途径中,含半胱氨酸的 Caspase 均被激活,剪切胞内底物,导致心肌细胞发生凋亡特有的生化以及形态学改变。

2.1 线粒体途径

在心肌细胞发生细胞凋亡的过程中,线粒体途径起着重要的作用^[11]。当细胞凋亡发生时,细胞线粒体的结构和功能会发生改变。在线粒体的凋亡过程中,细胞的内环境首先发生了改变,如氧化应激反应、I/R 等,这些损伤因子激活了细胞的凋亡蛋白如 P53、Bax 等,使线粒体膜的通透性发生了改变,致使一些高致死性物质(如细胞色素 C 等)释放入细胞液中,激活了 Caspase 级联反应,导致典型的凋亡形态学改变,此即“线粒体途径”。

2.2 死亡受体途径

死亡受体途径是在细胞凋亡的过程中,直接启动凋亡的一条最具特征性的信号转导途径。当 Fas 与其配体 FasL 结合后,能够诱导 Fas⁺细胞凋亡,因此 Fas 又被称为“死亡受体”。Fas 及 FasL 在心肌细胞中有丰富的表达:Fas 主要存在于心肌细胞膜上,FasL 则能在心脏肌层(包括心肌细胞和非心肌细胞)中检出,由此可见,心肌细胞是 Fas/FasL 介导效应的靶器官。当 FasL 与心肌细胞表面 Fas 结合后,诱导 Fas 多聚化,导致 Fas 分子胞浆段内的 DD 与 FADD 氨基端的 DD 结合,促使 FADD 的 N 端 DED(death effector domain,DED)与 pro-Caspase-8(或 10)中的 DED 结合,继而形成由 Fas/FADD/pro-Caspase-8(或 10)组成的死亡诱导信号传导复合体(death inducing signal complex, DISC)。Pro-Caspase-8(或 10)能够自身催化成活性异四聚体形式,激活下游的 pro-Caspase-3、pro-Caspase-6、pro-Caspase-7,激活的效应 Caspase 作用于心肌细胞内的死亡相关底物,最终导致心肌细胞凋亡。

3 Caspase-3 在 VMC 中心肌细胞凋亡的作用

Caspases 家族是一个含有半胱氨酸活性的胞浆蛋白酶家族,是细胞凋亡的中心环节和参与者,作为细胞凋亡的调控基因之一,在细胞凋亡的信号通路中起到非常重要的作用。它通过下游的效应因子(Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7)切断细胞间的信号传导,使细胞骨架重组,使 DNA 复制和修复过程关闭,破坏 DNA 和细胞的结构,诱导凋亡小体,执行细胞凋亡。目前发现 Caspases 家族有 13 名成员。各种细胞凋亡的诱导因素最后都是通过 Caspases 家族来起作用。Caspase-8 和 Caspase-9 是 Caspases 级联的始动环节,Caspase-3 是该级联的终末步骤,参与细胞凋亡的发生^[12]。效应 Caspase(Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7)含有较短的结构域或不含结构域,以无活性的二聚体形式主要存在于胞质中,通过剪切其大、小亚单位间的特异位点而被激活。当起始 Caspase(Caspase-2、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10)被激活后,随即剪切并激活效应 Caspase,后者又可互相剪切,以级联反应的方式被激活,Caspase-3 一旦被激活,细胞凋亡将不可避免。

Caspase 水平及活性升高是心肌细胞凋亡的重要标志之一,同时能够反映效应细胞的细胞毒活性。应用能够透过细胞膜的 Caspase 荧光底物,该底物被酶切后释放出荧光基团,通过流式细胞分析术(flow cytometry, FCM)检测其释放的荧光强度,可以推断 Caspase 的活性。Caspases 于细胞凋亡的早期才能检测到,在凋亡过程中持续升高,凋亡晚期其水平迅速下降,故通过 FCM 对 Caspase-3 的检测,可以动态观察细胞凋亡的全过程,可在单细胞水平对抗原特异性 T 细胞毒作用进行可视化和数量化分析。

在 VMC 的发生过程中,心肌细胞的细胞凋亡是一个多信号依赖的过程,包括多种信号分子与信号通路,构成了一个复杂的网络系统。目前已发现了多种具有调控细胞凋亡作用的基因及蛋白质分子,它们的表达水平在 VMC 的发生过程中均明显升高,这表明在 VMC 发生的病理生理过程中,心肌细胞存在着因细胞凋亡而造成的损伤,通过抑制细胞凋亡的调控因子(Caspase-3 等基因),减少心肌细胞的坏死,将会为 VMC 的治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] Brady W J, Ferguson J D, Ullman E A, et al. Myocarditis: emergency department recognition and management [J]. Emerg Med Clin North Am, 2002, 22(4): 865-885.
- [2] Huber S. T cells in coxsackievirus-induced myocarditis [J]. Viral Immunol, 2010, 17(2): 152-164.
- [3] Caforio A L, Mahon N J, Tona F, et al. Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance [J]. Eur J Heart Fail, 2002, 4(4): 411-417.
- [4] Si X, Mcmanus B M, Zhang J, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces coxsackievirus B3 replication through inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway [J]. J Virol, 2005, 79(13): 8014-8023.
- [5] Kytö V, Saraste A, Saukko P, et al. Apoptotic cardiomyocyte death in fatal myocarditis [J]. Am J Cardiol, 2004, 94(6): 746-950.
- [6] Saraste A, Arola A, Vuorinen T, et al. Cardiomyocyte apoptosis in experimental coxsackievirus B3 myocarditis [J]. Cardiovasc Pathol, 2003, 12(5): 255-262.
- [7] Zorc-Pleskovic R, Alibegović A, Zorc M, et al. Apoptosis of cardiomyocytes in myocarditis [J]. Folia Biol (Praha), 2006, 52(1-2): 6-9.
- [8] Binah O. Cytotoxic lymphocytes and cardiac electrophysiology [J]. J Mol Cell Cardiol, 2002, 34(9): 1147-1161.
- [9] Shilkrot M, Yaniv G, Asleh R, et al. Tyrosine kinases inhibitors block Fas-mediated deleterious effects in normoxic and hypoxic ventricular myocytes [J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 35(10): 1229-1240.
- [10] DeBiasi R L, Robinson B A, Sherry B, et al. Caspase inhibition protects against reovirus-induced myocardial injury in vitro and in vivo [J]. J Virol, 2004, 78(20): 11040-11050.
- [11] Ebermann L, Wika S, Klumpe I, et al. The mitochondrial respiratory chain has a critical role in the antiviral process in Cocksackievirus B3-induced myocarditis [J]. Lab Invest, 2012, 92(1): 125-134.
- [12] Fujino G, Noguchi T, Matsuzawa A, et al. Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1 [J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(23): 8152-8163.

(编辑:杨丹)

(收稿日期:2014-09-07 修回日期:2014-12-31)