

心脏特异性高度表达的抗凋亡蛋白——ARC*

李玉珍**

(解放军总医院基础医学所病理生理研究室, 北京 100853)

摘要 与凋亡 (apoptosis) 相关的许多心脏疾病如心肌梗死、心肌病及心衰等严重威胁着人类的健康和生命. 寻找有效手段防治这些心脏病是当前医学研究的热点. ARC(带有 caspase 富集功能域的凋亡抑制因子) 是新近发现的唯一在心脏大量且特异表达的抗凋亡蛋白, 其全称是带有 caspase 富集功能域的凋亡抑制因子. ARC 可被持续性磷酸化并参与阻断凋亡发生途径的多个层面. 因此, ARC 是一种强大的抗心肌凋亡蛋白.

关键词 ARC, 心肌凋亡, 抗凋亡蛋白

学科分类号 Q28

心肌梗死、心肌病、心脏肥大、心衰等心肌损伤性疾病日益严重地威胁着人类的健康和生命. 其死亡率已接近所有癌症死亡率的总和, 成为第一位的致死病因. 可见预防和治疗心肌损伤性心脏疾病是医学研究领域亟待解决的问题.

凋亡 (apoptosis) 在调节机体正常发育和维持内环境稳定中发挥着重要作用. 在心血管系统, 凋亡参与早期形态发生阶段心脏和血管结构的形成, 调节后期生长发育阶段分化的心血管组织生长发育. 因此, 凋亡是心血管系统发育过程中不可缺少的一个环节^[1].

发育成熟后的也即成年的心脏与其他增生的器官和组织不同, 是由末端分裂的心肌细胞组成, 它们不再具备分裂增殖能力. 心肌细胞的死亡不能通过有效的细胞增殖来弥补. 因此, 由凋亡造成的心肌细胞死亡最终会导致诸如心肌梗死、心肌病、心脏肥大、心衰等多种心脏疾病^[2]. 可见, 在心脏寻找特异性高表达的抗凋亡蛋白是当前医学和生物学研究的热门领域.

1 心脏特异性抗凋亡蛋白——ARC 的发现及分子结构特性

研究证明, 在已经发现的促凋亡因子中, 部分因子如 Bak, caspase-9 和 Fas/CD95 在心脏的表达比其他器官或组织中的表达要丰富^[3~5]. 从进化论的角度讲, 正常生理情况下, 为了维持终末分化器

官如心脏的内环境稳定, 促凋亡因子的高度表达要求与之相匹配的抗凋亡因子也应该有足量的表达.

1996年 Geertman 等^[6]从大鼠的嗜铬细胞瘤和脑的 cDNA 文库中获得多个 3' 端序列相同的 cDNA, 其中带有最长开放阅读框架的 cDNA 编码的蛋白质分子质量为 24.6 ku, 其 C 端富含脯氨酸和谷氨酸残基, 但是该蛋白质功能不清楚. 1998 年 Koseki 等^[7]通过分析蛋白质结构功能域, 发现这一基因含有 caspase 富集功能域 (caspase recruitment domain, CARD), 也就是说它可能与凋亡有关. 进而研究发现: 由该基因编码的蛋白质具有对抗 caspase-2 和 caspase-8 活性的作用, 从而证明这一蛋白是一种抗凋亡蛋白. 这是一种迄今为止在心脏高度特异, 且大量表达的抗凋亡蛋白, 其全称是带有 caspase 富集功能域的凋亡抑制因子 (apoptosis repressor with a caspase recruitment domain), 简称 ARC.

来源于大鼠 ARC cDNA 编码的蛋白质含有 221 个氨基酸, 分子质量为 24.6 ku^[6]. 人类 ARC cDNA 编码的蛋白质含有 208 个氨基酸, 分子质量为 22.6 ku^[7]. 小鼠 ARC cDNA 编码的蛋白质含有 220 个氨基酸, 分子质量为 24.5 ku^[8]. 原位杂交结

*国家自然科学基金资助项目(30570735).

** 通讯联系人. Tel: 010-66939774, Fax: 010-68234596

E-mail: yuzlif@yahoo.ca

收稿日期: 2006-05-09, 接受日期: 2006-05-29

果显示: 人类 ARC 有两个转录子, 一个转录子为 1.0 kb, 它编码 ARC 蛋白; 另一个转录子为 5.5 kb, 是由于 RNA 的选择性剪接产生的, 它编码的蛋白质是一种与 Nop30 相关的核仁蛋白, 其功能意义目前还不清楚, 但是在大鼠和小鼠未检测到这种核仁蛋白. 来源于小鼠 ARC 蛋白与人类有 80% 的同源性, 与大鼠有 91% 的同源性. 大鼠、人类和小鼠的 ARC 蛋白共同具有一个 N 端 CARD 结构域和一个富含脯氨酸和谷氨酸残基的 C 端结构域. ARC 的 CARD 结构域与 caspases-2、caspases-9、凋亡蛋白酶激活因子 -1 (apoptotic protease activating factor-1, Apaf-1)、受体反应蛋白相关的带有死亡结构域的 ICH-1/CED-3 同源蛋白 (receptor-interacting protein-associated ICH-1/CED-3 homologous protein with a death domain, RAIDD) 的 CARD 结构域高度同源.

2 ARC 从多个层面发挥抗凋亡作用

ARC 作为一个 caspase 抑制蛋白, 可特异地抑制 caspase-2 和 caspase-8 的活性, 因此可以抑制需要这些 caspase 参与发生的凋亡^[7]. 进一步研究表明, ARC 不仅可直接抑制 caspase 的活性, 还可以通过其他途径发挥其抗凋亡的作用. ARC 的 CARD 功能域可以直接与 Fas 和带有死亡结构域的 Fas 相关蛋白 (Fas-associating protein with a death domain, FADD) 的死亡结构域结合, 阻断 Fas 和 FADD 死亡结构域间的相互反应, 从而抑制死亡诱导信号复合体 (death-inducing signaling complex, DISC) 的组装, 阻断外源性凋亡途径^[9]. ARC 的 CARD 结构域也可以与促凋亡蛋白 Bax 的 C 端直接结合, 抑制 Bax 从胞浆到线粒体的转移, 从而阻断内源性凋亡途径^[9,15]. ARC 还具有抑制线粒体释放细胞色素 c 和稳定线粒体膜电位的功能^[10,11]. 增加细胞内 Ca^{2+} 浓度是细胞凋亡的重要信号传导途径. ARC 作为一种钙结合蛋白, 具有维持细胞内 Ca^{2+} 缓冲的功能. ARC 可通过其 C 端与 Ca^{2+} 结合, 阻断由 ATP 刺激引起的细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加, 抑制细胞凋亡^[12]. K^{+} 是维持细胞内离子浓度平衡和保持细胞体积正常的重要阳离子. K^{+} 外流可引起细胞皱缩, 继而造成细胞凋亡. ARC 可以阻断 K^{+} 通道, 抑制 K^{+} 外流和细胞凋亡^[13].

凋亡所参与的信号转导途径非常复杂, 上游信号分子可以调控细胞的促进和对抗凋亡蛋白的活性. 研究表明, ARC 也是由上游信号来调控的, 蛋

白激酶 CK2 可磷酸化 ARC 蛋白上的 149 位苏氨酸, 使 ARC 从细胞质中转运到线粒体, 随后 ARC 可直接与 caspase-8 结合. 令人感兴趣的是 CK2 磷酸化 ARC 在生理条件下是持续的, 说明 ARC 被磷酸化的重要性^[14].

综上所述, ARC 的高度表达以及从凋亡发生途径的多个层面上发挥阻断作用, 使其成为维持心肌细胞存活的重要因子.

3 ARC 是保护心肌免受凋亡相关因子损伤所必需的

用重组的 TAT-ARC 基因转染来源于胚胎大鼠心脏的肌源性 H9c2 细胞, 能明显地抑制 H_2O_2 诱导的线粒体跨膜电位丢失和核固缩, 减少细胞凋亡数量. 用 TAT-ARC 基因灌注大鼠心脏, 然后进行缺血再灌注, 发现过表达的融合 ARC 蛋白可以抑制肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 的释放和明显地减小心肌梗死的面积^[15]. 以上结果表明, ARC 具有抑制心肌细胞凋亡, 保护心肌免受凋亡相关因子损伤的功能. 进一步, 用点突变的方法敲除 ARC 蛋白 N 端 CARD 结构域中的亮氨酸残基 (ARCL31F), 将重组的 TAT-ARCL31F 基因灌注大鼠心脏, 发现突变的 ARC 蛋白丧失抑制 CK 的释放和减小心肌梗死面积的功能, 提示 ARC 的心肌保护作用依赖于其 CARD 结构域^[16].

尽管生理状态下 ARC 蛋白在心肌细胞中高度表达, 并可被持续性磷酸化和参与阻断凋亡发生途径的多个层面, 但是在凋亡刺激因子作用下心肌细胞仍可发生凋亡. 研究表明这与 ARC 蛋白表达水平的下降有关. Ekhterae 等^[10]将 H9c2 细胞暴露于缺氧条件下, 发现 H9c2 细胞凋亡明显增加, 同时伴有 ARC 蛋白表达水平下降和细胞色素 c 从线粒体释放至胞浆以及 caspase-3 的激活. 过度表达的 ARC 可以明显抑制缺氧诱导的 H9c2 细胞凋亡以及细胞色素 c 的释放和 caspase-3 的激活. 用 H_2O_2 刺激 H9c2 细胞可以诱导细胞凋亡和 ARC 蛋白表达水平明显下降, 而且 ARC 蛋白下降的程度与细胞凋亡的数量呈正比, ARC 的过度表达可以明显抑制 H_2O_2 诱导的细胞凋亡^[11]. 为了进一步研究内源性 ARC 在氧应激条件下的作用, Neuss 等^[11]将 H9c2 亚细胞系 (H9-) 暴露于 H_2O_2 . H9-细胞是 ARC 缺陷性细胞系, 本身不表达 ARC. 结果发现: 与 H9c2 细胞比较, H_2O_2 诱导 H9-细胞凋亡的剂量依赖性曲线左移, 表明 ARC 缺陷性细胞对氧应激诱导凋

亡作用更敏感. 将乳鼠心肌细胞暴露于 H_2O_2 , 可以增加 Fas 介导的心肌细胞凋亡和降低 ARC 蛋白表达^[7]. 终末期心脏衰竭的病人 ARC 蛋白表达水平明显下降^[18]. Donath 等^[18]用同源重组的方法产生 ARC 基因敲除的小鼠(ARC^{-/-}), ARC^{-/-}小鼠通过繁殖产生 ARC^{-/-}小鼠. ARC^{-/-}小鼠总体健康状况和心脏功能与正常小鼠(ARC^{+/+})比较无差异. 用横向主动脉结扎方法增加心脏负荷, 结扎后 14 天 ARC^{-/-}小鼠表现出心脏明显扩张、心肌收缩功能明显减退和心肌纤维化等典型的心肌病特征. 而 ARC^{+/+}小鼠横向主动脉结扎 14 天后心肌病明显轻于 ARC^{-/-}小鼠. ARC^{-/-}小鼠心脏缺血再灌注后心肌细胞凋亡和心肌梗死面积与 ARC^{+/+}小鼠比较明显增加.

4 结 语

20 世纪 90 年代初, 在凋亡的早期研究中, 人们对于凋亡在心脏中究竟是好还是坏这一理论问题混淆不清, 甚至认为凋亡对于心脏来讲无关紧要. ARC 蛋白的发现使人们认识到凋亡在心脏正常生理和病理情况下发挥重要作用, 由此开创了凋亡在心脏研究的新篇章.

参 考 文 献

- 1 Fisher S A, Langille B L, Srivastava D. Apoptosis during cardiovascular development. *Circ Res*, 2000, **87** (10): 856~864
- 2 Kang P M, Izumo S. Apoptosis and heart failure: A critical review of the literature. *Circ Res*, 2000, **86** (11): 1107~1113
- 3 Farrow S N, White J H, Martinou I, *et al.* Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature*, 1995, **374** (6524): 731~733
- 4 Srinivasula S M, 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 Biol Chem*, 1996, **271** (43): 27099~27106
- 5 Itoh N, Yonehara S, Ishii A, *et al.* The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*, 1991, **66** (2): 233~243
- 6 Geertman R, McMahon A, Sabban E L. Cloning and characterization of cDNAs for novel proteins with glutamic acid-proline dipeptide tandem repeats. *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1306** (2): 147~152
- 7 Koseki T, Inohara N, Chen S, *et al.* ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95** (9): 5156~5160
- 8 Abmayr S, Crawford R W, Chamberlain J S. Characterization of ARC, apoptosis repressor interacting with CARD, in normal and dystrophin-deficient skeletal muscle. *Human Molecular Genetics*, 2004, **13** (2): 213~221
- 9 Nam Y J, Mani K, Ashton A W, *et al.* Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions. *Mol Cell*, 2004, **15** (6): 901~912
- 10 Ekhterae D, Lin Z, Lundberg M S, *et al.* ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells. *Circ Res*, 1999, **85** (12): e70~77
- 11 Neuss M, Monticone R, Lundberg M S, *et al.* The apoptotic regulatory protein ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) prevents oxidant stress-mediated cell death by preserving mitochondrial function. *J Biol Chem*, 2001, **276** (36): 33915~33922
- 12 Jo D G, Jun J I, Chang J W, *et al.* Calcium binding of ARC mediates regulation of caspase 8 and cell death. *Mol Cell Biology*, 2004, **24** (22): 9763~9769
- 13 Ekhterae D, Platoshyn O, Zhang S, *et al.* Apoptosis repressor with caspase domain inhibits cardiomyocyte apoptosis by reducing K⁺ currents. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2003, **284**: 1405~1410
- 14 Li P F, Li J, Muller E C, *et al.* Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC. *Mol Cell*, 2002, **10** (2): 247~258
- 15 Gustafsson A B, Sayen M R, Williams S D, *et al.* TAT protein transduction into isolated perfused hearts, TAT-apoptosis repressor with caspase recruitment domain is cardioprotective. *Circulation*, 2002, **106**: 735~739
- 16 Gustafsson A B, Tsai J G, Logue S E, *et al.* Apoptosis repressor with caspase recruitment domain protects against cell death by interfering with Bax activation. *J Biol Chem*, 2004, **279** (20): 21233~21238
- 17 Yaniv G, Shilkrot M, Larisch S, *et al.* Hydrogen peroxide predisposes neonatal rat ventricular myocytes to Fas-mediated apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, **336** (3): 740~746
- 18 Donath S, Li P F, Willenbockel C, *et al.* Apoptosis repressor with caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress. *Circulation*, 2006, **113**: 1203~1212

An Anti-apoptotic Protein Expressed Specifically and Highly in The Cardiac Tissue: ARC*

LI Yu-Zhen**

(Department of Pathophysiology, Institute of Basic Medical Science, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

Abstract Many apoptosis-related heart diseases such as myocardial infarction, cardiomyopathies, and heart failure severely impair human's health and life. Currently, a key focus for the medical researchers is to find out effective ways to prevent or treat these heart diseases. ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) is the first anti-apoptotic protein so far identified to be highly and specifically expressed in the cardiac tissue. ARC could be structurally phosphorylated and involved in various signaling pathways during apoptosis.

Key words apoptosis repressor with caspase recruitment domain(ARC), myocardial apoptosis, anti-apoptotic protein

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30570735).

**Corresponding author . Tel: 86-10-66939774, Fax: 86-10-68234596, E-mail: yuzlif@yahoo.ca

Received: May 9, 2006 Accepted: May 29, 2006