



心脏特异抗凋亡蛋白 ARC 研究进展

廉虹¹, 张连峰^{1,2}

- (1. 中国医学科学院实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021;
2. 中国医学科学院实验动物研究所, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 中国医学科学院和北京协和医学院, 北京 100021)

【摘要】 含胱冬肽酶富集功能域的凋亡抑制因子 (apoptosis repressor with CARD, ARC) 蛋白是 20 世纪末发现的, 在心肌、骨骼肌和大脑等终末分化组织中大量表达的抗凋亡蛋白。ARC 的主要功能是抗凋亡作用。由于其在心脏中表达的特异性和抗凋亡的多层次性, 使 ARC 在心脏中的作用成为近年来研究的热点。本文主要对其抗凋亡途径以及近年来在心肌病中的研究进展两方面进行综述。

【关键词】 含胱冬肽酶富集功能域的凋亡抑制因子; 凋亡; 心肌病

【中图分类号】 R541 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)03-0059-03

doi:10.3969/j.issn.1671-7856.2011.03.015

The Advances in Heart Specific Anti-apoptosis Protein ARC

LIAN Hong¹, ZHANG Lian-feng^{1,2}

- (1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China;
2. Human Disease Animal Models Level-3 Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 ARC (apoptosis repressor with CARD) protein expressed at high levels in the terminally differentiated tissues, such as, heart, skeletal muscle and brain, which was identified at the end of last century. ARC inhibits apoptosis at different levels. Since the specific expression of ARC in heart and antagonize apoptosis in many pathways, it became a hot-spot in recent years. With the function of anti-apoptosis, ARC has become a protecting factor for heart muscle. This review mainly focuses on the anti-apoptosis pathways and recent-year advances on ARC in cardiomyopathy.

【Key words】 Apoptosis repressor with CARD (ARC); Apoptosis; Cardiomyopathy

含胱冬肽酶富集功能域的凋亡抑制因子 (apoptosis repressor with CARD, ARC), 是迄今发现的唯一一种在心脏中大量表达的抗凋亡蛋白。1996 年 Geertman 等^[1]从大鼠的嗜铬细胞瘤和脑的 cDNA 文库中发现了此蛋白; 1998 年 Takeyoshi 等^[2]通过分析其结构, 发现这种蛋白含有胱冬肽酶富集功能域 (caspase recruitment domain, CARD) 结构, 这一结构域可以结合胱冬肽酶 (caspase) 进而阻止一些死

亡受体发挥作用。

人源 ARC 蛋白由 208 个氨基酸组成, 相对分子质量约为 24.6×10^3 。大、小鼠 ARC 蛋白与人源 ARC 有很高的同源性, N 端 1-98 氨基酸残基为 CARD 功能域, 与死亡受体 Fas、FADD 等相互作用; C 端 99-208 氨基酸残基为富含脯氨酸和谷氨酸的结构域。ARC 在终末分化组织如心肌、骨骼肌和大脑中表达, 在其他组织中不表达或微量表达, 但当

[基金项目] 卫生部行业基金, 实验动物和人类疾病动物模型资源扩展 (200802036) 和十一五新药专项支持 (2009ZX09501-026)。

[作者简介] 廉虹 (1982 -), 女, 博士生。主要研究方向: 心肌病机制, E-mail: lian_hong1982@163.com。

[通讯作者] 张连峰, E-mail: Zhanglf@cnilas.org。

发生癌变时,ARC 表达量明显增加。ARC 存在于细胞核和细胞质中,细胞质中的 ARC 通过与死亡受体结合以及通过抑制线粒体凋亡途径实现抗凋亡的作用,细胞核中 ARC 的功能目前了解甚少^[3]。但是人们发现在瘤性细胞中 ARC 定位于细胞核而正常的细胞 ARC 定位于细胞质中,提示 ARC 在癌细胞发生过程中有一定的作用^[4]。

1 ARC 抗凋亡作用机制及其 ARC 相关信号通路

ARC 最主要的凋亡抑制途径有两条^[5]:一条是直接死亡受体相作用的外源性途径;另一条是通过控制线粒体渗透性而抑制凋亡的内源性途径。ARC 的 CARD 结构域竞争性的与 Fas 和 FADD 的死亡结构域 (dead domains, DDs) 相结合,使其不能顺利组装成死亡诱导信号复合物 (death-inducing signaling complex, DISC),进而抑制凋亡作用的发生。ARC 也可通过 CARD 功能域直接与 caspase-8 结合,阻断由 caspase-8 引起的凋亡。Bax 进入到线粒体引起膜通透性和电势差发生变化,可导致细胞色素 c 的释放,进一步激活凋亡的效应分子 Caspase-9 和 Caspase-3,启动内源性的凋亡途径。ARC 的 CARD 结构域与 Bax 的 C 末端结合使 Bax 的构象发生改变,抑制其进入到线粒体,从而抑制 Bax 引起的内源性的凋亡途径。另外,Ekhterae 等^[6]证实,ARC 能够抑制 H9c2 肌源性细胞凋亡,一定程度上是由于 ARC 抑制了细胞膜上的 K⁺ 离子通道而实现抗凋亡作用的。细胞内 Ca²⁺ 浓度的增加是引起细胞凋亡的重要信号传导途径,ARC 可通过其 C 端与 Ca²⁺ 结合,阻断细胞内 Ca²⁺ 浓度的增加,从而抑制细胞凋亡的发生^[7]。

只有磷酸化的 ARC 才能发挥抗凋亡的功能,磷酸化的 ARC 也可以受到磷酸酶的去磷酸化作用而丧失活性。蛋白激酶 CK2 是 ARC 的上游调节因子,CK2 可以使 ARC 的 149 位苏氨酸磷酸化,进而使 ARC 由细胞质中转移到线粒体,在线粒体可以直接抑制 caspase-8 和 caspase-2 的活性^[8,9]。Tan 等^[10]证实,异丙肾上腺素和醛固酮刺激诱导的凋亡,没有明显地降低 ARC 蛋白水平,但是却通过去磷酸化降低了其抗凋亡能力。所以异丙肾上腺素和醛固酮通过激活磷酸酶使 ARC 去磷酸化,去磷酸化的 ARC 不能抑制 caspase-8 活性。ARC 除了受到磷酸化和去磷酸化的调节之外,还受到泛素-蛋白酶体的降解作用,当机体受到死亡信号的刺激时,泛

素-蛋白酶体能够介导 ARC 的降解^[11],ARC 的泛素化是由泛素 E3 连接酶 (ubiquitin E3 ligase, MDM2) 介导的^[12],并且需要 MDM2 的戒指基序 (ring motif) 与 ARC 相结合实现其降解作用。MDM2 是一个重要的 ARC 蛋白表达调节子,主动脉结扎的小鼠伴随着 ARC 表达量的下调,MDM2 表达量升高。因此,MDM2 很可能成为心肌病预防和治疗的靶点。同时 Li 等^[13]证明,p53 可以在转录水平对 ARC 进行调节,当 P53 抑制 ARC 表达时,诱导凋亡的发生。

2 ARC 在心脏发育及心肌病中的作用

Ekhterae 等^[14]发现,将 H9C2 肌源性细胞暴露于缺氧条件下,ARC 蛋白表达量下降,并伴有细胞色素 C 从线粒体释放到胞浆细胞质和 caspase3 的激活,而过表达 ARC 可以明显的抑制缺氧诱导的 H9C2 的细胞凋亡。过表达的 ARC 也可以有效的逆转 H₂O₂ 引起的 H9C2 凋亡现象的发生,为了进一步研究 ARC 在氧应激条件下的作用,将不表达 ARC 蛋白的 H9C2 亚细胞系 (H9-) 暴露于 H₂O₂,发现此缺陷细胞对氧应激诱导的凋亡作用更加敏感^[15]。说明在细胞水平 ARC 能够抵抗缺氧以及氧应激条件下的细胞凋亡。

心脏受到损伤刺激,如缺血/再灌注损伤 (I/R)、心脏主动脉横向结扎 (TAB) 和阿霉素药物诱导时,ARC 蛋白都能表现出其强大的抗凋亡能力以及对心脏机能的保护作用。Pyo 等^[16]证实,心脏特异的 ARC 转基因小鼠 (TgARC),在经过缺血/低氧再灌注后,表现出对心肌收缩功能的改善作用。新生的 TgARC 小鼠的心肌细胞也可以明显的抵抗低氧造成的细胞死亡。同时证明 ARC 蛋白 C 端钙结合结构域具有保护心肌抵抗低氧造成的损伤的能力。TgARC 小鼠从出生到成年在健康状况和外表与野生鼠并没有什么异常变化。对 TgARC 和野生鼠左前降支冠状动脉结扎后,发现 ARC 转基因鼠心肌梗死面积比野生鼠明显降低 (大约降低 40%)。进一步研究发现,ARC 保护心肌抵抗缺氧死亡是通过调节其下游的 Drbp1 (developmentally regulated RNA-binding protein 1) 和 pMe2Gly (dimethylglycine dehydrogenase precursor) 的表达实现的。Donath 等^[17]报道了 ARC 敲除小鼠 (ARC^{-/-}) 与野生型小鼠在心脏几何形状以及心肌功能方面没有异常。但经过主动脉结扎后 ARC^{-/-} 小鼠比野生小鼠心脏收缩功能降低明显,心脏变大并且出现心肌纤维

化,心肌病病理症状更加严重。经过缺血再灌注后,ARC^{-/-}小鼠心肌梗死面积也比野生小鼠有所增加。

临床研究发现心衰和扩心病中心肌细胞都出现细胞肥大和凋亡的现象,尽管细胞肥大和凋亡是两种不同的细胞事件,但是许多刺激因子可以同时刺激肥大和凋亡,肥大的细胞可以发展为凋亡。例如:肿瘤坏死因子- α 和血管紧张素 II 既可以诱导凋亡又可以诱导肥大。凋亡可能是心肌超负荷肥大失代偿发展为心衰的一个转折性的事件。在心衰和扩心病病人中发现 ARC 蛋白表达下调,尤其在心衰病人中降低非常显著。磷酸化的 ARC 可以抑制心肌细胞的肥大,抑制 ARC 的磷酸化或者对内源的 ARC 进行沉默使心肌细胞更易肥大。活性氧促进 CK2 的羧基化,进而使 CK2 磷酸化 ARC 蛋白,使其发挥抑制心肌细胞肥大的作用^[18,19]。可以看出抗凋亡蛋白 ARC 参与了心肌细胞由正常向肥大的转变以及最终走向心衰的过程。

综上,ARC 是参与心脏病病理过程的重要因子之一,作为抗凋亡的心肌保护因子发挥作用,深入了解 ARC 在不同病理状态或不同病因的心脏病中的调控和抗凋亡机制对心脏病的诊断、治疗,甚至药物研制等具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Geertman R, McMahon A, Sabban EL. Cloning and characterization of cDNAs for novel proteins with glutamic acid-proline dipeptide tandem repeats [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1996, 1306(2):147-152.
- [2] Takeyoshi K, Naohiro I, Shu C, et al. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1998, 95: 5156-5160.
- [3] Mercier I, Vuolo M, Madan R, et al. ARC, an apoptosis suppressor limited to terminally differentiated cells, is induced in human breast cancer and confers chemo- and radiation-resistance [J]. *Cell Death Differ* 2005, 12(6):682-686.
- [4] Wang M, Qanungo S, Crow MT, et al. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain(ARC) is expressed in cancer cells and localizes to nuclei [J]. *FEBS Lett* 2005, 579(11):2411-2415.
- [5] Nam YJ, Mani K, Ashton AW, et al. Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions [J]. *Mol Cell* 2004, 15(6):901-912.
- [6] Ekhterae D, Platoshyn O, Zhang S, Remillard CV, et al. Apoptosis repressor with caspase domain inhibits cardiomyocyte apoptosis by reducing K⁺ currents [J]. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003, 284(6):C1405-1410.
- [7] Jo DG, Jun JI, Chang JW, et al. Calcium binding of ARC mediates regulation of Caspase 8 and cell death [J]. *Mol Cell Biol* 2004, 24(22):9763-9770.
- [8] Li PF, Li J, Müller EC, et al. Phosphorylation by protein kinase CK2: a signaling switch for the caspase-inhibiting protein ARC [J]. *Mol Cell* 2002, 10(2):247-258.
- [9] Zhang YQ, Herman B. ARC protects rat cardiomyocytes against oxidative stress through inhibition of caspase-2 mediated mitochondrial pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2006, 99(2): 575-588.
- [10] Tan WQ, Wang JX, Lin ZQ, et al. Novel cardiac apoptotic pathway the dephosphorylation of apoptosis repressor with Caspase recruitment domain by Calcineurin circulation [J]. 2008, 118(22):2268-2276.
- [11] Nam YJ, Mani K, Wu L, et al. The apoptosis inhibitor ARC undergoes ubiquitin-proteasomal-mediated degradation in response to death stimuli [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(8): 5522-5528.
- [12] Foo RS, Chan LK, Kitsis RN, et al. Ubiquitination and degradation of the anti-apoptotic protein ARC by MDM2 [J]. *J Biol Chem* 2007, 282(8):5529-5535.
- [13] Li YZ, Lu DY, Tan WQ, Wang JX, et al. p53 initiates apoptosis by transcriptionally targeting the antiapoptotic protein ARC [J]. *Mol Cell Biol* 2008, 28(2):564-574.
- [14] Ekhterae D, Lin Z, Lundberg MS, et al. ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells [J]. *Circ Res*, 1999, 85(12):e70-77.
- [15] Neuss M, Monticone R, Lundberg MS, et al. The apoptotic regulatory protein ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domain) prevents oxidant stress-mediated cell death by preserving mitochondrial function [J]. *J Biol Chem* 2001, 276(36):33915-33922.
- [16] Pyo JO, Nah J, Kim HJ, et al. Protection of cardiomyocytes from ischemic/hypoxic cell death via Drbp1 and pMe2GlyDH in cardio-specific ARC transgenic mice [J]. *J Biol Chem* 2008, 283(45):30707-30714.
- [17] Donath S, Li P, Willenbockel C, et al. Apoptosis repressor with Caspase recruitment domain is required for cardioprotection in response to biomechanical and ischemic stress [J]. *Circulation*, 2006, 113(9):1203-1212.
- [18] Li Y, Ge X, Liu X. The cardioprotective effect of postconditioning is mediated by ARC through inhibiting mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Apoptosis* 2009, 14(2):164-172.
- [19] Murtaza I, Wang HX, Feng X, et al. Down-regulation of catalase and oxidative modification of protein kinase CK2 lead to the failure of apoptosis repressor with caspase recruitment domain to inhibit cardiomyocyte hypertrophy [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(10):5996-6004.

修回日期) 2010-06-21