

植物细胞程序性死亡中的半胱氨酸蛋白酶的研究进展

王东方 (潍坊学院山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室, 山东潍坊 261061)

摘要 半胱氨酸蛋白酶是含有半胱氨酸的一组蛋白酶系列。它不但介入植物中的有关生理活动, 而且最新研究表明它与植物发生程序性死亡(PCD)有关。对 Caspase 的基本结构、分类以及 Caspase 参与植物程序性死亡过程等方面进行综述, 以期对半胱氨酸蛋白酶在植物细胞程序性死亡中的机理研究提供理论参考。

关键词 植物; 细胞程序性死亡; 半胱氨酸蛋白酶

中图分类号 S-03 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2015)18-011-03

Research Advances of Caspase in Plant Programmed Cell Death

WANG Dong-fang (Key Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology in Universities of Shandong, Weifang University, Weifang, Shandong 261061)

Abstract Caspase is a cysteine-rich class of protease family, which not only widely participates in variety physiological processes of plants, but the latest research shows that the occurrence of plant PCD is related with caspase. Caspase basic structure and classification and Caspase involved in plant PCD processes were reviewed, in order to provide a theoretical reference for study the role of Caspases in programmed cell death in plants.

Key words Plant; Programmed cell death; Caspase

细胞程序性死亡(Programmed cell death, PCD)是动植物由自身基因调控的细胞自主、有序的死亡方式^[1]。PCD 不仅是一类特殊的细胞死亡方式, 而且对动植物本身来说具有独特的意义。随着分子生物学的发展以及生物技术的进步, 细胞凋亡的有关研究不仅在动物和医学中深入开展, 而且 PCD 研究也在植物学中广泛展开, 成为植物学研究的热门领域。有关研究表明, 在众多的环境胁迫如干旱、高低温及盐碱胁迫下合成半胱氨酸蛋白酶的 mRNA 会逐渐积累且增多^[2-3], 在植物发生 PCD 的过程中半胱氨酸蛋白酶 mRNA 也会增加。这说明半胱氨酸蛋白酶(Caspase)与植物发生 PCD 有密切关系^[4]。

1 Caspase 的基本结构和分类

半胱氨酸蛋白酶(CysteinyI aspartate specific proteinase)是一类与生物细胞因子成熟和细胞凋亡有关的蛋白酶, 是富含半胱氨酸的一类蛋白酶家族。它们的活性位点均含半胱氨酸残基, 能够在特异天冬氨酸残基肽键部位进行切割, 造成细胞凋亡。半胱氨酸蛋白酶家族系列是细胞进行死亡机制的主要“调控者”。Caspase 蛋白酶组被刺激激活后, 启动细胞死亡程序, 导致细胞进入死亡调控的执行阶段^[5]。Caspases 是由两个前体合成的, 前体是由两个亚单位组成的异二聚体, 每个功能性 Caspase 都是由两个前体的结合形成, 然后形成异四聚体。Caspase 的激活经过两次在天冬氨酸羧基端的肽键部位裂解, 经裂解后蛋白酶前体被切割成三部分, 其中第一部分称为抑制区域, 即断裂后的 H₂N-端, 当被切断后丢失, 另外两部分是死亡区域, 即 COOH-端断裂后分成大小两个亚单位, 断裂的大小亚单位嵌合组成一个以 p 片层构成的核心, d 螺旋在其两侧, 由两大两小亚单位进一步结

合成活化酶。该四聚体在所对应的两端有两个活性位点, 可作用于其本身及其他 Caspase 酶原, 依照一定次序依次激活 Caspase, 形成酶级联反应^[6-7]。

Caspase 家族包括许多种, 多数与细胞程序调亡有关, 有些与炎症反应相关联^[8]。根据功能、位置, 可将 Caspase 家族大致分为两种类型: I 型 Caspase, 又称为启动型 Caspase (Initiator Caspase), 包括 Caspase-2、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-10 等, 存在于 Caspase 级联反应的最上端, 在辅助蛋白因子的辅助下进行活化并激活下端的 Caspase; II 型 Caspase, 又称为执行型 Caspase (Executioner Caspase), 包括 Caspase-3、Caspase-6、Caspase-7 等, 其功能是特异性地使底物裂解, 使细胞发生形态以及生理生化变化, 致使细胞调亡。此外, 还有一类 Caspase (包括 Caspase-1、Caspase-4、Caspase-5、Caspase-13、Caspase-14 等), 主要功能是与细胞因子介导的炎症反应有关, 同时在细胞程序性死亡过程中起辅助作用^[9]。

2 Caspase 参与植物 PCD 的过程

Caspase 的研究最早开始于线虫 (*C. elegans*) 细胞程序化死亡的相关研究。Caspase 是动物程序死亡进行启动及执行阶段的关键调控因子, 在植物中虽然没有分离得到 Caspase 基因, 但是在植物细胞死亡过程中检测到 Caspase 活性的提高。已有研究表明, 植物细胞调亡过程中 Caspase 活化, 推测其分子结构与动物不同, 在 PCD 中执行的功能也可能不同^[10]。用动物 Caspase 活性分析试剂盒检测湖北海棠根系, 发现存在 Caspase-3 或 Caspase-7 活性^[11]。在研究平邑甜茶及新疆野苹果的细胞程序性死亡时, 免疫印迹试验表明在干旱胁迫条件下两种砧木叶中都含有类 Caspase-3 蛋白酶, 而根中不存在, 通过 Western blot 检测出类 Caspase-3 的分子量约 40 kD, 比动物高 8 kD 左右^[12]。

2.1 植物 Caspase 的种类 基因序列分析研究证明, 在拟南芥基因组中没有检测到编码 Caspase 酶类的基因, 但是在正在死亡的植物细胞中可以检测到 Caspase 活性的升高, 表明植物细胞程序性死亡进程并非是 Caspase, 而是与 Caspase

基金项目 山东省星火计划(2012XH06031); 潍坊市科技发展计划资助项目(2011022)。

作者简介 王东方(1970-), 男, 山东昌乐人, 讲师, 硕士, 从事植物生理方面的研究。

收稿日期 2015-04-29

有类似酶活性的其他类型的蛋白酶有关。基因组序列比对证明,在植物的某些序列编码的蛋白酶中与 Caspase 在空间结构上具有一定的相类似的特性,并且可被 Caspase 酶类抑制剂抑制其活性。烟草原生质体用 menadione 诱导细胞程序性死亡的研究表明,抑制剂 Ac-DEVD-CHO 和 Ac-YVAD-CHO 能抑制 Caspase 活性,阻止 DNA 的断裂和 PARP (poly-(ADP-ribose) polymerase) 的降解^[13]。目前,植物中已鉴定出的半胱氨酸蛋白酶可以分为三类,其中豆类中天冬氨酸蛋白酶 (legumain) 家族的液泡加工酶 (vacuolar processing enzymes, VPEs) 和 metacaspase 属于半胱氨酸内肽酶,与 Caspase 具有类似的氨基酸序列及空间结构,是 Caspase 的同系物;丝氨酸内肽酶 (saspases) 是枯草芽孢杆菌丝氨酸蛋白酶,能分解人工合成的 Caspase 底物。最新的研究表明, saspases、VPEs、metacaspase 在植物细胞程序性死亡过程中均起类似 Caspase 酶类的重要调控作用,参与调节、控制与执行植物细胞程序性死亡。

2.2 动植物 Caspase 的异同 植物半胱氨酸蛋白酶与动物细胞凋亡过程中 Caspase 蛋白酶类似,也介入植物细胞程序性死亡的调控过程及环节。Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) 参与 H₂O₂ 诱导的植物 PCD,而植物 PARP 的降解依赖于细胞色素 C 释放到胞质中,可被特异地 Caspase-3 抑制剂所抑制^[14]。

动物和植物细胞中的半胱氨酸蛋白酶的区别主要有以下两点。①存在部位不同。植物 Caspase 存在于细胞壁和液泡,而且叶绿体中的半胱氨酸蛋白酶可以降解糖 1,5-二磷酸核酮羧化酶 (Rubisco),而有酶活性的动物 Caspase 蛋白只存在于细胞质中,液泡中不存在。②同源性较低。研究表明,植物细胞中的半胱氨酸蛋白酶包括基因序列和蛋白质结构及功能同源性均比较低,而动物 Caspase 蛋白家族相比就高得多。所以,相关学者对植物中是否真正存在由半胱氨酸蛋白酶参与的 PCD 调控机制还持有不同观点。

2.3 植物 Caspase 及其编码基因 虽然半胱氨酸蛋白酶家族被外界有关信号激活机制以及参与调控细胞死亡的具体调控进程还不明确,但关于 Caspase 的研究,已经从许多植物中成功地得到其编码基因。根据植物半胱氨酸蛋白酶的基因表达特点,可将其分为以下三类。

一是存在于植物正常发育阶段中或存在植物某些特殊时期所表达的半胱氨酸蛋白酶。Carne 等^[15]从中华猕猴桃 (*Actinidia chinensis*) 中获得一种半胱氨酸蛋白酶,测定其氨基酸序列,即 actimidain。Ryan 等^[16]在研究杏树果实成熟时发现一个编码半胱氨酸蛋白酶基因的高度表达,成功提取其 mRNA。这为今后的研究提供基础。Lee 等^[17]试验获得水稻半胱氨酸蛋白酶基因 *OsCP1*,发现 *OsCP1* 基因在水稻未成熟的花药中表达,通过 T-DNA 插入突变体分析表明 Caspase 基因 *OsCP1* 主要参与水稻花粉的生长发育过程。严秀蕊等^[18]在水稻发育过程中发现 Caspase 酶相关基因 *OsCP2*,结果表明它也在水稻未成熟的花药中及花药绒毡层,且只在花粉发育的空泡花粉时期到成熟时期进行表达。张红岩等^[19]采用

SSH (Suppression subtractive hybridization) 和 Race-PCR (Rapid-amplification of cDNA ends) 技术克隆得到来自油菜 (*Brassica napus* L.) 矮化突变体 'NDF-1' 的一个半胱氨酸蛋白酶相关基因 *Bncp5*; RT-PCR 检测表明,该基因具有植物组织中表达特异性。Tripathi 等^[20]在玫瑰花瓣脱落过程中发现转录激活一个 37 kD 的伴随乙烯反应的半胱氨酸蛋白酶基因 *Rb-CP1*。该基因与蛋白质的降解过程密切相关。张国林等^[21]在花生果种皮中发现一个半胱氨酸蛋白酶基因 *AhPSG13*。RT-PCR 检测表明,该基因在果种皮中表达特异性。

二是在生物胁迫和非生物胁迫条件下产生的半胱氨酸蛋白酶。在对拟南芥的逆境研究中,发现 RD (Responsive to dehydration) 系列基因包括 *rd19A*、*rd21A* 以及 *rd29A/cor78/lit78*^[22]。RD 系列基因已成为植物逆境研究中的关键点,对于逆境信号传导通道的交叉研究具有重要意义。Rossano 等^[23]发现在水分胁迫下,利用 RACE 方法得到小麦 Caspase 基因 *TaCP* (AY841792)。朱家红^[24]在橡胶树胶乳中克隆获得一个半胱氨酸蛋白酶基因 *HbCP1*; 半定量 RT-PCR 结果显示,通过乙烯伤害诱导胶乳 *HbCP1* 基因的表达,推测胶乳中的 *HbCP1* 蛋白可能具有防御功能。曹慧等^[25]在研究苹果砧木八棱海棠中也分离得到了 Caspase 基因。

三是在衰老的植物组织中 Caspase 表达量增加或在衰老时期半胱氨酸蛋白酶特异性表达。衰老是指生物体在进行生命活动、生理代谢过程中,随着时间的增加,生物体细胞增殖分化能力、生理功能等逐渐发生衰退的变化过程。衰老是生物内在因子调控的结果,最终导致细胞逐渐死亡,有时将衰老视为程序化死亡过程^[26]。在各种衰老的植物组织中分离获得许多调控半胱氨酸蛋白酶的基因,都被称作衰老相关基因 SAG (Senescence associated genes),如拟南芥的 *SAG2* 和 *SAG12*,玉米的 *See1* 和 *See2*,油菜的 *LSC7* 和 *LSC790*^[27],番茄的 *Cyp23* 和烟草的 *NTCP223*^[28]。这些基因在衰老的叶片中均过量存在。王勇等^[29]在大豆叶片衰老过程中发现了一个半胱氨酸蛋白酶相关基因,它在衰老的叶片中特异性表达。沈法富等^[30]从棉花衰老叶片中克隆了编码半胱氨酸蛋白酶的 cDNA,被称为 *Ghcysp* (AY604196)。研究表明,该基因在棉花的花中、根部、下胚轴及幼叶等生长旺盛部位中不表达,而在棉花的衰老叶片中特异性表达。King 等^[31]研究表明,在花椰菜花瓣衰老过程中半胱氨酸蛋白酶显著表达。朱海生等^[32]在草莓中克隆取得半胱氨酸蛋白酶基因 *FaCP*,并且发现 *FaCP* 基因表达量随着衰老程度的增加而逐渐增加,尤其是在衰老后期显著上升。

3 结语

半胱氨酸蛋白酶家族介入了植物生长和发育过程中蛋白的降解,在种子萌发、果实发育及成熟、器官衰老与脱落等生理活动进程中起重要作用;介入响应外界病菌侵入时的超敏反应;也与植物木质部分化有关,并和器官衰老引发的 PCD 相关联。半胱氨酸蛋白酶系列基因不但参与植物的衰老调控,而且参与信号传导,并响应外界环境中的生物和非生物胁迫^[14,33],但在植物对外界非生物胁迫和生物胁迫的响

应以及器官分化和衰老的过程中,Caspase 的功能、作用研究才刚开始。与动物 Caspase 的研究相比,在植物中的有关功能机理还需要进一步研究。有关植物细胞程序性死亡 Caspase 类蛋白酶的研究尚处于起始阶段。随着细胞凋亡研究的不断深入,植物细胞 Caspase 功能与程序性死亡关系的研究将会进入一个新阶段,从而进一步揭示植物细胞程序性死亡中 Caspase 酶类作用机理和机制。

参考文献

- [1] KEER J F, WYLLIE A H, CARRIE A R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics [J]. *Br J Cancer*, 1972, 26(4): 239 - 245.
- [2] JENNIFER T J, JOHN E M. A salt-and dehydration-inducible pea gene, Cyp15a, encodes a cell-wall protein with sequence similarity to cysteine protease [J]. *Plant Molecular Biology*, 1995, 28(6): 1055 - 1065.
- [3] MASAHIRO K, KAZUKO Y, HIDEO T, et al. Structure and expression of two genes that encode distinct drought-inducible cysteineproteases in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene*, 1993, 129(2): 175 - 182.
- [4] TADAMASA U, SHIGEMI S, YUKO O, et al. Circadian and senescence-enhanced expression of a tobacco cysteineprotease gene [J]. *Plant Molecular Biology*, 2000, 44(5): 649 - 657.
- [5] SHI Y. Mechanism of caspase activation and inhibition during apoptosis [J]. *Mol Cell*, 2002, 9(3): 459 - 470.
- [6] HOWARD Y, CHANG H Y, YANG X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of Caspases [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2000, 64(4): 821 - 846.
- [7] NICHOLSON D W. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(11): 1028 - 1042.
- [8] THORNBERRY N A, LAZEBNIK Y. Caspases: enemies within [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1312 - 1316.
- [9] TSCHOPP J, MARTINON F, BURNS K. NALPs: A novel protein family involved in inflammation [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003, 4(2): 95 - 104.
- [10] 马怀宇, 肖静, 杨洪强. 水分胁迫下湖北海棠根系线粒体及细胞死亡特性研究 [J]. *园艺学报*, 2007, 34(3): 549 - 554.
- [11] 谭冬梅. 干旱胁迫诱导新疆野苹果和平邑甜茶细胞程序性死亡的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2005: 28 - 32.
- [12] 李嘉琦, 吴娟. Caspases 与细胞凋亡 [J]. *动物医学进展*, 2003, 24(1): 53 - 55.
- [13] SUN Y L, ZHAO Y, HONG X, et al. Cytochrome c release and caspase activation during menadione-induced apoptosis in plants [J]. *FEBS Lett*, 1999, 462(3): 317 - 321.
- [14] GRUDKOWSKA M, ZAGDANSKA B. Multifunctional role of plant cysteine proteinases [J]. *Acta Biochemica Polonica*, 2004, 51(3): 609 - 624.
- [15] CARNE A, MOORE C H. The amino acid sequence of the tryptic peptide from actinidin, a proteolytic enzyme from the fruit of *Actinidia chinensis* [J]. *Biochemical Journal*, 1978, 173(1): 73 - 83.

- [16] RYAN S N, LAING W A, MCMANUS M T. A cysteine proteinase inhibitor purified from apple fruit [J]. *Phytochemistry*, 1998, 49(4): 957 - 963.
- [17] LEE S, JUNG K H, AN G, et al. Isolation and characterization of a rice cysteine protease gene, OsCPI, using T-DNA gene-trap system [J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54(5): 755 - 765.
- [18] 严秀蕊, 张大生, 梁婉琪, 等. 水稻半胱氨酸蛋白酶 OsCPI2 的特征分析及其原核表达与纯化 [J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2010, 28(2): 140 - 146.
- [19] 张红岩, 薛华, 马欣荣, 等. 甘蓝型油菜半胱氨酸蛋白酶 cDNA 的克隆及组织特异性表达分析 [J]. *应用与环境生物学报*, 2008, 14(2): 172 - 176.
- [20] TRIPATHI S K, SINGH A P, SANE A P, et al. Transcriptional activation of a 37 kDa ethylene responsive cysteine protease gene, RbCPI, is associated with protein degradation during petal abscission in rose [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(7): 2035 - 2044.
- [21] 张国林, 石新国, 蔡宁波, 等. 花生果种皮特异表达基因 AhPSG13 的克隆和表达研究 [J]. *中国油料作物学报*, 2010, 32(1): 35 - 40.
- [22] BEERS E P, JONES A M, DICKERMAN A W. The S8 serine, C1A cysteine and A1 aspartic protease families in *Arabidopsis* [J]. *Phytochemistry*, 2004, 65(1): 43 - 58.
- [23] ROSSANO R, LAROCCA M, RICCIO P. 2-D zymographic analysis of Broccoli (*Brassica oleracea* L, var, Italica) florets proteases; Follow up of cysteine protease isotypes in the course of post-harvest senescence [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2011, 168(13): 1517 - 1523.
- [24] 朱家红. 巴西橡胶树半胱氨酸蛋白酶基因 HbCPI1 的克隆与表达分析 [D]. 儋州: 华南热带农业大学, 2007: 66.
- [25] 曹慧, 程姣姣, 刘春香, 等. 干旱胁迫下八棱海棠 PCD 特征检测及类 Caspase 基因片段的克隆与分析 [J]. *果树学报*, 2012, 29(4): 525 - 529.
- [26] NOODEN L D, GUIAMET J J. Genetic control of senescence and aging in plants [M] // SCHNEIDER E L, ROWE J W. *Handbook of the biology of aging*. 4th ed. Oxford: Academic Press, 1996: 94 - 118.
- [27] 沈成国, 关军锋, 王晓云, 等. 植物衰老生理与分子生物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 355 - 359.
- [28] ADAMS J M, CORRY S. The Bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival [J]. *Science*, 1998, 9(2): 1322 - 1326.
- [29] 王勇, 夏建润, 王宁宁, 等. 与大豆叶片衰老相关的 cDNA 的克隆 [J]. *南开大学学报: 自然科学版*, 1999, 32(3): 182 - 188.
- [30] 沈法富, 喻树迅, 韩秀兰, 等. 棉花半胱氨酸蛋白酶基因的克隆和表达特性分析 [J]. *科学通报*, 2004, 49(22): 2318 - 2323.
- [31] KING K L, GIDLOWSKI J A. Cell cycle regulation and apoptosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60(9): 601 - 617.
- [32] 朱海生, 陈敏敏, 温庆放, 等. 草莓半胱氨酸蛋白酶基因的克隆及表达分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2013, 21(2): 158 - 164.
- [33] CHEN H J, SU C T, LIN C H, et al. Expression of sweet potato cysteine protease SPCP2 altered developmental characteristics and stress responses in transgenic *Arabidopsis* plants [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167(10): 838 - 847.

(上接第 10 页)

- [24] 张饮江, 王聪, 刘晓培, 等. 天然植物辣木籽对水体净化作用的研究 [J]. *合肥工业大学学报*, 2012, 35(2): 262 - 267.
- [25] 帖靖玺, 邵天元, 田欣, 等. 辣木籽粕粗提液对水中浊度及水质的影响 [J]. *河南农业大学学报*, 2014, 48(2): 214 - 218.
- [26] 黎小清, 白旭华, 刘昌芬. 凝胶过滤层析纯化辣木絮凝剂研究 [J]. *热带农业科技*, 2008, 31(2): 35 - 37.
- [27] 张重权, 马李一, 王有琼, 等. 辣木天然净水剂研究进展 [J]. *水处理技术*, 2009, 35(2): 9 - 13.
- [28] 段琼芬, 马李一, 建兴, 等. 辣木油抗紫外线性能研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(9): 118 - 121.
- [29] 彭晓云, 李均洋, 张明. 辣木精油对黑腹果蝇寿命及 SOD 和 MDA 的影响 [J]. *湖北农业科学*, 2009, 48(3): 555 - 557.
- [30] 彭晓云, 张明, 李均洋, 等. 辣木精油对果蝇寿命及抗氧化后效应的影

响 [J]. *中国老年学杂志*, 2010, 30(20): 2966 - 2967.

- [31] 段琼芬, 马李一, 余建兴, 等. 辣木油的抗氧化稳定性研究 [J]. *北京林业大学学报*, 2009, 31(6): 112 - 115.
- [32] 段琼芬, 杨蓬, 李钦, 等. 辣木油对小鼠抗紫外线损伤的保护作用 [J]. *林产化学与工业*, 2009, 29(5): 69 - 73.
- [33] 许庆清, 周作明. 微生物降解苯酚废水的特性研究 [J]. *环境科学与管理*, 2006, 31(4): 136 - 138.
- [34] 伍斌, 郑毅. Cr(VI) 生物吸附剂辣木籽的改性研究 [J]. *环境污染与防治*, 2013, 35(12): 64 - 67.
- [35] 伍斌, 郑毅. 辣木树皮对 Cr(VI) 吸附性能的研究 [J]. *环境科学与技术*, 2013, 36(12): 11 - 14, 60.
- [36] 潘庚华. 辣木籽吸附 Cu(II) 的性能研究 [J]. *广东化工*, 2013, 40(3): 48 - 49.