

文章编号: 1004-0374(2011)05-0429-05

碳酸酐酶III在疾病和肌肉疲劳发生发展中的作用

尚西亮¹, 鲍苑苑², 任惠民³, 陈世益^{1*}

(1 复旦大学附属华山医院运动医学科, 上海 200040; 2 复旦大学附属华山医院内分泌科, 上海 200040; 3 复旦大学神经病学研究所, 上海 200040)

摘要: 碳酸酐酶 (carbonic anhydrases, CAs) 是一种广泛存在的含锌的金属蛋白酶, 能可逆性地高效催化 CO₂ 的水合反应, 参与调节胞内 pH 值、离子运输和生物合成反应等多种生理过程。在哺乳动物体内已发现 13 种 CA 同工酶和 3 种 CA 相关蛋白, 其中 CAIII 与其他 CA 同工酶相比, 在组织分布、分子结构和生物学功能上均有其独特之处。CAIII 表达异常可能与多种临床疾病的发生和发展有关, 还可能参与了肌肉疲劳的发生。

关键词: 碳酸酐酶 III; 生物学功能; 疾病; 肌肉疲劳

中图分类号: Q556; R363.1+4 **文献标志码:** A

Effects of CAIII on the occurrence and development of diseases and muscle fatigue

SHANG Xi-Liang¹, BAO Yuan-Yuan², REN Hui-Min³, CHEN Shi-Yi^{1*}

(1 Department of Sports Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China;

2 Department of Endocrinology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China;

3 Institute of Neurology, Fudan University, Shanghai 200040, China)

Abstract: Carbonic anhydrases (CAs) are zinc metalloenzymes that catalyze the reversible hydration of CO₂ to bicarbonate. They are major players in many physiological processes, including pH regulation and homeostasis, ion transportation, biosynthetic reactions, etc. The CA family consists of 13 different CA isozymes and 3 different CA-related proteins (CARP). Carbonic anhydrase III (CAIII) is one specific member of this family, which distinguished from the other isozymes by tissue distribution, molecular structure and biological functions. In recent years, it has been suggested that the changes of protein levels and activities of CAIII might be related with the occurrence and development of many kinds of diseases and muscle fatigue.

Key words: carbonic anhydrase III; biological functions; diseases; muscle fatigue

碳酸酐酶 (carbonic anhydrases, CAs) 是一种广泛存在于不同细胞内的含锌的金属蛋白酶家族, 它能可逆性地高效催化 CO₂ 的水合反应。至今在哺乳动物体内已发现 13 种 CA 同工酶 (CA I、II、III、IV、VA、VB、VI、VII、IX、XII、XIII、XIV、XV) 和 3 种 CA 相关蛋白 (carbonic anhydrase related protein, CARP), 即 CARPVIII、CARPX、CARPXI。其中, CA I-III、CAVII 和 CAXIII 为胞浆可溶性蛋白, CAIV、CAIX、CAXII、CAXIV 和 CAXV 为胞膜相关蛋白, CAVA 和 CAVB 存在于细胞线粒体中,

CAVI 为一种分泌型蛋白。13 种 CA 同工酶均具有催化 CO₂ 水合生成碳酸氢根 (HCO₃⁻) 的能力。因此, 与许多关键的生理病理过程有关, 如连接代谢组织和肺 CO₂/HCO₃⁻ 的呼吸和转运, 维持胞内 pH 值稳

收稿日期: 2010-11-29; 修回日期: 2011-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771044); 复旦大学青年科学基金项目(09FQ66)

*通信作者: E-mail: cshiyi@163.com; Tel: 021-52888255

定和 CO₂ 平衡, 参与生物合成反应 (如糖异生、脂肪形成和尿素生成等)、骨吸收、钙化和肿瘤形成等^[1]。3 种 CARP(CARPVIII、CARPX、CARPXI) 并不具有 CA 活性, 主要是由于它们与 CA 的功能域有较高的同源性而归入此家族。CAIII 与其他 CA 同工酶相比, 无论是在组织分布、分子结构还是生物学功能上都有其独特之处。本文旨在概述 CAIII 的生物学功能及其与疾病和肌肉疲劳之间的关系等方面的研究进展。

1 CAIII的组织分布及分子结构

CAIII 是一种丰富的胞浆蛋白, 主要存在于骨骼肌、肝脏和脂肪细胞中, 分别约占骨骼肌、肝脏和脂肪细胞胞质可溶性蛋白的 10%、8% 和 24%^[2], 其中骨骼肌 I 型纤维 (慢收缩纤维) 含量较高 (约占细胞湿重的 2%), II 型纤维 (快收缩纤维) 中则含量很少^[3]。此外, CAIII 也存在于输尿管平滑肌细胞、红细胞、唾液腺、前列腺、肺、肾、结肠和睾丸等组织和细胞中, 但表达量非常低。在哺乳动物中, CAIII 基因位于 8q22, 它有 7 个外显子和 6 个内含子。在 CA 家族成员中, 与 CAIII 相对分子质量最接近和氨基酸序列同源性最高的为 CAI 和 CAII。CAI 和 CAII 与 CAIII 分别有 55% 和 56% 的同源性, 并且三者的肽链均由 259 个氨基酸组成, 相对分子质量约为 29 k。在 CA 活性中心存在一个 Zn 原子, 这对于 CA 的催化活性来说是必需的, 其中 CAI 和 CAII 的 Zn 原子以单体形式存在, 而在 CAIII 中则以二硫键相连的二聚体形式存在^[4]。

2 CAIII的生物学功能

这种含锌的金属蛋白酶家族之所以称为 CA, 是因为它能可逆性地催化 CO₂ 的水合反应。CAIII 虽然与 CAII 互为同工酶, 在分子结构上亦有许多相似之处, 但它催化 CO₂ 水合的活性仅为 CAII 的 0.3%^[2]。尽管 CAIII 的水化酶活性非常低, 但由于它在骨骼肌 I 型纤维中的含量非常高, 如在大鼠比目鱼肌中的浓度为 0.5 mmol/L, 这足以保证它的水化酶作用。CAIII 除具有水化酶的作用外, 还具有酯酶和磷酸酶的生物活性^[5]。Cabisco 和 Levine^[6] 研究发现, S-谷胱甘肽化作用能可逆性地调节 CAIII 的磷酸酶活性, 即如果 CAIII 肽链中的 Cys-186 与谷胱甘肽间形成二硫键, 它就具有磷酸酶活性; 但如果肽链中的 Cys-181 与谷胱甘肽间形成二

硫键, 它则会失去磷酸酶活性。尽管如此, Kim 等^[7] 却认为 CAIII 的磷酸酶活性并非它本身所有, 而是分离、纯化获得的 CAIII 中混有一个污染的磷酸酶成分所致。为明确 CAIII 是否具有磷酸酶活性, 黄河和任惠民^[8] 进行了深入研究, 最终通过磷酸酶活性染色、特异抑制剂实验和酶催化反应动力学研究等证实了 CAIII 具有确凿的磷酸酶功能。

3 CAIII与疾病

3.1 CAIII与骨骼肌损伤/心肌损伤

由于 CAIII 在骨骼肌胞浆中含量非常丰富。因此, 当运动或创伤造成骨骼肌损伤时, 它必然会溢出, 从而造成血清 CAIII 水平升高。如 Lippi 等^[9] 在对 10 名健康男性运动员进行了 21 km 的跑步 (亚最大强度有氧运动) 训练后, 检测发现血清 CAIII 水平明显升高, 约为运动前的 2.9 倍。与骨骼肌相比, 心肌 CAIII 含量很低, 因此测定血清 CAIII 和血清肌酸激酶同工酶 (CKMB) 可用于鉴别急性心肌梗死 (AMI) 和骨骼肌损伤。如当 AMI 时, 血清 CAIII 水平正常, CKMB 增高, CKMB/CAIII 比值升高; 而骨骼肌损伤时, 血清 CAIII 和 CKMB 均明显增高, 此时 CKMB/CAIII 比值并不增高^[10]。

3.2 CAIII与肾脏疾病

广泛性近端小管 (proximal tubule, PT) 功能障碍, 又称 Fanconi 综合征 (肾脏多发性近端小管功能障碍综合征)。目前研究 Fanconi 综合征较好的模型为 *Clcn5* 基因敲除 (*Clcn5Y⁻*) 小鼠模型。Gailly 等^[11] 研究发现, CAIII 仅在正常肾脏外皮层 PT 细胞中呈低表达, 但在 *Clcn5Y⁻* 小鼠肾脏中 CAIII 表达阳性 PT 细胞数量增加了大约 4 倍, 并在 *Clcn5Y⁻* 小鼠和 Dent 病 (又称伴肾钙化和肾结石的肾脏 Fanconi 综合征, 是一种染色体病, 由 *CIC-5* 基因突变所致) 患者尿液中均检测到了 CAIII; 进一步研究发现, 正常肾脏 CAIII mRNA 的表达水平约为 CAII 的 1/5, 而在 *Clcn5Y⁻* 小鼠肾脏内 CAIII mRNA 的表达水平则明显升高, 约为正常水平的 5~6 倍, CAII mRNA 的表达水平无明显变化。此外, 作者在体外研究中还发现, 当将 PT 细胞暴露于 H₂O₂ 中时, 细胞 CAIII 表达水平明显增高; 由于 CAIII 具有抗氧化的作用, 可保护细胞免于氧化应激造成的损伤^[3]。因此, 作者推测 CAIII 可能在此过程中发挥了自由基清除剂的作用。鉴于 *Clcn5Y⁻* 小鼠肾脏主要表现为较高的细胞增殖状态和氧化应激状

态^[12], 结合体外实验的结果, 作者认为CAIII可能在CIC-5缺陷小鼠肾脏避免遭受氧化应激损伤中发挥了重要的作用^[11]。

3.3 CAIII与类风湿性关节炎

类风湿性关节炎(RA)被认为是与免疫相关的疾病, 检测血清是否存在自身抗体可用于预测和早期诊断RA的发病情况, 以便尽早应用抗风湿药物进行治疗, 降低关节的损害程度。然而, 到目前为止, 已知的与RA有关的血清自身抗体仅在50%~60%的RA患者的起病阶段呈阳性^[13-14]。近来, Robert-Pachot等^[15]采用免疫印迹法, 用13名早期RA患者和10名正常人血清检测另外2名RA患者切除的滑膜组织中是否存在与血清IgG有应答反应的蛋白质时发现, 6名患者血清可与滑膜中异常表达的CAIII发生免疫反应, 表明部分患者血清中存在抗CAIII的自身抗体, 而正常人血清中则未见有能与CAIII反应的自身抗体存在。作者推测原因可能有两个方面, 一是由于RA患者滑膜组织过度破坏, 导致大量CAIII释放入血, 诱导产生抗CAIII自身抗体; 二是由于滑膜组织中表达的CAIII发生异常氧化修饰, 增加了CAIII的免疫原性, 刺激产生了抗CAIII的自身抗体。然而, 其确切机制目前尚不清楚, 血清CAIII自身抗体检测对于诊断RA的敏感性和特异性也有待于深入评价。

3.4 CAIII与血液系统疾病

在红细胞内, 可分离出3种CAs(CAI、CAII和CAIII), CAIII在红细胞内的浓度低于CAI和CAII, 其功能主要为清除氧自由基, 具有抗氧化的作用^[16]。研究发现, 某些生理、病理因素可影响红细胞CAIII水平, 如在缺铁性贫血时, 其CAIII水平明显低于正常人, 而在地中海性贫血时则比正常人高1.8倍^[16], 以上变化的原因目前尚不清楚。

3.5 CAIII与肿瘤

长期以来, 有关CAs与肿瘤之间关系的报道很少。近来, Dai等^[17]的研究发现, 转CAIII基因SK-Hep1肝癌细胞过表达CAIII可导致细胞的过度增殖和侵袭力增加, 而siRNA沉默CAIII表达则可降低SK-Hep1细胞的侵袭能力; 进一步研究发现, 转CAIII基因SK-Hep1细胞培养基pH值明显低于对照组, 且细胞磷酸化FAK(focal adhesion kinase)及其下游产物磷酸化Src和磷酸化Rac-1蛋白水平明显升高, 而siRNA沉默转基因细胞FAK表达则可降低SK-Hep1细胞的侵袭能力。鉴于FAK蛋白

表达增高或磷酸化都可使肿瘤恶性程度和侵袭力增加, 抑制FAK表达则可促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤转移。因此, 作者认为肝癌细胞侵袭能力的增加可能是由于过表达的CAIII改变了胞内、胞外的pH值, 进而激活了FAK信号通路所致。

3.6 CAIII与糖尿病

Dodgson和Watford^[18]采用链唑霉素诱导大鼠糖尿病模型时发现, 给予成年雄性大鼠链唑霉素6d后, 大鼠肝脏CAIII活性下降了60%, CAV活性增加了2倍, 总体CA活性与对照组相比则无明显变化。此外, 作者还发现CAI、CAII和CAIV总体活性占正常大鼠肝脏CA活性的30%, 在糖尿病大鼠肝脏则达70%, 表明多种CA酶参与了糖尿病的发生。Nishita等^[19]采用链唑霉素诱导成年雄性大鼠糖尿病后发现, 造模84d后大鼠肝脏和血清CAIII蛋白水平与对照组相比分别下降了98%和75%, 而骨骼肌(股直肌、胫前肌、比目鱼肌)CAIII蛋白水平则无明显变化。可见, 糖尿病对肝脏和骨骼肌CAIII表达影响不同; 给予胰岛素后, 肝脏CAIII浓度恢复至正常水平, 而血清CAIII浓度则无明显变化, 是否增加胰岛素浓度或延长胰岛素给药时间有助于血清CAIII浓度恢复有待于继续研究。至于链唑霉素对肝细胞CAIII浓度的影响, 作者认为可能是因为链唑霉素诱导的糖尿病使生长激素分泌失调, 进而影响了肝细胞CAIII生物合成所致, 具体机制目前尚不清楚。

3.7 CAIII与重症肌无力

重症肌无力(MG)是一种由乙酰胆碱受体(AChR)抗体介导的自身免疫性肌肉疾病, 患者临床表现主要为骨骼肌易疲劳和肌肉收缩无力。近年来, 任惠民等^[20-23]研究发现, MG患者骨骼肌CAIII mRNA和蛋白质水平明显低于正常人和其他神经肌肉疾病患者, 而且AChR抗体阴性患者骨骼肌CAIII mRNA和蛋白质水平也明显减少。有关MG患者骨骼肌易疲劳和肌肉收缩无力目前是用AChR抗体与突触后膜AChR结合导致神经冲动传导受阻的理论来解释的, 但MG患者中尚存在许多AChR抗体阴性者, 显然上述理论无法解释为何他们的骨骼肌也表现为易疲劳和肌肉收缩无力。鉴于CAIII在骨骼肌中主要存在于I型纤维, 而I型纤维的作用主要是维持缓慢而持久的收缩, 因此, 作者认为MG患者骨骼肌易疲劳和肌肉收缩无力很可能与其骨骼肌CAIII蛋白缺乏有关^[21]。然而有关MG

患者骨骼肌 CAIII 蛋白与基因表达降低的原因及其在 MG 中究竟扮演何角色目前尚不清楚。

3.8 CAIII与肌肉疲劳

运动性肌肉疲劳特指运动引起肌肉产生最大随意收缩力量或输出功率暂时性下降的生理现象,其发生机制极其复杂,涉及中枢运动驱动、神经肌肉接头兴奋—收缩耦联和肌肉能量代谢等多种生理过程。近年来研究发现,骨骼肌 CAIII 表达水平和/或活性的改变可能与骨骼肌疲劳的发生有关^[24-25]。如 Côté 等^[24]研究发现,抑制骨骼肌 I 型纤维 CAIII 的活性可导致骨骼肌易疲劳;进一步研究发现,CAIII 的活性状态与骨骼肌 I 型纤维能量代谢密切相关。我们研究发现,急性高强度跑台运动及低频电刺激诱发大鼠骨骼肌疲劳后均可引起相应肌肉 CAIII 表达的下调^[25]。此外,从肌肉疲劳的发生机理和 CAIII 的生理功能进行分析,两者之间亦存在密切的关系。(1) 剧烈运动时肌细胞内代谢产物大量堆积造成胞内 pH 值的改变,是肌肉产生疲劳的重要原因之一^[26]。CAIII 具有调节细胞内 pH 和维持组织酸碱平衡的作用,可将肌肉代谢过程中产生的 CO₂ 及时运送出细胞^[27]。(2) 肌肉运动引起自由基和其他形式活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的增加,是导致肌肉疲劳/损伤的另一重要原因^[28]。有趣的是,CAIII 具有抗氧化的作用,可保护细胞免于氧化应激造成的损伤^[3]。(3) 骨骼肌肉内 ATP 水平的下降是肌肉疲劳的又一原因^[29]。而 CAIII 又与线粒体 ATP 合成有关,如当骨骼肌缺乏 CAIII 时,线粒体 ATP 合成明显减少^[30]。

4 结语

无论是从组织分布、分子结构还是生物学功能上来说,CAIII 均是 CA 家族中比较独特的一员,它在清除胞内 CO₂、调节胞内 pH 值、维持组织酸碱平衡、抗氧化、能量代谢和信号转导等方面均发挥重要的作用,CAIII 表达异常还可能与多种临床疾病的发生和发展有关。然而, Kim 等^[1]研究发现,CAIII 基因敲除的小鼠依旧能正常地生长和生育,生命周期也未受明显影响,这使 CAIII 究竟有何生理功能变得扑朔迷离。此外,在骨骼肌细胞、肝细胞和脂肪细胞中含量丰富的 CAIII 到底发挥什么样的作用;为何 MG 患者骨骼肌 CAIII 会明显减少;CAIII 在肌肉疲劳的发生发展过程中究竟起什么样的作用。所有这些令人感兴趣的问题均有待于我们

进一步地研究与探讨。

[参 考 文 献]

- [1] Kim G, Lee TH, Wetzel P, et al. Carbonic anhydrase III is not required in the mouse for normal growth, development, and life span. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(22): 9942-7
- [2] Vullo D, Nishimori I, Scozzafava A, et al. Carbonic anhydrase activators: activation of the human cytosolic isozyme III and membrane-associated isoform IV with amino acids and amines. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(15): 4303-7
- [3] Zimmerman UJ, Wang P, Zhang X, et al. Anti-oxidative response of carbonic anhydrase III in skeletal muscle. *IUBMB Life*, 2004, 56(6): 343-7
- [4] Mafra D, Cozzolino SM. Erythrocyte zinc and carbonic anhydrase levels in nondialyzed chronic kidney disease patients. *Clin Biochem*, 2004, 37(1): 67-71
- [5] Innocenti A, Scozzafava A, Parkkila S, et al. Investigations of the esterase, phosphatase, and sulfatase activities of the cytosolic mammalian carbonic anhydrase isoforms I, II, and XIII with 4-nitrophenyl esters as substrates. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(7): 2267-71
- [6] Cabiscol E, Levine RL. The phosphatase activity of carbonic anhydrase III is reversibly regulated by glutathiolation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(9): 4170-4
- [7] Kim G, Selengut J, Levine RL. Carbonic anhydrase III: the phosphatase activity is extrinsic. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 377(2): 334-40
- [8] 黄河, 任惠民. 骨骼肌碳酸酐酶 III 具有磷酸酶活性. *中国临床神经科学*, 2008, 16(2): 113-9
- [9] Lippi G, Schena F, Montagnana M, et al. Influence of acute physical exercise on emerging muscular biomarkers. *Clin Chem Lab Med*, 2008, 46(9): 1313-8
- [10] Vuori J, Syrjala H, Vaananen HK. Myoglobin/carbonic anhydrase III ratio: highly specific and sensitive early indicator for myocardial damage in acute myocardial infarction. *Clin Chem*, 1996, 42(1): 107-9
- [11] Gailly P, Jouret F, Martin D, et al. A novel renal carbonic anhydrase type III plays a role in proximal tubule dysfunction. *Kidney Int*, 2008, 74(1): 52-61
- [12] Wilmer MJ, de Graaf-Hess A, Blom HJ, et al. Elevated oxidized glutathione in cystinotic proximal tubular epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(2): 610-4
- [13] Nielen MM, van Schaardenburg D, Reesink HW, et al. Specific autoantibodies precede the symptoms of rheumatoid arthritis: a study of serial measurements in blood donors. *Arthritis Rheum*, 2004, 50(2): 380-6
- [14] Raza K, Breese M, Nightingale P, et al. Predictive value of antibodies to cyclic citrullinated peptide in patients with very early inflammatory arthritis. *J Rheumatol*, 2005, 32(2): 231-8
- [15] Robert-Pachot M, Desbos A, Moreira A, et al. A new

- target for autoantibodies in patients with rheumatoid arthritis. *Ann N Y Acad Sci*, 2007, 1108: 382-91
- [16] Kuo WH, Yang SF, Hsieh YS, et al. Differential expression of carbonic anhydrase isoenzymes in various types of anemia. *Clin Chim Acta*, 2005, 351(1-2): 79-86
- [17] Dai HY, Hong CC, Liang SC, et al. Carbonic anhydrase III promotes transformation and invasion capability in hepatoma cells through FAK signaling pathway. *Mol Carcinog*, 2008, 47(12): 956-63
- [18] Dodgson SJ, Watford M. Differential regulation of hepatic carbonic anhydrase isozymes in the streptozotocin-diabetic rat. *Arch Biochem Biophys*, 1990, 277(2): 410-4
- [19] Nishita T, Igarashi S, Asari M. Determination of carbonic anhydrase-III by enzyme-immunoassay in liver, muscle and serum of male rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol*, 1995, 27(4): 359-64
- [20] 任惠民, 周志刚, 陈向军, 等. 重症肌无力患者骨骼肌肌肉蛋白成分分析. *中华神经科杂志*, 2000, 33(4): 227-30
- [21] 任惠民, 涂江龙, 都爱莲, 等. 重症肌无力患者骨骼肌减少的25000蛋白即为碳酸酐酶 III的论证. *中华神经科杂志*, 2005, 38(12): 764-8
- [22] 涂江龙, 任惠民, 吕传真, 等. 重症肌无力患者骨骼肌中碳酸酐酶III蛋白减少的原因. *中华神经科杂志*, 2007, 40(8): 207-11
- [23] Du AL, Ren HM, Lu CZ, et al. Carbonic anhydrase III is insufficient in muscles of myasthenia gravis patients. *Autoimmunity*, 2009, 42(3): 209-15
- [24] Côté C, Riverin H, Barras MJ, et al. Effect of carbonic anhydrase III inhibition on substrate utilization and fatigue in rat soleus. *Can J Physiol Pharmacol*, 1993, 71(3-4): 277-83
- [25] 尚西亮, 陈世益, 任惠民, 等. 大强度跑台运动及低频电刺激对大鼠骨骼肌及血清CAIII表达的影响. *中国运动医学杂志*, 2009, 28(2): 159-63
- [26] Lindinger MI, Kowalchuk JM, Heigenhauser GJ. Applying physicochemical principles to skeletal muscle acid-base status. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2005, 289(3): R891-4
- [27] Henry RP. Multiple roles of carbonic anhydrase in cellular transport and metabolism. *Annu Rev Physiol*, 1996, 58: 523-38
- [28] Reid MB. Free radicals and muscle fatigue: of ROS, canaries, and the IOC. *Free Radic Biol Med*, 2008, 44(2): 169-79
- [29] De Haan A, Koudijs JC. A linear relationship between ATP degradation and fatigue during high-intensity dynamic exercise in rat skeletal muscle. *Exp Physiol*, 1994, 79(5): 865-8
- [30] Liu M, Walter GA, Pathare NC, et al. A quantitative study of bioenergetics in skeletal muscle lacking carbonic anhydrase III using ^{31}P magnetic resonance spectroscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(1): 371-6