

细胞凋亡酶在肉品成熟过程中对其嫩度影响的研究进展

苟惠天¹, 师希雄^{2*}

1(甘肃农业大学 动物医学院, 甘肃 兰州, 730070) 2(甘肃农业大学 食品科学与工程学院, 甘肃 兰州, 730070)

摘 要 综述了近年来有关细胞凋亡酶在肉成熟过程中的研究新进展, 包括: 细胞凋亡酶的种类、激活途径, 对蛋白水解作用的调控机制, 细胞凋亡酶参与蛋白水解的不同途径, 细胞凋亡酶与钙蛋白酶之间的相互作用。从多方面论证肉品成熟过程中细胞死亡的主要方式为细胞凋亡; 同时, 就细胞凋亡酶在肉品成熟中的作用机制提出一些新思路。

关键词 细胞凋亡酶; 肉品成熟; 细胞凋亡

肉品的宰后成熟过程是一个复杂过程, 在这一过程中, 内源蛋白酶对肌原纤维蛋白的水解被认为是影响成熟过程的主要因素。肉品经过成熟其嫩度、保水性、风味都得到改善, 经济价值大大提升。目前, 对于肉品嫩化研究最多的酶主要分为 4 类: 钙激活酶、组织蛋白酶、蛋白酶体和细胞凋亡酶^[1]。本文就近年来, 细胞凋亡酶及细胞凋亡途径对于肌肉结构、生化特性及对肉品成熟过程影响的研究进行简要综述。

1 细胞凋亡酶

SENTANDREU 等首次将细胞凋亡及细胞凋亡酶的概念引入到胴体成熟及肉品嫩化的研究中。他们认为屠宰后骨骼肌中的细胞死亡主要是以细胞凋亡而非细胞坏死的形式出现。具体表现为: 相邻细胞的分离, 细胞收缩, 线粒体去极化, 染色体凝结, DNA 断裂, 细胞膜空泡化, 最终形成凋亡小体^[2]。细胞凋亡的主要特征是, 在凋亡的整个过程中, 细胞膜维持良好的完整性, 阻止细胞成分的释放从而破坏相邻的细胞。该过程由半胱氨酸、天冬氨酸特异性蛋白酶及部分细胞凋亡酶介导^[3]。

现已发现细胞凋亡酶蛋白家族有 14 个成员, 其中大部分已在体外成功表达。该家族中一些成员具有较高的种属特异性, 例如细胞凋亡酶 13 只在牛体内表达, 而细胞凋亡酶 11 也只在鼠类中被发现^[4]。

对于细胞凋亡酶的遗传进化分析发现, 该家族所有成员可被分成两大类, 细胞凋亡酶 1, 4, 5, 11, 13 与炎症反应有关, 而细胞凋亡酶 3, 6, 7, 8, 9, 10, 12 主要参与细胞凋亡过程。后者又可根据在细胞死亡途径中发挥作用的位置分为: 细胞凋亡起始酶(8, 9, 10, 12)和细胞凋亡效应酶(3, 6, 7)。所有细胞凋亡酶在细胞浆中都是以无活性的酶原形式被合成, 其中细胞凋亡起始酶无活性时以单体形式存在, 而细胞凋亡效应酶则是以二聚体形式存在^[5]。

细胞凋亡酶对于细胞凋亡的激活通过两步完成: 首先细胞凋亡刺激信号激活起始酶, 这些酶一旦活化后, 便可通过限制性水解切割方式激活细胞凋亡效应酶。在细胞凋亡酶介导细胞凋亡的过程中, 存在三条活化途径。第一条被称为内部途径, 主要由细胞凋亡酶 9 介导, 由于外部环境的变化(局部缺氧和缺血), 使细胞内发生变化, 从而启动该途径。外部压力引发细胞生理学变化, 包括线粒体外膜通透性改变, 线粒体内部跨膜势能的降低, 细胞色素 c 的释放, 形成细胞凋亡体等, 这一系列变化对于细胞凋亡酶 9 的活化至关重要^[6]。第二条被称为外部途径, 通过细胞凋亡酶 8 和 10 的活化来完成, 最终组装成一个细胞膜受体-配体-细胞凋亡酶的复合物。该复合物和之前在内部途径中形成的细胞凋亡体一起向蛋白水解传递分子信号^[5]。第三条途径是通过细胞凋亡酶 12 直接作用于内质网(ER), 启动细胞凋亡级联反应的形式来参与细胞死亡过程^[7]。细胞凋亡酶 12 是一个独特的细胞凋亡起始酶, 该酶的活化并不需要像细胞凋亡酶 8, 9, 10 一样要形成一个复合物; 由于该酶与细胞凋亡酶 1, 4, 5, 11 具有较高的同源性, 最初被认为与炎症反应有关(图 1)。

第一作者: 博士, 讲师(师希雄博士为通讯作者, E-mail: sxix77@163.com)。

基金项目: 甘肃省自然科学基金(1308RJZA268, 145RJZA172); 国家自然科学基金(31460433, 31560700); 兰州市人才创新创业专项(2014-2-11)

收稿日期: 2015-08-19, 改回日期: 2015-12-17

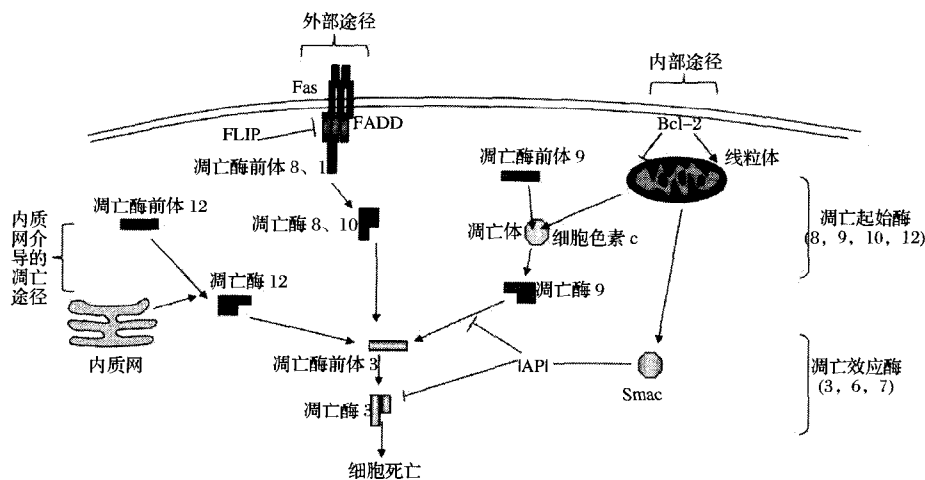


图1 细胞凋亡的内部途径、外部途径及内质网途径的模式图

Fig.1 Mode pattern of the intrinsic, extrinsic and ER-mediated apoptosis pathways

细胞凋亡起始酶通过将细胞凋亡效应酶切割为大、小两个亚基而将其进行激活。细胞凋亡酶3和7是迄今研究最多的两个细胞凋亡酶,它们在同源性、底物、抑制剂方面具有很高的相似性,利用常规方法很难将其进行区分。然而,它们具有不同的前体结构域,认为可能与各自不同的亚细胞靶位点有关。细胞凋亡酶6由于具有短的前体结构域,也被归为效应酶,其靶位点与细胞凋亡酶3和7的完全不同,说明它们的功能并不重叠^[6]。细胞凋亡酶具有很高的特异性,在它们底物切割位点的C端要求有一个天冬氨酸残基存在。截至目前,至少有1 000个分子底物被鉴定为细胞凋亡效应酶的靶位点,包括肌原纤维肌动蛋白,肌球蛋白,肌间线蛋白, α -辅肌动蛋白,肌钙蛋白等^[3]。

细胞凋亡酶一旦激活便将带来严重的影响。因此,机体对于细胞凋亡及相关成员的活性具有严格、复杂的调控机制。Bcl家族成员可被分为抗细胞凋亡和促细胞凋亡两类。促细胞凋亡成员与内部途径和外部途径的成员(例如细胞凋亡酶、细胞色素c等)紧密连接,彼此相互作用,放大细胞死亡信号,促进细胞凋亡的发生。Bcl家族的抗细胞凋亡成员能够通过将与细胞死亡相关的成员进行隔离来促进细胞的存活^[4]。例如:FLIPs(Fas相关死亡结构域样白介素-1 β -转化酶抑制蛋白)可以特异性地与外部途径结合,阻止细胞凋亡酶8和10与细胞膜结合,发挥竞争性抑制剂的作用。另外,IAPs(细胞凋亡抑制剂)作为细胞凋亡关键控制点之一,可以直接与特异性细胞凋亡酶结合。有研究显示,细胞凋亡抑制剂蛋白表

达水平在不同猪的骨骼肌中差异很大。有关细胞凋亡酶在骨骼肌中的调控作用,以及细胞凋亡途径和细胞凋亡酶之间的详细内在关系还有待深入研究。

2 肉品成熟过程中的细胞凋亡

热休克蛋白(Hsp)是一类保护性蛋白家族,在细胞凋亡过程中具有阻止蛋白降解、结构破坏的功能^[8]。Hsp 27和Hsp 70现已证实,可以直接抑制细胞凋亡的内部和外部途径^[9]。DNAJA1编码热休克蛋白40,是Hsp 70的分子伴侣,这种复合物可以通过阻止促凋亡蛋白Bax向线粒体膜的移位来抑制凋亡的发生。以牛胸最长肌肉为例,经检测来自夏洛来牛的样品中,基因DNAJA1较低,说明DNAJA1的表达与肉品的嫩度呈负相关;通过二维电泳及质谱分析,发现在挪威红牛宰后48h胴体的胸最长肌中,Hsp70的表达水平降低。另外,Hsp 27的表达量变化也是如此^[10]。该研究人员还发现,当肌肉用电流刺激后,Hsp 70的表达呈现较低丰度,说明电流刺激可通过降低Hsp70的表达,提高肉品的嫩度^[11]。BERNARD等也证实在质地柔软的肌肉中,Hsp 27的表达丰度较低。Hsp27能够调控和稳定肌纤维蛋白的表达,同时可以保护肌动蛋白微丝。因此,Hsp27的表达减少,说明肌动蛋白分解在增加,成为细胞凋亡关键起始因子,同时分解产物也成为细胞凋亡酶的底物^[12]。综上,抗细胞凋亡成分:DNAJA1,Hsp70,Hsp27的表达量下降,在宰后胴体中有利于细胞死亡和细胞凋亡酶的活性增加,最终提高肉品的嫩度。

有研究将质地不同的两份胸最长肌肉样品通过

二维电泳进行比较时发现,柔软的肌肉样品中蛋白水解产物的含量显著增加。进一步分析发现该水解产物中,有6种成分来自于线粒体内、外膜。同时在宰后早期就可以检测到以上成分,并非是由肉品成熟后所产生。这说明在质地柔软的肌肉中线粒体膜的降解增加,而且该反应发生在内部凋亡途径的早期阶段,包括对细胞凋亡酶的活化^[13]。对于储藏阶段胴体的背最长肌、腰大肌、半腱肌的分析发现,这些肌肉中细胞的形态变化和生化反应都与细胞凋亡紧密相关。例如:核染色体的凝结发生在屠宰后30 min,核染色体转移在屠宰后1 d,4 d后观察到凋亡小体的形成,DNA片段降解的高峰发生在宰后7天。该研究将为胴体中细胞死亡是通过细胞凋亡并非细胞坏死理论提供直接证据^[14]。同时也说明,在动物屠宰后很短时间内细胞凋亡就开始发生,而且细胞凋亡所引起的肉品品质的一些列变化短期内即可完成。

3 细胞凋亡酶介导肌原纤维水解

KEMP等首次在胴体的骨骼肌中检测到细胞凋亡酶水解系统,证实在不同猪的肌肉中都存在该酶的表达及活性^[15]。同时观察到在肌肉样品中细胞凋亡酶9的高水平表达,但细胞凋亡酶8和12表达水平很低甚至不表达。该结果也被PULFORD等的研究所证实^[16],他们发现在牛肌肉样品中细胞凋亡酶9的活性显著高于细胞凋亡酶8,而且在整个宰后胴体中细胞凋亡酶9的活性与细胞凋亡酶3、7的活性呈正相关。以上说明,在胴体骨骼肌中细胞凋亡的主要途径为内部途径,包括细胞凋亡酶9。因此,该结论也支持OUALI等提出的假设^[17],死亡和放血导致肌肉细胞的低氧和局部缺血,最终激活细胞凋亡内部途径。

细胞凋亡酶活性在宰后胴体中呈现出随时间逐渐降低的趋势。在猪背最长肌中,细胞凋亡酶3、7、9的活性变化与肌肉剪切力呈负相关。活化的酶越多,酶活性越大,肌肉的剪切力就越低,肉品的嫩度就越高。同样观察到剪切力与细胞凋亡酶产生的 α -II型血影蛋白降解产物(SBDP120)呈负相关。当用水解作用诱导剂处理鸡的胸肌肉样品后,就可检测到SBDP120蛋白。由细胞凋亡酶介导的特异性切割机制,可将大小214 kDa的完整 α -II型血影蛋白形成150和120 kDa的降解产物。这些降解产物也随即成为检测细胞凋亡酶介导细胞凋亡的理想标记物。在凋亡过程中, α -II型血影蛋白的降解在很大程度上影响

细胞膜的通透性和细胞骨架的完整性,而这些变化都与肉品的嫩度有关^[15]。

细胞凋亡酶与肉品质量的关系在双肌臀羊上也有发现,双肌臀羊的特征是肌肉在盆骨和腰部区域分布较多,在胸部分布较少。由于肉品中钙蛋白酶抑制剂的含量较高,导致肉品嫩度较低。KEMP等发现与一般羊的肌肉比较,双肌臀羊肌肉中细胞凋亡酶3、7、9的活性较低。以上研究说明细胞凋亡酶可以通过活化目的蛋白,或者切割特异性底物的方式来参与凋亡,同时再次证明细胞凋亡是胴体中细胞死亡的主要形式^[18]。

近年来,在蛋白水解和肉品嫩化研究中,都是通过体外模拟体内的一些列变化来评价某种蛋白酶^[19]。将猪背最长肌肌原纤维与体外重组的细胞凋亡酶3蛋白共同孵育,就可观察到重组细胞凋亡酶3可以降解肌原纤维蛋白。质谱分析发现降解产物包括肌间线蛋白、肌钙蛋白I等;而将肌原纤维蛋白与细胞凋亡酶抑制剂DEVD-CHO共同孵育时,并未观察到上述降解反应。对于细胞凋亡酶介导肌原纤维蛋白降解的相关研究,在细胞凋亡酶6上也有发现,与细胞凋亡酶3不同的是,其降解产物主要为中等长度的肌间线蛋白^[20]。

4 细胞凋亡酶和钙蛋白酶系统的相互作用

已知钙蛋白酶水解系统是蛋白水解及肉品嫩化的主要因素, μ -依钙蛋白酶被认为是该系统中主要的蛋白酶^[21]。然而,当将 μ -依钙蛋白酶基因沉默后,肌肉的水解作用并未受影响,这说明肌肉蛋白水解过程有多种酶参与,形成多条路径。也说明细胞凋亡酶和钙蛋白酶系统之间存在相互作用、相互影响的机制。对于其机制的研究主要集中在这两种酶家族的底物,包括:肌动蛋白、辅肌动蛋白、肌球蛋白、血影蛋白、波形蛋白、肌钙蛋白I等。当内质网 Ca^{2+} 平衡被打破后,细胞凋亡酶12就可被钙蛋白酶激活。微量的钙蛋白酶也可以将促细胞凋亡蛋白Bcl-X_L激活,后者主要与线粒体膜结合,形成促细胞凋亡蛋白,最终诱导细胞凋亡内部途径的启动。钙蛋白酶也能以负调控方式对细胞凋亡进行作用,例如钙蛋白酶可以切割细胞凋亡酶3、7、8、9,使之成为无活性的亚型结构^[22]。因此,细胞凋亡酶和钙蛋白酶之间的相互作用,可发生在多个步骤中。

钙蛋白酶抑制蛋白是细胞凋亡酶的底物,可以被细胞凋亡酶3、7切割产生不同的水解片段^[23]。细胞

凋亡酶介导的蛋白降解,通过破坏细胞膜和细胞骨架的完整性,导致钙离子浓度和钙蛋白酶活性的增加。因此,细胞凋亡酶通过对钙蛋白酶的作用,间接调节蛋白的水解及肌肉的嫩化。相反,钙蛋白酶的抑制作用是通过上调钙蛋白酶抑制蛋白,或者作用于钙螯合剂 EDTA,最终上调细胞凋亡酶活性,加速细胞凋亡的发生。用纯化的猪胸最长肌的肌原纤维蛋白分别与重组细胞凋亡酶 3,钙蛋白酶抑制蛋白,EDTA 进行孵育,3 组都可观察到肌原纤维蛋白分解产物:肌球蛋白、肌动蛋白、肌钙蛋白 T 的增加。对于该现象的准确机制还不太清楚,推测可能是细胞凋亡酶发挥的补偿作用^[24]。

最近,在 μ -钙蛋白酶基因敲除小鼠上也观察到两种酶的相互作用。该研究通过转基因方法敲除小鼠 μ -钙蛋白酶基因,来阐明 μ -钙蛋白酶对于骨骼肌生长的影响。结果显示,相对于野生型小鼠,敲除小鼠中细胞凋亡酶 3、7 的含量显著增高,该现象在幼龄小鼠中表现的尤为明显。说明细胞凋亡酶的上调,补偿 μ -钙蛋白酶的缺失,确保骨骼肌的正常生长。进一步强调细胞凋亡酶和钙蛋白酶系统相互作用的复杂性^[25]。

5 展望

肉品的成熟、嫩化是一个复杂的过程,在该过程中,蛋白酶扮演着重要角色。虽然大量实验已证实,肌原纤维蛋白水解过程中的细胞死亡主要是以细胞凋亡,并非细胞坏死的形式完成。但诸如细胞凋亡酶水解系统的精确作用机制,其与钙蛋白酶系统的互作机制等问题仍需要进一步研究,唯有如此,才能彻底揭开肉品成熟的复杂机制,为生产实践服务。

参 考 文 献

- [1] LIAN T, WANG L, LIU YA. New Insight into the role of calpains in post-mortem meat tenderization in domestic animals; A review[J]. Asian-Australas J Anim Sci, 2013, 26(3):443-454.
- [2] SENTANDREU MA, COULIS G, OUALI A. Role of muscle endopeptidases and their inhibitors in meat tenderness[J]. Trends in Food Science & Technology, 2002, 13(6):400-421.
- [3] SEKINE S, ICHIJO H. Mitochondrial proteolysis: its emerging roles in stress responses[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(2):274-280.
- [4] CHIARINI A, LIU D, ARMATO U, et al. Bcl10 crucially nucleates the pro-apoptotic complexes comprising PDK1, PKC ζ and caspase-3 at the nuclear envelope of etoposide-treated human cervical carcinoma C4-I cells[J]. International Journal of Molecular Medicine, 2015, 36(3):845-856.
- [5] HUANG F, HUANG M, ZHANG H, et al. Changes in apoptotic factors and caspase activation pathways during the postmortem aging of beef muscle[J]. Food Chem, 2016, 190(1):110-114.
- [6] BOATRIGT K M, SALVESENG S. Mechanisms of caspase activation[J]. Current Opinion in Cell Biology, 2003, 15(6):725-731.
- [7] NAKAGAWA T, YUAN J. Cross-talk between two cysteine protease families, Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis[J]. The Journal of Cell Biology, 2000, 150(4):887-894.
- [8] KENNEDY D, JÄGER R, MOSSER DD, et al. Regulation of apoptosis by heat shock proteins[J]. IUBMB Life, 2014, 66(5):327-38.
- [9] PURANDHAR K, JENA PK, PRAJAPATI B, et al. Understanding the role of heat shock protein isoforms in male fertility, aging and apoptosis[J]. World Journal of Mens Health, 2014, 32(3):123-32.
- [10] BJARNADOTTIR S G, HOLLUNG K, FAERGESTAD E M, et al. Proteome changes in bovine longissimus thoracis muscle during the first 48h post mortem: Shifts in energy status and myofibrillar stability[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(12):7408-7414.
- [11] BJARNADÓTTIR S G, HOLLUNG K, HØY M, et al. Proteome changes in the insoluble protein fraction of bovine Longissimus dorsi muscle as a result of low-voltage electrical stimulation[J]. Meat Science, 2011, 89(2):143-149.
- [12] BERNARD C, CASSAR-MALEK I, LECUNFF M, et al. New Indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(13):5229-5237.
- [13] SACCÀ E1, CORAZZIN M1, PIZZUTTI N, et al. Early post mortem expression of genes related to tenderization in two Italian Simmental young bulls' skeletal muscles differing in contractile type[J]. Anim Sci J, 2015 [Epub ahead of print].
- [14] CAO J, SUN G, ZHOU G, et al. Morphological and Biochemical assessment of apoptosis indifferent skeletal muscles of bulls during conditioning[J]. Journal of Animal Science, 2010, 88(10):3439-3444.
- [15] KEMP C M, PARR T, BARDSLEY R G, et al. Compari-

- son of the relative expression of caspase isoforms in different porcine skeletal muscles[J]. *Meat Science*, 2006, 73(3):426–431.
- [16] PULFORD D J, DOBBIE P, VAZQUEZFRAGA S, et al. Variation in bull beef quality due to ultimate muscle pH is correlated to endopeptidase and small heat shock protein levels[J]. *Meat Science*, 2009, 83(1):1–9.
- [17] OUALI A, HERRERA-MENDEZ H C, COULIS G, et al. Revisiting the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms[J]. *Meat Science*, 2006, 74(1):44–58.
- [18] KEMP C M, KING D A, SHACKELFORD S D, et al. The caspase proteolytic system in callipyge and normal lambs in longissimus dorsi, semimembranosus and infraspinatus muscles during post mortem storage[J]. *Journal of Animal Science*, 2009, 87(9):2 943–2 951.
- [19] CHEN L, FENG X C, ZHANG Y Y, et al. Effects of ultrasonic processing on caspase-3, calpain expression and myofibrillar structure of chicken during post-mortem ageing[J]. *Food and Chemistry*, 2015, 177(11):280–287.
- [20] HUANG M, HUANG F, MA H, et al. Preliminary study on the effect of caspase-6, and calpain inhibitors on post-mortem proteolysis of myofibrillar proteins in chicken breast muscle[J]. *Meat Science*, 2012, 90(3):536–542.
- [21] GEESINK G H, KUCHAY S, CHISHTI A H, et al. Micro-calpain is essential for post mortem proteolysis of muscle proteins[J]. *Journal of Animal Science*, 2006, 84(10):2 834–2 840.
- [22] SMUDER A J, KAVAZIS A N, HUDSON M B, et al. Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, 49(7):1 152–1 160.
- [23] WANG K K, POSMANTUR R, NADIMPALLI R, et al. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1998, 356(2):187–196.
- [24] KEMP CM, WHEELER T L. Effects of manipulation of the caspase system on myofibrillar protein degradation *in vitro*[J]. *Journal of Animal Science*, 2011, 89(10):3 262–3 271.
- [25] GOLL DE, NETI G, MARES, et al. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains[J]. *Journal of Animal Science*, 2008, 86(14 Suppl):E19–E35.

Research advances in effect of caspase on meat tenderness during meat aging

GOU Hui-tian¹, SHI Xi-xiong^{2*}

1 (College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

2 (College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT Study progress on caspase during meat aging in recent years was reviewed in this article, including kinds of caspase, activation pathway, the regulation mechanisms of proteolysis, different apoptosis pathway during protein hydrolysis and the interaction between caspase and calpain. It was also demonstrated from multiaspect that apoptosis was a main mode for cell death during meat aging process. At the same time, some new ideas about the action mechanism of caspase in meat aging was proposed.

Key words caspase; meat aging; apoptosis