

- gene variant and LDL, HDL, VLDL cholesterol and triglyceride levels with ischemic stroke and its subtypes. *J Neurol Sci*, 2012, 318(1-2): 51-54.
- [10] Xu E, Li W, Zhan L, et al. Polymorphisms of the lipoprotein lipase gene are associated with atherosclerotic cerebral infarction in the Chinese. *Neuroscience*, 2008, 55(2): 403-408.
- [11] Amer AK, Moustapha MSZ, EL-Sobky MS, et al. Hind III polymorphism of lipoprotein lipase gene and its contribution to coronary artery disease in Egyptian. *Aust J Basic Appl Sci*, 2010, 4(12): 6641-6646.
- [12] Aratjo LM, Cendoroglo MS, Giguek CO, et al. Association of lipase lipoprotein polymorphisms with high-density lipoprotein and triglycerides in elderly men. *Genet Mol Res*, 2010, 9(1): 86-96.
- [13] Xian X, Liu T, Yu J, et al. Presynaptic defects underlying impaired learning and memory function in lipoprotein lipase-deficient mice. *J Neurosci*, 2009, 29(14): 4681-4685.
- [14] Wang H, Astarita G, Taussig MD, et al. Deficiency of lipoprotein lipase in neurons modifies the regulation of energy balance and leads to obesity. *Cell Metab*, 2011, 13(1): 105-113.
- [15] Wang X, Sun W, Xu E. The expression and activity of brain lipoprotein lipase is increased after acute cerebral ischemia-reperfusion in rats. *Neuropathology*, 2010, 30(2): 131-139.
- [16] 邓锦凤, 胡中扬, 侯德仁. 微小 RNA 与缺血性脑血管病. *国际神经病学神经外科杂志*, 2011, 38(3): 287-290.
- [17] Chen T, Li Z, Tu J, et al. MicroRNA-29a regulates pro-inflammatory cytokine secretion and scavenger receptor expression by targeting LPL in oxLDL stimulated dendritic cells. *FEBS Lett*, 2011, 585(4): 657-663.
- [18] Holmstrom K, Pedersen AW, Claesson MH, et al. Identification of a microRNA signature in dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Hum Immunol*, 2010, 71(1): 67-73.
- [19] Davies BS, Beigneux AP, Fong LG, et al. New wrinkles in lipoprotein lipase biology. *Curr Opin Lipidol*, 2012, 23(1): 35-42.
- [20] Liu J, Afroza H, Rader DJ, et al. Angiopoietin-like protein 3 inhibits lipoprotein lipase activity through enhancing its cleavage by proprotein convertases. *J Biol Chem*, 2010, 285(36): 27561-27570.
- [21] Pollin TI, Damcott CM, Shen H, et al. A null mutation in human APOC3 confers a favorable plasma lipid profile and apparent cardioprotection. *Science*, 2008, 322(5908): 1702-1705.
- [22] Lee JH, Giannikopoulos P, Duncan SA, et al. The transcription factor cyclic AMP-responsive element-binding protein H regulates triglyceride metabolism. *Nat Med*, 2011, 17(7): 812-815.
- [23] Perdomo G, Kim DH, Zhang T, et al. A role of apolipoprotein D in triglyceride metabolism. *J Lipid Res*, 2010, 51(6): 1298-1311.

组织蛋白酶 D 与自噬及脑出血的关系

廖远生 综述 吴成翰, 杨瑞玲 审校

福建中医药大学附属第二人民医院神经内科, 福建省福州市 350003

摘要: 组织蛋白酶 D (Cathepsin D) 是一种细胞溶酶体内的天冬氨酸蛋白酶, 作用广泛, 参与机体多种生理、病理过程。近年来研究发现, 自噬参与了脑出血后的病理学过程, 并且影响神经细胞的生存和死亡。Cathepsin D 是介导自噬过程的重要蛋白, Cathepsin D 可能在脑出血发病机制中起着重要作用。

关键词: 组织蛋白酶 D; 自噬; 脑出血

自 Westley 和 Rochefort 在 1979 年首次报道组织蛋白酶 D (Cathepsin D) 以来, 许多学者对此产生了很大的兴趣, 并进行了大量的基础和临床研究, 特别是在肿瘤方面。然而, 针对 Cathepsin D 在脑出

收稿日期: 2012-08-13; 修回日期: 2012-11-15

作者简介: 廖远生 (1986-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事脑血管疾病的基础与临床研究。

通讯作者: 吴成翰 (1957-), 男, 教授, 主任医师, 主要从事神经系统变性疾病及脑血管病的基础与临床研究。

血方面的研究与报道还是比较少的。近年来研究发现,自噬参与了脑出血后的病理学过程,并且影响神经细胞的生存和死亡。本文就 Cathepsin D 与自噬及脑出血的关系做一综述。

1 Cathepsin D 的生物学特点

Cathepsin D 是一种酸性溶酶体的天冬氨酸蛋白酶,由 48 kDa 和 34 kDa 亚单位组成的双链蛋白,分布广泛,在人类几乎所有的细胞中表达,分子量大约为 42000 (Mr, 42000),可分为前体 (Mr, 52000)、中间体 (Mr, 48000) 及成熟型体 (Mr, 34000)。Cathepsin D 在细胞中的生物合成包括转录水平、翻译水平、翻译后水平和运输水平。Cathepsin D 由蛋白酶 D 前体(人体中蛋白酶 D 前体由 412 个氨基酸和一个信号肽组成)在粗糙型内质网上合成。当其通过内质网膜时,发生共表达,信号肽被切除,生成无活性的蛋白酶原(392 个氨基酸,52 kDa)。然后经过糖基化和磷酸化,最后通过芽生方式形成运输小泡,把 Cathepsin D 前体传送到晚期内涵体中,最后锚定至溶酶体^[1]。Cathepsin D 前体进入溶酶体后,会经历几次蛋白水解加工过程进而变成成熟的 Cathepsin D。Cathepsin D 在组织和细胞中具有重要的生物学作用,如参与多种组织的重构、改建,参与细胞内蛋白的代谢以及酶原和激素原的激活等,能够在溶酶体内 pH 呈酸性的环境下分解蛋白质。

目前对 Cathepsin D 的测定主要有定量法和定性法 2 种。定量法主要包括免疫放射测定法 (immunoradiometric assay, IRMA) 和酶免疫测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 都是对组织的匀浆进行测定,故不能区分 Cathepsin D 是来源于组织细胞还是间质细胞,并要求新鲜标本,实验条件要求高。定性法以免疫组织化学法 (Immunohistochemistry, IHC) 为主,应用广泛,优点是不需要新鲜标本,能在病理玻片上观察,能定性测定组织细胞和间质细胞内 Cathepsin D 的表达,特异性强,有利于对 Cathepsin D 在不同细胞内表达的意义进行评价。

2 Cathepsin D 与自噬

自噬 (autophagy) 是真核细胞中的降解/再循环系统,是广泛存在于所有真核细胞内的一种生理学现象,人们将自噬称为 II 型程序性细胞死亡,包括大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬。自噬是生物降解胞内蛋白,完成细胞器转化,保持内环境稳

定的重要方式^[2]。自噬的整个形态学过程可总结为:诱导因素→特殊单层膜出现→杯状双层膜形成“C”形→自噬体形成→自噬溶酶体形成→自噬体裂解^[3-5]。见图 1。

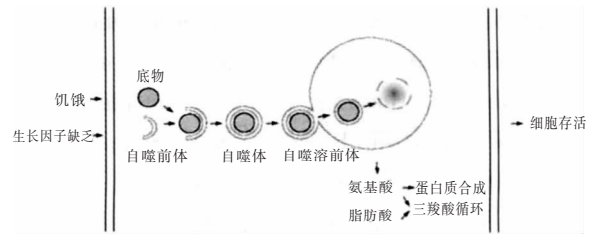


图 1 自噬的形态学过程。该图改编自 Martinet W, Knaapen MWM, Kockx MM, et al. Autophagy in cardiovascular disease. Trends Mol Med, 2007, 13 (11): 482-491.

溶酶体是由单层膜包裹酸性 (pH 约 4.5) 间质构成的细胞器,是大自噬、小自噬和分子伴侣介导的自噬过程的终端细胞器,在这里自噬体分离包裹的物质将会被溶酶体中的酶降解重新利用。Cathepsin D 在溶酶体中主要表现内肽酶活性。已有报道显示^[6]: Cathepsin D 在程序性细胞死亡中发挥不同的作用。如前所述,自噬的发生与溶酶体息息相关。溶酶体组织蛋白酶 (cathepsins) 通过降解多余的细胞内外物质维持细胞代谢,它的过度释放可以导致细胞结构的破坏,引发一系列的病理过程并参与细胞死亡,其中包括坏死、凋亡、自噬性细胞死亡^[7]。劳凤学等^[8]用白藜芦醇处理 Raji 细胞(人 Burkitt 淋巴瘤细胞),发现在白藜芦醇诱导 Raji 细胞自噬死亡过程中, Cathepsin D 表达水平下调,对线粒体损伤较小而引起自噬死亡途径,提示 Cathepsin D 基因与自噬死亡途径有关。目前,已有研究表明 cathepsins 与多种神经系统疾病有关^[9-11]。在阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD)、亨廷顿舞蹈病 (Huntington's disease, HD) 及急性脊髓侧索硬化病 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 患者的脑内,发现不同程度的 Cathepsin D 及 Cathepsin B 的表达异常。贺淑芳等^[12]发现微管相关蛋白 LC3、Cathepsin D 在子宫内膜样腺癌中表达下降,提示二者与自噬活性相关,自噬活性的改变可能参与子宫内膜样腺癌的发生和演进过程。禹志韞等^[13]在宫颈鳞状细胞癌放疗耐受的研究中发现, Cathepsin D 在肿瘤浸润前沿的细胞表达较弱,推测 Cathepsin D 与自噬活性有关,且自噬活

性的降低在子宫颈癌中起保护肿瘤细胞免受放射线打击的作用。综上, Cathepsin D 是溶酶体标记物, 它的表达和激活可反映自噬活性, 在执行自噬性细胞死亡过程中扮演着重要的角色。近年研究发现^[14], Cathepsin D 可通过内源途径、外源性途径和凋亡诱导因子途径参与细胞凋亡, 是细胞凋亡的启动因子。在某些条件下细胞自噬也能导致细胞死亡。自噬的过度发生将导致自噬体的形成数量超过溶酶体的降解能力, 在一些调节因子的作用下, 自噬将作为一种死亡机制诱导细胞发生程序性细胞死亡, 与凋亡一起促进细胞死亡^[15]。另有研究表明, 过度自噬并不直接导致细胞死亡, 而是通过触发细胞凋亡程序而引起细胞死亡^[16]。自噬被认为是凋亡的诱因, 而不是导致细胞死亡的直接原因。细胞凋亡与自噬程序性死亡在死亡信号通路之间可能存在信号途径的互串或交叉, Cathepsin D 可能在两者之间起着桥梁式的作用。

3 Cathepsin D 与自噬及脑出血的关系

众所周知, 脑出血的血肿占位效应及直接破坏是脑损伤的主要因素, 脑损伤的另外一个重要因素就是出血后的继发性损伤, 而出血后的局部血流改变、炎症反应、周围水肿、血红蛋白分解产物、凝血酶及基质金属蛋白酶等物质的改变都可能是继发性损伤的原因^[17-20]。最新研究表明, 细胞凋亡参与了脑出血的继发性损伤^[21-25], 而与细胞凋亡密切相关的自噬现象在脑出血继发性损伤中所起的作用也引起了人们的关注^[26, 27]。Cathepsin D 是介导自噬过程的重要蛋白, 有研究表明其能介导自噬的过程, 若能抑制 Cathepsin D, 就能阻止自噬泡的形成^[28]。在脑出血研究中, He 等^[29, 30]在研究大鼠脑出血模型中, 发现大脑内注射自体血或离子铁后同侧基底节区 LC3-I 向 LC3-II 转换、Cathepsin D 的表达增加。去铁胺能够显著减少 LC3-I 向 LC3-II 转换, 降低 Cathepsin D 的表达。从而证实脑出血后能够诱导自噬, 离子铁在脑出血后诱发自噬过程中发挥了关键作用。Gong 等^[31]研究发现老龄大鼠脑出血后 Cathepsin D 表达增加, 会导致更严重的自噬和神经功能缺损。Hu 等^[32]也发现脑出血后, 凝血酶能增加 LC3-I 向 LC3-II 转换和 Cathepsin D 的表达上调, 并且认为凝血酶参与脑出血后的自噬过程。Lee 等^[33]在大鼠蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH) 模型上发现急性脑损伤期有同侧额底皮质神经元 LC3-II/LC3-I 比值、Cathepsin D 和自噬相关基因 Beclin-1 表

达升高, 均表明存在自噬激活现象, 提示了自噬激活可能参与了 SAH 后的早期脑损伤。从以上研究可以看出, 不管是脑实质内出血还是蛛网膜下腔出血均能产生自噬, 而且能够被诱导。Cathepsin D 表达量的改变可能是自噬引发的结果并可能导致神经细胞功能的改变, 是自噬活性的评定指标。

4 结语

虽然目前自噬与脑出血的研究相对较少, 但是它所呈现出的蓬勃生命力和价值, 已引起人们的重视, 成为当前研究热点。自噬在脑出血后病理过程中是起保护作用还是加重损伤的作用仍有待于进一步研究。对脑出血诱发自噬的确切机制的认识, 有助于为脑出血的治疗提供新的途径和手段。而 Cathepsin D 能介导自噬的发生, 可作为自噬活性的评定指标。Cathepsin D 表达量的改变可能是自噬引发的结果并可能导致神经细胞功能的改变, 故可推测 Cathepsin D 可能在脑出血发病机制中起着重要作用, 对于防治脑出血继发性损伤将有着重要的意义。

参 考 文 献

- [1] Minarowska A, Miarowski L, Karwowska A, et al. Regulatory role of cathepsin D in apoptosis. *Folia Histochem Cytobiol*, 2007, 45(3): 159-163.
- [2] Monastyrska I, Klionsky DJ. Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover. *Mol Aspects Med*, 2006, 27(5-6): 483-494.
- [3] Wang CW, Klionsky DJ. The molecular mechanism of autophagy. *Mol Med*, 2003, 9(3-4): 65-76.
- [4] Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagosomes: biogenesis from scratch. *Curr Opin Cell Biol*, 2005, 17(4): 415-422.
- [5] Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, et al. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [6] Liang ZQ, Wang XX, Li LY, et al. Nuclear factor-kappaB-dependent cyclin D1 induction and DNA replication associated with N-methyl-D-aspartate receptor-mediated apoptosis in rat striatum. *J Neurosci Res*, 2007, 85(6): 1295-1309.
- [7] Qin AP, Zhang HL, Qin ZH. Mechanisms of lysosomal proteases participating in cerebral ischemia-induced neuronal death. *Neurosci Bull*, 2008, 24(2): 117-123.
- [8] 劳凤学, 商迎辉, 刘端祺. 白藜芦醇诱导 Raji 细胞死亡的自噬途径. *中国生物制品学杂志*, 2009, 22(7): 654-658.
- [9] Adamec E, Mohan PS, Cataldo AM, et al. Up-regulation of the lysosomal system in experimental models of neuronal injury: implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 2000,

- 100(3): 663-675.
- [10] Wellington CL, Ellerby LM, Leavitt BR, et al. Huntingtin proteolysis in Huntington disease. *Clin Neurosci Res*, 2003, 3(3): 129-139.
 - [11] Kikuchi H, Yamada T, Furuya H, et al. Involvement of cathepsin B in the motor neuron degeneration of amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Neuropathol*, 2003, 105(5): 462-468.
 - [12] 贺淑芳, 万小云, 谢幸, 等. 微管相关蛋白 LC3 和组织蛋白酶 D 在子宫内腺样腺癌中的表达及意义. *现代妇产科进展*, 2007, 16(2): 100-102.
 - [13] 禹志韞, 王晓云, 张素贞, 等. HIF-1 α 、cathepsin D 表达与宫颈鳞状细胞癌放疗耐受的关系. *中国妇幼保健*, 2011, 26(4): 578-580.
 - [14] Zhang F, Yin W, Chen J, et al. Apoptosis in cerebral ischemia: Executional and regulatory signaling mechanisms. *Neurol Res*, 2004, 26(8): 835-845.
 - [15] Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, et al. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, 2006, 126(1): 121-134.
 - [16] Scott RC, Juhasz G, Neufeld TP, et al. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr Biol*, 2007, 17(1): 1211.
 - [17] Wu CH, Yang RL, Huang SY, et al. Analysis of thrombin-antithrombin complex contents in plasma and hematoma fluid of hypertensive intracerebral hemorrhage patients after clot removal. *Eur J Neurol*, 2011, 18(1): 1331-1468.
 - [18] 葛秀明, 吴成翰, 高丽丽. 血红蛋白降解产物在脑出血后脑水肿形成中的作用机制. *国际脑血管病杂志*, 2009, 17(11): 863-865.
 - [19] 潘新发, 万曙, 詹仁雅. 脑出血后血肿周围组织炎症反应的研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(3): 263-267.
 - [20] Power C, Henry S, Del Bigio MR, et al. Intracerebral hemorrhage induces macrophage activation and matrix metalloproteinases. *Ann Neurol*, 2003, 53(6): 731-742.
 - [21] 吕磊, 蔡定芳. 线粒体依赖的凋亡通路与脑出血后神经损伤. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2008, 35(2): 132-136.
 - [22] Huang M, Hu YY, Dong XQ, et al. The protective role of oxymatrine on neuronal cell apoptosis in the hemorrhagic rat brain. *J Ethnopharmacol*, 2012, 143(1): 228-235.
 - [23] 吴成翰, 丁喜豔, 葉小包, 等. 人脑出血血肿周围神经元凋亡及部分调控基因的研究. *臺灣醫學會《內科學志》*, 2009, 20(5): 440-446.
 - [24] Xue M, Del Bigio MR. Intracortical hemorrhage injury in rats: relationship between blood fractions and brain cell death. *Stroke*, 2000, 31(7): 1721-1727.
 - [25] Matsushita K, Meng W, Wang X, et al. Evidence for apoptosis after intercerebral hemorrhage in rat striatum. *Cereb Blood Flow Metab*, 2000, 20(2): 396-404.
 - [26] 左全庭, 吴成翰, 高丽丽. 自噬与卒中. *国际脑血管病杂志*, 2010, 18(7): 548-552.
 - [27] Wong E, Cuervo AM. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases. *Nature Neurosci*, 2010, 13(7): 805-811.
 - [28] Araki T, Hayashi M, Saruta T. Anion-exchange blocker enhances cytoplasmic vacuole formation and cell death in serum-deprived mouse kidney epithelial cells in mice. *Cell Biol Int*, 2006, 30(1): 93-100.
 - [29] He Y, Hua Y, Song S, et al. Induction of autophagy in rat hippocampus and cultured neurons by iron. *Acta Neurochir Suppl*, 2008, 105: 29-32.
 - [30] He Y, Wan S, Hua Y, et al. Autophagy after experimental intracerebral hemorrhage. *Cereb Blood Flow Metab*, 2008, 28(5): 897-905.
 - [31] Gong Y, He Y, Gu Y, et al. Effect of aging on autophagy after experiment intracerebral hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl*, 2011, 111: 113-117.
 - [32] Hu S, Xi G, Jin H, et al. Thrombin-induced autophagy: A potential role in intracerebral hemorrhage. *Brain Res*, 2011, 1424: 60-66.
 - [33] Lee JY, He Y, Saghe O, et al. Activated autophagy pathway in experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*, 2009, 1287: 126-135.