

# 组织蛋白酶 L 与动脉粥样硬化

贾小英 综述, 危当恒 审校

(南华大学医学院心血管疾病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[关键词] 组织蛋白酶 L; 动脉粥样硬化; 斑块

[摘要] 组织蛋白酶 L 是人体内最重要的组织蛋白酶之一, 在心血管病中的作用日益凸显。组织蛋白酶 L 以其强效的降解弹性蛋白及胶原特性在动脉粥样硬化中介导斑块内巨噬细胞的凋亡, 从而影响斑块的稳定性。因此, 对于组织蛋白酶 L 的研究将有助于动脉粥样硬化的诊断及预防。文章对组织蛋白酶 L 在动脉粥样硬化中的研究现状做一综述。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

## Cathepsin L and Atherosclerosis

JIA Xiao-Ying, and WEI Dang-Heng

(Institute of Cardiovascular disease, Medical College, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

[KEY WORDS] Cathepsin L; Atherosclerosis; Plaque

[ABSTRACT] Cathepsin L is a cysteine protease with potent collagenolytic and elastinolytic activities and has increasingly prominent role in cardiovascular disease. In human carotid atheroma cathepsin L mainly accumulated in macrophages and mediated macrophages apoptosis, which led to plaque destabilization. In this article, the development of cathepsin L in atherosclerosis was reviewed.

组织蛋白酶是一类裂解肽键的蛋白水解酶, 根据其催化中心不同可分为不同类型, 包括组织蛋白酶 B (cathepsin B, CATB)、组织蛋白酶 D (cathepsin D, CATD) 和组织蛋白酶 L (cathepsin L, CATL) 等。其中 CATL 广泛存在于哺乳动物的各种组织细胞中, 具有内肽酶的活性, 降解和更新细胞内蛋白质, 参与激素原的激活、抗原递呈、组织器官的发育等生理过程。病理情况下, 诱导细胞损伤的因素 (如病原微生物、炎症因子、氧化应激等) 导致溶酶体膜稳定性降低、通透性增高甚至破裂, 进而促使 CATL 等蛋白酶类渗透到胞浆或组织间隙, 降解层粘连素、胶原纤维 IV、纤维连接素等细胞以及细胞间质组份, 参与肿瘤的浸润和转移、关节炎、骨质疏松、阿尔茨海默病、多发性硬化症以及其它慢性炎症性疾病的发生发展过程。

## 1 组织蛋白酶 L 的表达调控

### 1.1 转录水平的调控

研究表明, 转录因子通过直接与 CATL 启动子

结合, 从而调节 CATL 的转录。骨骼肌细胞中, 在能量缺乏的情况下转录因子叉头蛋白 O1 (forkhead box O1, FOXO1) 能直接和 hCATL 启动子结合, 上调其 mRNA 的表达, 从而改变骨骼肌的能量代谢状态<sup>[1]</sup>。而野生型 p53 不仅通过直接与 hCATL 启动子结合上调其转录水平, 而且还通过诱导 C/EBP $\alpha$  表达而间接上调 hCATL 的转录<sup>[2]</sup>。此外, 有研究表明 hCATL 的启动子区存在一个 47 bp 的血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的反应元件<sup>[3]</sup>, VEGF 通过上调启动子活性从而上调其转录水平。

### 1.2 转录后调控

CATL 至少被 5 种不同的 mRNA 所编码, 这 5 种不同的 mRNA 均来自于 9q21-22 的同一个基因, 该基因含有两个启动子。第一个启动子的转录本经选择性拼接形成 4 种不同 mRNA 分子, 分别为 hCATL A、A I、A II 和 A III, 各自含有不同长度的外显子 I [其中 hCATLA 含有全长外显子 I (280 个碱

[收稿日期] 2011-03-27

[基金项目] 国家自然科学基金 (30800449) 以及湖南省卫生厅项目 (C2008-012) 资助

[作者简介] 贾小英, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及防治, E-mail 为 jialijuan198509@163.com。通讯作者危当恒, 博士, 副教授, 研究方向为动脉粥样硬化的发病机制及防治, E-mail 为 weizhonghua99@126.com。

基),hCATL A I 缺失外显子 I 3'端的 27 个碱基,hCATL A II 缺失外显子 I 3'端的 90 个碱基,hCATL A III 缺失外显子 I 3'端的 145 个碱基],从而具有不同特征的 5'非翻译区。在这 4 种 hCATL mRNA 中,A III mRNA 最稳定,从而在细胞中其丰度最高;但由于 hCATL A 的 5'非翻译区能够形成一个翻译调控的顺式作用元件——内部核糖体进入位点 ( internal ribosome entry site,IRES ),可被核糖体识别并启动翻译,从而具有较高的翻译效率<sup>[4]</sup>。

1.3 翻译后修饰

前体酶原由信号肽、前体以及含有催化活性中心的成熟肽构成<sup>[5]</sup>。前体酶原在内质网合成后,通过 N 末端的信号肽定位到高尔基体,被高甘露糖碳水化合物糖基化,形成 CATL 酶原,然后与 2 个 6-磷酸甘露糖受体中的一个结合形成复合物并转运至前溶酶体。此处的微环境使酶和受体复合物分离并促进酶的激活,形成分子量为 30 kDa 的成熟 CATL<sup>[6]</sup>。生理条件下,大约 10% 的酶原被分泌至胞质,然后被溶酶体中其它的蛋白水解酶水解或自身激活加工成 24 kDa 的活性形式。成熟 CATL 主要分布于溶酶体,也有极少部分定位于细胞核。

2 组织蛋白酶 L 的酶学特性

胡庆国等<sup>[7]</sup> 研究证明,CATL 很可能是肌动球蛋白非结合型酶。其粗酶液的最适 pH 和温度分别为 5.0 和 45℃,在该条件及中性条件 ( pH7.0, 25℃ )下,CATL 有较高的热稳定性。在酸性条件 (pH 5.0 )时,其酶活性随 NaCl 浓度的增加而增大,而中性条件下,其酶活性并不随 NaCl 的浓度而变化。

CATL 酶原主要由 N-端的酶活性抑制功能域和 C-端的酶催化活性功能域构成。其免疫学活性区域主要是 N-端的酶活性抑制功能域 ( aa67 ~ aa127 ),为特异性抗体的主要结合部位;而酶活性功能域的序列保守性很高,是维持其功能所必须。酶功能域中的催化中心是一个口袋状的裂缝,形成催化中心的 3 个关键的氨基酸 [ 19 位至 21 位的谷氨酸-亮氨酸-丙氨酸 ( Q19L20A21 ) ],位于“口袋”的底部;抑制域可通过遮盖功能域中的裂缝,阻止底物与酶的结合。研究表明,抑制域不仅可以抑制随后合成的组织蛋白酶的活性,避免自身降解,同时也能特异地辅助随后合成的组织蛋白酶的正确折叠<sup>[8]</sup>。研究表明,CATL1 酶原可以通过自我切除抑制域而激活

或在其它蛋白酶作用下激活<sup>[9]</sup>,其中被切除的抑制域片段,分子量小,更易通过胆管壁或毛细胆管渗透到循环系统中。

3 组织蛋白酶 L 与动脉粥样硬化

3.1 组织蛋白酶 L 与细胞外基质重塑

研究表明,酸性条件下 CATL 的作用底物主要为 II、IX 和 XI 型胶原,在中性条件下 CATL 具有极强的水解弹性蛋白的能力,并一度被认为是水解弹性蛋白和胶原能力最强的蛋白水解酶。正常生理条件下,血管内皮细胞、平滑肌细胞及成纤维细胞周围整齐分布着大量的血管壁细胞外基质,其主要成份是弹力蛋白和胶原蛋白,对于维持血管壁稳定及血管内外正常的微环境发挥着重要的作用。当内皮细胞、平滑肌细胞以及巨噬细胞受到氧化型低密度脂蛋白刺激时,溶酶体膜受损而引起 CATL 从溶酶体进入胞浆以及胞外,从而导致细胞外基质的降解。蛋白质组学研究证实,CATL 在氧化型低密度脂蛋白处理的单核细胞来源的巨噬细胞中表达明显上调<sup>[10]</sup>。近年来的研究表明冠心病患者血清 CATL 水平显著高于非冠心病对照组<sup>[11]</sup>,冠状动脉狭窄患者中血清 CATL 水平显著高于无冠状动脉狭窄者。研究表明,动脉粥样斑块中 CATL 表达明显上调,并且主要分布在与动脉粥样硬化 ( As ) 病变密切相关的内皮细胞、平滑肌细胞以及巨噬细胞,并且人冠状动脉粥样硬化斑块中胞内及胞外的组织蛋白酶 L 表达呈病变依赖性增加<sup>[12]</sup>。Kitamoto 等<sup>[13]</sup> 对 CATL<sup>-/-</sup> LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠、CATL<sup>+/-</sup> LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠以及 CATL<sup>+/+</sup> LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠的研究结果表明,在喂饲高脂饮食 13 周后, CATL<sup>-/-</sup> LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠、CATL<sup>+/-</sup> LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠与 CATL<sup>+/+</sup> LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠相比,血浆总胆固醇含量明显降低 ( 其中低密度脂蛋白以及乳糜微粒的含量明显降低而高密度脂蛋白的含量没有明显改变 ),As 斑块面积明显减少,发展速度明显减缓,脂质核心的体积明显减小,斑块中的胶原蛋白和弹性蛋白含量明显增多;体外实验进一步表明,来源于 CATL<sup>-/-</sup> LDLR<sup>-/-</sup> 小鼠的巨噬细胞以及 T 淋巴细胞的跨胶原基质迁移能力明显减弱,提示 CATL 通过调节细胞外基质重塑而参与 As 的发生发展过程。

3.2 组织蛋白酶 L 与血管新生

研究表明,血管新生在 As 病变的发展过程中起重要作用。血管新生又称为新的血管形成,其形成过程非常复杂。正常成人内皮细胞和血管平滑肌细

胞不进行有丝分裂,在生长发育、缺血、缺氧、炎症、异常剪切应力及其它应激情况下,血管内皮细胞分泌蛋白分解酶,使细胞基底膜断裂,内皮细胞反复分裂增殖,增殖游走的内皮细胞形成管腔。在血管新生的过程中,内皮细胞的生长、迁移受基质降解蛋白酶、细胞-细胞外基质相互作用的调节,细胞外基质的降解与沉积,对细胞生长、迁移及血管形成过程中不同阶段的细胞分化均起重要作用。Fujiwara 等<sup>[14]</sup>研究发现,存在于血管基底膜上的层黏连蛋白 8 (laminin-8, LN-8) 以及 Laminin-10 /11 对人微血管内皮细胞的迁移具有重要的调节作用,而层黏连蛋白是 CATL 的作用底物,提示 CATL 参与内皮细胞的迁移调控。碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 能诱导内皮细胞形成血管样的管腔结构,而 CAT 抑制剂 Cystatin C 能降低内皮细胞的管腔形成能力达 80%。进一步的研究表明, CATL 直接通过 JNK 途径促进 bFGF 诱导的内皮细胞迁移及血管新生<sup>[15]</sup>。

内皮祖细胞是内皮细胞的前体细胞,在血管新生过程中起着非常重要的作用。近来的研究表明, CATL 在内皮祖细胞中的表达量明显高于成熟内皮细胞,并且对内皮祖细胞的迁移至关重要。将 CATL 的抑制剂预处理内皮祖细胞输给后肢缺血模型小鼠,新生血管密度明显降低,提示 CATL 与内皮祖细胞参与的血管新生密切相关。

### 3.3 组织蛋白酶 L 与动脉粥样硬化斑块的不稳定性

As 斑块的形成和发展以氧化脂类和炎症细胞的聚集为特点,斑块的破裂是动脉闭塞性血栓形成最常见的触发事件并可引发急性缺血性事件,如急性冠状动脉综合征和中风<sup>[16]</sup>。斑块的稳定性与斑块内脂质核心的大小、炎性细胞含量、斑块内新生血管的含量、纤维帽的厚度以及斑块内蛋白酶的含量等密切相关。其中,动脉壁细胞外基质蛋白的酶解及细胞的凋亡是影响 As 斑块稳定性的重要事件,此过程涉及基质金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶及半胱氨酸蛋白水解酶类<sup>[17,18]</sup>。溶酶体组织蛋白酶类除了参与病变区弹性蛋白和胶原的降解外,也参与了凋亡信号转导途径。细胞凋亡机制中的溶酶体途径及相关组织蛋白酶已在巨噬细胞等细胞模型中被广泛证实。研究表明, CATL 在人颈动脉 As 病变及腹主动脉微动脉瘤病变的内皮细胞及巨噬细胞中表达增加<sup>[19]</sup>。对冠状动脉 As 患者中的单核细胞源性巨噬细胞和自发凋亡的巨噬细胞的研究表明,两者都有 CATL 高表达, CATL 释放进入细胞质后触发细胞凋

亡<sup>[20]</sup>。体外实验表明,当巨噬细胞暴露于氧化型低密度脂蛋白和氧化固醇后, CATL 激活细胞凋亡蛋白酶 3 (caspase-3) 及其它的组织蛋白酶类如组织蛋白酶 D 调控巨噬细胞的凋亡<sup>[21,22]</sup>。Li 等<sup>[23]</sup>对 49 例颈动脉粥样硬化患者标本的免疫组织化学和影像学分析表明,所有斑块中 CATL 表达均明显升高,并且破裂的斑块中 CATL 的表达水平最高;相对于早期稳定斑块,进展期斑块 CATL 的表达量更高,胶原纤维含量更少,双色和三色染色的结果表明 CATL 主要表达于 CD68<sup>+</sup> 区域;并且与健康志愿者相比,冠状动脉粥样硬化组巨噬细胞表达更多的 CATL,并且与激活的 Caspase-3 及细胞凋亡共定位,细胞凋亡程度明显增加。

综上所述, CATL 可能在多个途径参与 As 的发生发展过程。CATL 在高胆固醇血症、高血压、吸烟、糖尿病和肥胖等危险因素诱导下异常表达,分泌增多,分布异常,进而损伤动脉壁内皮细胞,使其屏障功能等正常的生理功能 (调节血管平滑肌张力、抗血栓、抗炎作用) 缺失,并产生某些化学信号吸引血液中的单核细胞向血管壁移行<sup>[24]</sup>;并且分泌的 CATL 又能高效降解血管壁细胞外基质,为单核细胞黏附并进入内皮层和基膜创造条件,随后单核细胞分化为巨噬细胞并吞噬氧化型低密度脂蛋白形成负脂的泡沫细胞,这些泡沫细胞又能聚集胆固醇和其他脂肪物质,激发平滑肌细胞增殖与迁移,最终泡沫细胞堆积形成 As 斑块;此外, CATL 降解血管壁细胞外基质致使动脉弹性下降,加重 As 病变,并且在多个层次影响着 As 斑块的稳定性。因此,更好地认识 CATL 在 As 发生发展中的作用,对于 As 发病机制的阐明以及相关防治策略的应用均有着非常重要的意义。

### [参考文献]

- [1] Yamazaki Y, Kamei Y, Sugita S, et al. The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle [J]. *Biochem J*, 2010, 427(1): 171-178.
- [2] Katara R, Mir RA, Shukla AA, et al. Wild type p53-dependent transcriptional upregulation of cathepsin L expression is mediated by C/EBP $\beta$  in human glioblastoma cells [J]. *Biol Chem*, 2010, 391(9): 1 031-040.
- [3] Keerthivasan S, Keerthivasan G, Mittal S, et al. Transcriptional upregulation of human cathepsin L by VEGF in glioblastoma cells [J]. *Gene*, 2007, 399(2): 129-136.
- [4] Mittal S, Mir RA, Chauhan SS. Post-transcriptional regulation of human cathepsin L expression [J]. *Biol Chem*, 2011, 392(5): 405-413.



- [5] Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1477 (1-2): 98-111.
- [6] Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities[J]. *EMBO J*, 2001, 20 (17): 4 629-633.
- [7] 胡庆国, 张进杰, 纪 蓉. 组织蛋白酶 L 及其酶学特性研究[J]. *合肥学院学报*, 2010, 20(3): 66-71.
- [8] Cappetta M, Rot h I, Diaz A, et al. Role of the prosegment of *Fasciola hepatica* cathepsin L1 in folding of the catalytic domain[J]. *Biol Chem*, 2002, 383 (7-8): 1 215-221.
- [9] Collins PR, Stack CM, O' Neill SM, et al. Cathepsin L1, the major protease involved in liver fluke ( *Fasciola hepatica* ) virulence: propeptide cleavage sites and autoactivation of the zymogen secreted from gast rodermal cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(17): 17 038-046.
- [10] Fach EM, Garulacan LA, Gao J, et al. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2004, 3(12): 1 200-210.
- [11] 王 峻, 刘颖娴, 李向平, 等. 组织蛋白酶 L 与冠心病及其危险因素的相关性[J]. *中南大学学报*, 2009, 34 (2): 130-134.
- [12] Li Wei, Dalen H, Eaton JW, et al. Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma [ J ]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(7): 1 124-130.
- [13] Kitamoto S, Sukhova GK, Sun J, et al. Lipoprotein receptor-knockout mice cathepsin L deficiency reduces diet-induced atherosclerosis in low-density receptor-knockout mice[J]. *Circulation*, 2007, 115(15): 2 065-075.
- [14] Fujiwara H, Gu J, Sekiguchi K. Rac regulates integrin-mediated endothelial cell adhesion and migration on laminin-8[J]. *Exper Cell Res*, 2004, 292(1): 67-77.
- [15] Chung JH, Im EK, Jin TW, et al. Cathepsin L derived from skeletal muscle cells transfected with bFGF promotes endothelial cell migration[J]. *Exp Mol Med*, 2011, 43 (4): 179-188.
- [16] Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, et al. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46(6): 937-954.
- [17] Liu J, Sukhova GK, Sun JS, et al. Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(8): 1 359-366.
- [18] Lutgens SP, Cleutjens KB, Daemen MJ, et al. Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease[J]. *Faseb J*, 2007, 21(12): 3 029-041.
- [19] Liu J, SukhovGK a, Yang JT, et al. Cathepsin L expression and regulation in human abdominal aortic aneurysm, atherosclerosis, and vascular cells[J]. *Atherosclerosis*, 2006, 184(2): 302-311.
- [20] Tsuchiya K, Kohda Y, Yoshida M, et al. Postictal blockade of ischemic hippocampal neuronal death in primates using selective cathepsin inhibitors [ J ]. *Exp Neurol*, 1999, 155(2): 187-194.
- [21] Yuan XM, Li W, Brunk UT. OxLDL-induced macrophage cytotoxicity is mediated by lysosomal rupture and modified by intralysosomal redox-active iron[J]. *Free Radic Res*, 1998, 29(5): 389-398.
- [22] Yuan XM, Li W, Brunk UT, et al. Lysosomal destabilization during macrophage damage induced by cholesterol oxidation products[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28 (2): 208-218.
- [23] Wei Li, Louise Kornmark, Lena Jonasson, et al. Cathepsin L is significantly associated with apoptosis and plaque destabilization in human atherosclerosis[J]. *Atherosclerosis*, 2009, 202(1): 92-102.
- [24] 彭 旷, 顾洪丰, 许增祥, 等. 氧化型低密度脂蛋白和氧化型高密度脂蛋白对 ECV304 细胞 Toll 样受体 2 和 Toll 样受体 4 表达的影响及其对人单核细胞的趋化作用[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2007, 15(7): 562.

(此文编辑 许雪梅)