

半胱氨酸蛋白酶抑制剂 Stefins 的功能研究进展

刘彪¹, 范奇超¹, 林扬元², 谢群²

莆田学院, 福建莆田 351100 ¹临床医学院; ²基础医学部

摘要: Stefins 是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族(Cystatins)的一个分支, 属于 I 型 Cystatins, 在人类中主要包括 Stefin A 和 Stefin B。Stefins 具有多种生物学功能: Stefin B 的基因突变与翁-隆病(Unverricht-Lundborg disease, EPM1) 的发生紧密相关; Stefins 参与淀粉斑的形成, 在阿尔茨海默病的发生、发展中发挥重要作用; 近年来关于 Stefins 在肿瘤的发生、发展、侵袭、转移中的作用备受关注。本文就 Stefins 的功能研究进展作一综述。

关键词: Stefins; 翁-隆病; 阿尔茨海默病; 肿瘤

中图分类号: R730; R338 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2015)05-0518-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2015.05.028

网络出版时间: 2015-03-11 10:32

网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20150311.1032.003.html

Advances in biological function of stefins

LIU Biao¹, FAN Qichao¹, LIN Yangyuan², XIE Qun²

¹Clinical Medical School; ²Department of Basic Medical Science Putian University, Putian 351100, Fujian Province, China

Corresponding author: XIE Qun. Email: xqptu@163.com

Abstract: Stefins family is a branch of cystatin superfamily, which apparently acts as inhibitors of cysteine proteases, belonging to type I cystatins. Stefin A and steфин B are the main two kinds of stefins in human beings. Stefins has many biological functions: the gene mutation of steфин B is closely related to the development of Unverricht-Lundborg disease (EPM1); Stefin A and steфин B participate in the formation of the amyloid plaque, which play an important role in the development of Alzheimer's disease; Stefins may also involve in the genesis, development, invasion and metastasis of tumor. This review elucidates the advances in biological function of stefins.

Keywords: stefins; Unverricht-Lundborg disease; Alzheimer disease; neoplasms

蛋白酶根据其水解机制和活性结构分为天冬氨酸蛋白酶、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)、丝氨酸蛋白酶和半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteinases, CPs) 4 种。其中, 半胱氨酸蛋白酶是溶酶体中的胞内蛋白酶, 参与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)降解、细胞凋亡、免疫调节和血管生成等, 其功能与活性受到内源性抑制剂即半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族的严格调控。Cystatins 超家族通过抑制 CPs 的活性参与多种生理及病理过程^[1-2]。随着对该家族成员氨基酸序列同源性、催化机制和活性部位结构特点的深入研究, 目前在高等真核生物中报道的 Cystatins 超家族至少存在 5 大类, 即 Stefin、Cystatin、

Latexin、Fetuin 和 Kininogen 家族。其中, Stefins 家族的结构与功能是近年的研究热点。

1 Stefins 的结构与分布

Stefins 是 Cystatins 超家族内唯一的一类细胞内抑制剂, 包括原有的 Stefin A(Cystatin A) 和 Stefin B(Cystatin B) 两类。Turk 等^[3]于 1986 年从人类肝内上皮样细胞和血细胞中分离获得 Stefin A, 其主要分布在上皮细胞及淋巴组织等部位。Stefin B 则广泛分布于各种细胞和组织, 是一种广谱的细胞内蛋白酶抑制剂^[4]。除此之外, Stefins 家族里一些新成员 Stefin C、Stefin D1、Stefin D2 也相继在牛、猪等动物中分离, 但在人类的分离及定位还在研究之中^[5]。Stefins 被称为 I 型细胞内的半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 包括一个 Cystatins 样的结构域。人的 Stefin A 分子量约为 11 kU, 是由 98 个氨基酸组成的单链酸性蛋白, 其基因位于 3q21 染色体, 有 3 个外显子和 2 个内含子。Stefin A 在上皮细胞、多形核白细胞和淋巴组织中浓度较高, 特别是在上皮组织中分布较丰富^[6]。人的 Stefin B 基因也包含 3 个外显子和 2 个内含子, 是一种含 98 个氨基酸残基的单链中性蛋白, 编码基因位于染色体 21q22.3, 分子量约为 11 kU, 分布于各种细胞核及细胞质中, 与 Stefin A 高度同源^[7]。Stefin A 与 Stefin B 通过调控胞内溶酶体蛋白酶的活性从而调控蛋白转换和酶原、激素原的加工^[8]。虽然 Stefins 缺乏分泌到细胞外的信号序列, 早期认为其主要在胞内起作用, 但近年来在一些患者的腹水、

收稿日期: 2014-12-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81201670); 福建省中青年教师教育科研项目(JA13287; JB11168); 福建省教育厅资助省属高校科研专项(JK2011050); 莆田市科技计划项目[2012S11(1)]; 国家级大学生创新创业训练计划项目(201411498007)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81201670); Research Projects for Young and Middle-aged Teachers of Fujian Province(JA13287; JB11168); Scientific Special Foundation of the Education Department of Fujian Province(JK2011050); Science and Technology Projects in Putian City[2012S11(1)]; Training Programs of Innovation and Entrepreneurship for Undergraduates(201411498007)

作者简介: 刘彪, 男, 本科。研究方向: 肝癌肿瘤标记物。Email: 779759750@qq.com

通信作者: 谢群, 博士, 教授。Email: xqptu@163.com

血清、支气管黏液或唾液中检测到Stefin A、Stefin B蛋白的存在与变化^[9-10]。

2 Stefins的生物学功能

2.1 Stefins与组织蛋白酶 哺乳动物中的木瓜蛋白酶类即属于组织蛋白酶,组织蛋白酶既能够水解一些前体蛋白(酶原和激素原)从而生成其活性形式,也能激活其他蛋白水解系统而参与人体的多种生理功能^[11]。半胱氨酸蛋白酶抑制剂可以通过可逆性竞争性抑制组织蛋白酶,保护细胞免受内源或外源性蛋白酶水解,调控细胞内外蛋白水解的平衡,从而参与蛋白质的分解代谢、细胞增殖、细胞分化、细胞凋亡、感染与免疫、血管生成及肿瘤侵袭、转移等多种生理病理过程。因此,针对这类蛋白酶抑制剂的研究可为许多重大疾病的防治提供新思路和新靶点。在Stefins家族中,Stefin B对组织蛋白酶L的抑制作用较强,而对组织蛋白酶D、E和G的抑制作用较弱。在生理状态下,蛋白酶及其抑制剂之间维持一种动态平衡,共同调控相关生理功能。而在一些疾病比如肿瘤进展中,靶酶及其内源性抑制剂之间的平衡遭到破坏,蛋白酶抑制剂活性下降,蛋白酶活性增高,从而影响并加剧肿瘤的发生发展^[12]。

2.2 Stefin B与翁-隆病(Unverricht-Lundborg disease, EPM1)

EPM1是进行性肌阵挛性癫痫(progressive myoclonus epilepsy, PME)中发生率最高的一种疾病,为常染色体隐性遗传性神经元变性疾病,患者常从6~15岁开始出现运动失调并逐步发展,最终导致智力退化、意向性震颤、发音困难等严重症状^[13]。Lehesjoki和Koskiniemi^[14]报道了位于染色体21q22.3的EPM1基因缺损是其发病的重要原因,该基因的编码产物即是Stefin B。Stefin B基因发生突变导致其编码的Stefin B蛋白丧失正常功能从而导致该病的发生。正常情况下,Stefin B基因的启动子区域一段含有12个核苷酸重复序列(5'-CCCCGCCGCG-')的拷贝数一般为2~3,EPM1患者中却发现多数病人的等位基因出现这一突变类型,呈现高拷贝数,甚至高达30个。目前报道至少存在12种Stefin B基因突变影响EPM1的发病,其中既有由于Stefin B基因碱基突变后影响剪接位点,也有突变导致编码氨基酸残基改变和引起蛋白翻译或者读码框改变^[15-17]。Pinto等^[18]研究发现,Stefin B基因敲除小鼠的小脑普肯野细胞出现凋亡,结合EPM1患者体内Stefin B mRNA水平降低,而组织蛋白酶B的活性升高,认为上述不稳定的高拷贝的核苷酸重复序列可能削弱了该基因的表达,从而导致抑制剂和蛋白酶之间的失衡,导致细胞程序性死亡。

2.3 Stefins与阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)

阿尔茨海默病是一种以进行性认知功能障碍和记忆损害为特征的中枢神经退行性疾病。其发病机制中的主流学说是淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)沉积假说。A β 可以诱导细胞凋亡和蛋白过度异常磷酸化,促进双股螺旋丝(paired helical filament, PHF)形成及细胞内神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs),从而出现淀粉样老年斑这一经典的病理变化,导致神经元退行性变。近年来,研究发现,Stefin B是一种A β 和 β 淀粉样前体蛋白(amyloid

precursor protein, APP)的伴侣蛋白,能够与A β 和APP紧密结合从而导致A β 形成^[19]。Li等体外实验表明,在Stefin B与A β 和APP共存于中国仓鼠卵巢细胞(chinese hamster ovary, CHO)中,可以抑制APP的代谢,Stefin A、Stefin B是淀粉斑的组成成分;而增加组织蛋白酶B的活性及减少组织蛋白酶B的抑制剂如Cystatin C、Stefin B等有利于清除A β ^[20];推测Stefin B可能在AD的发生、发展中发挥重要作用。这些研究尚局限于细胞水平,更多的证据还需通过AD的研究模型加以深入探讨。

2.4 Stefins在肿瘤发生、发展、侵袭、转移中的作用

Stefin A是首个报道与恶性肿瘤发生、发展相关的抑制剂,随后,其与Stefin B在恶性肿瘤进展中的作用越来越受到重视^[21]。在喉癌、食管癌患者中,Stefin A、Stefin B在肿瘤组织中的表达明显低于癌旁组织,其表达趋势与转移潜能存在逆向相关,能够抑制癌细胞侵袭及向远处转移^[22-23]。Stefins是通过抑制组织蛋白酶功能来阻止其对细胞外基质的水解作用,从而抑制肿瘤侵袭、转移。但是,这种作用无法解释Stefins在肿瘤患者癌组织和血清中的高表达现象。Lee等^[24]研究表明,肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者癌组织和血清中Stefin B含量升高,且随病变由肝炎向HCC发展而递增,与HCC的发展和预后有关。Stefin A高表达水平对肺非小细胞癌是有价值的预后指标^[25];食管癌中Stefin A明显增加与肿瘤的分级、分期、复发呈正相关,提示Stefin A在食管癌进展中具有促癌作用,还可以作为肿瘤进程和预后标志^[23]。这种的高表达现象可能的原因:1)不同病变组织中Stefins蛋白的表达存在差异;2)Stefins对于半胱氨酸蛋白酶存在可逆性和竞争性的抑制作用,在肿瘤进展的早期阶段,抑制剂为了抑制蛋白酶含量出现阶段性降低,随着肿瘤进展,蛋白酶水平持续增高,为了在数量上平衡组织蛋白酶活性的升高,抑制剂出现反弹性含量升高;3)Stefins与蛋白酶的细胞定位可能存在差异,导致组织蛋白酶活性得不到有效抑制,组织蛋白酶水解加强,反而促进了癌的浸润发展。可见,抑制剂与靶酶组织蛋白酶之间的失衡可能是疾病病理发展过程中的根本原因之一^[26]。有学者们还发现,Stefins家族成员调控肿瘤不仅仅源于对组织蛋白的单纯作用,TGF- β 信号、PI3 kinase/Akt信号转导介导、细胞凋亡等途径也是Stefins调控肿瘤进展的重要途径^[27]。

2.5 Stefins参与细胞凋亡调控 在黑色素瘤细胞中,Yang等^[28]发现,Stefin B对肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)介导的凋亡信号通路具有抑制作用,且无关于内源性组织蛋白酶的作用,而与增强Caspase-8活性相关。Stefin A大量表达于表皮角化细胞内,体内外实验结果发现,Stefin A可以抑制紫外线诱导的表皮细胞凋亡现象,且发现Caspase-3的活性失调可能是其抑制作用的重要机制之一^[29]。

2.6 Stefins的其他功能 Stefin A参与细胞增殖过程,可作为增殖异常疾病的治疗靶点,其mRNA水平在牛皮癣等一些皮肤炎症性病变中出现升高^[30]。Stefin A能够保护皮

肤,防止过敏性、变应性反应及异位性皮炎等,抑制螨虫等过敏原中蛋白水解的活性,抑制过敏原刺激下的表皮细胞释放IL-8和GM-CSF^[31]。Stefin B蛋白能够保护胞质内的一些蛋白,使细胞骨架蛋白免受半胱氨酸蛋白酶的破坏。Stefin B可以通过下调胞内组织蛋白酶K的活性来参与调控破骨细胞的生理功能,进而抑制骨组织吸收过程^[32]。此外,Stefin B蛋白与核小体内的组蛋白H2A.Z、H2B、H3等存在交互作用,Stefin B基因敲除小鼠的胚胎成纤维细胞可以加速细胞周期的发生,反之,若上调T98G细胞核内Stefin B的表达量则可以延迟细胞周期发生,此类现象同样可能与Stefin B和相应的组织蛋白酶的活性调控有关^[33]。

3 结语

对Stefins成员在肿瘤发生、发展、侵袭、转移中作用的研究是近年来研究的热点,肿瘤组织、肿瘤患者的血清及体液中Stefins基因成员的表达与含量各异,揭示其在肿瘤进展中的重要作用。对这个基因家族成员的生物学功能展开进一步研究,有助于了解一些重大疾病的发生机制,并为防治这些重大疾病提供新的诊断分子标记物及潜在的治疗靶点。

参考文献

- 1 Keppler D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function [J]. *Cancer Lett*, 2006, 235 (2): 159-176.
- 2 苏显都,林榕,徐晓兰,等.血清胱抑素C、 β 2-微球蛋白及肌酐在多发骨髓瘤诊断中的价值[J].*解放军医学院学报*, 2014, 35 (11): 1126-1129.
- 3 Turk V, Brzin J, Kotnik M, et al. Human cysteine proteinases and their protein inhibitors stefins, cystatins and kininogens [J]. *Biomed Biochim Acta*, 1986, 45 (11/12): 1375-1384.
- 4 Shannon P, Pennacchio LA, Houseweart MK, et al. Neuropathological changes in a mouse model of progressive myoclonus epilepsy: cystatin B deficiency and Unverricht-Lundborg disease [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2002, 61 (12): 1085-1091.
- 5 Turk B, Krizaj J, Kralj B, et al. Bovine stefin C, a new member of the stefin family [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268 (10): 7323-7329.
- 6 Kos J, Lah TT. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review) [J]. *Oncol Rep*, 1998, 5 (6): 1349-1361.
- 7 Ritonja A, Machleidt W, Barrett AJ. Amino acid sequence of the intracellular cysteine proteinase inhibitor cystatin B from human liver [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1985, 131 (3): 1187-1192.
- 8 Hiwasa T, Sawada T, Sakiyama S, et al. Cysteine proteinase-inhibitory activity of ras gene product is not affected by mutations at GTPase-activating protein-binding sites [J]. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1989, 370 (11): 1215-1220.
- 9 Gashenko EA, Lebedeva VA, Brak IV, et al. Evaluation of serum procathepsin B, cystatin B and cystatin C as possible biomarkers of ovarian cancer [J/OL]. <http://www.circumpolarhealthjournal.net/index.php/ijch/article/view/21215>.
- 10 Devic I, Shi M, Schubert MM, et al. Proteomic analysis of saliva from patients with oral chronic graft-versus-host disease [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2014, 20 (7): 1048-1055.
- 11 Fonović M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840 (8): 2560-2570.
- 12 Kos J, Mitrovic A, Mirkovic B. The current stage of cathepsin B inhibitors as potential anticancer agents [J]. *Future Med Chem*, 2014, 6 (11): 1355-1371.
- 13 Kälviäinen R, Khyuppenen J, Koskenkorva P, et al. Clinical picture of EPM1-Unverricht-Lundborg disease [J]. *Epilepsia*, 2008, 49 (4): 549-556.
- 14 Lehesjoki AE, Koskiniemi M. Progressive myoclonus epilepsy of Unverricht-Lundborg type [J]. *Epilepsia*, 1999, 40 (S3): 23-28.
- 15 Pinto E, Freitas J, Duarte AJ, et al. Unverricht-Lundborg disease: homozygosity for a new splicing mutation in the cystatin B gene [J]. *Epilepsy Res*, 2012, 99 (1/2): 187-190.
- 16 Polajnar M, Zavašnik-Bergant T, Kopitar-Jerala N, et al. Gain in toxic function of stefin B EPM1 mutants aggregates: correlation between cell death, aggregate number/size and oxidative stress [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843 (9): 2089-2099.
- 17 Polajnar M, Vidmar R, Vizovišek M, et al. Influence of partial unfolding and aggregation of human stefin B (cystatin B) EPM1 mutants G50E and Q71P on selective cleavages by cathepsins B and S [J]. *Biol Chem*, 2013, 394 (6): 783-790.
- 18 Pinto E, Freitas J, Duarte AJ, et al. Unverricht-Lundborg disease: homozygosity for a new splicing mutation in the cystatin B gene [J]. *Epilepsy Res*, 2012, 99 (1-2): 187-190.
- 19 Polajnar M, Ceru S, Kopitar-Jerala N, et al. Human stefin B normal and patho-physiological role: molecular and cellular aspects of amyloid-type aggregation of certain EPM1 mutants [J]. *Front Mol Neurosci*, 2012, 5 : 88.
- 20 Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, et al. Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits [J]. *Brain*, 2011, 134 (1): 258-277.
- 21 Hawley-Nelson P, Roop DR, Cheng CK, et al. Molecular cloning of mouse epidermal cystatin A and detection of regulated expression in differentiation and tumorigenesis [J]. *Mol Carcinog*, 1988, 1 (3): 202-211.
- 22 陈立伟,刘明波,王嘉陵,等.喉癌患者外周血Cathepsin B、L及Stefin A水平检测的意义[J].*军医进修学院学报*, 2011, 32 (6): 620-621.
- 23 Anižin A, Gale N, Smid L, et al. Expression of stefin A is of prognostic significance in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2013, 270 (12): 3143-3151.
- 24 Lee MJ, Yu GR, Park SH, et al. Identification of cystatin B as a potential serum marker in hepatocellular carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14 (4): 1080-1089.
- 25 Butler MW, Fukui T, Salit J, et al. Modulation of cystatin A expression in human airway epithelium related to genotype, smoking, COPD, and lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2011, 71 (7): 2572-2581.
- 26 Gole B, Huszthy PC, Popović M, et al. The regulation of cysteine cathepsins and cystatins in human gliomas [J]. *Int J Cancer*, 2012, 131 (8): 1779-1789.
- 27 Wang X, Gui L, Zhang Y, et al. Cystatin B is a progression marker of human epithelial ovarian tumors mediated by the TGF- β signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44 (4): 1099-1106.
- 28 Yang F, Tay KH, Dong L, et al. Cystatin B inhibition of TRAIL-induced apoptosis is associated with the protection of FLIP (L) from degradation by the E3 ligase itch in human melanoma cells [J]. *Cell Death Differ*, 2010, 17 (8): 1354-1367.
- 29 Takahashi H, Komatsu N, Ibe MA, et al. Cystatin A suppresses ultraviolet b-induced apoptosis of keratinocytes [J]. *J Dermatol Sci*, 2007, 46 (3): 179-187.
- 30 Xiao PP, Hu YH, Sun L. *Scophthalmus maximus* cystatin B enhances head kidney macrophage-mediated bacterial killing [J]. *Dev Comp Immunol*, 2010, 34 (12): 1237-1241.

(上接520页)

- 31 Kato T, Takai T, Mitsuishi K, et al. Cystatin A inhibits IL-8 production by keratinocytes stimulated with Der p 1 and Der f 1 : biochemical skin barrier against mite cysteine proteases [J] . J Allergy Clin Immunol, 2005, 116 (1) : 169-176.
- 32 Laitala-Leinonen T, Rinne R, Saukko P, et al. Cystatin B as an

intracellular modulator of bone resorption [J] . Matrix Biol, 2006, 25 (3) : 149-157.

- 33 Ceru S, Konjar S, Maher K, et al. Stefin B interacts with histones and cathepsin L in the nucleus [J] . J Biol Chem, 2010, 285 (13) : 10078-10086.