

·综述·

半胱氨酸蛋白酶 L 在卵巢癌中的研究进展

刘丽,汪希鹏[△]

【摘要】 卵巢癌的早期发现率低,70%以上的患者诊断时已为进展期,由于广泛转移和耐药,其预后极差。半胱氨酸蛋白酶 L(CTSL)是半胱氨酸蛋白酶家族的主要成员之一,可分布于细胞内或分泌到细胞外基质,以细胞内外多种蛋白为底物。CTSL 在多种恶性肿瘤组织中表达水平增高,卵巢癌组织和卵巢癌患者血清中 CTSL 的水平也异常增高。CTSL 促进卵巢癌的生长、转移、耐药、血管生成等恶性生物学行为。血清 CTSL 与其他生物标记联合应用有利于早期诊断卵巢癌,同时实验研究表明以 CTSL 为靶点的治疗对控制卵巢癌的进展有较好的效果。因此对 CTSL 在卵巢癌进展中的作用机制进行更深入的探讨有望为卵巢癌的早期诊断和治疗提供新的思路。

【关键词】 卵巢肿瘤;半胱氨酸内肽酶类;肿瘤转移;抗药性,肿瘤;半胱氨酸蛋白酶 L

Research Progress of Cathepsin L in Ovarian Cancer LIU Li, WANG Xi-peng. Department of Gynecology, Affiliated First Maternity and Infant Hospital of Tongji University, Shanghai 201204, China (LIU Li); Department of Gynecology and Obstetrics, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University Shanghai 200092, China (WANG Xi-peng)

Corresponding author: WANG Xi-peng, E-mail: xipengwang@hotmail.com

【Abstract】 The early detection rate of ovarian cancer is low, and more than 70 percentages of patients are diagnosed at advanced stages. The prognosis is too poor because of widespread metastasis and chemoresistance. Cathepsin L (CTSL) is an important member of cathepsin family, distributing intracellularly and extracellularly and participating in the degradation of diverse proteins. CTSL is overexpressed in a variety of malignant tumor tissues and the level of CTSL is high in ovarian cancer tissues and the serum of patients. CTSL can promote the growth, metastasis, chemoresistance and angiogenesis of ovarian cancer. Serum CTSL level is helpful in the diagnosis of ovarian cancer in combination with other biological markers. On the other hand, experimental researches have revealed that targeting CTSL is effective to control the progression of ovarian cancer. Therefore, investigating the role of CTSL in the progression of ovarian cancer more deeply is promising to supply more clues for the diagnosis and therapy of ovarian cancer, and here we will review the progression in this area.

【Keywords】 Ovarian neoplasms; Cysteine endopeptidases; Neoplasm metastasis; Drug resistance, neoplasm; Cathepsin L

(J Int Obstet Gynecol, 2018, 45:310-313)

卵巢癌是预后最差的妇科恶性肿瘤,根据美国癌症统计学分析结果,2017 年美国可能有 14 080 名女性死于卵巢癌,卵巢癌在女性癌症相关的死亡原因中居于第 5 位^[1]。然而,卵巢癌的发生发展机制目前还不是十分清楚。半胱氨酸蛋白酶 L(cathepsin L, CTSL) 是一种广泛分布于细胞内外的蛋白水解酶,可催化多种蛋白质的降解,其在卵巢癌中的过度表达与其生长、转移、耐药、血管生成等恶性生物学行为密切相关,且以 CTSL 为标记和靶点的诊治方法的研究已见报道,现对相关的研究进展作一综述。

1 半胱氨酸蛋白酶(cathepsin, CTS)

CTS 也称组织蛋白酶,是包括金属蛋白酶、丝氨酸蛋白酶、天门冬氨酸蛋白酶和苏氨酸蛋白酶在内的五类蛋白酶中的一类^[2]。CTS 家族含有 11 个成员: B, C, F, H, K, L, O, S, V, W 和 X/Z, 其含有 3 个共用的由半胱氨酸和赖氨酸组成的保守的活性位点和 3 个底物结合位点^[2-3]。多数 CTS 以无活性的前体形式存在,在酸性环境条件下自溶激活或通过肽链内切酶激活^[4]。近年发现 CTS 的表达水平失调与多种疾病的发生和进展有关,引起了学者们的关注^[4-5]。

2 CTSL

CTSL 是 CTS 家族的一个重要成员,其前体翻译形成后,在内质网中被加工成为双链结构,随后在高尔基体加工为前体,由 6-磷酸甘露糖途径转运到核内体和溶酶体后加工为成熟的 CTSL^[4]。1, 10-二氮

基金项目:国家自然科学基金(81072136, 81372787);上海市市级医疗卫生学科建设项目(2017ZZ020)

作者单位:201204 上海,同济大学附属第一妇婴保健院妇科(刘丽);上海交通大学附属新华医院妇产科(汪希鹏)

通信作者:汪希鹏, E-mail: xipengwang@hotmail.com

[△]审校者

杂菲和抑肽素可部分抑制 CTSL 酶原的加工成熟,溶酶体中 CTSL 的激活受到金属蛋白酶或 CTSD 等蛋白酶的调节,当 pH 值为 3 时也可由 CTSL 本身催化激活^[6]。溶酶体中的酸性环境可促进蛋白水解酶激活,此外,在肿瘤微环境中由于无氧糖酵解引起的局部酸性环境,也可促进细胞外 CTSL 的激活^[4]。

CTSL 可通过催化细胞内外多种蛋白的水解参与机体的免疫稳态、血管保护等生理现象的调控,而其表达水平失调与帕金森病、早发性痴呆等疾病有关。Adams-Cioaba 等^[7]曾报道 CTSL 失活突变体-组蛋白 H3 肽段复合体的三维晶体结构,为 CTSL 与底物的结合提供了直接的证据。Hou 等^[8]发现 CD4⁺T 细胞中一种由 CTSL 和丝氨酸抑制蛋白 B1、天冬酰胺内肽酶组成的复合物可促进该细胞向 Th17 细胞分化,调节 CD4⁺T 细胞参与的免疫反应^[8]。CTSL 表达受抑制的血管细胞中的线粒体氧化磷酸化复合物 I、III、IV 表达水平下降,致使线粒体中的活性氧聚集和线粒体膜的过度极化,最终发生血管疾病,因此 CTSL 对于血管保护具有重要作用^[9]。Li 等^[10]在使用 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 构建帕金森病模型时发现,受 6-OHDA 作用的神经母细胞瘤的细胞核中 CTSL 增多,并上调自噬相关的蛋白轻链 3-II 蛋白和 P62 蛋白的表达,诱发帕金森病。Lee 等^[11]发现与前体颗粒蛋白 (progranulin, PGRN) 共同分布于神经元溶酶体中的 CTSL 可催化 PGRN 降解为多颗粒体蛋白和颗粒体蛋白碎片,导致额颞叶变性,诱导早发性痴呆发生。

3 CTSL 与肿瘤

研究表明,CTSL 在肺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中的表达水平显著增高,促进肿瘤细胞的增殖、侵袭、迁移、耐药及血管生成等恶性生物学行为。非小细胞肺癌组织中的 CTSL 表达水平较正常组织高,表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂 (epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitors, EGFR-TKI) 耐药的肺癌 PC-9/GR 细胞株中 CTSL 表达水平较 EGFR-TKI 敏感的 PC-9 细胞株高。而使用短发夹结构敲低 PC-9/GR 细胞的 CTSL 基因可使其增殖能力下降,相反凋亡现象增强^[12]。Yu 等^[13]发现胃癌细胞中过度表达的转录因子叉形头转录因子 O3a (Forkhead box O3a, FOXO3a) 可通过增加 CTSL 启动子激活,抑制钙黏附蛋白 E (E-cadherin) 的表达,促进胃癌细胞上皮间质转化,最终促进胃癌细胞的侵袭和转移。最后,使用 CTSL 的抑

制剂 KGP94 或短发夹结构对乳腺癌细胞的 CTSL 进行抑制可使肿瘤模型形成血管的能力下降,伴随与内皮细胞的细胞周期相关的 2 959 个基因发生显著改变,提示 CTSL 参与肿瘤中的血管生成^[14]。

有学者在探索 CTSL 抑制在抑制肿瘤进展中的作用时发现,CTSL 抑制剂 Z-FY-CHO 或短发夹结构抑制胶质瘤细胞中的 CTSL,可通过增加放射线诱导的 DNA 损伤使细胞停滞在 G2/M 期,同时通过上调 *Bax* 和 *Bcl-2* 基因的表达促进胶质瘤细胞凋亡^[15]。Lu 等^[16]则发现以 CTSL 为靶点的外源性微小 RNA-152 (miRNA-152) 可有效抑制消化道间质肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

4 CTSL 与卵巢癌

近年 CTS 在卵巢癌发生发展中的作用也备受关注^[16,17],其中 CTSL 异常高表达同样被证明与卵巢癌细胞的恶性生物学行为密切相关。为观察 CTSL 对卵巢癌细胞增殖能力的影响,有研究者使用携带 CTSL 的质粒对 OV-90 卵巢癌细胞的 CTSL 进行过表达后其增殖能力增强,而使用短发夹结构抑制 CTSL 的表达后其体外增殖能力和在小鼠体内形成的肿瘤的生长均受到抑制。在机制方面,研究显示 CTSL 主要通过影响丝裂原活化蛋白激酶、RAF 蛋白激酶和细胞外信号调节蛋白激酶等增殖相关蛋白的磷酸化调节卵巢癌细胞的增殖能力^[18]。Zhang 等^[19]的研究表明卵巢癌组织中的 CTSL 水平较良性肿瘤升高,并与肝转移、网膜转移和淋巴转移均有关,对 CTSL 进行过表达后,上皮性卵巢癌细胞系 HO8910 和 A2780 细胞的迁移和侵袭能力均增强,而 Sui 等^[20]对 SKOV3 卵巢癌细胞的 CTSL 进行抑制后发现其迁移和侵袭能力下降。然而,两项研究均未对 CTSL 下游信号通路进行探讨。根据目前的报道,CTSL 促进肿瘤侵袭和转移的主要机制为释放到细胞外的 CTSL 可降解蛋白聚糖、蛋白多糖、弹力蛋白、层黏连蛋白、纤连蛋白以及 I、II、IX 和 XI 型胶原等细胞外基质中的蛋白,伴随 E-cadherin 的降解,导致细胞与细胞之间的黏附减少^[2,4,21]。不可忽略的是,细胞外基质的降解可诱导生长因子的释放,从而促进卵巢癌细胞的侵袭和迁移^[2]。

当肿瘤的直径达到 1~2 mm 时,需要血管生成以支持其生长^[2],CTSL 促进卵巢癌微环境中的血管生成。上皮性卵巢癌患者网膜内皮细胞中 CTSL 的表达水平高于卵巢良性肿瘤患者的网膜内皮细胞^[22]。卵巢癌细胞可分泌 CTSL 作用于网膜微血管内

皮细胞诱导其形成小管结构并增强其迁移能力,肝细胞生长因子和胰岛素样生长因子结合蛋白-7 作用后也可观察到相同的结果,但对于三者之间作用的关系未进行阐明^[23]。化疗耐药仍是影响卵巢癌预后的主要因素之一,耐药可使肿瘤细胞的无限制增殖,并增加卵巢癌向其他器官转移的风险。L'Espérance 等^[24]曾对接受新辅助化疗前后的卵巢癌组织进行 DNA 芯片的比较,发现接受辅助化疗后 121 个基因显著上调,54 个基因显著下调,其中 CTSL 为显著上调的基因之一。Sui 等^[20]的研究同样显示紫杉醇耐药的卵巢癌细胞株 SKOV3/TAX 中 CTSL 表达水平较紫杉醇敏感株高。而使用短发夹^[22]结构敲低 CTSL 后紫杉醇诱导的肿瘤细胞凋亡增加,Zhang 等^[25]的研究结果支持该结论。

5 CTSL 在卵巢癌诊治中的应用

有学者利用 CTSL 在卵巢癌中特异性高表达、在酸性肿瘤微环境中被激活的特性,研究了其在卵巢癌诊治中的应用,取得了较好的进展。早在 1995 年,就有学者发现卵巢癌患者的血清 CTSL 水平较良性卵巢肿瘤患者高,将其用于卵巢癌的诊断敏感度和特异度分别为 80% 和 85%,与 CA125 和 CA72-4 相比,其假阳性率较低^[26]。Lv 等^[27]发现卵巢癌患者血清中佛波脂蛋白、卵巢癌抗原 X1 蛋白和 CTSL 的含量均比良性卵巢上皮肿瘤患者高,可将其联合用于卵巢癌的诊断。Zhang 等^[28]发现卵巢恶性肿瘤患者血清中的 CTSL 与基质金属蛋白酶-9,乙酰肝素酶联合应用于卵巢癌诊断的敏感度和特异度分别是 84.6% 和 82.1%。该研究还发现上皮性卵巢肿瘤患者血浆 CTSL 水平较非上皮性卵巢肿瘤者高。最后,基于卵巢癌细胞中特异性高表达的 CTSL 和 CTSB, Fujii 等^[29]设计了针对两种蛋白的探针 Z-Phe-Arg-HMRG 和 Z-Arg-Arg-HMRG,其在肿瘤酸性微环境中与 CTS 发生作用后可散发出荧光,利用该原理,可特异性显影 SHIN-3, SKOV-3 和 OVCAR-3 卵巢癌细胞,并通过体内实验证明其可观察到直径最小为 0.5 mm 的 SKOV3 细胞形成的卵巢癌病灶。

目前已有体外实验表明抑制 CTSL 可抑制卵巢癌细胞的增殖并增强其对紫杉醇的敏感性,提示 CTSL 可作为卵巢癌治疗的靶点^[18, 20]。Ueki 等^[30]利用卵巢癌高表达 CTSL 和组蛋白去乙酰酶的特征设计出含有嘌呤霉素(PTM)的复合物,该复合物可被以上两种酶激活,嘌呤霉素可保持杀伤卵巢癌细胞的能力,因此可通过使嘌呤霉素在肿瘤所在部位释放从而增强

其特异性抗肿瘤的效果。然而,目前还未见 CTSL 抑制在肿瘤临床治疗中应用的报道。

6 小结与展望

卵巢癌是致死率最高的妇科恶性肿瘤,由于早期发现卵巢癌非常困难,多数患者诊断时已为进展期,而晚期卵巢癌由于转移和耐药,其 5 年生存率极低,因此早期诊断以及发现新的治疗靶点对于改善卵巢癌预后尤为重要。CTSL 在卵巢癌中的表达水平异常增高并释放至外周血,目前的研究已提示其在促进卵巢癌的恶性生物学行为中可能扮演着重要角色,且对卵巢癌的诊治具有潜在的应用价值,但目前的研究仍存在以下不足:①目前的研究多停留在 CTSL 对卵巢癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭能力等的现象研究上,较少深入地对下游信号通路的改变和分子机制进行研究,而开展相关的研究可为开发更精准的以 CTSL 相关的通路为靶点的卵巢癌的靶向治疗方案提供依据。目前在其他肿瘤中已发现,CTSL 可通过与 *FOXO3a*、*E-cadherin* 等基因相互作用促进肿瘤的进展,而在卵巢癌细胞中是否存在相同的机制尚需进行进一步研究;②血清 CTSL 在卵巢癌诊断中的应用尚缺乏大样本的研究,同时其单独使用和与 CA125 等血清标志物联合应用的特异度、敏感度、假阳性率、假阴性率均需要进行更多更大样本量的研究进行比较分析;③尽管体内外实验均表明 CTSL 抑制对于抑制卵巢癌发展和逆转耐药均具有一定的效果,但由于 CTSL 在机体内的分布广泛,并参与正常细胞发育等众多的生理功能,尚需要解决其在体内特异性控制卵巢癌发展的问题。近年大量的研究表明非编码 RNA [主要包括 miRNA,长链非编码 RNA(lncRNA)和环状 RNA(circRNA)]在编码基因表达的调控中发挥着重要作用,其在 CTSL 表达调控中的作用却极少见报道,探索 CTSL 相关并在卵巢癌中表达水平发生特异性改变的非编码 RNA 在卵巢癌中的作用,可为卵巢癌的治疗提供更多精准的靶点。

参 考 文 献

- [1] Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3): 177-193.
- [2] Lankelma JM, Voorend DM, Barwari T, et al. Cathepsin L, target in cancer treatment? [J]. Life Sci, 2010, 86(7/8): 225-233.
- [3] Kramer L, Turk D, Turk B. The Future of Cysteine Cathepsins in Disease Management[J]. Trends Pharmacol Sci, 2017, 38(10): 873-898.

- [4] Fonović M, Turk B. Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(8):2560–2570.
- [5] Chen S, Dong H, Yang S, et al. Cathepsins in digestive cancers[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(25):41690–41700.
- [6] Pranjol MZ, Gutowski N, Hannemann M, et al. The Potential Role of the Proteases Cathepsin D and Cathepsin L in the Progression and Metastasis of Epithelial Ovarian Cancer [J]. *Biomolecules*, 2015, 5(4):3260–3279.
- [7] Adams-Cioaba MA, Krupa JC, Xu C, et al. Structural basis for the recognition and cleavage of histone H3 by cathepsin L [J]. *Nat Commun*, 2011, 2:197.
- [8] Hou L, Cooley J, Swanson R, et al. The protease cathepsin L regulates Th17 cell differentiation [J]. *J Autoimmun*, 2015, 65:56–63.
- [9] Fu GX, Chen AF, Xu QM, et al. Cathepsin L deficiency results in reactive oxygen species (ROS) accumulation and vascular cells activation[J]. *Free Radic Res*, 2017, 51(11/12):932–942.
- [10] Li L, Gao L, Song Y, et al. Activated cathepsin L is associated with the switch from autophagy to apoptotic death of SH-SY5Y cells exposed to 6-hydroxydopamine [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470(3):579–585.
- [11] Lee CW, Stankowski JN, Chew J, et al. The lysosomal protein cathepsin L is a progranulin protease[J]. *Mol Neurodegener*, 2017, 12(1):55.
- [12] Cui F, Wang W, Wu D, et al. Overexpression of Cathepsin L is associated with gefitinib resistance in non-small cell lung cancer[J]. *Clin Transl Oncol*, 2016, 18(7):722–727.
- [13] Yu S, Yu Y, Zhang W, et al. FOXO3a promotes gastric cancer cell migration and invasion through the induction of cathepsin L [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23):34773–34784.
- [14] Sudhan DR, Rabaglino MB, Wood CE, et al. Cathepsin L in tumor angiogenesis and its therapeutic intervention by the small molecule inhibitor KGP94[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2016, 33(5):461–473.
- [15] Zhang QQ, Wang WJ, Li J, et al. Cathepsin L suppression increases the radiosensitivity of human glioma U251 cells via G2/M cell cycle arrest and DNA damage[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(9):1113–1125.
- [16] Lu HJ, Yan J, Jin PY, et al. MicroRNA-152 inhibits tumor cell growth while inducing apoptosis via the transcriptional repression of cathepsin L in gastrointestinal stromal tumor [J]. *Cancer Biomark*, 2018, 21(3):711–722.
- [17] Fan X, Wang C, Song X, et al. Elevated Cathepsin K potentiates metastasis of epithelial ovarian cancer [J]. *Histol Histopathol*, 2018, Jan 5. [Epub ahead of print].
- [18] Zhang L, Wei L, Shen G, et al. Cathepsin L is involved in proliferation and invasion of ovarian cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(1):468–474.
- [19] Zhang W, Wang S, Wang Q, et al. Overexpression of cysteine cathepsin L is a marker of invasion and metastasis in ovarian cancer [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(3):1334–1342.
- [20] Sui H, Shi C, Yan Z, et al. Overexpression of Cathepsin L is associated with chemoresistance and invasion of epithelial ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29):45995–46001.
- [21] Gocheva V, Joyce JA. Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion[J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(1):60–64.
- [22] Winiarski BK, Cope N, Alexander M, et al. Clinical Relevance of Increased Endothelial and Mesothelial Expression of Proangiogenic Proteases and VEGFA in the Omentum of Patients with Metastatic Ovarian High-Grade Serous Carcinoma [J]. *Transl Oncol*, 2014, 7(2):267–276.e4.
- [23] Winiarski BK, Wolanska KI, Rai S, et al. Epithelial ovarian cancer-induced angiogenic phenotype of human omental microvascular endothelial cells may occur independently of VEGF signaling [J]. *Transl Oncol*, 2013, 6(6):703–714.
- [24] L'Espérance S, Popa I, Bachvarova M, et al. Gene expression profiling of paired ovarian tumors obtained prior to and following adjuvant chemotherapy: molecular signatures of chemoresistant tumors[J]. *Int J Oncol*, 2006, 29(1):5–24.
- [25] Zhang H, Zhang L, Wei L, et al. Knockdown of cathepsin L sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11(6):4235–4239.
- [26] Nishida Y, Kohno K, Kawamata T, et al. Increased cathepsin L levels in serum in some patients with ovarian cancer: comparison with CA125 and CA72-4[J]. *Gynecol Oncol*, 1995, 56(3):357–361.
- [27] Lv XL, Zhu Y, Liu JW, et al. The application value of the detection of the level of tissue polypeptide antigen, ovarian cancer antigen X1, cathepsin L and CA125 on the diagnosis of epithelial ovarian cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(24):5113–5116.
- [28] Zhang W, Yang HC, Wang Q, et al. Clinical value of combined detection of serum matrix metalloproteinase-9, heparanase, and cathepsin for determining ovarian cancer invasion and metastasis[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(10):3423–3428.
- [29] Fujii T, Kamiya M, Urano Y. In vivo imaging of intraperitoneally disseminated tumors in model mice by using activatable fluorescent small-molecular probes for activity of cathepsins [J]. *Bioconjug Chem*, 2014, 25(10):1838–1846.
- [30] Ueki N, Wang W, Swenson C, et al. Synthesis and Preclinical Evaluation of a Highly Improved Anticancer Prodrug Activated by Histone Deacetylases and Cathepsin L[J]. *Theranostics*, 2016, 6(6):808–816.

(收稿日期:2017-10-20)

[本文编辑 王琳]