



段树民 院士
教授, 博士生导师

DUAN Shu-min
Academician
Professor, Doctoral Supervisor

段树民, 1982年蚌埠医学院医疗系本科毕业, 1991年在日本九州大学获博士学位。1996至1999先后在美国夏威夷大学、加州大学旧金山分校做博士后研究。2000年1月至2009年12月在中国科学院神经科学研究所先后任研究员、神经科学国家重点实验室主任和副所长。2010年全职任职于浙江大学,任医学部主任、教授。

在神经信号传递及神经元-胶质细胞相互作用研究领域做出了系统的创新工作,形成了自己的研究特色,在Science、Cell、Nature Neurosci等国际著名杂志发表系列研究论文,促进了人们对神经胶质细胞新功能的认识。2007年增选为中国科学院院士,2008年获何梁何利科学与技术进步奖,2010年获国家自然科学二等奖。中国神经科学学会理事长,国际脑研究组织常务理事,全国政协委员,中国神经科学学会会刊《Neurosci Bull》主编,先后担任《Glia》等多个重要国际杂志编委。

[文章编号] 1000-2200(2018)10-1266-09

· 述 评 ·

溶酶体水解酶 Cathepsin D 的细胞生物学功能

刘悻君,段树民

[关键词] Cathepsin D;细胞生物学;述评

[中图分类号] Q 556 [文献标志码] A DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2018.10.002

Cathepsin 是一类广泛存在于真核细胞中的蛋白酶类,目前已经发现的 Cathepsin 家族成员有近 20 种。大部分的 Cathepsin 家族成员定位于溶酶体类酸性囊泡,同时依赖酸性 pH 环境发挥酶催化活性。该家族成员根据酶活性中心的不同氨基酸残基以及催化底物差异,可以分为:(1)半胱氨酸组织蛋白酶,包括 Cathepsin B, Cathepsin C, Cathepsin H, Cathepsin F, Cathepsin K, Cathepsin L, Cathepsin O, Cathepsin S, Cathepsin V, Cathepsin X, Cathepsin W;(2)天冬氨酸组织蛋白酶,包括 Cathepsin D, Cathepsin E;(3)丝氨酸组织蛋白酶,包括 Cathepsin A,

Cathepsin G。其中,Cathepsin D 属于天冬氨酸蛋白酶的胃蛋白酶家族,占溶酶体内蛋白酶的 11%,占全脑酸性蛋白酶的 90%,是 Cathepsin 家族中重要一员^[1-2]。由于 Cathepsin D 能够在多种生理或病理过程中发挥重要作用,近年来日益受到关注。

1 Cathepsin D 的合成和成熟过程

Cathepsin D 是一种可溶性的肽链内切酶,在粗面内质网(rough endoplasmic reticulum, RER)中被合成最初的前-前体酶原形式, pre-pro-Cathepsin D。人类细胞中, pre-pro-Cathepsin D 共有 412 个氨基酸, N 末端带有 20 个氨基酸的分泌信号肽。该信号肽在 Cathepsin D 被转运出内质网时被剪切,形成相对分子质量 52 000 的 pro-Cathepsin D。pre-pro-Cathepsin D 第 134 和 263 位点的天冬氨酸残基上,有

[收稿日期] 2018-09-14

[作者单位] 浙江大学医学院,浙江杭州 310000

[作者简介] 刘悻君(1982-),女,讲师。

[通信作者] 段树民,中国科学院院士,博士研究生导师,教授。

两个糖基化位点,在剪切掉信号肽的同时,这两个糖基化位点被氨基糖基化修饰,形成糖基化-Cathepsin D。随后,糖基化-Cathepsin D 被转运至高尔基体^[3]。这两个糖基化位点在折叠的 pre-pro-Cathepsin D 表面相隔甚远,因此,存在被同时糖基化或被分别单个糖基化的情况。目前的研究认为,单个糖基化或双糖基化并不影响 Cathepsin D 的蛋白折叠或活化过程。但对于 Cathepsin D 向溶酶体系统囊泡的转运过程来说,糖基化修饰是必要条件,只有糖基化修饰后的 Cathepsin D 才能被正确转运^[4]。

Cathepsin D 到达高尔基体后,糖基化-Cathepsin D 被再次共价修饰。该过程中,第 6 位的甘露糖位点被进一步磷酸化,形成甘露糖-6-磷酸基团 (mannose-6-phosphate group, M-6-P 基团)。该 M-6-P 基团能够被高尔基体内的阳离子非依赖的甘露糖-6-磷酸受体 (cation-independent mannose-6-phosphate receptor, CI-M6PR) 所识别。在 CI-M6PR 的帮助下, pro-Cathepsin D 被包装、分选、运输,并进入晚期内吞体^[5]。此外,阳离子依赖型的甘露糖-6-磷酸受体

(cation-dependent mannose-6-phosphate receptor, CD-M6PR) 也参与了 Cathepsin D 从高尔基体到内吞体的转运过程^[6]。此外, pro-Cathepsin D 还能通过结合 pro-saponin、sortilin 受体等分子,通过非 M-6-P 依赖通路运输到晚期内吞体^[7-8]。

内质网合成 pre-pro-cathepsin D 蛋白,其 N 端带有约相对分子质量 4 000 的信号肽 (signal peptide, S) 及蛋白前体片段 (propeptide, P)。pre-pro-cathepsin D 在转运至高尔基体后,信号肽 S 被剪切,形成约相对分子质量 52 000 的 pro-cathepsin D。同时, Asn70 和 Asn199 两个糖基化位点被进一步磷酸化修饰,形成 M-6-P 基团,被 M6PR 受体识别并转运至晚期内吞体,并去除前体片段 P,形成相对分子质量 48 000 中间体。随着囊泡成熟,晚期内吞体逐步酸化,中间体 Cathepsin D 被进一步剪切,暴露其蛋白水解关键位点 Asp33 和 Asp231,最终形成具有相对分子质量 14 000 轻链和 34 000 重链的成熟 Cathepsin D (见图 1)。

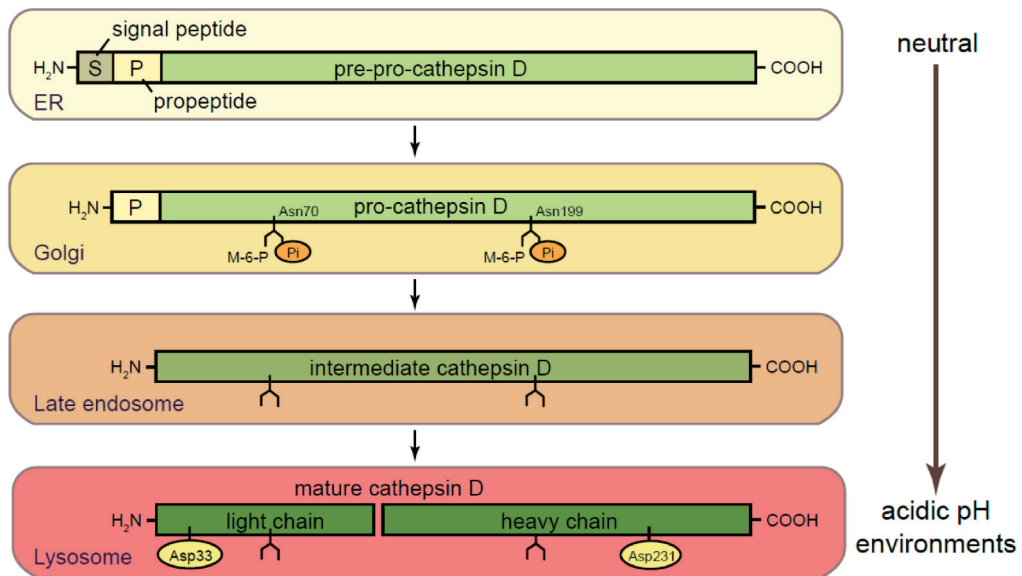


图1 人源Cathepsin D蛋白的剪切和成熟过程

虽然晚期内吞体和溶酶体之间没有非常清楚的界限标志,但目前公认这两类囊泡的 pH 具有一定差异^[9-10]。晚期内吞体的 pH 大约 5.0 ~ 5.5,溶酶体内 pH 则更低^[9]。到达内吞体后的 pro-Cathepsin D 经过多种蛋白水解酶类的进一步加工,从 M-6-P 受体上解离并脱去除磷酸基团,最终经过剪切形成 Cathepsin D 成熟体^[11-12]。其中,最先发生的蛋白水解过程是 pro-Cathepsin D 的 44 个氨基酸前体肽的去除,产生相对分子质量 48 000 的中间体单链,

该过程确保了蛋白后续的正常折叠、激活和运输^[11,13]。随着溶酶体成熟过程中囊泡内 pH 的持续降低,相对分子质量 48 000 的中间体单链进一步经过 Cathepsin B 和 Cathepsin L 等蛋白水解酶剪切,最终产生成熟 Cathepsin D。成熟 Cathepsin D 包括一条位于 N 端的相对分子质量 14 000 的轻链和一条位于 C 端的相对分子质量 34 000 的重链,两条链之间借疏水作用相互关联^[14-15]。

在成熟的过程中, Cathepsin D 重链和轻链之间

的特定区域被去除 7 个氨基酸残基,形成具有蛋白水解酶活性的 Cathepsin D 成熟结构^[16]。因此,有假说认为,pro-Cathepsin D 表面可能由于这些氨基酸构成一种 β 折叠结构,而这一结构可能具有特殊的功能。而另一些实验则表明,用无关的序列取代 Cathepsin D 的该 β 折叠结构,并不影响 Cathepsin D 向溶酶体的正常转运和最终的酶活性。但 β 折叠结构被替代后的 Cathepsin D 无法被识别并剪切,导致最终形成的 Cathepsin D 呈现稳定的单链结构^[17-18]。因此可以推断,轻链和重链之间的 β 折叠结构可能是产生 Cathepsin D 双链被识别的重要结构,但该结构并不参与影响蛋白水解酶活性。该 β 折叠结构是否还具有其他功能,有待于进一步研究。

2 Cathepsin D 的蛋白结构

Cathepsin D 广泛存在于多种真核细胞,不同物种的 Cathepsin D 序列相对保守。人源 Cathepsin D 与羊 Cathepsin D 蛋白序列具有 85% 的相似度,与小鼠 Cathepsin D 具有 79% 相似度^[19]。以人源性 Cathepsin D 蛋白为例,其催化位点含有两个关键的天冬氨酸残基,分别位于轻链上第 33 和重链上的第 231 位^[20]。与肾素(rennin)、凝乳酶(chymosin)、胃蛋白酶原(pepsinogen)等其他天冬氨酸蛋白酶类似,成熟的 Cathepsin D 具有双亚基结构,主要由 β 片层和一个长且深的活性中心裂缝构成。Cathepsin D 的每一个亚基都带有一个关键的活性部位的天冬氨酸残基^[20]。目前认为,这些天冬氨酸残基决定了水分子的结合位置,并参与激活水分子、转移底物 H^+ ,随后水解底物的肽键^[21]。一些研究表明,仅仅突变两个天冬氨酸活性位点之一并不足以使酶失活,也不影响蛋白水解过程^[20]。此外,无论是否与抑制剂 pepstatin 结合,成熟 Cathepsin D 与其他天冬氨酸蛋白酶家族成员具有高度相似的晶体构象^[21-23]。提示 Cathepsin D 的蛋白水解酶活性可能受到更多的精细调控,以保证该水解酶在溶酶体内正常发挥蛋白降解作用。

值得注意的是,Cathepsin D 的蛋白结构受到多种因素的调控,并且因此影响其蛋白酶活性。研究发现,Cathepsin D 在不同 pH 环境下,其晶体结构具有显著差异。Cathepsin D 处于 pH 7.5 的环境中时,其 N 末端链发生大约 30 Å 的位移,并出现在 pro-Cathepsin D 的 β 折叠结构位置,这种位移导致

其 N 端插入 Cathepsin D 的活性中心裂缝中,并阻碍底物进入其活性中心。此外,在重链上的 Glu 5、Glu 180、Asp 187 等位点,还可能存在离子依赖的调控方式,其具体机制有待进一步阐明^[23]。

3 Cathepsin D 的表达水平和催化活性在正常细胞中受严格控制

随着胚胎发育,所有组织中 Cathepsin D 表达水平逐渐升高,提示溶酶体系统随着发育阶段逐步成熟并参与调控发育进程^[8]。Cathepsin D 表达水平或者催化活性降低可能导致严重的神经系统功能紊乱和神经退行性疾病。针对 Cathepsin D 缺失动物的研究表明,Cathepsin D 功能缺失小鼠出生后 3 周左右出现癫痫样痉挛、视觉退化、肠道坏死等表型,并在出生后 24 d 左右死亡,其脑内神经元中出现大量蜡样脂褐质聚积,并伴随视网膜和中枢神经系统神经退行性病变,以及自噬空泡的聚积^[24-27]。Cathepsin D 缺失果蝇也出现神经元蜡样脂褐质沉积症^[28]。在人类以及狗、羊等其他哺乳动物中,先天性 Cathepsin D 表达下降和/或无活性蛋白产生的 Cathepsin D 突变同样引起典型的神经元蜡样脂褐质沉积症^[19,29-31]。此外,也有研究显示 Cathepsin D 缺陷与帕金森病可能存在相关性^[32]。这些证据均提示,Cathepsin D 的蛋白表达水平降低可能导致严重的细胞功能和系统功能障碍。

另一方面,Cathepsin D 蛋白表达水平升高则可能与一些致死性疾病相关。例如,心脏 Cathepsin D 表达和活性的增加诱发心力衰竭,这可能是由于 Cathepsin D 水解产生一种调节产后心肌病的相对分子质量 16 000 催乳素^[33]。此外,孤独症病人与健康人群相比,前额叶皮层、海马、小脑等多个脑区的 Cathepsin D 蛋白表达水平异常升高,提示 thepsin D 水平可能与孤独症发病具有一定相关性^[34]。这些证据提示,Cathepsin D 的表达和活性在细胞中受到精确严格调控,Cathepsin D 蛋白表达水平或酶活性异常都可能导致严重的溶酶体相关病变。

4 Cathepsin D 的生理功能

与其他天冬氨酸蛋白酶分子相似,Cathepsin D 作为典型的溶酶体蛋白水解酶,在酸性环境下可以对进入酶催化位点的底物蛋白或多肽进行结合和后续剪切。基于这一基本特性,Cathepsin D 能够降解溶酶体内多种外来抗原和自身的异常蛋白,并参与

胞内蛋白的降解后再回收^[35-38]。

依赖其蛋白水解酶活性, Cathepsin D 剪切激素、细胞因子、生长因子及其受体的前体肽, 去掉信号肽部分, 使这些蛋白或多肽最终得以活化。例如纤维母细胞生长因子、血纤维蛋白溶酶原、甲状腺球蛋白、白细胞介素-1、骨钙蛋白、催乳素等蛋白和多肽的激活均依赖 Cathepsin D 蛋白水解酶的功能进行加工而成熟^[38-42]。同时, Cathepsin D 可以剪切和消化主要组织相容性复合体 II 不可变链, 通过调节其水平影响抗原特异性的 Th1 和 Th2 型 CD4⁺ T 细胞的活化过程^[43-44]。此外, 通过对溶酶体内抗原物质的剪切和加工, Cathepsin D 参与抗原递呈^[45-47]。

5 Cathepsin D 与细胞凋亡

目前认为, Cathepsin D 同时参与抗凋亡和促凋亡通路, 可能具有双向调节作用。在 Cathepsin D 敲除小鼠的研究中发现, 小鼠缺失 Cathepsin D 导致胸腺和视网膜部位的细胞凋亡, 提示 Cathepsin D 可能在生理情况下具有抗凋亡作用^[24-26]。另有研究显示, 将 Cathepsin D 过表达的肿瘤细胞进行异体移植, 这部分移植后的肿瘤细胞凋亡水平明显较低^[48]。干扰或抑制 Cathepsin D, 会导致成神经瘤细胞对阿霉素的敏感性增高, 并诱发凋亡过程^[49]。这些工作提示, Cathepsin D 可能参与了细胞的抗凋亡通路。

另一方面, Cathepsin D 也参与细胞促凋亡通路的调节。胚胎发育时期, Cathepsin D 主要表达在细胞发生生理性死亡的区域^[50]。此外, 细胞发生凋亡时, 溶酶体膜通透性升高, Cathepsin D 被释放或转运至细胞质, 并作用促凋亡蛋白原 Bid, 促使 Bid 激活。Bid 被激活后成为有活性的促凋亡蛋白 tBid, 触发促凋亡蛋白 Bax 插入到线粒体膜上, 导致线粒体释放细胞色素 C (Cytochrome C, Cyt C)。Cyt C 进而激活下游 caspases9 和 caspase3, 从而诱导细胞凋亡^[51-56]。同时, 在炎症消退过程中, Cathepsin D 也可以通过激活 caspase 8, 引起嗜中性粒细胞等免疫细胞凋亡^[57-58]。另外, Cathepsin D 也可以通过其他非 caspases 依赖途径诱发细胞凋亡, 即不通过 Bid 的裂解, 直接激活 Bax, 导致线粒体释放凋亡诱导因子^[59-60]。另一些研究发现, 在一些特殊类型细胞发生凋亡时, 成熟 Cathepsin D 出现在细胞核中, 可能参与调节核酸内切酶的激活、调控基因转录^[61-62]。

6 Cathepsin D 在肿瘤细胞中的作用

在肿瘤组织中, Cathepsin D 在癌细胞和间质的巨噬细胞中的表达水平异常升高^[28]。因此, 对肿瘤细胞中 Cathepsin D 的功能进行研究, 有助于进一步了解 Cathepsin D 在生理和病理情况下的细胞生物学功能。针对 Cathepsin D 表达调控的研究发现, 肿瘤细胞系接受多种胞外信号分子, 如雌激素, 以及胰岛素样生长因子 (insulin-like growth factor, IGF) 1、EGF、胰岛素等生长因子的调节。这些信号分子激活细胞内下游通路后, 并且能够通过上调转录水平, 引起 Cathepsin D 蛋白水平升高^[63]。在肿瘤细胞系中过表达 Cathepsin D, 可能导致 Cathepsin D 在细胞中异常聚集, 并影响其蛋白水解能力。此外, 肿瘤细胞过表达的 Cathepsin D 能够以 pro-Cathepsin D 形式分泌到细胞外, 影响基质细胞功能, 参与细胞外基质成分的降解, 并组成和调节肿瘤细胞的微环境^[64]。

间质细胞可以通过分泌多种生长因子、细胞因子和蛋白酶等细胞外信号, 调节肿瘤生长和迁移, 并对肿瘤转移具有重要作用^[65-66]。以乳腺癌为例, 肿瘤细胞分泌 pro-Cathepsin D, 并被肿瘤细胞周围的成纤维细胞所摄取^[67]。这些 pro-Cathepsin D 刺激成纤维细胞生长, 并通过成纤维细胞释放的血管生成因子促进肿瘤血管再生, 促进肿瘤生长和迁移^[48,68]。

此外, 被分泌到胞外的 pro-Cathepsin D 能够被肿瘤细胞自身摄取, 发挥自分泌调控作用^[69-70]。肿瘤细胞内吞的 Cathepsin D 重新返回酸性的溶酶体系统囊泡中, 并可能通过灭活生长抑素, 促进肿瘤细胞快速生长^[71]。同时, 分泌至胞外的 pro-Cathepsin D 与 IGF2 竞争结合受体 M6P/IGF2R, 导致 IGF2 游离并与 IGF1 受体结合, 引起促有丝分裂的 IGF1 通路激活^[72-73]。一些研究^[70,74-75]提示, pro-Cathepsin D 的 N 段 (27~44 aa) 存在一段可能与一种未知的细胞表面受体发生相互作用的序列, 并在结合受体后发挥促肿瘤细胞有丝分裂功能。另外, 也有研究^[76]发现分泌至胞外的 pro-Cathepsin D 能够帮助碱性成纤维生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 等生长因子从细胞外基质上游离, 通过升高游离 bFGF 水平促进肿瘤细胞旁血管生成。

一些临床试验^[77-79]表明, 转移性肿瘤患者的血浆中, pro-Cathepsin D 水平显著升高。提示肿瘤细

胞的 pro-Cathepsin D 不仅被分泌至细胞外基质,并且能够进入循环系统。这些进入循环系统的 pro-Cathepsin D 发挥着怎样的作用目前尚不清楚,但目前血浆 pro-Cathepsin D 水平与肿瘤组织 Cathepsin D 水平一样,已经作为肿瘤转移和肿瘤浸润的重要预后评价指标被临床检验广泛应用^[80-81]。

7 Cathepsin D 非蛋白水解酶活性依赖的其他功能

与其他溶酶体半胱氨酸蛋白水解酶(如 Cathepsin B, Cathepsin L)相比, Cathepsin D 发挥蛋白水解酶活性需要更低的 pH 环境。内吞体-溶酶体囊泡以外的胞内环境和胞外环境中, pH 通常为中性甚至稍偏碱性。而 Cathepsin D 的成熟和蛋白水解酶活性均依赖于酸性 pH 环境^[11-12]。蛋白组学和细胞生物学方面的研究^[54,82-83]提示, Cathepsin D 不仅存在于合成及成熟相关的各类囊泡中,同样可能存在于胞外环境和胞质,甚至细胞核中。这些针对 Cathepsin D 的功能研究提示, Cathepsin D 可能在非酸性环境中发挥着非传统蛋白水解酶的作用。

我们前面提到 Cathepsin D 在细胞凋亡过程中的作用:凋亡细胞的 Cathepsin D 被从溶酶体内以相对分子质量 34 000 的活性形式释放至胞质,与 Bid、Bax 等凋亡因子结合后,触发下游信号并诱发线粒体功能障碍,开启 Caspases 介导的凋亡信号通路^[51-56]。其中, Cathepsin D 与 Bid、Bax 结合后,由于缺少蛋白酶活性依赖的酸性环境,无法对这些蛋白进行剪切。因此,细胞凋亡时,处于胞质内的成熟 Cathepsin D 如何与抗凋亡因子或促凋亡因子发生作用,并参与凋亡级联反应调节,其机制有待于进一步阐明。

另一些实验^[52,54,56,59,84]发现,使用 Cathepsin D 抑制剂 pepstatin A,仅能够部分抑制 IFN- γ 、TNF- α 、血清饥饿、氧化应激诱导的细胞凋亡。而其他研究表明,无酶催化活性的 Cathepsin D 与正常活性的 Cathepsin D 相比,这种对细胞凋亡的抑制效应并没有区别^[85-86]。将无蛋白酶活性的突变 pre-pro-Cathepsin D 微注射到细胞质中,同样能够引起细胞凋亡^[87]。同时,实验发现在细胞凋亡过程中,成熟 Cathepsin D 离开溶酶体系统囊泡,进入细胞核,并对一些基因的转录造成影响^[62]。这些研究共同提示,进入胞质或胞核的 Cathepsin D 可能并非依赖其酶催化活性参与凋亡调节过程。

肿瘤细胞分泌至胞外微环境的 pro-Cathepsin D,具有类似细胞因子的作用,通过旁分泌和自分泌

途径影响肿瘤细胞的增殖和转移^[65-66,69-70]。其中,有研究将缺失蛋白酶活性的 Cathepsin D 突变体 D231N 基因导入 Cathepsin D 缺失的细胞,发现缺失蛋白酶活性的 Cathepsin D 蛋白同样能够诱导肿瘤细胞发生迁移和侵袭。此外,缺失蛋白酶催化活性的 Cathepsin D 突变体与野生型 Cathepsin D 类似,具有促进成纤维细胞分裂的作用^[88]。这些证据提示, Cathepsin D 通过旁分泌和自分泌途径诱导细胞迁移以及细胞增殖的功能,同样也不依赖其蛋白水解酶活性^[89]。

内吞体及溶酶体中的成熟 Cathepsin D 在酸性环境中主要发挥蛋白水解作用,参与蛋白降解、生物大分子的活化及抗原递呈等过程。此外,各种成熟阶段的 Cathepsin D 可被内质网-高尔基体-内吞体或溶酶体释放至胞外,参与细胞外基质的修饰,并激活某些目前未知受体,参与细胞增殖、血管发生、肿瘤迁移及细胞代谢调节。同时, Cathepsin D 存在胞内释放现象,可通过激活 Bid-Bax 信号通路,促使线粒体细胞色素 C 和 apaf-1 释放,进而开启 Caspase 9-Caspase 3 相关的凋亡通路,调控细胞生存过程。此外,核内定位的 cathepsin D 可能通过激活核酸内切酶,促进细胞基因转录和后续蛋白翻译(见图 2)。

8 研究前景和展望

Cathepsin D 参与了多种生理和病理过程,是细胞和机体赖以维持正常运作的关键蛋白酶。Cathepsin D 缺失的哺乳动物神经系统发育异常,在出生后 2 周左右出现包括颤抖、惊厥和肌肉强直等在内的神经系统症状^[19,25]。随后,视觉系统、免疫系统和消化系统出现功能障碍,个体在出生后早期死亡^[24]。此外, Cathepsin D 与阿尔兹海默病、神经元蜡样脂褐质沉积病及癌症等多种人类疾病有着密切的关系。但目前为止, Cathepsin D 在各种疾病病程中发挥的作用及其分子机制目前尚不清楚,因此研究 Cathepsin D 在细胞和组织中的生理及病理功能对于人类疾病的诊断和治疗具有重要意义。

其中,阐明 Cathepsin D 及其结合蛋白的结构和调节方式,是开发特异性高、阻断效果好的 Cathepsin D 抑制剂和调控药物的关键问题。另外,由于不同形式的 Cathepsin D 在 pH 中性环境中,对于多种蛋白可能具有不同于传统认识的非蛋白水解酶功能。因此,针对 pH 调节的 Cathepsin D 功能方面的解析,可能会为针对 Cathepsin D 的研究提供理论基础和新的临床药物靶点。

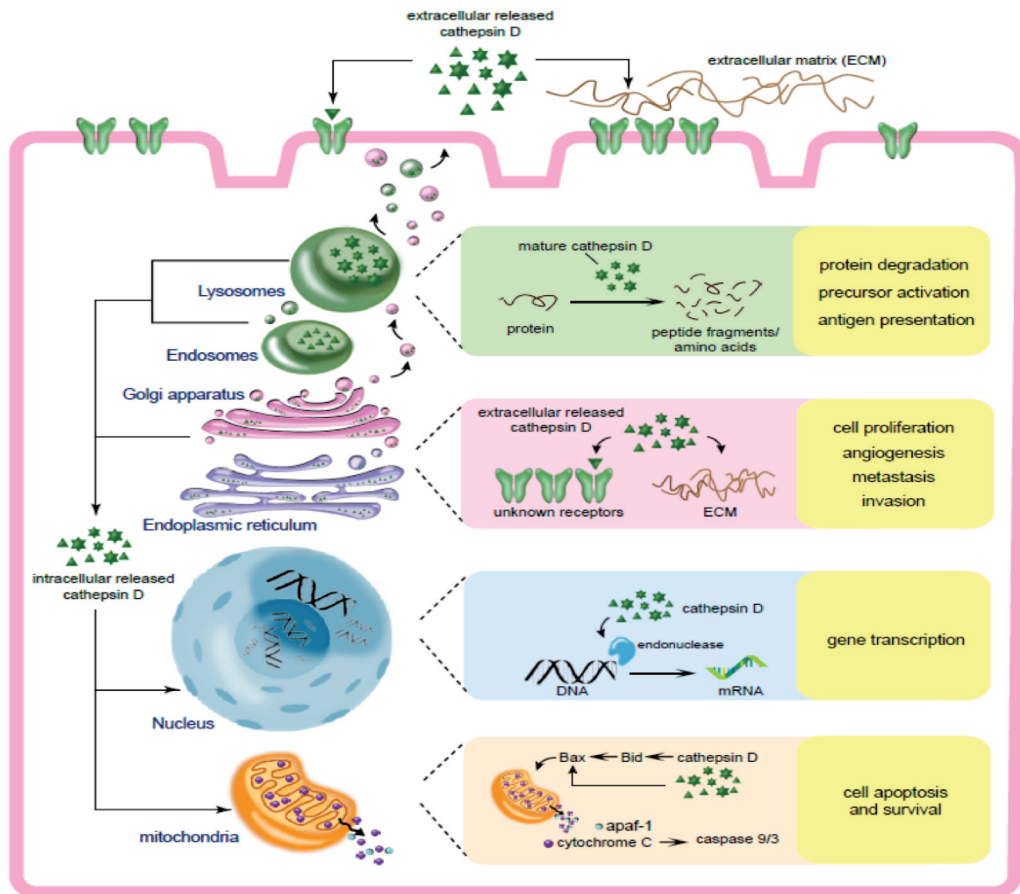


图2 Cathepsin D的细胞生物学功能

[参 考 文 献]

- [1] MARKS BN, LAJTHA A. Separation of acid and neutral proteinases of brain[J]. *Biochem J*, 1965, 97(1):74.
- [2] WHITAKER JN, RHODES RH. The distribution of cathepsin D in rat tissues determined by immunocytochemistry[J]. *Am J Anat*, 1983, 166(4):417.
- [3] GARCIA M, PLATET N, LIAUDET E, *et al.* Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer metastasis[J]. *Stem Cells*, 1996, 14:642.
- [4] FORTENBERRY SC, SCHOREY JS, CHIRGWIN JM. Role of glycosylation in the expression of human procathepsin D[J]. *J Cell Sci*, 1995, 108 (Pt 5):2001.
- [5] DRAGONETTI A. The lysosomal protease cathepsin D is efficiently sorted to and secreted from regulated secretory compartments in the rat basophilic/mast cell line RBL[J]. *J Cell Sci*, 2000, 113 (Pt 18):3289.
- [6] DAHMS NM, LOBEL P, KORNFELD S. Mannose 6-phosphate receptors and lysosomal enzyme targeting[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(21):12115.
- [7] GOPALAKRISHNAN MM, GROSCH HW, LOCATELLI-HOOPS S, *et al.* Purified recombinant human prosaposin forms oligomers that bind procathepsin D and affect its autoactivation[J]. *Biochem J*, 2004, 383 (Pt 3):507.
- [8] CANUEL M, KORKIDAKIS A, KONNYU K, *et al.* Sortilin mediates the lysosomal targeting of cathepsins D and H[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373(2):292.
- [9] AUBRY L, KLEIN G, MARTIEL JL, *et al.* Kinetics of endosomal pH evolution in *Dictyostelium discoideum* amoebae. Study by fluorescence spectroscopy[J]. *J Cell Sci*, 1993, 105 (Pt 3):861.
- [10] SORKIN A, VON ZASTROW M. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(8):600.
- [11] YASUDA Y, TSUKUBA T, OKAMOTO K, *et al.* The role of the cathepsin E propeptide in correct folding, maturation and sorting to the endosome[J]. *J Biochem*, 2005, 138(5):621.
- [12] BOWN DP, GATEHOUSE JA. Characterization of a digestive carboxypeptidase from the insect pest corn earworm (*Helicoverpa armigera*) with novel specificity towards C-terminal glutamate residues[J]. *Eur J Biochem*, 2004, 271:2000.
- [13] TAKESHIMA H, SAKAGUCHI M, MIHARA K, *et al.* Intracellular targeting of lysosomal cathepsin D in COS cells[J]. *J Biochem*, 1995, 118(5):981.
- [14] KOBAYASHI T, HONKE K, GASA S, *et al.* Proteolytic processing sites producing the mature form of human cathepsin D[J]. *Int J Biochem*, 1992, 24(9):1487.
- [15] LAURENT-MATHA V, DEROCQ D, PREBOIS C, *et al.* Processing of

- human cathepsin D is independent of its catalytic function and auto-activation; involvement of cathepsins L and B [J]. *J Biochem*, 2006, 139(3):363.
- [16] ERICKSON AH, BLOBEL G. Carboxyl-terminal proteolytic processing during biosynthesis of the lysosomal enzymes β -glucuronidase and cathepsin D [J]. *Biochemistry*, 1983, 22(22):5201.
- [17] FOLLO C, CASTINO R, NICOTRA G, *et al.* Folding, activity and targeting of mutated human cathepsin D that cannot be processed into the double-chain form [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39:638.
- [18] YONEZAWA S, TAKAHASHI T, WANG XJ, *et al.* Structures at the proteolytic processing region of cathepsin D [J]. *J Biol Chem*, 1988, 263(31):16504.
- [19] TYYNELÄ J, SOHAR I, SLEAT DE, *et al.* A mutation in the ovine cathepsin D gene causes a congenital lysosomal storage disease with profound neurodegeneration [J]. *EMBO J*, 2000, 19(12):2786.
- [20] Metcalf P, Fusek M. Two crystal structures for cathepsin D; the lysosomal targeting signal and active site [J]. *EMBO J*, 1993, 12(4):1293.
- [21] BALDWIN ET, BHAT TN, GULNIK S, *et al.* Crystal structures of native and inhibited forms of human cathepsin D; implications for lysosomal targeting and drug design [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(14):6796.
- [22] GOLDFARB NE, LAM MT, BOSE AK, *et al.* Electrostatic switches that mediate the pH-dependent conformational change of "short" recombinant human pseudocathepsin D [J]. *Biochemistry*, 2005, 44(48):15725.
- [23] LEE AY, GULNIK SV, ERICKSON JW. Conformational switching in an aspartic proteinase [J]. *Nat Struct Biol*, 1998, 5:866.
- [24] SAFTIG P, HETMAN M, SCHMAHL W, *et al.* Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells [J]. *EMBO J*, 1995, 14(15):3599.
- [25] KOIKE M, NAKANISHI H, SAFTIG P, *et al.* Cathepsin D deficiency induces lysosomal storage with ceroid lipofuscin in mouse CNS neurons [J]. *J Neurosci*, 2000, 20(18):6898.
- [26] KOIKE M, SHIBATA M, OHSAWA Y, *et al.* Involvement of two different cell death pathways in retinal atrophy of cathepsin D-deficient mice [J]. *Mol Cell Neurosci*, 2003, 22(2):146.
- [27] WALLS KC, KLOCKE BJ, SAFTIG P, *et al.* Altered regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling in cathepsin D-deficient brain [J]. *Autophagy*, 2007(3):222.
- [28] MYLLYKANGAS L, TYYNELÄ J, PAGE-MCCAW A, *et al.* Cathepsin D-deficient *Drosophila* recapitulate the key features of neuronal ceroid lipofuscinoses [J]. *Neurobiol Dis*, 2005, 19(1/2):194.
- [29] AWANO T, KATZ ML, O'BRIEN DP, *et al.* A mutation in the cathepsin D gene (CTSD) in American Bulldogs with neuronal ceroid lipofuscinosis [J]. *Mol Genet Metab*, 87(4):341.
- [30] SIINTOLA E, PARTANEN S, STRÖMME P, *et al.* Cathepsin D deficiency underlies congenital human neuronal ceroid-lipofuscinosis [J]. *Brain*, 2006, 129 (Pt 6):1438.
- [31] FRITCHIE K, SIINTOLA E, ARMAO D, *et al.* Novel mutation and the first prenatal screening of cathepsin D deficiency (CLN10) [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 117:201.
- [32] CULLEN V, LINDFORS M, NG J, *et al.* Cathepsin D expression level affects alpha-synuclein processing, aggregation, and toxicity in vivo [J]. *Mol Brain*, 2009, 2:5.
- [33] HILFIKER-KLEINER D, KAMINSKI K, PODEWSKI E, *et al.* A cathepsin D-cleaved 16 kDa form of prolactin mediates postpartum cardiomyopathy [J]. *Cell*, 2007, 128(3):589.
- [34] SHEIKH AM, LI X, WEN G, *et al.* Cathepsin D and apoptosis related proteins are elevated in the brain of autistic subjects [J]. *Neuroscience*, 2010, 165:363.
- [35] BAECHLE D, FLAD T, CANSIER A, *et al.* Cathepsin D is present in human eccrine sweat and involved in the postsecretory processing of the antimicrobial peptide DCD-1L [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(9):5406.
- [36] VAN DER STAPPEN JW, WILLIAMS AC, MACIEWICZ RA, *et al.* Activation of cathepsin B, secreted by a colorectal cancer cell line requires low pH and is mediated by cathepsin D [J]. *Int J Cancer*, 1996, 67(4):547.
- [37] BANKOWSKA A, GACKO M, CHYCZEWSKA E, *et al.* Biological and diagnostic role of cathepsin D [J]. *Rocz Akad Med Białymst*, 1997, 42 (Suppl 1):79.
- [38] TAKEI Y, HIGASHIRA H, YAMAMOTO T, *et al.* Mitogenic activity toward human breast cancer cell line MCF-7 of two bFGFs purified from sera of breast cancer patients; co-operative role of cathepsin D [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1997, 43(1):53.
- [39] MORIKAWA W, YAMAMOTO K, ISHIKAWA S, *et al.* Angiostatin generation by cathepsin D secreted by human prostate carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(49):38912.
- [40] LKHIDER M, CASTINO R, BOUGUYON E, *et al.* Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117:5155.
- [41] DUNN AD, CRUTCHFIELD HE, DUNN JT. Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(30):20198.
- [42] KUDO S, MIYAMOTO G, KAWANO K. Proteases involved in the metabolic degradation of human interleukin-1 β by rat kidney lysosomes [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 1999, 19(4):361.
- [43] ZHANG T, MAEKAWA Y, HANBA J, *et al.* Lysosomal cathepsin B plays an important role in antigen processing, while cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice [J]. *Immunology*, 2000, 100(1):13.
- [44] MOSS CX, VILLADANGOS JA, WATTS C. Destructive potential of the aspartyl protease cathepsin D in MHC class II-restricted antigen processing [J]. *Eur J Immunol*, 2005, 35(12):3442.
- [45] BANAY-SCHWARTZ M, DAHL D, HUI KS, *et al.* The breakdown of the individual neurofilament proteins by cathepsin D [J]. *Neurochem Res*, 1987, 12(4):361.
- [46] RODRIGUEZ GM, DIMENT S. Role of cathepsin D in antigen presentation of ovalbumin [J]. *J Immunol*, 1992, 149(9):2894.

- [47] RHODES JM, ANDERSEN AB. Role of cathepsin D in the degradation of human serum albumin by peritoneal macrophages and veiled cells in antigen presentation [J]. *Immunol Lett*, 1993, 37 (2/3):103.
- [48] BERCHEM G, GLONDU M, GLEIZES M, *et al.* Cathepsin-D affects multiple tumor progression steps *in vivo*: proliferation, angiogenesis and apoptosis [J]. *Oncogene* 2002, 21 (38):5951.
- [49] SAGULENKO V, MUTH D, SAGULENKO E *et al.* Cathepsin D protects human neuroblastoma cells from doxorubicin-induced cell death [J]. *Carcinogenesis* 2008, 29 (10):1869.
- [50] ZUZARTE-LUIS V, MONTERO JA, TORRE-PEREZ N, *et al.* Cathepsin D gene expression outlines the areas of physiological cell death during embryonic development [J]. *Dev Dyn*, 2007, 236 (6):880.
- [51] OLLINGER K. Inhibition of cathepsin D prevents free-radical-induced apoptosis in rat cardiomyocytes [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 373 (2):346.
- [52] KÅGEDAL K, JOHANSSON U, OLLINGER K. The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress [J]. *FASEB J*, 2001, 15 (9):1592.
- [53] EMERT-SEDLAK L, SHANGARY S, RABINOVITZ A. *et al.* Involvement of cathepsin D in chemotherapy-induced cytochrome c release, caspase activation, and cell death [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4 (5):733.
- [54] JOHANSSON AC, STEEN H, OLLINGER K, *et al.* Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10 (11):1253.
- [55] ROBERG K, KÅGEDAL K, OLLINGER K. Microinjection of cathepsin d induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts [J]. *Am J Pathol*, 2002, 161 (1):89.
- [56] HEINRICH M, NEUMEYER J, JAKOB M, *et al.* Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11 (5):550.
- [57] CONUS S, POP C, SNIPAS SJ, *et al.* Cathepsin D primes caspase-8 activation by multiple intra-chain proteolysis [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287 (25):21142.
- [58] CONUS S, PEROZZO R, REINHECKEL T, *et al.* Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation [J]. *J Exp Med*, 2008, 205 (3):685.
- [59] BIDÈRE N, LORENZO HK, CARMONA S. *et al.* Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278 (33):31401.
- [60] JÄÄTTELÄ M, CANDÉ C, KROEMER G. Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF [J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11 (2):135.
- [61] GRDOVIĆN, VIDAKOVIĆM, MIHAILOVIĆM, *et al.* Proteolytic events in cryonecrotic cell death: Proteolytic activation of endonuclease P23 [J]. *Cryobiology*, 2010, 60 (3):271.
- [62] ZHAO S, AVILES ER JR, FUJIKAWA DG. Nuclear translocation of mitochondrial cytochrome c, lysosomal cathepsins B and D, and three other death-promoting proteins within the first 60 minutes of generalized seizures [J]. *J Neurosci Res*, 2010, 88 (8):1727.
- [63] CAVAILLES V, AUGEREAU P, GARCIA M, *et al.* Estrogens and growth factors induce the mRNA of the 52K-pro-cathepsin-D secreted by breast cancer cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16 (5):1903.
- [64] ROCHEFORT H, CAVAILLES V, AUGEREAU P *et al.* Overexpression and hormonal regulation of pro-cathepsin D in mammary and endometrial cancer [J]. *J Steroid Biochem*, 1989, 34 (1/6):177.
- [65] MUELLER MMI, FUSENIG NE. Friends or foes-bipolar effects of the tumour stroma in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2004, 4 (11):839.
- [66] LIOTTA LA, KOHN EC. The microenvironment of the tumour-host interface [J]. *Nature*, 2001, 411 (6835):375.
- [67] HEYLEN NI, VINCENT LM, DEVOS V *et al.* Fibroblasts capture cathepsin D secreted by breast cancer cells: possible role in the regulation of the invasive process [J]. *Int J Oncol*, 2002, 20 (4):761.
- [68] HU LI, ROTH JM, BROOKS P *et al.* Thrombin up-regulates cathepsin D which enhances angiogenesis, growth, and metastasis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68 (12):4666.
- [69] LAURENT-MATHA V, FARNOUD MR, Lucas A, *et al.* Endocytosis of pro-cathepsin D into breast cancer cells is mostly independent of mannose-6-phosphate receptors [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111 (Pt 17):2539.
- [70] FUSEK M, VETVICKA V. Mitogenic function of human procathepsin D: the role of the propeptide [J]. *Biochem J*, 1994, 303 (Pt 3):775.
- [71] LIAUDET E, DEROCQ D, ROCHEFORT H, *et al.* Transfected cathepsin D stimulates high density cancer cell growth by inactivating secreted growth inhibitors [J]. *Cell Growth Differ*, 1995, 6 (9):1045.
- [72] MATHIEU M, ROCHEFORT H, BARENTON B, *et al.* Interactions of cathepsin-D and insulin-like growth factor-II (IGF-II) on the IGF-II/mannose-6-phosphate receptor in human breast cancer cells and possible consequences on mitogenic activity of IGF-II [J]. *Mol Endocrinol*, 1990, 4 (9):1327.
- [73] FARIDI JS, MOHAN S, DE LEON DD. Modulation of cathepsin D routing by IGF-II involves IGF-II binding to IGF-II/M6P receptor in MCF-7 breast cancer cells [J]. *Growth Factors*, 2004, 22 (3):169.
- [74] OHRI SS, VASHISHTA A, PROCTOR M, *et al.* Depletion of pro-cathepsin D gene expression by RNA interference: a potential therapeutic target for breast cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2007, 6 (7):1081.
- [75] VASHISHTA A, OHRI SS, PROCTOR M, *et al.* Role of activation peptide of procathepsin D in proliferation and invasion of lung cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26 (6B):4163.
- [76] BRIOZZO P, BADET J, CAPONY F, *et al.* MCF7 mammary cancer

- er cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix; a permissive role of cathepsin D [J]. *Exp Cell Res*, 1991, 194(2):252.
- [77] BROUILLET JP, DUFOUR F, LEMAMY G, *et al.* Increased cathepsin D level in the serum of patients with metastatic breast carcinoma detected with a specific pro-cathepsin D immunoassay [J]. *Cancer*, 1997, 79(11):2132.
- [78] SZAJDA SD, SNARSKA J, JANKOWSKA A, *et al.* Cathepsin D and carcino-embryonic antigen in serum, urine and tissues of colon adenocarcinoma patients [J]. *Hepatogastroenterology*, 2008, 55(82/83):388.
- [79] SZAJDA SD, SNARSKA J, ROSZKOWSKA-JAKIMIEC W, *et al.* Activity of cathepsin D in the blood serum and urine of patients with cancer of the stomach, pancreas and liver [J]. *Pol Arch Med Wewn*, 2006, 116(6):1150.
- [80] AALTONEN M, LIPPONEN P, KOSMA VM, *et al.* Prognostic value of cathepsin-D expression in female breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 1995, 15(3):1033.
- [81] FITZGIBBONS PL, PAGE DL, WEAVER D, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999 [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2000, 124(7):966.
- [82] ROBERG K, JOHANSSON U, OLLINGER K. Lysosomal release of cathepsin D precedes relocation of cytochrome c and loss of mitochondrial transmembrane potential during apoptosis induced by oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 1999, 27(11/12):1228.
- [83] LIAUDET-COOPMAN E, BEAUJOUIN M, DEROCQ D, *et al.* Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis [J]. *Cancer Lett*, 2006, 237(2):167.
- [84] SHIBATA M, KANAMORI S, ISAHARA K, *et al.* Participation of cathepsins B and D in apoptosis of PC12 cells following serum deprivation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 251(1):199.
- [85] BEAUJOUIN M, BAGHDIGUIAN S, GLONDU-LASSIS M, *et al.* Overexpression of both catalytically active and -inactive cathepsin D by cancer cells enhances apoptosis-dependent chemo-sensitivity [J]. *Oncogene*, 2006, 25(13):1967.
- [86] TARDY C, TYYNELA J, HASILIK A, *et al.* Stress-induced apoptosis is impaired in cells with a lysosomal targeting defect but is not affected in cells synthesizing a catalytically inactive cathepsin D [J]. *Cell Death Differ*, 2003, 10(9):1090.
- [87] SCHESTKOWA O, GEISEL D, JACOB R, *et al.* The catalytically inactive precursor of cathepsin D induces apoptosis in human fibroblasts and HeLa cells [J]. *J Cell Biochem*, 2007, 101(6):1558.
- [88] ROCHEFORT H, LIAUDET-COOPMAN E. Cathepsin D in cancer metastasis: A protease and a ligand [J]. *APMIS*, 1999, 107(1):86.
- [89] LAURENT-MATHA V, MARUANI-HERRMANN S, PRÉBOIS C, *et al.* Catalytically inactive human cathepsin D triggers fibroblast invasive growth [J]. *J Cell Biol*, 2005, 168(3):489.

(本文编辑 姚仁斌)