

# Cystatin C/组织蛋白酶在动脉粥样硬化中的作用机制及与冠心病流行病学研究

张 瑾综述 李 勇 李 剑 黄成磊审校

**【摘要】** 动脉内膜斑块的破裂是引起心脑血管急性事件的主要原因,这些破裂是由于参与动脉粥样硬化的巨噬细胞或内皮细胞分泌的蛋白酶导致细胞外基质(ECM)蛋白降解所致。这些蛋白酶中的一些如基质金属蛋白酶(MMPs),丝氨酸蛋白酶等已被广泛研究。最近发现,组织蛋白酶(cathepsins)及其内源性抑制剂血清半胱氨酸蛋白酶抑制剂(cystatin C)在斑块的发生发展中也起着重要的作用。另外,cystatin C作为一种预测肾功能的危险因素,在心血管疾病的流行病学调查研究中更是受到了许多的关注。该文就 cystatin C 和组织蛋白酶在动脉粥样硬化不同阶段的可能作用机制以及与心血管疾病的相关性进展作一综述。

**【关键词】** Cystatin, 组织蛋白酶, 动脉粥样硬化

## 1 Cystatin 和组织蛋白酶的生理学特性

### 1.1 Cystatin C

Cystatin C 是组织蛋白酶家族中的半胱氨酸蛋白酶(cysteine proteases)的主要抑制剂。编码 cystatin C 的基因属于管家基因<sup>[1]</sup>。Cystatin C 由所有有核细胞以恒定的速度产生,能够自由地通过肾小球,并在近曲小管几乎完全被重吸收和降解,不再重新回到血循环中,同时肾小管也不分泌 cystatin C。

### 1.2 组织蛋白酶

组织蛋白酶家族中的半胱氨酸蛋白酶家族,属于溶酶体蛋白酶,以前体形式被合成,然后在内质网或溶酶体的酸性环境下通过剪切被激活<sup>[2]</sup>。尽管它们最适 pH 值为酸性,但有报道表示分泌的活性组织蛋白酶在中性 pH 下也有活性<sup>[3]</sup>。众所周知,组织蛋白酶能够降解血管壁细胞外基质(ECM)的主要成分弹性蛋白和胶原。另外,其他基质成分如骨桥蛋白、骨结合素、蛋白聚糖、黏蛋白 C、纤维结合蛋白、基底膜蛋白的层粘连蛋白和Ⅳ型胶原以及脂蛋白 B-100,都是半胱氨酸蛋白酶作用的底物<sup>[4]</sup>。

## 2 动脉粥样硬化中的 Cystatin C 和组织蛋白酶

Jormsjö 等<sup>[5]</sup>发现,相对于健康的 C57BL/6

小鼠,动脉粥样硬化的( $\text{apoE}^{-/-}$ )小鼠模型的主动脉中,组织蛋白酶 B、L、S 的 mRNA 的水平上调,而 cystatin C 的 mRNA 则没有变化。病灶处细胞外的 cystatin C 水平在翻译或分泌阶段被调节,而不是在转录阶段。然而,cystatin C 不能在病灶中被完全下调,因为在  $\text{apoE}^{-/-}$  小鼠的动脉粥样硬化斑块中能够通过免疫组化方法发现 cystatin C<sup>[6]</sup>。因此,研究者认为,cystatin C/组织蛋白酶的平衡在动脉粥样硬化中发生了改变。

对敲除 cystatin C 和组织蛋白酶基因小鼠模型的研究则发现,cystatin C 作为一种抗动脉粥样硬化蛋白,是通过抑制弹性蛋白降解起到保护作用。对缺乏和表达 cystatin C 的  $\text{apoE}^{-/-}$  小鼠研究发现其病变范围更大,而这种对动脉的保护作用被证实其由非造血细胞产生的 cystatin C 所为<sup>[7]</sup>。同时也证实,cystatin C<sup>-/-</sup>, $\text{apoE}^{-/-}$  小鼠其弹性层的降解增加,斑块中平滑肌细胞(SMC)含量也增加,主动脉的扩张增加<sup>[8]</sup>。

Lutgens 等<sup>[9]</sup>进一步阐述了组织蛋白酶对动脉粥样硬化形成的作用,他们发现缺乏组织蛋白酶 K 的  $\text{apoE}^{-/-}$  小鼠具有较小的斑块,更多的胶原,而中层弹性蛋白的降解也少。而 Sukhova 等<sup>[10]</sup>也发现相对于低密度脂蛋白(LDL)受体缺乏( $\text{LDLR}^{-/-}$ )小鼠,LDLR<sup>-/-</sup> 合并有组织蛋白酶 S 缺乏(cathepsin S<sup>-/-</sup>LDLR<sup>-/-</sup>)小鼠动脉粥样硬化

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院心内科

病变范围更小。提示组织蛋白酶具有致动脉粥样硬化作用。

再狭窄机制涉及狭窄重修饰和 SMC 增殖和纤维化的增加。在动脉重修饰形成新内膜的过程中, SMC 迁移要求内弹性层的降解。在球囊损伤颈动脉的大鼠中, 发现组织蛋白酶 S 和 K 被上调, 而 cystatin C 水平没改变<sup>[11]</sup>。研究者认为受损血管弹性层降解的增加是由于半胱氨酸蛋白酶的活性增强, 而胶原的降解则受于半胱氨酸蛋白酶和 MMPs。

这些在动物模型上进行的体内试验都强调了 cystatin C 和组织蛋白酶在动脉粥样硬化发生发展中所起的重要作用。

### 3 细胞水平的 Cystatin C 和组织蛋白酶的研究

单核细胞分化成巨噬细胞需要白细胞介素 (IL-3) 诱导组织蛋白酶 K 和 V 的表达<sup>[12]</sup>。C 组织蛋白酶的表达可能在泡沫细胞的形成中也增加, 因为当用氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 处理人巨噬细胞时组织蛋白酶 S 的表达有所增加<sup>[4]</sup>。

组织蛋白酶 S、K、L 以及 cystatin C 都在内皮细胞上表达<sup>[9,13,14]</sup>。Shi 等<sup>[14]</sup>发现, 在肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  和  $\beta$ -碱性纤维生长因子 (FGF) 刺激下, 内皮细胞产生 cystatin C 减少, 而组织蛋白酶 S 的分泌可受干扰素 (IFN)- $\gamma$ 、血管内皮生长因子 (VEGF) 和  $\beta$ -FGF 刺激而增加。同时也发现, cystatin C 能够抑制内皮细胞形成微血管。提示组织蛋白酶和 cystatin C 在血管新生机制上的作用。

在细胞培养实验中已经证明, 组织蛋白酶是由单核细胞来源的巨噬细胞和细胞因子刺激 SMC 以活性形式分泌<sup>[3]</sup>。另外, 血小板源性生长因子 (PDGF) 刺激的 SMC 对弹性蛋白和胶原浸润能被 cystatin C 抑制<sup>[15]</sup>。目前认为降解弹性组织的活性几乎完全为组织蛋白酶的作用, 而降解胶原的活性主要依赖于 MMPs。

通过运用具有细胞渗透性和非渗透性的半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 发现半胱氨酸蛋白酶对弹性蛋白的降解作用 2/3 在细胞外, 1/3 在细胞内完成<sup>[12]</sup>。

这些细胞试验进一步说明了 cystatin C 和组织蛋白酶在细胞黏附、迁移和增殖上所发挥的作

用, 而这些细胞 (SMC、内皮细胞、巨噬泡沫细胞) 又是动脉粥样硬化形成机制中最重要的参与者。

### 4 Cystatin C 和组织蛋白酶在循环中的水平以及与心血管疾病的相关性

基于以上一系列基础试验, 开始了大量的流行病学研究, 其中最重要的有以下这些研究。

#### 4.1 Cystatin C 和组织蛋白酶与心肌梗死

Liu 等<sup>[13]</sup>测定了动脉粥样硬化狭窄 (血管造影中左前降支, 右冠状动脉, 左回旋支中至少一支血管狭窄  $>10\%$ ) 病人循环中的组织蛋白酶 L 水平, 发现比没有病变的对照组血清组织蛋白酶 L 水平增高  $[(1.47 \pm 0.33) \text{ ng/ml}$  对  $(0.60 \pm 0.06) \text{ ng/ml}$ ,  $P < 0.02]$ , 即使在线性回归模型中调整了性别、吸烟、年龄和血糖后仍然具有显著性 ( $P < 0.05$ )。研究显示组织蛋白酶 L 水平与年龄、性别、吸烟史、高血压、血清胆固醇、VLDL、血糖均无关; 血清中组织蛋白酶 L 水平与冠脉疾病严重性强相关<sup>[13]</sup>。

急性心肌梗死或不稳定心绞痛病人有较高水平的组织蛋白酶 S。而糖尿病病人中也存在组织蛋白酶 S 的增加, 因此研究者认为糖尿病人的心血管疾病风险增加可能与弹性组织降解的增强有关<sup>[15]</sup>。

#### 4.2 Cystatin C 和组织蛋白酶与冠心病预后

为了评价 cystatin C 在冠心病病人中的预后价值, Koenig 等<sup>[16]</sup>进行了一项前瞻性研究, 对 1 033 例患有冠心病的病人 (30~70 岁) 进行平均 33.5 个月左右的随访, 在基线时抽取血标本测定 cystatin C 和其他生化指标, 将致死和非致死性心血管事件的发生作为复合终点。随访期间, 71 例病人 (6.9%) 发生了二次心血管事件, 无论是 Cr ( $P = 0.63$ ) 还是 CrCl ( $P = 0.10$ ) 都与心血管病发生率无关, 而 cystatin C 与二次心血管事件显著相关 ( $P < 0.0001$ )。在多变量分析中, 比起最低 cystatin C 五分位数水平的病人, 处在较高 cystatin C 五分位数水平的病人其二次心血管事件发生的危险性显著增加, 即使调整了其他经典的危险因素: 冠脉疾病严重程度、糖尿病史、血管紧张素转化酶抑制剂的使用和 C 反应蛋白后 (HR, 2.27; 95% CI, 1.05-4.91), 表明 cystatin

C 水平的增加与未来二级心血管事件发生显著且独立相关。

#### 4.4 Cystatin C 和组织蛋白酶对亚临床冠脉粥样硬化的预测

在平均  $(2.5 \pm 0.4)$  年的随访期间, Maahs 等<sup>[17]</sup>对 509 例糖尿病病人[其中 42% 为男性, 平均年龄  $(36 \pm 9)$  岁, 糖尿病平均患病时间  $(23 \pm 9)$  年]进行了 2 次冠脉钙化评分, 将大于钙化体积评分的平方根值的 2.5 倍以上或出现临床的冠心病表现定义为亚临床冠脉粥样硬化(SCA)进展( $n = 131$ ), 采用 logistic 回归模型中的逐步(stepwise)方式进行统计分析预测因子, 发现 cystatin C 能够预测 SCA(odds ratio 1.44, 95% CI, 1.00-2.18,  $P = 0.048$ ), 即使在调整了其他危险因素后也存在。Cystatin C 预测 SCA 的进展要优于血清肌酐或 e GFR (CG 公式和 MDRD 公式)。

#### 4.5 Cystatin C/组织蛋白酶对心力衰竭的预测

Tang 等<sup>[18]</sup>前瞻性的观察了 139 例稳定的慢性心力衰竭病人(左室射血分数  $< 35\%$ ), 随访病人的长期不良预后(死亡, 心脏移植, 心力衰竭住院率)结果发现, 即使在肾功能稳定的病人中, cystatin C 升高了 41%, 且与 NT-脑利钠肽原相关( $r = 0.57$ ,  $P < 0.0001$ )。即使调整了 GFR, cystatin C 仍然是临床不良事件的独立危险因素(hazard ratio 1.88, 95% CI, 1.15-3.09,  $P < 0.012$ )。

#### 4.6 Cystatin C 和组织蛋白酶对冠心病严重性的预测

Wang 等<sup>[19]</sup>随访 408 例年龄大约为 75 岁, 做过血管造影评定为正常或阻塞性冠脉的病人, 冠心病严重性按三支主要血管腔内狭窄  $> 50\%$  分别记为 0 支, 1 支 2 支和 3 支病变, 测定病人的血浆 cystatin C 水平、肌酐、Egfr、血脂指标、CRP、同型半胱氨酸、ADMA (asymmetric dimethylarginine) 和 SDMA (symmetric dimethylarginine)。研究发现, 血浆 cystatin C 与 CAD 的发生显著相关( $OR = 1.27$ , 95% CI, 1.04-1.56,  $P = 0.02$ ), 表明 cystatin C 增高能够预测 CAD 的严重性( $P = 0.013$ ), 且独立于其他危险因素。

#### 4.7 其他研究

Eriksson 等<sup>[20]</sup>曾发现, 心肌梗死病人的 cys-

tatin C 水平呈降低, Noto 等<sup>[21]</sup>也在研究中指出, cystatin C 水平在急性心肌梗死病人中是降低的[没有统计学差异, 但用 Cr 校正 cystatin C 后差异显著 (cystatin C/Cr)]。出院时, 急性心肌梗死病人的血清 cystatin C 恢复至正常水平, cystatin C 在急性心肌梗死中的变化也许反映了一种急性期的应激反应。

### 5 总结与展望

总的来说, 体内或体外研究都强调 cystatin C 和组织蛋白酶在斑块起始、进展和随后的斑块破裂中的重要作用。而大规模的流行病学研究也提示 cystatin C 和组织蛋白酶在心血管疾病上的应用价值。动脉粥样硬化疾病中蛋白酶的活性可以是有益的, 例如基质的降解对于血管平滑肌细胞迁移形成保护性的纤维帽来说是必须的, 但也可以是有害的, 如动脉粥样硬化疾病中基质降解在斑块破裂中的作用。也许组织蛋白酶和它们的抑制剂 cystatin C, 都能显示出致动脉粥样硬化作用和抗动脉粥样硬化的作用, 而这些都取决于所研究的疾病在哪个阶段。今后的研究可能将集中在对 cystatin C 和组织蛋白酶作用机制更深入的探索, 以及在临床上运用这些指标对疾病进行判断、危险分层和预后的评估, 也许不久的将来, 抑制组织蛋白酶的药物和促进 cystatin C 表达的药物也将应运而生。

### 参考文献

- [1] Dickinson DP. Salivary (SD-type) cystatins: over one billion years in the making but to what purpose? [J]. Crit Rev Oral Biol Med, 2002, 13 (6): 485-508.
- [2] Kominami E, Tsukahara T, Hara K, et al. Biosyntheses and processing of lysosomal cysteine proteinases in rat macrophages [J]. FEBS Lett, 1988, 231(1): 225-228.
- [3] Punturieri A, Filippov S, Allen E, et al. Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages [J]. Exp Med, 2000, 192(6): 789-799.
- [4] Burns-Kurtis CL, Olzinski AR, Needle S, et al. Cathepsin S expression is up-regulated following balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit [J]. Cardiovasc Res, 2004, 62(3): 610-620.
- [5] Jormsjö S, Wuttge DM, Sirsjö A, et al. Differential expression of cysteine and aspartic proteases during progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Am J Pathol, 2002, 161(3): 939-945.

(下转第 273 页)

- severity on clinical outcomes among patients with acute coronary syndromes [J]. *Am J Cardiol*, 2005, 96 (9): 1200-1206.
- [19] Rao SV, Jollis JG, Harrington RA, et al. The relationship of blood transfusion and clinical outcomes in patient with acute coronary syndromes [J]. *JAMA*, 2004, 292 (13): 1555-1562.
- [20] Manoukian SV, Feit F, Mehran R, et al. Impact of major bleeding on 30-day mortality and clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. an analysis from the ACUTY Trial [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2007, 49(12): 1362-1368.
- [21] Fox KAA, Bassand JP, Mehta SR, et al; on behalf of the OASIS 5 Investigators. Influence of renal function on the efficacy and safety of fondaparinux relative to enoxaparin in non- ST- segment elevation acute coronary syndromes [J]. *Ann Intern Med*, 2007, 147(5): 304-310.
- [22] Price MJ. Monitoring platelet function to reduce the risk of ischemic and bleeding complications [J]. *Am J Cardiol*, 2009, 103(Suppl): 35A-39A.
- [23] Chan FK, Ching JY, Hung LC, et al. Clopidogrel versus aspirin and esomeprazole to prevent recurrent ulcer bleeding [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(3): 238-244.
- [24] Bassand JP, Hamm CW, Ardissino D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes [J]. *Eur Heart J*, 2007, 28(13): 1598-1660.
- (收稿: 2009-01-19 修回: 2009-05-05)  
(本文编辑: 丁媛媛)

(上接第 266 页)

- [6] Bengtsson E, To F, Grubb A, et al. Absence of the protease inhibitor cystatin C in inflammatory cells results in larger plaque area in plaque regression of apoE-deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2005, 180(1): 45-53.
- [7] Bengtsson E, To F, Håkansson K, et al. Lack of the cysteine protease inhibitor cystatin C promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005, 25(10): 2151-2156.
- [8] Sukhova GK, Wang B, Libby P, et al. Cystatin C deficiency increases elastic lamina degradation and aortic dilatation in apolipoprotein E null mice [J]. *Circ Res*, 2005, 96 (3): 368-375.
- [9] Lutgens E, Lutgens SP, Faber BC, et al. Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation [J]. *Circulation*, 2006, 113(1): 98-107.
- [10] Sukhova GK, Zhang Y, Pan JH, et al. Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice [J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(6): 897-906.
- [11] Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, et al. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(3): 576-583.
- [12] Yasuda Y, Li Z, Greenbaum D, et al. Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages [J]. *Biol Chem*, 2004, 279(35): 36761-36770.
- [13] Liu J, Sukhova GK, 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.
- [14] Shi GP, Sukhova GK, Kuzuya M, et al. Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth [J]. *Circ Res*, 2003, 9(5): 493-500.
- [15] Liu J, Ma L, Yang J, et al. Increased serum cathepsin S in patients with atherosclerosis and diabetes [J]. *Atherosclerosis*, 2006, 186(2): 411-419.
- [16] Koenig W, Twardella D, Brenner H, et al. Plasma concentrations of cystatin C in patients with coronary heart disease and risk for secondary cardiovascular events: more than simply a marker of glomerular filtration rate [J]. *Clin Chem*, 2005, 51(2): 321-327.
- [17] Maahs DM, Ogden LG, Kretowski A, et al. Serum cystatin C predicts progression of subclinical coronary atherosclerosis in individuals with type 1 diabetes [J]. *Diabetes*, 2007, 56(11): 2774-2779.
- [18] Tang WH, Van Lente F, Shrestha K, et al. Impact of myocardial function on cystatin C measurements in chronic systolic heart failure [J]. *J Card Fail*, 2008, 14(5): 394-399.
- [19] Wang J, Sim AS, Wang XL, et al. Relations between markers of renal function, coronary risk factors and the occurrence and severity of coronary artery disease [J]. *Atherosclerosis*, 2008, 197(2): 853-859.
- [20] Eriksson P, Deguchi H, Samnegard A, et al. Human evidence that the cystatin C gene is implicated in focal progression of coronary artery disease [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(3): 551-557.
- [21] Noto D, Cefalu AB, Barbagallo CM, et al. Cystatin C levels are decreased in acute myocardial infarction: effect of cystatin C G73A gene polymorphism on plasma levels [J]. *Int J Cardiol*, 2005, 101 (2): 213-217.
- (收稿: 2009-02-05 修回: 2009-07-20)  
(本文编辑: 金谷英)