

丝氨酸蛋白酶 PRSS8 的生物学功能

杨万才^{1,2} 鲍永华¹

(¹ 济宁医学院精准医学研究院, 济宁 272067; ² 美国伊利诺伊大学芝加哥分校病理学系, 芝加哥 60612)



杨万才, 济宁医学院病理学教授、精准医学研究院院长, 美国伊利诺伊大学芝加哥分校病理学系兼职教授、博士生导师。主要从事消化道肿瘤的分子学机制研究。主持美国卫生总署(NIH)主持中国国家自然科学基金重大研究计划项目和面上项目等多项。在 *Science*、*Nature Genetics*、*Cancer Research* 等国际知名杂志发表 SCI 文章 80 多篇, 被引用次数达 9000 余次。

摘 要 PRSS8 是一种丝氨酸蛋白酶, 其表达与上皮终末分化、消化系统以及免疫系统的发育等有关。最近的研究发现, PRSS8 参与上皮黏膜屏障的合成, 并与胰岛素介导的糖尿病以及肿瘤的发生密切相关。本文就 PRSS8 的生物学功能作一综述。

关键词 PRSS8; 上皮屏障; 糖尿病; 肿瘤

中图分类号: R34 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-9760(2016)10-305-04

Biological functions of serine protease PRSS8

YANG Wancan^{1,2}, BAO Yonghua¹

(¹ Institute of Precision Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China;

² Department of Pathology, University of Illinois at Chicago, IL 60612 USA, China)

Abstract: Objective PRSS8 is a serine protease and plays important roles in epithelial cell terminal differentiation, in the development of digestive system and immune system. Recent studies have demonstrated that PRSS8 participates in epithelial barrier functions and is associated with the development of insulin-mediated diabetes and carcinogenesis. This review summarized the biological functions of PRSS8.

Keywords: PRSS8; Epithelial barrier; Diabetes; Carcinogenesis

PRSS8 是一种丝氨酸蛋白酶 (serine protease), 又称前列腺蛋白 (prostasin) 或 CAP-1。丝氨酸蛋白酶具有重要的生理和病理学功能, 参与蛋白的降解和消化以及蛋白加工和组织重塑。它们共享具有高度氨基酸序列同一性, 特别是它们共享组氨酸-天冬氨酸-丝氨酸残基所必需的催化活性。膜结合的丝氨酸蛋白酶要么经由糖基磷脂酰肌醇样的羧基末端跨膜结构域 (I 型) 连接, 要么经由氨基末端近端跨膜结构域 (II 型) 连接。糖基磷脂酰肌醇样锚定蛋白在真核细胞的质膜内广泛分布, 具有不同的作用, 可以作为酶、细胞粘附分子或细胞表

面抗原与膜受体结合^[1-2]。

PRSS8 基因位于 16 号染色体 (16p11.2), 包括 6 个外显子和 5 个内含子。全长 mRNA 包含 1032nt 开放阅读框, 翻译的氨基酸大小为 343aa^[3]。PRSS8 在正常上皮组织中大量表达 (例如, 皮肤、结肠、肝脏、食管、胃、前列腺、肾脏和肺脏等), 并且在上皮终末分化 (terminal differentiation)、消化系统以及免疫系统中起重要作用^[4-5]。PRSS8 可以通过调控蛋白酶激活受体 PAR2 而调节上皮钠离子通道 (ENaC)^[6]。最近的研究发现, PRSS8 参与上皮黏膜屏障的合成, 并与胰岛素介导的糖尿病

以及肿瘤的发生密切相关。本文就 PRSS8 的生物功能作一综述。

1 PRSS8 与上皮黏膜屏障的关系

以往的研究表明 PRSS8 在皮肤表皮中高表达,特别是在皮肤表皮细胞紧密连接及皮肤屏障形成的过程中起重要作用^[7-8]。为揭示 PRSS8 在皮肤屏障形成中的作用, Leyvraz 等建立了一种皮肤表皮 PRSS8 基因条件性敲除小鼠 (Prss8lox/ Δ /K14-Cre 小鼠)^[8]。这种敲除小鼠在出生后不超过 60h 即死亡。对基因敲除动物的表皮的向内和向外屏障功能检测发现 PRSS8 缺失严重影响表皮的屏障功能,不能很好的控制机体水分平衡,导致小鼠因脱水而死。提示皮肤中 PRSS8 的表达是出生后早期生存不可缺少的。分子机制研究提示, PRSS8 缺失后,紧密连接蛋白(如 claudin-1、occludin 和 ZO-1 等)表达异常,特别是 occludin 的表达显著减少,导致皮肤表皮的紧密连接的完整性破坏而通透性增强,从而失去对机体水分的调控。肠道粘膜上皮也是机体的一个重要保护屏障。

本课题组通过转录组学和蛋白组学等高通量筛选发现,PRSS8 的表达与肠上皮细胞的粘膜屏障蛋白的表达密切相关。大量研究表明^[9-12],肠道菌群失调所致肠道微生态变化可严重影响肠道粘膜上皮细胞分泌黏液的功能,黏膜表面的黏液缺乏可以直接导致黏膜上皮的紧密连接(tight-junction)破坏,黏膜保护层(barrier)的受损,增加了肠道黏膜炎症的敏感性,在早期病理改变为肠炎,但随着时间的推移可以发生恶变,引起结直肠癌的发生^[9,13]。分子机制研究发现菌群失调与炎症的发生及癌变与编码炎症小体(inflammasomes)的基因 NOD1 和 NOD2 突变或失活有关^[14-15]。最近的研究证实在炎症性肠病(IBD)中有些梭杆菌属的物种也同时在 CAC 肿瘤中被发现^[14]。这些引起 IBD 的微生物,不仅可以引发结肠炎,还可以活化和增强 β -catenin 信号通路,有利于激活致癌信号通路,引起细胞膜上的连接蛋白 E-cadherin 裂解,破坏肠黏膜屏障,刺激局部炎症反应^[9,16]。肠道菌群失调诱发 IBD 和结肠炎恶变的分子机制主要包括基因突变、致癌信号通路激活以及表观遗传学的变化^[9,17-18]。Wnt 信号通路中的 Apc 基因突变所导致的 Wnt/ β -catenin 活化最常见。此外, p53 和 K-Ras 的突变也较为常见^[19],而 NF- κ B, PI-3K 以及

Sphk1/Stat3/Akt 等信号通路的活化,更加促进 β -catenin 的细胞核内转移和聚集^[20],下调 E-cadherin 的表达,影响细胞的紧密连接。

2 PRSS8 与糖尿病的关系

流行病学及临床实验证明 II 型糖尿病与血浆中高水平的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)及胰岛素耐受相关联。而血液循环中长期升高的由肠道产生的 LPS 或“代谢毒素血症”可能会引起 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)介导持续性的全身炎症^[21-22]。最近的研究发现 PRSS8 可以通过调控 TLR4 介导的信号传导通路而影响肝脏对胰岛素的敏感性^[5]。高脂饮食可以诱导内质网因而抑制 PRSS8 的表达并增加 TLR4 在肝脏中的表达水平。在肝脏, PRSS8 可以通过切割 TLR4 而导致全长形式的减少和降低的 TLR4 的激活和释放。肝脏特异性 PRSS8 条件性敲除小鼠的肝脏中 TLR4 的表达显著增加,从而导致胰岛素耐受。反过来,如果恢复高脂饮食小鼠或肝脏特异性的 PRSS8 条件性基因敲除小鼠的肝脏中 PRSS8 表达,则可以降低 TLR4 水平并可改善胰岛素耐受。研究发现,在健康人群血清中 PRSS8 与身体质量指数(body mass index, BMI)成负相关。即 BMI 越低,血清中 PRSS8 水平越高,而 BMI 越高,血清中 PRSS8 含量就越低。这些结果提示 PRSS8 具有一种新的生理功能并且在肝源性的胰岛素耐受所致糖尿病的发生中起重要作用。

最近的研究发现, PRSS8 通过肝脏中 TLR4 介导的信号通路调节肝脏胰岛素介导的糖代谢,其表达水平的降低与肥胖诱发的炎症引起的糖尿病密切相关。

3 PRSS8 与肿瘤的关系

最近的研究发现 PRSS8 与肿瘤的发生有关^[3]。如 PRSS8 在胃癌^[24]、卵巢癌^[25]、乳腺癌^[26-27]以及膀胱癌^[28]中的表达减少,但其作用机制尚不清楚。本课题组对美国癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库以及肿瘤专业数据库 Oncomine (www. oncomine. com)资料进行深入分析发现:与正常肠黏膜相比,结肠癌组织中 PRSS8 mRNA 表达水平明显降低。

本课题组研究发现 PRSS8 的 mRNA 和蛋白的表达水平在食管癌和结肠癌组织中均显著降低,并

且这种降低与肿瘤分化差和病人生存期缩短密切相关^[29-30]。此外,采用组织芯片检测发现 PRSS8 的表达在肝癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌以及乳腺癌中均显著降低^[30]。利用甲基化特异性 PCR 检测发现,食管癌细胞系和食管癌组织中 PRSS8 的差异性表达与 PRSS8 启动子上的甲基化有关^[29]。即在低表达 PRSS8 的细胞系中 PRSS8 启动子高度甲基化(hypermethylation),而在高表达的细胞系中不存在甲基化。用去甲基化的药物地西他滨(Dacitabine)处理甲基化的食管癌细胞系后,PRSS8 的表达又重新得以恢复。这些发现证实 PRSS8 在食管癌中的表达降低是由于启动子的甲基化引起的。进一步研究发现,恢复 PRSS8 的表达后,食管癌细胞的增殖明显减慢,细胞迁徙能力变弱,提示 PRSS8 在食管癌中表现为肿瘤抑制基因。

为了揭示 PRSS8 是否在结肠癌中具有同样的抑癌功能,本课题组研究发现 PRSS8 在结肠癌细胞系中也存在差异性表达。随后,对低表达的细胞系进行转染 PRSS8 表达质粒,对高表达的细胞系进行小 RNA 干预,敲低 PRSS8 的表达。结果显示,增加 PRSS8 表达可以显著抑制细胞的增生和迁徙,而敲低 PRSS8 的表达后显著促进癌细胞的增生和迁徙^[30]。在荷瘤小鼠的在体实验进一步证实了 PRSS8 的抑癌功能。在细胞水平和荷瘤小鼠中的分子机制研究揭示 PRSS8 的抑癌基因功能是通过抑制结肠炎相关的信号通路 Sphk1/S1P/Stat3/Akt 以及与 Wnt/ β -catenin/EMT 信号通路的直接互作(cross-talk)实现的^[30]。特别有趣的是,在结肠癌细胞 HCT116 中过表达 PRSS8 可以影响细胞骨架蛋白的表达和细胞形态的改变,使侵袭性较强的梭形细胞改变为侵袭性较弱的椭圆形细胞。采用 iTRAQ 方法对过表达 PRSS8 的结肠癌细胞系 HCT116 进行蛋白质组学分析发现,膜连接蛋白 E-cadherin 表达升高, β -catenin 和 Rac1 等表达降低。除 Rac1 外,同属 G 蛋白相关的激酶 CDC42 等的蛋白表达水平也显著降低。以上研究清楚地提示 PRSS8 是一个肿瘤抑制基因,其抑癌功能与炎症和细胞之间的紧密连接密切相关。

参考文献:

- [1] Sumagin R, Parkos CA. Epithelial adhesion molecules and the regulation of intestinal homeostasis during neutrophil transepithelial migration [J]. Tissue Barriers, 2015, 3 (1-2): e969100. DOI: 10. 4161/21688362. 2014. 969100.
- [2] Szabo R, Lantsman T, Peters DE, et al. Delineation of proteolytic and non-proteolytic functions of the membrane-anchored serine protease prostasin [J]. Development, 2016, 143 (15): 2818-2828. DOI: 10. 1242/dev. 137968.
- [3] Wu JX, Chao L, Ward DC, et al. Structure and chromosomal localization of the human prostasin (PRSS8) gene [J]. Genomics, 1996, 32 (3): 334-340. DOI: 10. 1006/geno. 1996. 0127.
- [4] Peters DE, Szabo R, Friis S, et al. The membrane-anchored serine protease prostasin (CAPI/PRSS8) supports epidermal development and postnatal homeostasis independent of its enzymatic activity [J]. J Biol Chem, 2014, 289 (21): 14740-14749. DOI: 10. 1074/jbc. M113. 541318.
- [5] Uchimura K, Hayata M, Mizumoto T, et al. The serine protease prostasin regulates hepatic insulin sensitivity by modulating TLR4 signalling [J]. Nat Commun, 2014, 5: 3428. DOI: 10. 1038/ncomms4428.
- [6] Frateschi S, Keppner A, Malsure S, et al. Mutations of the serine protease CAPI/Prss8 lead to reduced embryonic viability, skin defects, and decreased ENaC activity [J]. Am J Pathol, 2012, 181 (2): 605-615. DOI: 10. 1016/j. ajpath. 2012. 05. 007.
- [7] Crisante G, Battista L, Iwaszkiewicz J, et al. The CAPI/Prss8 catalytic triad is not involved in PAR2 activation and protease nexin-1 (PN-1) inhibition [J]. FASEB J, 2014, 28 (11): 4792-4805. DOI: 10. 1096/fj. 14-253781.
- [8] Leyvraz C, Charles RP, Rubera I, et al. The epidermal barrier function is dependent on the serine protease CAPI/Prss8 [J]. J Cell Biol, 2005, 170 (3): 487-496. DOI: 10. 1083/jcb. 200501038.
- [9] Grivennikov SI. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia [J]. Semin Immunopathol, 2013, 35 (2): 229-244. DOI: 10. 1007/s00281-012-0352-6.
- [10] Quante M, Varga J, Wang TC, et al. The gastrointestinal tumor microenvironment [J]. Gastroenterology, 2013, 145 (1): 63-78. DOI: 10. 1053/j. gastro. 2013. 03. 052.
- [11] Schulz MD, Atay C, Heringer J, et al. High-fat-diet-mediated dysbiosis promotes intestinal carcinogenesis independently of obesity [J]. Nature, 2014, 514 (7523): 508-512. DOI: 10. 1038/nature13398.
- [12] Yang T, Owen JL, Lightfoot YL, et al. Microbiota impact

- on the epigenetic regulation of colorectal cancer [J]. Trends Mol Med, 2013, 19 (12) : 714-725. DOI: 10. 1016/j. molmed. 2013. 08. 005.
- [13] Johansson ME. Mucus layers in inflammatory bowel disease [J]. Inflamm Bowel Dis, 2014, 20 (11) : 2124-2131. DOI:10. 1097/MIB. 0000000000000117.
- [14] Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, et al. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer [J]. J Clin Invest, 2013, 123 (2) : 700-711. DOI:10. 1172/JCI62236.
- [15] Kattah MG, Mahadevan U. Insights into the molecular pathophysiology of inflammatory bowel disease: ATG16L1 suppresses nod-driven inflammation [J]. Gastroenterology, 2014, 147 (2) : 528-530. DOI:10. 1053/j. gastro. 2014. 06. 014.
- [16] Keerthivasan S, Aghajani K, Dose M, et al. β -Catenin promotes colitis and colon cancer through imprinting of proinflammatory properties in T cells [J]. Sci Transl Med, 2014, 6 (225) : 225ra28. DOI: 10. 1126/scitranslmed. 3007607.
- [17] Yashiro M. Molecular Alterations of colorectal cancer with inflammatory bowel disease [J]. Dig Dis Sci, 2015, 60 (8) : 2251-2263. DOI:10. 1007/s10620-015-3646-4.
- [18] Liang J, Nagahashi M, Kim EY, et al. Sphingosine-1-phosphate links persistent STAT3 activation, chronic intestinal inflammation, and development of colitis-associated cancer [J]. Cancer Cell, 2013, 23 (1) : 107-120. DOI:10. 1016/j. ccr. 2012. 11. 013.
- [19] Raskov H, Pommergaard HC, Burcharth J, et al. Colorectal carcinogenesis--update and perspectives [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20 (48) : 18151-18164. DOI: 10. 3748/wjg. v20. i48. 18151.
- [20] Shi C, Yang Y, Xia Y, et al. Novel evidence for an oncogenic role of microRNA-21 in colitis-associated colorectal cancer [J]. Gut, 2016, 65 (9) : 1470-1481. DOI:10. 1136/gutjnl-2014-308455.
- [21] Velloso LA, Folli F, Saad MJ. TLR4 at the crossroads of nutrients, gut microbiota, and metabolic inflammation [J]. Endocr Rev, 2015, 36 (3) : 245-271. DOI: 10. 1210/er. 2014-1100.
- [22] Saad MJ, Santos A, Prada PO. Linking gut microbiota and inflammation to obesity and insulin resistance [J]. Physiology (Bethesda), 2016, 31 (4) : 283-293. DOI: 10. 1152/physiol. 00041. 2015.
- [23] Kohn KW, Zeeberg BM, Reinhold WC, et al. Gene expression correlations in human cancer cell lines define molecular interaction networks for epithelial phenotype [J]. PLoS One, 2014, 9 (6) : e99269. DOI: 10. 1371/journal. pone. 0099269.
- [24] Lei KF, Liu BY, Zhang XQ, et al. Development of a survival prediction model for gastric cancer using serine proteases and their inhibitors [J]. Exp Ther Med, 2012, 3 (1) : 109-116. DOI:10. 3892/etm. 2011. 353.
- [25] Tamir A, Gangadharan A, Balwani S, et al. The serine protease prostatic (PRSS8) is a potential biomarker for early detection of ovarian cancer [J]. J Ovarian Res, 2016, 9:20. DOI:10. 1186/s13048-016-0228-9.
- [26] Chen L M, Chai K X. Prostatic serine protease inhibits breast cancer invasiveness and is transcriptionally regulated by promoter DNA methylation [J]. International Journal of Cancer, 2001, 97 (3) : 323-329. DOI: 10. 1002/ijc. 1601.
- [27] Desai MA, Webb HD, Sinanan LM, et al. An intrinsically disordered region of methyl-CpG binding domain protein 2 (MBD2) recruits the histone deacetylase core of the NuRD complex [J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43 (6) : 3100-3113. DOI:10. 1093/nar/gkv168.
- [28] Chen LM, Verity NJ, Chai KX. Loss of prostatic (PRSS8) in human bladder transitional cell carcinoma cell lines is associated with epithelial-mesenchymal transition (EMT) [J]. BMC Cancer, 2009, 9:377. DOI: 10. 1186/1471-2407-9-377.
- [29] Bao Y, Wang Q, Guo Y, et al. PRSS8 methylation and its significance in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2016, 7 (19) : 28540-28555. DOI: 10. 18632/oncotarget. 8677.
- [30] Bao Y, Li K, Guo Y, et al. Tumor suppressor PRSS8 targets Sphk1/S1P/Stat3/Akt signaling in colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2016, 7 (18) : 26780-26792. DOI: 10. 18632/oncotarget. 8511.

(收稿日期 2016-09-24)