

## 衰老过程中脂褐素的形成和蛋白质降解受阻

黄 鹂<sup>1</sup>      印大中<sup>1, 2</sup>

1 广州中医药大学第二附属医院

2 蛋白质化学与发育生物学教育部重点实验室, 湖南师范大学

### 【作者简介】

印大中, 江苏扬州人, 1983年毕业于上海同济大学化学系, 1987年被聘为江苏农学院讲师。曾在瑞典、英国、美国等国留学共约十二年: 1988—1990年在瑞典哥德堡食品科学研究所做访问学者, 1995年获瑞典林雪平大学医学院(病理系)博士学位, 1995—1999年为伦敦大学/林雪平大学合作研究博士后及副教授。1999年被聘为湖南师范大学特聘教授, 博士生导师, 兼任《生命科学研究》杂志执行主编。印大中教授现任美国老年协会理事, 中国生物物理学会理事, 中国老年学学会理事, 中国药文化研究会老年医药委员会副主任委员, 中国老年学学会衰老与抗衰老科学委员会副主任委员, 中国药理学会抗衰老和老年痴呆专业委员会常委。已在国内外学术领域, 发表著作和合著著作十多部, 科学论文近二百篇。科技论文被国际杂志引用六百多次。关于老年色素生化形成机制作出了集大成的贡献, 单独署名发表的关于老年色素的经典论文是目前国际上同领域引用率最高的文章。印大中教授曾获国内外科学研究和论文奖项二十多次, 如美国老年协会 1993 Walter Nicolai 奖, 首届中国老年学奖——杰出贡献奖, 湖南省首届优秀科普著作一等奖和湖南省科技进步二等奖等, 多次应邀在国际学术会议上作报告, 是羰基毒化衰老学说的创始人之一, 提出了睡眠抗衰老机制的假说。目前的研究方向主要在衰老生物化学、预防医学和老年退行性疾病等相关的领域, 于近年来创造性的提出了高等动物广义衰老机制, 生理性衰老过程的生化本质, 熵增衰老的生物化学和生物物理内涵, 以及以现代科学解读中医治本等重要理论。

### 【代表性论文】

1. Yin Dazhong, Lingnert H, Ekstrand B and Brunk UT. Fenton reagents may not initiate lipid peroxidation in an emulsified linoleic acid model system. *Free Radic Biol Med*, 1992, 13: 543-556.
2. Yin Dazhong. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med*, 1996, 21: 871-888.
3. Yin Dazhong. Is carbonyl detoxification an important anti-aging process during sleep? *Medical*

通讯地址: 湖南师范大学生命科学学院, 长沙

E-mail: dazhongyin@hotmail.com

Hypothesis, 2000, 54: 519-522.

4. Yin Dazhong, Chen Keji. The essential mechanisms of aging: irreparable damage accumulation of biochemical side-reactions. *Experimental Gerontology*, 2005, 40: 455-465.
5. 印大中. 衰老, 千古之谜的终结. *中国老年学杂志*, 2008, 28 (3): 209-211.

## 1 引言

随着近几十年来人类平均寿命的迅速增长, 衰老机理的研究以及生物医学技术在健康和抗衰老领域的应用格外受到世人的瞩目, 也取得了许多重大的进展。由于生物组织的复杂性, 无论是遗传因子还是环境因子都已被证明对生物体的疾病和衰老过程产生重大的影响。研究表明, 多种自发进行(非酶促)的生化副反应, 如氧化和非酶糖基化过程, 都会不停地对生物体的结构和功能分子产生熵增性的和随机性的嫌忌反应和修饰, 并对动物和细胞的新陈代谢造成伤害性的, 有时甚至是不可逆的影响和改变。在老化机体内则往往可观察到如脑组织中脂褐素的蓄积, 神经纤维缠结, 淀粉样蛋白和老年斑类物质增多以及血管硬化等增龄性改变, 最终造成脑组织细胞的死亡和生物整体的衰老。目前, 随着自由基生物医学以及糖生物化学研究的深入发展, 细胞内溶酶体和蛋白酶小体中蛋白质的水解和更新以及两者与细胞内随龄蓄积的脂褐素之间的关系越来越引起有关领域专家的密切关注。

## 2 衰老与细胞内蛋白质的降解

衰老的一个显著特征是组织细胞内出现不可降解的荧光物质——脂褐素<sup>[1-3]</sup>。尽管在某些有丝分裂细胞(如肝细胞)中也有脂褐素蓄积的记载, 但脂褐素的蓄积最开始是在不同组织的不分裂细胞如神经元和心肌细胞等长寿细胞中被发现的。脂褐素的超微结构及组化特征跟晚期溶酶体颇为相似, 例如脂褐素颗粒被单膜包被, 与检验溶酶体蛋白酶的组化试剂起反应等等。组成脂褐素的生化物质中包含有各种形式的不可降解的生物大分子垃圾, 其中包括多种蓄积的变性蛋白质。研究认为这些变性蛋白质的产生部分归因于与氧应激和糖应激相关的翻译后修饰<sup>[4-6]</sup>。值得注意的是一些与氧化紧张相关的老化退行性疾病和荧光颗粒的出现往往密切相关<sup>[7]</sup>。最近的研究表明氧化修饰蛋白质的生成、蛋白水解酶活力与溶酶体的内容物的蓄积有关。根据这些研究有人提出脂褐素与腊黄素(脂褐素前体物)的产生部分是由于细胞内蛋白水解能力因年龄和疾病的影响而下降所导致的后果。因此研究这些过程的分子机理及脂褐素和腊黄素的蓄积所带来的细胞功能的改变对研究衰老和退行性病变有着十分重要的意义。

### 2.1 衰老与溶酶体功能

溶酶体作为蛋白质更新系统中的关键亚细胞器在降解各种细胞组分的过程中发挥着十分重要的作用。研究表明溶酶体在衰老过程中发生了改变, 特别是其更新代谢生物分子过程前期的吞噬作用的效率在衰老过程中逐渐下降<sup>[8]</sup>。在自吞噬过程中, 细胞组分形成自吞噬小体与溶酶体发生融合, 进而被蛋白酶和酸性水解酶所降解。自吞噬小体的形成速度及其与溶酶体的融合速度都随着年龄的增加而显著下降<sup>[8,9]</sup>。衰老过程中溶酶体功能发生改变的另一途径是由分子

配体所介导的吞噬作用。在这种蛋白质更新的过程中,蛋白质由于其自身特定的结构特点而被热休克蛋白 73 所识别并与其特异性结合,其中一种蛋白配体为KFERQ。随后靶蛋白与热休克蛋白复合物经溶酶体膜上糖蛋白受体 96(LPG96)的介导而转运到溶酶体内,这种受体也称之为LAMP-2a。据报道,LPG96 在衰老的过程中下调,因而导致分子配体介导的吞噬作用下降。自吞噬和分子配体所介导的吞噬对于细胞内蛋白质和亚细胞器的降解十分重要,因此研究这些衰老过程中溶酶体的衍变是研究细胞衰老和脂褐素蓄积的重要内容之一。

研究用的脂褐素和腊黄素的组织样本主要有以下三种来源:(1)患有某些退行性疾病的人;(2)构建患有这些疾病的动物模型;(3)不同年龄的健康人人体器官。阿尔茨海默症的细胞学特征是神经元内出现由变构蛋白蓄积而形成的老年斑。大量的研究表明,这种神经退行性疾病与不断增加的氧化紧张的伤害有关。有的专家认为老年斑的形成是 $\beta$ -淀粉样蛋白前体水解受阻所造成的<sup>[7,10]</sup>。有趣的是在含有老年斑的神经元中,溶酶体会发生非正常蓄积,并且伴随有组织蛋白酶和其他溶酶体组分的上调。这些现象,有可能是组织细胞对于抗降解变性蛋白质的反馈效应。此外,有报道称组织蛋白酶家族的功能在衰老过程中也发生了改变。溶酶体功能的改变对阐明帕金森症的发病机制也有所启示。此病的特征是在大脑神经元中出现由包被小体蓄积所形成的路易氏小体,在患有此病的大鼠模型中加入1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶(MPTP)会诱导产生 $\alpha$ -核蛋白,此种蛋白的非正常产生有可能与帕金森症的病理机制有关。它在神经元中会形成与脂褐素相似的颗粒。

体外研究也为脂褐素的生成与溶酶体功能随龄变化之间的相关性提供了证据。通常的实验方法是在培养细胞或整个动物的蛋白水解系统中加入蛋白水解酶的抑制剂来观察其结果<sup>[11,12]</sup>。对培养的成纤维细胞的研究表明组织蛋白酶的抑制会导致细胞内荧光物质的蓄积<sup>[13]</sup>,这些物质与脂褐素及腊黄素的结构有一定的相似性,并且它们的产生与细胞功能的退化有关。事实上,腊黄素、脂褐素及蛋白质抑制剂诱导产生的荧光颗粒具有相似的荧光特性<sup>[1,12]</sup>。

## 2.2 衰老与蛋白酶小体的功能

最近的研究表明,脂褐素、腊黄素的形成与细胞内另外一种蛋白水解系统——蛋白酶小体的功能也有一定联系。蛋白酶小体含有多种细胞内蛋白水解酶(如糜蛋白酶、胰蛋白酶和谷胱甘肽复合肽水解酶),具有广泛的蛋白水解能力。它的水解功能是通过识别一定的蛋白质构象而发挥的。蛋白酶(20S 蛋白酶)的催化中心是由两个相邻的七元环状的 $\beta$ 亚基和覆盖在 $\beta$ 亚基两端的两个 $\alpha$ 调控亚基所构成。体外研究结果表明20S蛋白酶倾向于降解已氧化修饰的变性蛋白质。20S蛋白酶与一种多亚基的调节蛋白PA100结合形成26S蛋白酶,这种蛋白酶具有ATP和泛醌依赖性,PA26蛋白对其进行远程调节,这种调节是通过PA26蛋白与20S核心结合而达到的。它形成后在MHC家族I抗原的产生中发挥作用,因此这种蛋白酶结构和催化功能上的特点使它能在更广的范围内参与对细胞功能的调节。

尽管细胞的蛋白水解能力和程度有时会受到研究模式的影响,但衰老过程中蛋白酶的催化功能还是被观察到有相当程度的降低<sup>[14]</sup>,这种降低可能是许多因素共同作用的结果。例如,在衰老过程中人上皮成纤维细胞中蛋白酶的C3和C8亚基会逐渐失活;大鼠的骨骼肌细胞中蛋白酶的Z亚基也会失活。进一步的研究表明在成纤维细胞逐渐衰老的过程中蛋白酶的亚基也会发

生改变。用大鼠心脏组织做的衰老过程中蛋白酶的变化的研究表明酶的催化活性随年龄的增长而下降,这可能是由于心脏组织中 20S蛋白酶在衰老过程中逐渐丧失造成的。此外,对从大鼠心脏组织纯化出来的 20S蛋白酶进行分析,其结果表明催化中心亚基的变化与年龄的变化呈正相关。值得注意的是从衰老个体提取的多肽酶的活性比年轻个体的要低。另外,人为的抑制培养的成纤维细胞中的蛋白酶也会导致脂褐素的形成。

### 3 自由基伤害与蛋白质水解抑制

通过大量的体外研究可以清楚地知道氧自由基能与蛋白质、脂质和DNA反应,从而改变这些生物大分子的结构和功能。氨基酸残基的直接氧化会导致蛋白质的“变质”,如羧基化,而使酶的活力丧失,因而氧化失活的酶被发现随年龄的增加而增加<sup>[15,16]</sup>。应该说明的是,尽管蛋白酶本身容易被氧自由基所损伤,但迄今为止,氧化对溶酶体蛋白酶的直接影响仍知之甚少。

#### 3.1 氧化修饰和蛋白质的水解

蛋白质的初级氧化修饰将会增加蛋白质对蛋白酶降解的敏感性,这可能是由于蛋白质疏水基团暴露而被蛋白酶识别所造成的。然而,进一步地氧化修饰特别是产生复杂稳定结构的蛋白质的交联反应则会使蛋白质的抗水解能力增强。这里首先有必要追溯氧自由基对细胞膜脂质层的氧化损伤的研究,这是氧化损伤领域历时最久,研究最深入和最清楚的范畴。氧自由基可以很容易地将脂膜中的多不饱和脂肪酸过氧化,产生如丙二醛(MDA)和 4-羟基-2-壬烯醛(HNE)等大量对细胞有毒害作用的不饱和醛酮和羟酮等氧化中间产物。在纯化的蛋白质中加入HNE等不饱和醛酮则会导致酶失活和蛋白质交联,放置一段时间还会产生与脂褐素和腊黄素相似的往往具有荧光特性的变性蛋白(激发峰和吸收峰的范围分别在 360~390 nm和 400~600 nm之间)<sup>[1]</sup>。体外研究通常以测定HNE的毒性反应和氨基酸-HNE反应复合物的模式来进行。HNE 的Michael加合物与希夫碱产物是具有荧光的 2-羟基-3-亚氨基-1,2-二氢吡啶(激发峰和吸收峰的范围分别为 360~430 nm)。赖氨酸-HNE荧光物质的交联产物是一种相对稳定的变性蛋白质终末产物。HNE造成的蛋白交联形成了相对稳定的分子结构,阻碍了正常的蛋白水解及其更新代谢。大量的研究结果显示,脂质的过氧化和蛋白质的氧化变性蛋白质的变构和脂褐素的蓄积直接相关。

自由基介导的对蛋白质的直接修饰也会产生与衰老和疾病相关的蛋白质。这种蛋白质醛酮与蛋白质氨基之间的交联也会对细胞的蛋白水解和代谢产生抑制,Davies及其同事将人肺成纤维细胞置于氧化应激的条件下培养,研究了蛋白酶及组织蛋白酶功能的改变。在他们的早衰模型中,细胞被置于富氧的环境中,使细胞中自由基的产生和氧化修饰蛋白的过程加速。在前 5 周内,总体上蛋白水解活动增强,之后至第 12 周,蛋白质水解随时间的延续而下降。使用多肽荧光显示方法,可以检测到组织蛋白酶和蛋白酶小体中的糜蛋白酶样的总活力随时间的延续而下降。细胞内的次级溶酶体和自发荧光物质在蛋白水解系统受到抑制后会随时间而增加,这是检测脂褐素累积的一种方法。此外,氧化损伤成纤维细胞线粒体也是一种有用的模式。线粒体是正常细胞呼吸产生自由基的来源,线粒体氧自由基在缺血再灌注等许多病理条件下会增加,在阿尔茨海默症和帕金森症中也会增加<sup>[1,3,17]</sup>。因此氧化的线粒体可以用于诱导产生氧化紧

张,使氧化损伤的组织中产生交联和蓄积变性蛋白,而成为溶酶体吞噬作用降解的靶物。把成纤维细胞的线粒体暴露在氧化环境中,将会抑制胰蛋白酶样和糜蛋白酶样的活力。细胞内自发荧光和组织蛋白酶活力往往伴随着溶酶体的增加而升高。这些研究表明自由基伤害所导致的蛋白酶的抑制与溶酶体的结构和功能有关,而且 20S蛋白酶降解氧化修饰蛋白质能力的下降会因溶酶体内蛋白酶的增加得到补偿。应该说明的是,蛋白酶小体本身也可被溶酶体所吞噬降解。

### 3.2 蛋白酶小体的功能与氧化应激

在衰老过程中蛋白酶小体的活性也受到了氧化修饰蛋白的影响。对不同年龄大鼠心肌细胞的蛋白酶小体活性的研究表明,与 8 月龄的大鼠相比,26 月龄的大鼠的糜蛋白酶、胰蛋白酶以及谷胱甘肽复合肽水解酶的活性分别降低了 60%、90%和 70%<sup>[18]</sup>。与此同时,老年大鼠的心肌细胞中氧化修饰蛋白质的水平全面升高。将 8~26 月龄的大鼠的心脏组织中的 20S蛋白酶小体催化中心被提纯后,可以观察到与年龄相关的糜蛋白酶活性的丧失,而在相同情况下,胰蛋白酶和谷胱甘肽复合肽水解酶的活性被部分保存且仍能发挥作用。另外,纯化的 20S蛋白酶小体降解酪蛋白的活性也降低了近 50%<sup>[18]</sup>。与增龄相关的蛋白酶小体活性的抑制被部分地认为是由于肌细胞内酶的内容物的减少和 20S蛋白酶小体的催化中心亚基组成的变化所致。

## 4 展望

总之,在细胞存活期间,由于蛋白质和其他生物大分子经历了损伤性的交联反应,抑制了细胞内蛋白质的降解和更新,从而最终导致了脂褐素类生物垃圾的生成和蓄积。溶酶体和蛋白酶小体的结构及功能的变化在生理学上的重要意义,以及它们在与衰老相关的细胞功能改变中的作用,仍有待于进一步的考证。由于蛋白酶小体在免疫与应激应答、基因转录和细胞凋亡的防护方面发挥作用<sup>[19,20]</sup>,因此与衰老相关的溶酶体和蛋白酶小体的结构和功能的改变可能会广泛影响各种新陈代谢通路,因而今后的研究应着眼于细胞及生理学功能的与衰老相关的影响蛋白水解过程的分子机理,而脂褐素形成及细胞衰老机理的研究无疑将有助于这个目标的实现。

## 参考文献

- 1 Yin D. Biochemical basis of lipofuscin, ceroid, and age pigment-like fluorophores. *Free Radic Biol Med*, 1996;21(6):871-888.
- 2 Jung T, Bader N, Grune T. Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences. *Ann NY Acad Sci*, 2007;1119:97-111.
- 3 Porta EA. Pigments in aging: an overview. *Ann N Y Acad Sci*, 2002;959: 57-65.
- 4 Chio KS, Tappel AL. Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry*, 1969;8(7):2821-2826.
- 5 Itakura K, Uchida K. Evidence that malondialdehyde-derived aminoenimine is not a fluorescent age pigment. *Chem Res Toxicol*, 2001;14(5):473-475.
- 6 Brunk UT, Terman A. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*, 2002;33(5):611-619.

- 7 Nixon RA, Cataldo AM, Mathews PM. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review. *Neurochem Res*, 2000;25(9-10):1161-1172.
- 8 Terman A. The effect of age on formation and elimination of autophagic vacuoles in mouse hepatocytes. *Gerontology*, 1995;41 Suppl 2:319-326.
- 9 Cavallini G, Donati A, Gori Z, Pollera M, Bergamini E. The protection of rat liver autophagic proteolysis from the age-related decline co-varies with the duration of anti-ageing food restriction. *Exp Gerontol*, 2001;36(3):497-506.
- 10 Cataldo AM, Barnett JL, Berman SA, Li J, Quarless S, Bursztajn S, Lippa C, Nixon RA. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron*, 1995;14(3):671-680.
- 11 Ivy GO, Roopsingh R, Kanai S, Ohta M, Sato Y, Kitani K. Leupeptin causes an accumulation of lipofuscin-like substances and other signs of aging in kidneys of young rats: further evidence for the protease inhibitor model of aging. *Ann N Y Acad Sci*, 1996;786: 12-23.
- 12 Kitani K, Ohta M, Kanai S, Nokubo M, Sato Y, Otsubo K, Ivy GO. Morphological, physiological and biochemical alterations in livers of rodents induced by protease inhibitors: a comparison with old livers. *Adv Exp Med Biol*, 1989;266:75-92.
- 13 Terman A, Brunk UT. Ceroid/lipofuscin formation in cultured human fibroblasts: the role of oxidative stress and lysosomal proteolysis. *Mech Ageing Dev*, 1998;104(3):277-291.
- 14 Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis free radicals and aging. *Free Radic Biol Med*, 2002;33(1):29-36.
- 15 Yan LJ, Sohal RS. Prevention of flight activity prolongs the life span of the housefly, *Musca domestica*, and attenuates the age-associated oxidative damage to specific mitochondrial proteins. *Free Radic Biol Med*, 2000;29(11):1143-1150.
- 16 Das N, Levine RL, Orr WC, Sohal RS. Selectivity of protein oxidative damage during aging in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J*, 2001;360 (pt 1):209-216.
- 17 Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 2000;29(3-4):222-230.
- 18 Bulteau AL, Szweda LI, Friguet B. Age-dependent declines in proteasome activity in the heart. *Arch. Biochem. Biophys*, 2002;397(2):298-304.
- 19 Szweda PA, Friguet B, Szweda LI. Proteolysis free radicals and aging. *Free Radic Biol Med*, 2002;33(1):29-36.
- 20 Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003;4(3):192-201.