

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.14.009

Cathepsin L 在鱼藤酮诱导的 PC12 细胞凋亡中的作用*

袁诗宇[#] 徐舒青[#] 宋云珍 梁中琴[△]

(苏州大学药学院 江苏 苏州 215123)

摘要目的: 研究 Egr-1 对 Cathepsin L 的调控在鱼藤酮(Rotenone)诱导的多巴胺能神经元 PC12 凋亡的作用,初步探讨 Egr-1 与 Cathepsin L 的关系及机制。**方法:** 常规培养 PC12 细胞,分别取 1 μM , 2 μM 的 Rotenone 处理,用倒置显微镜观察细胞的形态变化;确定敏感性最强的浓度后再在不同的时间点下用 Western blotting 检测 Egr-1、Cathepsin L 蛋白表达情况;采用 Egr-1 siRNA 转染 PC12 细胞,空载体 siVector 转染 PC12 细胞,Hoechst 染色法检测细胞凋亡,Western blotting 检测各处理组中 Egr-1、Cathepsin L 蛋白的表达情况。**结果:** Western blotting 结果显示,经 Rotenone 刺激过的 PC12 细胞在 2 μM 的浓度下最敏感,其 Egr-1 和 Cathepsin L 蛋白的表达量显著增加,且 Egr-1 在 15 min 就有明显的增加,而 Cathepsin L 在 30 min 才明显增加,说明 Egr-1 的确是出现在 Cathepsin L 蛋白的上游;Egr-1 siRNA 转染的 PC12 细胞的 Cathepsin L 表达量明显低于空载体转染 PC12 细胞。**结论:** 多巴胺能神经元 PC12 在 Rotenone 刺激下,细胞内 Cathepsin L 的表达与细胞内 Egr-1 蛋白水平有关,并且在抑制 Egr-1 的表达后,细胞内 Cathepsin L 的表达也相应的降低。所以我们得出 Egr-1 对 Cathepsin L 可能有调控作用,从而来调控多巴胺能神经元的凋亡。

关键词: 组织蛋白酶 L; Egr-1; 鱼藤酮; PC12 细胞; 帕金森综合症

中图分类号: R-33; R742.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)14-2640-06

The Role of Cathepsin L in Rotenone-induced PC12 Cells Apoptosis*

YUAN Shi-yu[#], XU Shu-qing[#], SONG Yun-zhen, LIANG Zhong-qin[△]

(Pharmacy college of Soochow University, Suzhou, Jiangsu, 215123, China)

ABSTRACT Objective: To research the regulation between Cathepsin L and Egr-1 in Rotenone-induced dopaminergic neurons PC12's apoptosis, and explore the relationship between Cathepsin L and Egr-1 and its mechanism. **Methods:** Conventional culture PC12 cells, and we observed cell morphology by inverted microscope. We took 1 μM and 2 μM Rotenone to treat PC12 cells and detect its sensitivity. Respectively we chose the concentration of the most sensitivity and then at different time points, we examined the expression level of Cathepsin L and Egr-1 in PC12 cells treated by Rotenone using Western blotting. PC12 cells were transfected with Egr-1 siRNA plasmid or control siRNA plasmid-A, and Hoechst detects cell apoptosis, and Western blotting detects each treatment group of Egr-1 and Cathepsin L protein expression intracellular. **Results:** The results showed that PC12 cells had the most sensitivity at the concentration of 2 μM Rotenone. Western blotting results suggested that after Rotenone stimulated PC12 cells, Egr-1 and Cathepsin L protein expression increased significantly, and Egr-1 increased significantly at 15 minutes, and Cathepsin L was increased significantly at 30 minutes, indicating that Egr-1 is indeed on the upstream of Cathepsin L protein. Cathepsin L expression of Egr-1 siRNA-transfected PC12 cells was significantly lower than that in PC12 cells transfected with empty vector. **Conclusion:** After treated by Rotenone, Cathepsin L expression of intracellular cells is related with the level of Egr-1 protein, and the interference of the expression of Egr-1 protein could made the intracellular expression of Cathepsin L correspondingly reduced. We guessed that Egr-1 could regulate the expression of Cathepsin L and then regulate apoptosis of dopaminergic neurons.

Key words: Cathepsin L; Egr-1; Rotenone; PC12 cells; Parkinson

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R742.5 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)14-2640-06

前言

近年来,一种常见的临床表现为表情减少、震颤、肌强直等现象的疾病在中老年中非常流行,这就是我们所知道的帕金森

病(Parkinson's disease, PD)。PD 又称震颤麻痹,是中老年人中最常见的一种退行性中枢神经系统疾病。主要的病理特征表现为中脑黑质纹状体中多巴胺(Dopamine, DA)能神经元损伤,导致 DA 含量显著减少,并且使神经突触核蛋白 α -synuclein 生成

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81072656, 81102466, 81373430)

[#] 为共同第一作者

作者简介:袁诗宇(1992-),女,硕士研究生,主要研究方向:药理学,电话:18862195169, E-mail: shiyu_yuan@163.com

[△] 通讯作者:梁中琴(1954-),女,教授,主要研究方向:神经与肿瘤药理学,电话:13862046589, E-mail: liangzhongqin@suda.edu.cn

(收稿日期:2016-06-29 接受日期:2016-07-18)

并聚集^[1,2]。目前我们了解到有药物治疗、手术治疗、康复治疗和心理治疗等治疗方式。目前,临床上仍然以 DA 替代疗法为主要治疗方式。

PD 的发病机制到目前为止尚未得到清晰准确的阐明。但已有报道称遗传因素和环境毒素是 PD 发病的主要因素,而其他因素如氧化应激反应、线粒体功能发生障碍、凋亡等也可共同起到诱发细胞内蛋白质的过度表达及异常聚集,最终导致多巴胺能神经元的死亡^[3]。因此,加速清除异常聚集的蛋白质,减轻其对细胞的毒性作用,极有可能成为 PD 以及类似的神经营养性退行性疾病治疗的新靶点。

组织蛋白酶 L(Cathepsin L),是属于溶酶体蛋白酶中的一员,通常以前体形式被合成,经高尔基体以囊泡形式分泌,之后以成熟形态储存在各种组织细胞的溶酶体中,近年来,越来越多的研究发现,该蛋白酶与肿瘤的发生、发展、浸润、转移和耐药性等密切相关^[4-7]。在近几年的研究中,不少学者发现 Cathepsin L 可能也参与肿瘤细胞的化疗敏感性调节^[8,9]。Cathepsin L 是许多细胞凋亡反应的上游效应物,当细胞被某些物理和化学因素如辐射和 Rotenone 刺激时,Cathepsin L 也会被激活从而从溶酶体中释放到胞浆中,也可通过线粒体途径引起细胞色素 C 的释放和 Caspase 的激活,从而引起细胞凋亡^[10]。除此之外,在小鼠急性脑缺血模型中,可发现脑组织的局部缺血可以激活 Cathepsin L 和 Cathepsin B 的表达,从而引起细胞凋亡^[11]。近几年我们课题组研究发现,Cathepsin L 还可通过核转位影响细胞周期的进程来诱导凋亡,为了证明这一观点我们实验室使用 Cathepsin L 抑制剂 Z-FY-DMK 来抑制 Rotenone 诱导的 S 期的阻滞^[12],从而减轻 Rotenone 的毒性作用并保护多巴胺能神经元 SH-SY5Y 细胞^[13],另外在喹啉酸诱导的大鼠纹状体神经元损伤中,Cathepsin L 抑制也起到了神经保护作用^[14]。

近几年研究发现 Cathepsin L 的表达受多种机制调控^[15],主要表现在以下几个方面:(1)通过启动子水平的转录机制调控;(2)通过基因扩增调控;(3)通过 CpG 区域甲基化调控;(4)通过转录后机制调控;(5)NF- κ B, SP1 和 SP3 作为转录因子参与人类 Cathepsin L 基因转录的调控^[16,17];(6)通过环境因素调控^[18]。

早期生长反应基因 1(Early growth response 1, Egr-1)是早期生长反应基因家族成员之一,具有典型的锌指结构,Egr-1 通过激活或抑制靶基因的表达实现其生物学功能,其活化的过程是许多炎症相关性疾病的发生发展的重要环节^[19],其可通过影响细胞的增殖和凋亡从而参与到诱导细胞的转化和肿瘤的形成。目前有文章报道 Egr-1 可以转录激活 Bim 的表达从而来介导大鼠小脑颗粒神经元的凋亡^[20]。

综上所述,组织蛋白酶 L 在体内的表达受到了很多因素的影响,这些结果为我们的研究做了很好的铺垫。

本文我们拟解决的问题是:(1)在 Rotenone 刺激 PC12 细胞时 Egr-1 对 Cathepsin L 的调控作用;(2)干扰 Egr-1 后对 Cathepsin L 的影响以及对多巴胺能神经元的保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和样本

鱼藤酮(Rotenone),购于 Sigma 公司,用 DMSO 完全溶解,配成 10 mM 母液,每次使用时均新鲜配制。

细胞培养试剂:DMEM 细胞培养基、Gibco 胎牛血清,购于 Gibco 公司。

抗体: β -actin (Multisciences); Egr-1 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY); Cathepsin L (Abcam);抗鼠和抗兔的二抗 (Multisciences)。

质粒:Egr-1 shRNA 质粒,购于 SANTA CRUZ 公司。

Lipofectamine 2000,购于 Intritrogen 公司。

试验主要试剂盒:BCA (bicinchoninic acid)蛋白定量试剂盒 (Thermo 公司);Hoechst33258 购于 Beyotime 公司;DAPI 购于美国 Sigma 公司。

其它:DMSO 溶液用于完全溶解鱼藤酮,购于 AMRESO 公司;其它试剂均为国产分析纯。

1.2 细胞培养

褐家鼠 PC12 细胞,维持神经细胞生存的培养液是包含 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养液,放入 37 °C, 5% CO₂ 条件的培养箱培养。当细胞铺满瓶底的 75%-95% 时,0.25% 胰酶用来消化、传代。

1.3 正常 PC12 细胞及 Rotenone 刺激后 PC12 细胞形态学观察

用镊子将已冻存的 PC12 细胞从液氮罐中取出,将其迅速置于 37 °C 的水浴锅中,持续振荡,摇晃,使其溶化;于 4 mL 的 EP 管中吸入 2 mL 的 DMEM 培养基,再将溶化的冻存液吸入,离心 2000 rpm, 5 min; 吸出上清液于废液缸中,加入 2 mL 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基到离心管中进行重悬,再将细胞悬液与 3 mL 含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基一同加入细胞培养皿中,轻微振荡,摇晃均匀,放置于 37 °C, 5% CO₂ 的培养箱中培养。待细胞铺满皿底的 75%-80% 时,弃掉培养液,用 PBS 清洗一次,再用 0.25% 胰酶进行消化、传代处理。

1.4 Western blotting 法

将细胞铺板,进行不同组处理,并收集不同处理组的细胞,弃去培养液,加入裂解液,放置于冰浴中进行超声裂解,在 4 °C 下,离心 12000 rpm, 15 min,然后将蛋白上清液吸到新的 EP 管中,用 BCA 法测量蛋白浓度。用 PBS 调节上样蛋白浓度,使其浓度一致,再按照 4:1 的样品比例加入 5 倍上样缓冲液,将其混匀后放入 100 °C 煮沸的水中 5 min,使蛋白质变性,然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。转膜后用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,加入一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗 3 次,加入荧光二抗避光孵育 1 h。TBST 洗膜后用电化学发光(ECL)显色。

1.5 Hoechst 染色法

将调整浓度后对数生长期的 PC12 细胞接种于已处理的小圆玻片上,并置于 24 孔板中培养,等待细胞贴壁后再给予不同分组处理;用配好的 Rotenone 处理至相关特定的时间后,弃去培养液,加入 500 μ L 固定液,4 °C 温度下固定 15 min;再弃掉固定液,用预冷的 PBS 洗两次,每次 5 min,然后吸尽所有液体;在 24 孔板的每个孔中分别加入 500 μ L 的 Hoechst 33258 染色液,室温避光染色处理 10 min;再弃染色液,用预冷的 PBS 洗涤两次,每次 5 min,吸尽液体;最后将 2.5 μ L 的抗荧光淬灭封片液滴于载玻片上,在载玻片上盖上盖玻片,并将细胞朝下,

贴着载玻片,将气泡除去从而使细胞能充分接触封片液;封好片子后在倒置荧光显微镜下观察,并用紫外光激发,最后观察摄片。

1.6 免疫荧光法

将对数期生长的 PC12 细胞接种于已处理过的小圆玻片上,放置于 24 孔板内加培养液进行培养,等待细胞贴壁后给予不同分组的实验处理至设定的时间,吸去培养液,用预冷的 PBS 洗 3 次,每次 5 min;再吸去 PBS,从 -20 °C 冰箱里取出冷的无水乙醇固定 10 min;然后吸去无水乙醇,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;再用 0.2 % Triton-PBS 100 孵育 10 min,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;再在 4 °C 的环境中滴加 1 % 的 BSA 封闭 1 h;再用预冷的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;滴加由 1 % 的 BSA 稀释的一抗,在 4 °C 环境中孵育过夜;用预冷的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;再在 4 °C 环境中向每孔加入配好的二抗稀释液进行避光孵育处理上 1 h 后,用预冷的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min;最后将 DAPI 染液滴加上去(DAPI 染液主要染核),避光染色 10 min;用预冷的 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,于暗处晾干;最后使用荧光封片液封好片,尽可能的避免气泡;于共聚焦显微镜下观察并摄片。

1.7 Egr-1 siRNA 转染

在转染前一天,将 PC12 细胞制成细胞悬液,调整细胞浓度,接种于六孔板中,放于 37 °C、5 %CO₂ 培养箱中培养至 60

%-70 %融合,并在转染前 30 min,更换新鲜的 DMEM 培养液;制备 A 液,在 500 μL OMEM 培养液中加入 3 μL Egr-1 siRNA Plasmid,混匀制成 DNA 稀释液,室温下无菌静置 5 min;制备 B 液,取 6 μL Lipofectamine 2000 加入到 500 μL OMEM 中,充分混匀,室温下无菌静置 5 min;将 A 液与 B 液轻轻混匀,室温下无菌静置 15 min,将转染后所得的复合物加入到所需转染的培养瓶中,轻轻混匀,并于 5 h 后更换完全培养基,再放在 37 °C、5 %的 CO₂ 培养箱中培养 24 h,收集细胞并检测其转染水平,然后进行后续相关实验。

1.8 统计学分析

免疫荧光结果的图像用 Sigma Pro 5 软件来进行采集并分析,用 GraphPad Prism 5 软件做柱状统计图并分析方差。统计学方法以 P<0.05 认为有显著性差异且差异有统计学意义。实验重复至少 3 次。

2 结果

2.1 Rotenone 诱导 PC12 细胞凋亡

常规培养条件下,经 1 μM 和 2 μM Rotenone 分别在 1 h、2 h 刺激后的 PC12 细胞与正常 PC12 细胞相比,形态学上出现了一些变化(图 1),实验组 PC12 细胞的 85 %-95 %由长梭形变成不规则圆形。

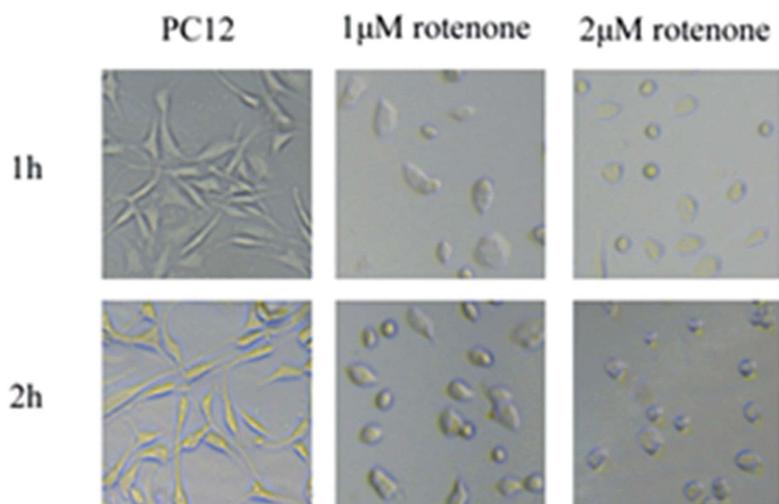


图 1 正常 PC12 细胞及 Rotenone 刺激后 PC12 细胞形态学观察(400×)

Fig.1 Normal PC12 cells and Retonone-induced PC12 cells morphological observation (400×)

2.2 不同 Rotenone 浓度不同时间点下 Cathepsin L 的表达情况

最常用的定性分析蛋白质的电泳方式是 SDS-PAGE,其分离原理为依据蛋白质的分子量的不同,其电泳迁移率不同,分离出的条带为蛋白质的亚基。

Western blotting 免疫印迹结果发现(图 2),2 μM Rotenone 刺激的 PC12 细胞凋亡的程度更明显,且细胞内的 Cathepsin L 蛋白表达在 30 min 时与其他处理组相比明显升高,PC12 细胞的凋亡可能与细胞内 Cathepsin L 蛋白水平有关(统计学差异)。

2.3 Rotenone 刺激后 Egr-1 的表达

我们用 Western blotting 实验来检测 Rotenone 刺激对 PC12 细胞中 Egr-1 的表达情况。如图 3 所示,在 15 min 处 E-

gr-1 的表达开始增加,30 min 处显著升高,这与之前 Cathepsin L 的表达在 30 min 处显著增高产生了联系,我们推测,有可能 Egr-1 参与了 Cathepsin L 表达的调控。以上试验结果表明,Egr-1 处于 Cathepsin L 的上游区段,在细胞凋亡的过程中,先于 Cathepsin L 表达。

2.4 干扰 Egr-1 前后细胞的凋亡情况以及 Cathepsin L 的表达

为了进一步研究 Egr-1 与 Cathepsin L 之间的关系,我们用 Egr-1 靶向 siRNA 作用于 PC12 细胞(图 4)。Hoechst 结果发现,正常对照组中的 PC12 细胞其染色质表现为均质并发出弥散匀称的蓝色荧光,而在 R(Rotenone)刺激过的 PC12 细胞 30 %-50 %都出现碎块状致密浓染的蓝色荧光,且 2 μM 的凋亡

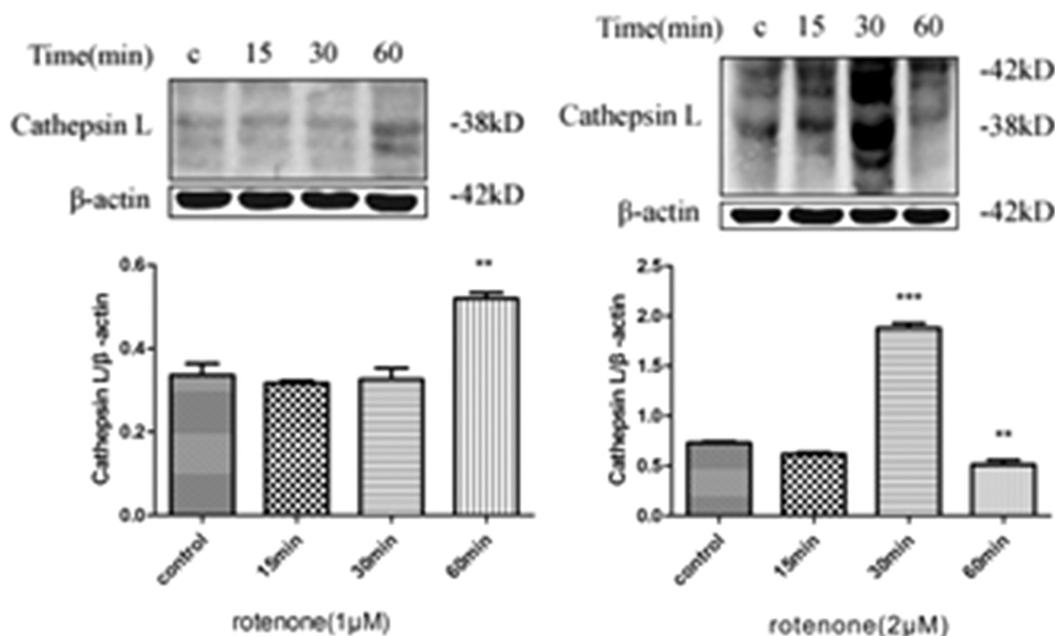


图 2 PC12 细胞经鱼藤酮处理后 Cathepsin L 的表达

Fig.2 The expression of Cathepsin L in Retonone-induced PC12 cells(Note: P< 0.05, *, P< 0.01, **, P< 0.005, ***)

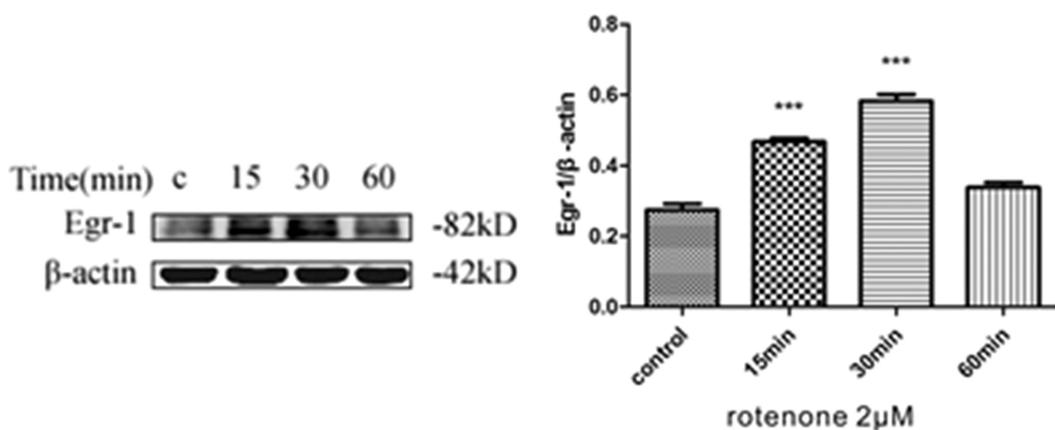


图 3 PC12 细胞经 Rotenone 处理后 Egr-1 的表达

Fig.3 The expression of Egr-1 in Retonone-induced PC12 cells(Note: P< 0.05, *, P< 0.01, **, P< 0.005, ***)

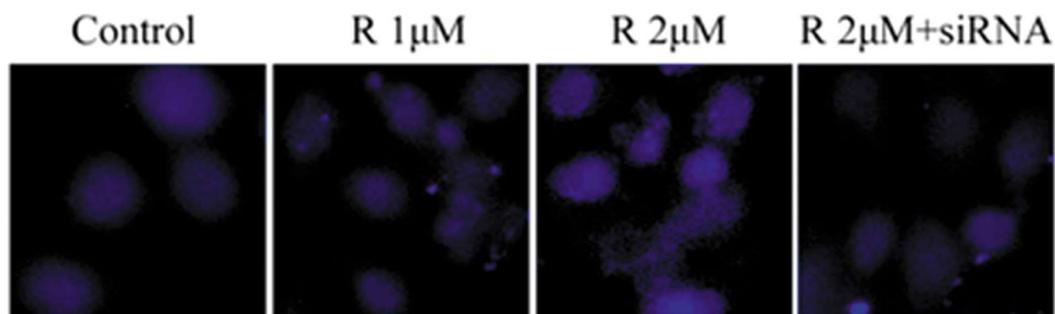


图 4 Hoechst 染色检测 PC12 细胞凋亡情况 (600×)

Fig.4 The apoptosis level measured by Hoechst staining (600×)

程度明显高于 1 µM, 为凋亡阳性染色特征; 而转染了 Egr-1 siRNA 的细胞核有了明显的恢复, 其凋亡程度减弱, 我们从而推断出 Egr-1 可能通过调控某些凋亡蛋白的表达而抑制细胞凋亡。

于是我们做了 Western blotting 来检测干扰 Egr-1 后

Cathepsin L 的表达情况(图 5)。根据之前的情况, 我们选用 2 µM 的 R 刺激 2 h 来进行细胞造模。Western Blotting 的结果表明, PC12 细胞转染了 Egr-1 靶向 siRNA 后, Egr-1 表达明显降低, 而转染后的 PC12 细胞中 Cathepsin L 的表达与未转染的相比发现亮度明显减弱。

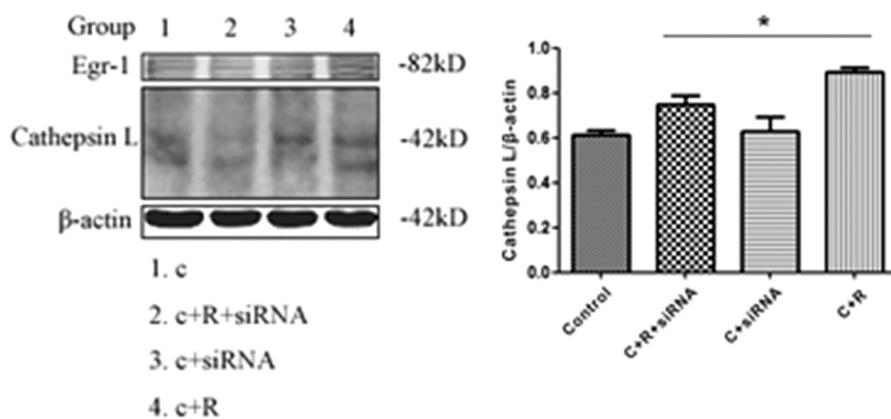


图 5 干扰 Egr-1 可以显著降低 Cathepsin L 的表达

Fig.5 Interference Egr-1 can effectively reduced Cathepsin L expression(Note: *p<0.05)

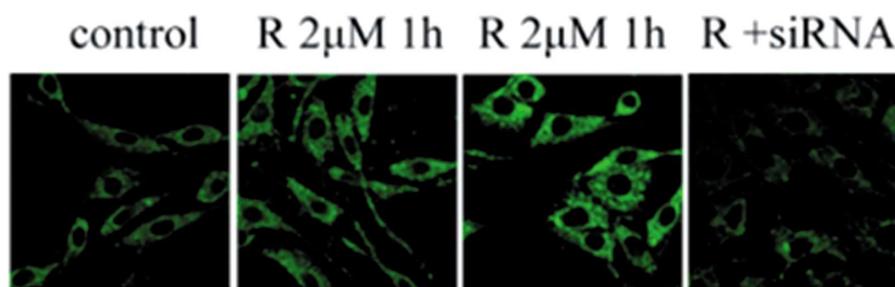


图 6 干扰 Egr-1 后 cathepsin L 表达降低 (600×)

Fig.6 Immunostaining confirmed that interference Egr-1 effectively reduced Cathepsin L (600×)

为了进一步证明试验结果我们又做了免疫组化来验证 Cathepsin L 在细胞转染后表达的情况(图 6)。在共聚焦下拍摄发现 PC12 细胞在 2 μM Rotenone 刺激时最敏感且 Cathepsin L 表达最高。免疫组化结果表明,用 2 μM Rotenone 刺激的 PC12 细胞中 Cathepsin L 的颜色亮的范围最大,且 Cathepsin L 的表达与未经处理或空载体转染对照组相比,有明显降低。

3 讨论

帕金森病(Parkinson's disease, PD)严重影响着中老年人的健康水平和生活质量。它在六十岁左右的老年人身上发病率高达 1-2 %^[21]。近年来,随着人口老龄化水平的增加以及人们物质生活水平的逐步提高,帕金森病的患病率也一直处于上升趋势,给公共卫生事业带来了艰巨的挑战。迄今为止,帕金森病尚无明确的对因治疗手段,而其对症治疗手段也并不能延缓疾病的进展,且长期用药会诱发一些不良副作用,如左旋多巴长期用药就会导致严重的运动障碍^[22]。因此,寻找新的能够阻止疾病进展的调控机制已经刻不容缓。

凋亡,已报道其参与了 PD 神经元的死亡^[23-25]。帕金森病的主要病理特征就是黑质致密部多巴胺能神经元的损伤^[26]以及与环境毒素 MPTP 和杀虫剂、除草剂 Rotenone 等的长期接触都可能是 PD 发生的诱因^[27],但经 Rotenone 处理后可产生 α-synuclein 的形成和聚集这一系列病理变化,因此本试验选用了 Rotenone 暴露的方法为 PD 建立细胞模型。

Cathepsin L(组织蛋白酶 L)是一种半胱氨酸蛋白酶,广泛存在于溶酶体内,当其收到某种物理或化学因素刺激后,会释

放到细胞浆中,通过线粒体途径引导细胞色素 C 的释放,而细胞色素 C 的释放是整个凋亡过程的重要环节,其释放会导致 Caspase 家族蛋白的级联激活,进而最终导致细胞凋亡。我们课题组研究发现,Cathepsin L 蛋白表达的异常及细胞周期的紊乱与多巴胺能神经元的凋亡有着紧密的联系,而有关 Cathepsin L 与凋亡的研究报道并不多,所以这就更值得我们去进行深入的研究。

在本研究中,用 1 μM 和 2 μM 的 Rotenone 分别处理了 PC12 细胞后发现,2 μM 的 Rotenone 处理过的 PC12 细胞活力明显比 1 μM 的要低,并且 Hoechst 染色和免疫荧光结果也都显示出,不同浓度的 Rotenone 处理过的 PC12 细胞也都不同程度地发生了明显的凋亡现象,这些结果都表明已成功建立了 Rotenone 诱导的 PD 细胞模型。另外,我们的研究发现,经 Rotenone 刺激过的 PC12 细胞内 Egr-1 与 Cathepsin L 的表达均有明显的增加,且 Egr-1 表达水平的增加出现在 Cathepsin L 表达水平增加之前,并且在抑制了 Egr-1 的表达之后,Cathepsin L 的表达也会相应的降低。此结果提示,Egr-1 可能在上游参与调节 PC12 细胞内 Cathepsin L 的表达。为了进一步验证这个猜想,我们运用 Egr-1 靶向 shRNA 抑制 PC12 细胞内 Egr-1 的表达,分别用 Hoechst 染色和免疫组化来检测细胞凋亡的情况以及相关蛋白分泌情况。

综上所述,本文在建立了 Rotenone 诱导的 PD 细胞模型中探索了 Cathepsin L 与 Egr-1 之间的相互关系,运用形态学观察、转染、Western Blotting、Hoechst 染色、免疫组化等实验方法验证了 Egr-1 对 Cathepsin L 的调控作用。研究显示:与

Rotenone 单个用药组相比,抑制 Egr-1 的表达后,PC12 细胞的凋亡情况受到了更加明显的抑制,主要表现在细胞的形态以及 Cathepsin L 蛋白水平的表达。并且 Egr-1 可能是通过调节 Cathepsin L 的表达来对细胞凋亡进行调控。本文的研究对探索多巴胺能神经元凋亡机制提供了新线索,并且提出调节 Cathepsin L 可作为多巴胺能神经元损伤治疗中重要的靶点,为今后的多巴胺类药物开发提供了实验依据。

参考文献(References)

- [1] Bredesen DE, Rao RV, Mehlen P. Cell death in the nervous system[J]. *Nature*, 2006, 443: 796-802
- [2] Mattson MP. Apoptosis in neurodegenerative disorders [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2000, 1: 120-129
- [3] Navab R, Pedraza C, Fallavollita L, et al. Loss of responsiveness to IGF-I in cells with reduced cathepsin L expression levels [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 4973-4985
- [4] Singh N, Das P, Gupta S, et al. Plasma cathepsin L: A prognostic marker for pancreatic cancer [J]. *World J Gastroentero*, 2014, 20 (46): 17532-17540
- [5] Zheng X, Chou PM, Mirkin BL, et al. Senescence-initiated Reversal of Drug Resistance: Specific Role of Cathepsin L [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 1773-1780
- [6] Zhang LS, Wei LX, Shen GZ, et al. Cathepsin L is involved in proliferation and invasion of ovarian cancer cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2015, 11 (1): 468-474
- [7] Tsai JY, Lee MJ, Chang MDT, et al. The effect of catalase on migration and invasion of lung cancer cells by regulating the activities of cathepsin S, L, and K [J]. *Experimental Cell Research*, 2014, 323 (1): 28-40
- [8] Kirschke H, Eerola R, Hopsu-Havu VK, et al. Antisense RNA inhibition of cathepsin L expression reduces tumorigenicity of malignant cells[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(6): 787-795
- [9] Neng YANG, Pan WANG. Inhibition of cathepsin L sensitizes human glioma cells to ionizing radiation in vitro through NF- κ B signaling pathway[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2015, 36: 400-410
- [10] Cirman T, Oresic K, Mazovec GD, et al. Selective disruption of lysosomes in Hela cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomalCathepsins [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(5): 3578-3587
- [11] Kaasik A, Rikk T, Piirsoo A, et al. Up-regulation of lysosomal Cathepsin L and autophagy during neuronal death induced by reduced serum and potassium[J]. *European Journal of Neuroscience*, 2005, 22 (5): 1023-1031
- [12] Xiang B, Fei X, Zhuang W, et al. Cathepsin L is involved in 6-hydroxydopamine induced apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells[J]. *Brain Res*, 2011, 1387: 29-38
- [13] Fei XF, Qin ZH, Xiang B, et al. Olomoucine inhibits cathepsin L nuclear translocation, activates autophagy and attenuates toxicity of 6-hydroxydopamine[J]. *Brain Res*, 2009, 1264: 85-97
- [14] Wang Y-R, Qin S, Han R, et al. Cathepsin L Plays a Role in Quinolinic Acid-Induced NF-Kb Activation and Excitotoxicity in Rat Striatal Neurons [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(9): e75702
- [15] Jean D, Rousselet N, Frade R. Expression of Cathepsin L in human tumor cells is under the control of distinct regulatory mechanisms [J]. *Oncogene*, 2006, 25: 1474-1484
- [16] Jean D, Guillaume N, Frade R. Characterization of human Cathepsin L promoter and identification of binding sites for NF-Y, Sp1 and Sp3 that are essential for its activity[J]. *Biochem.J*, 2002, 361: 173-184
- [17] Ishidoh K, Taniguchi S, Kominami E. Egr Family Member Proteins Are Involved in the Activation of the Cathepsin L Gene in v-src-Transformed Cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 238: 665-669
- [18] Jean D, Rousselet N, Frade R. Cathepsin L expression is up-regulated by hypoxia in human melanoma cells: role of its 5'-untranslated region [J]. *Biochem J*, 2008, 413: 125-134
- [19] Ogishima T, Shiina H, Breault JE, et al. Increased heparanase expression is caused by promoter hypomethylation and up-regulation of transcriptional factor early growth response-1 in human prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3): 1028-1036
- [20] Xie B, Wang C, Zheng Z, et al. Egr-1 transactivates Bim gene expression to promote neuronal apoptosis [J]. *J Neurosci*, 2011 31: 5032-5044
- [21] Sethi KD. Clinical aspects of Parkinson disease [J]. *Curr Opin Neurol*, 2002, 15: 457-460
- [22] Sharma S, Singh S, Sharma V, et al. Neurobiology of I-DOPA induced dyskinesia and the novel therapeutic strategies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 70: 283-293
- [23] Schapira AH, Olanow CW, Greenamyre JT, et al. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives[J]. *Lancet*, 2014, 384: 545-555
- [24] Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders[J]. *Prog Neurobiol*, 2014, 112: 24-49
- [25] Omura T, Kaneko M, Okuma Y, et al. Endoplasmic reticulum stress and Parkinson's disease: the role of HRD1 in averting apoptosis in neurodegenerative disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2013, 2013: 239854
- [26] Lamberts JT, Hildebrandt EN, Brundin P. Spreading of alpha-synuclein in the face of axonal transport deficits in Parkinson's disease: A speculative synthesis[J]. *Neurobiol Dis*, 2015, 77: 276-283
- [27] Cannon JR, Greenamyre JT. Gene-environment interactions in Parkinson's disease: specific evidence in humans and mammalian models[J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 57: 38-46