

## 组织蛋白酶 K 对大鼠空间学习记忆功能的影响\*

陈丽<sup>1,2+</sup>, 陈金信<sup>3+</sup>, 王心怡<sup>1,2</sup>, 李香兰<sup>4</sup>, 姜海英<sup>2Δ</sup>

(1. 浙江中医药大学, 杭州 310000; 2. 嘉兴学院, 嘉兴 314000; 3. 三亚学院, 三亚 572000; 4. 延边大学, 延吉 136200)

**【摘要】 目的:** 探讨组织蛋白酶 K(CatK)对大鼠海马空间学习和记忆功能的影响及其神经化学机制。**方法:** SD 雄性大鼠随机分为对照组(Control 组)和 CatK 阻断组(CatK II 组)每组各 10 只,分别于海马 DG 区微量注射组织蛋白酶 K 特异性阻断剂(0.5 μg/μl)和等量人工脑脊液 5 d;原代培养海马神经元细胞,设对照组(CON 组)、阴性对照组(NC 组)和 siRNA 干扰组(siCatK 组),每组设 3 个复孔,siRNA 导入 18~20 h 后收集样本。应用 Morris 水迷宫评估大鼠空间学习和记忆功能,同时在大鼠清醒、自由活动状态下,结合脑部微量透析法和高效液相色谱法观察学习记忆过程中 DG 区细胞外液中谷氨酸(Glu)含量的动态变化;采用蛋白免疫印迹法检测海马组织和神经元细胞中 c-Notch1、Notch1、p-CREB、BDNF 等相关信号蛋白的表达情况。**结果:** 动物实验显示,与 Control 组相比,CatK II 组空间学习记忆能力明显减弱,并伴随着海马组织的 c-Notch1、p-Akt、p-CREB 和 BDNF 蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ );Control 组和 CatK II 组 DG 区 Glu 含量均随水迷宫训练天数的增加而明显升高,但 CatK II 组升高幅度均明显弱于 Control 组( $P < 0.05$ )。细胞实验结果显示,与 CON 组和 NC 组相比,siCatK 组 CatK、c-Notch1、p-CREB 和 BDNF 蛋白表达明显减少( $P < 0.05$ )。**结论:** CatK 可通过激活海马 Notch1 及其记忆相关信号蛋白,影响大鼠空间学习记忆功能。

**【关键词】** 组织蛋白酶 K; Notch1; 学习和记忆; 海马; 大鼠; 细胞培养

**【中图分类号】** R338

**【文献标识码】** A

**【文章编号】**1000-6834(2024)01-028-006

**【DOI】** 10.12047/j.cjap.6311.2022.077

## Effects of Cathepsin K on spatial learning and memory in rats

CHEN Li<sup>1,2+</sup>, CHEN Jin-xin<sup>3+</sup>, WANG Xin-yi<sup>1,2</sup>, LI Xiang-lan<sup>4</sup>, JIANG Hai-ying<sup>2Δ</sup>

(1. Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310000; 2. Jiaxing University, Jiaxing 314000; 3. University of Sanya, Sanya 572000; 4. Yanbian University, Yanji 136200, China)

**【ABSTRACT】 Objective:** To investigate the effects of Cathepsin K (CatK) on spatial learning and memory in rat hippocampus and its mechanisms. **Methods:** Twenty male SD rats were randomly divided into Control group and CatK inhibitor group (CatK II group), which were microinjected with Cathepsin K specific inhibitor (0.5 μg/μl) and artificial cerebrospinal fluid in hippocampal DG area respectively with 5 days. The cultured hippocampal neuron cells were divided into control group (CON group), negative control group (NC group), siRNA interference group (siCatK group). Three re-wells were set for each group, and samples were collected 18~20 h after siRNA transfection. Morris water maze was used to evaluate spatial learning and memory function of rats. Meanwhile, dynamic changes of glutamate (Glu) content in extracellular fluid of DG region during learning and memory were observed by microdialysis and high performance liquid chromatography in conscious rats. Western blot was used to detect CatK-mediated Notch1 activation and other signal molecules. **Results:** Animal experiments showed that compared with the control group, the spatial learning and memory ability were decreased significantly in CatKII group, and the hippocampus protein expressions of c-Notch1, p-Akt, p-CREB and BDNF were also decreased significantly ( $P < 0.05$ ); the levels of Glu in DG area of control group and CatK II group were increased significantly with Morris water maze training days, but the increase of CatK II group was significantly weaker than that of control group ( $P < 0.05$ ). The results of cell experiment showed that the expressions of CatK, c-Notch1, p-CREB and BDNF in siCatK group were significantly lower than other groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** CatK can affect the spatial learning and memory function of rats by activating Notch1 and its memory related signal protein in hippocampus.

**【KEY WORDS】** Cathepsin K; Notch1; learning and memory; hippocampus; rat; cell culture

组织蛋白酶 K (Cathepsin K, CatK) 属于半胱氨

酸蛋白酶家族成员之一,是目前已知的体内蛋白水解作用最强的弹性蛋白酶,参与机体多种生物功能。研究表明,CatK 在机体不同细胞中均有表达,参与骨质疏松、动脉粥样硬化、精神分裂症等多种疾病<sup>[1]</sup>,但其中枢神经系统中的作用特别是对学习记忆功能的影响仍不清楚。研究表明,CatK 在人类和啮齿类动物的大脑不同脑区中均有表达,广泛存

\*【基金项目】浙江省基础公益研究计划项目(LGJ20H090001); 国家自然科学基金项目(81760207); 三亚学院青年教师专项培养科研项目(USYQNZX21-21)

【收稿日期】2022-04-07【修回日期】2022-09-14

Δ【通讯作者】Tel: 18457392565; E-mail: hyjiang7689@zjxu.edu.cn.

cn. +: 为共同第一作者

在于各类神经元和神经胶质细胞中<sup>[2]</sup>,尤其在海马齿状回区(dentate gyrus, DG) CatK 活性最高<sup>[3]</sup>。众所周知,海马是产生并维持学习记忆功能的关键脑区,提示 CatK 可能参与神经元再生、突触可塑性和学习记忆等过程。

Notch 信号通路是在进化过程中高度保守的信号通路,其在记忆形成和神经再生中均发挥着重要作用,海马 Notch1 基因条件性敲除导致小鼠出现学习记忆障碍<sup>[4]</sup>。最新研究提示包括 CatK 在内的组织蛋白酶不仅在细胞质的溶酶体、细胞核内发挥作用,在细胞膜内外均可显示出蛋白酶活性<sup>[5]</sup>。前期研究中我们发现 CatK 也具有类似  $\gamma$ -分泌酶的作用可激活 Notch1 释放 c-Notch1;并在动物实验中证实 CatK 可激活 Notch1 影响下肢缺血性血管再生过程<sup>[6]</sup>。但是,在中枢系统中 CatK 是否可通过激活 Notch1 参与海马学习记忆的产生过程尚不清楚。

本研究旨在整体和细胞水平上探讨 CatK 对大鼠空间学习和记忆能力的影响及其神经化学机制,将为海马学习记忆功能的研究提供新的理论依据,亦可为认知障碍性疾病的治疗寻找新的、具有临床治疗意义的生物标志物。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与分组

成年雄性 SD 大鼠,体重(295±20)g 购自延边大学实验动物中心,许可证号:SCXK(吉)2017-0003。大鼠适应性饲养一周后,随机分为对照(Control)组和组织蛋白酶 K 阻断剂(CatKII)组(各组  $n=10$ )。CatK II 组海马 DG 区微量注射组织蛋白酶 K 特异性阻断剂(0.5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ );Control 组微量注射等量人工脑脊液,连续 5 日。本实验严格遵守国家实验动物管理条例及实施细则。

### 1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:8R-6 型脑立体定位仪购自成茂公司(日本);HTEC-300 型生物活性物质分析系统、CA-50DS 型高效液相分离柱、EFC-82 自动样本收集器、ECD-300 电化学检测器均购自 EICOM 公司(日本);倒置式生物显微镜购自 Nikon 公司(日本);倒置生物荧光显微镜购自 Olympus 公司(日本);定量 PCR 仪、高电流电源均购自 BIO-RAD 公司(美国);多功能成像仪购自 GE 公司(美国);Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)购自上海吉量科技有限公司。

主要试剂:CathepsinK Inhibitor II 购自 Calbio-

chem 公司(德国);Notch1、c-Notch1、Akt、p-Akt、CREB、p-CREB、BDNF、GAPDH 购自 CST 公司(美国);Cathepsin K (E-7) 购自 SCBT 公司(美国);DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶购自 Sigma 公司(美国);RIPA 裂解液、蛋白磷酸酶抑制剂、ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术有限公司(上海);BCA 蛋白定量试剂盒购自康为世纪生物技术有限公司(北京)。

### 1.3 外科手术和相关实验步骤

大鼠术前 12 h 禁食、6 h 禁水,麻醉后固定于大鼠脑立体定位仪(8R-6 型脑立体定位仪,日本),根据 Paxinos 和 Watson 大鼠脑图谱将微量透析探针外套管垂直植入到一侧海马(AP 3.2 mm;L/R 1.6 mm;H 2.5 mm),牙托粉固定。术后待大鼠状态恢复 1~2 d 后,乙醚麻醉下透析探针插入到外套管内并固定好探针,透析探针下部超出外套管 1.5 mm。待大鼠完全清醒后,将微量透析探针与微量泵接通,以 1.5  $\mu\text{l}/\text{min}$  的速度 DG 区灌流人工脑脊液,稳定 15 min 后用自动样本收集器采集脑脊液样本,用于测定氨基酸类神经递质的含量。Morris 水迷宫训练前和每一天的训练后,在大鼠清醒、自由活动状况下,立即收集 DG 区细胞外液样本待测定和分析谷氨酸含量。

### 1.4 海马神经元原代培养和免疫荧光鉴定

取出生 24 h 内的 SD 乳鼠,75% 乙醇浸泡消毒后在立体显微镜下分离脑组织中海马体并剪碎,加入 0.25% 胰蛋白酶消化 15 min,用无血清 DMEM 培养基终止消化。将细胞混悬液依次通过 40 目和 200 目筛网过滤除去大块杂质后,吸取过滤后的滤液 1 200 r/min 离心 5 min,去除上清。DMEM 培养基(含 10% FBS)重悬沉淀,调整细胞密度至  $5 \times 10^5$  cells/ml 接种 6 孔板,37°C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养 6 h 细胞贴壁后,换 10% B27 神经元培养基继续培养。利用免疫荧光染色方法以 NSE 抗体鉴定海马神经元细胞。

### 1.5 海马神经元细胞实验

海马神经元细胞设对照组(CON 组)、阴性对照组(NC 组)和 siRNA 干扰组(siCatK 组)。根据 Lipofectamine RNAiMax 试剂盒说明将三种序列 siCatK(序列见表 1)及对照 siRNA 转入到海马神经元,收集细胞利用 RT-PCR 方法测定 CatK 的 mRNA 表达,筛选到最佳抑制序列 RNA3(CatK-Rat446)用于后续细胞实验。细胞转染 siRNA 18~20 h 后收集并裂解,利用免疫印迹法观察 c-Notch1 等相关信号蛋白的表达水平,每组 3 个复孔,实验重复 3 次。

Tab. 1 siRNA-CathepsinK sequence

Gene ID: 29175	Sense(5'-3')	Antisense(5'-3')
RNA1: CatK-Rat-205	CUCGGCGUUUAAUUUGGATT	UCCCAAUUAAACGCCGAGTT
RNA2: CatK-Rat-335	GAAGAUGACUGGACUCAGATT	UCUGAGUCCAGUCAUCUUCTT
RNA3: CatK-Rat-446	CUAUGUUACUCCAGUCAAAATT	UUUGACUGGAGUACAUAAGTT

## 1.6 大鼠的定位航行和空间探索实验(MWM实验)

MWM 实验中定位航行实验单次游泳时限为 120 s,若在 120 s 内找到并爬上平台且停留 10 s 以上,则逃避潜伏期为其找到平台所需的时间。若 120 s 内未找到隐藏平台,则将其引导至平台,并让其在平台上停留 10 s,此种情况以 120 s 记录;空间探索实验撤去隐藏平台,从原平台放置象限的对侧象限将大鼠放入水中,检测其在 120 s 内穿越原平台区的次数、游泳速度、总路程以及在各个象限停留的时间等指标。

## 1.7 海马 DG 区 Glu 含量测定

应用 HPLC 和电化学检测法分析透析样本中的谷氨酸(glutamate, Glu)含量<sup>[7]</sup>。具体操作步骤:在室温条件下抽取 12  $\mu$ l 样本与 3  $\mu$ l 的 OPA 溶液(4 mmol/L)充分混匀,反应 150 s 后抽取 10  $\mu$ l 混合液,利用手动进样器将混合液注入到生物活性物质微量分析系统(HTEC-300, Eicom, Japan)内,以 0.23 ml/min 的速度通过高效液相色谱分离柱(CA-50DS, Eicom, Japan)和电化学检测器(ECD-300, Eicom, Japan),测定各个样本中 Glu 的浓度。

## 1.8 蛋白免疫印迹实验

用 RIPA 裂解液对海马组织和海马神经元细胞进行裂解,BCA 法进行蛋白定量。对样本进行电泳和转膜,电泳条件:恒压 90V,1~1.5 h。转膜条件:恒流 370 mA 湿转 1 h。转膜结束后用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 膜 1.5 h,加入兔一抗 4 $^{\circ}$ C 摇动过夜。次日用山羊抗兔 IgG(H+L)-HRP 二抗孵育 2 h, ECL 显影,以 GAPDH 为内参蛋白。

## 1.9 统计学处理

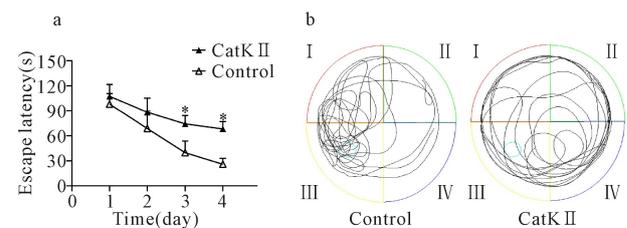
所有数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,图片绘制在 GraphPad Prism 8.0 软件上完成。应用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理,其中两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用 one-way ANOVA 进行统计学分析。

## 2 结果

### 2.1 Catk 对大鼠空间学习记忆功能的影响

本研究通过 MWM 实验评估大鼠的空间学习和记忆功能。定位航行实验显示,两组大鼠找到平台所需的逃避潜伏期均随着训练天数的增加而逐渐缩

短。Control 组第 4 日的逃避潜伏期(25.9 $\pm$ 2.7) s,与第 1 日(98.0 $\pm$ 4.8) s 相比明显缩短;同样 CatKII 组第 4 日的逃避潜伏期(68.1 $\pm$ 3.4) s 相较于第 1 日(107.4 $\pm$ 5.3) s 也明显缩短。然而对比 Control 组, CatKII 组每天的逃避潜伏期均延长,其中第 3 日和第 4 日的逃避潜伏期与 Control 组相比具有显著性差异( $P<0.05$ ,图 1a),提示 CatKII 降低了大鼠海马空间学习能力。空间探索实验结果显示,与 Control 组相比 CatKII 组在目标象限的游泳轨迹明显减少(图 1b),且穿越原站台区的次数也明显减少( $P<0.05$ ,表 2)。为了排除学习记忆功能的差异是由运动功能障碍所引起的,观察了两组的游泳速度和总游泳距离。结果如表 2 显示两组间的游泳速度无明显差异,同样总游泳距离也无差异。



**Fig. 1** Effects of CatK on the spatial learning and memory abilities in rats

a: The escape latency in place navigation trial of MWM test( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ ); b: Representative swimming traces in spatial probe trial of MWM test

\* $P<0.05$  vs control group

**Tab. 2** The number of platform crossing and the swimming speed in spatial probe trial of MWM test( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Group	The number of platform crossing (times/120 s)	The swimming speed(cm/s)	Total swimming distance(cm)
Control	8.33 $\pm$ 1.37	28.12 $\pm$ 2.56	3142.82 $\pm$ 150.21
CatKII	3.33 $\pm$ 1.03**	30.78 $\pm$ 2.74	3152.50 $\pm$ 258.71

\*\* $P<0.01$  vs control group

### 2.2 Catk 对海马 DG 区 Glu 含量的影响

本研究在每天 MWM 实验结束后,收集并测定两组大鼠海马 DG 区细胞外液中的 Glu 含量,各组以开始 MWM 实验前的 Glu 含量基础值为 100%,计算出每天训练后的含量变化率。结果显示,Control 组 Glu 含量基础值为(2.04 $\pm$ 0.25) pg/ $\mu$ l, CatKII 组为(2.02 $\pm$ 0.19) pg/ $\mu$ l,两组间无明显差异( $P>$

0.05)。Control 组和 CatKII 组 DG 区 Glu 含量均随着训练天数的增加而增加,其后趋于恢复。CatKII 组第 4、5 日的 Glu 含量与 Control 组相比显著减少

( $P < 0.05$ , 表 3), 该结果显示, CatKII 减弱了空间学习过程中突触处 Glu 的释放。

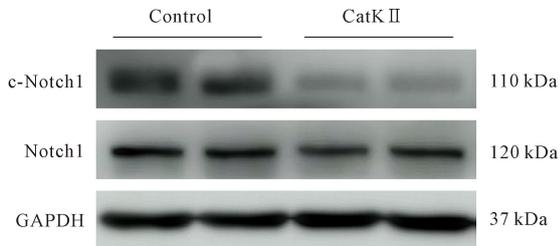
**Tab. 3** Effects of CatKII on Glu levels in the hippocampal DG during MWM test(% ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Group	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
Control	168.10±43.30	205.80±35.60	274.60±41.50	354.30±39.10	283.40±52.30
CatKII	134.20±38.30	159.90±31.10	181.50±38.20	201.30±29.70*	144.60±41.40*

\* $P < 0.05$  vs control group

### 2.3 Catk 激活海马 Notch1

为了探讨 CatKII 组大鼠空间学习记忆功能下降是否与海马 Notch1 激活有关,观察两组海马组织中的 Notch1 及其活化形式 c-Notch1 的表达情况。两种蛋白以 GAPDH 为内参,计算相应蛋白的比例。如图 2 和表 4 所示,与 Control 组相比,CatKII 组 c-Notch1 的表达显著下调( $P < 0.01$ );Notch1 的表达无显著变化。



**Fig. 2** Representative bands of Notch1, c-Notch1, GAPDH expression in rat hippocampus

**Tab. 4** Western blot analyses for Notch1, c-Notch1 expressions in hippocampus( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Group	Notch1 protein level (Notch1/GAPDH)	c-Notch1 protein level (c-Notch1/GAPDH)
Control	0.49±0.05	0.39±0.04
CatKII	0.46±0.06	0.15±0.02**

c-Notch1: cleaved Notch1

\*\* $P < 0.01$  vs control group

**Tab. 5** Western blot analyses for p-Akt, Akt, p-CREB, CREB, BDNF expressions in hippocampus( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 5$ )

Group	p-Akt protein level (p-Akt/GAPDH)	Akt protein level (Akt/GAPDH)	p-CREB protein level (p-CREB/GAPDH)	CREB protein level (CREB/GAPDH)	BDNF protein level (BDNF/GAPDH)
Control	0.84±0.05	0.29±0.02	0.50±0.05	0.59±0.05	0.79±0.04
CatKII	0.31±0.04**	0.30±0.02	0.26±0.02**	0.56±0.08	0.64±0.08*

CREB: cAMP response element-binding proteins; BDNF: Brain-derived neurotrophic factor

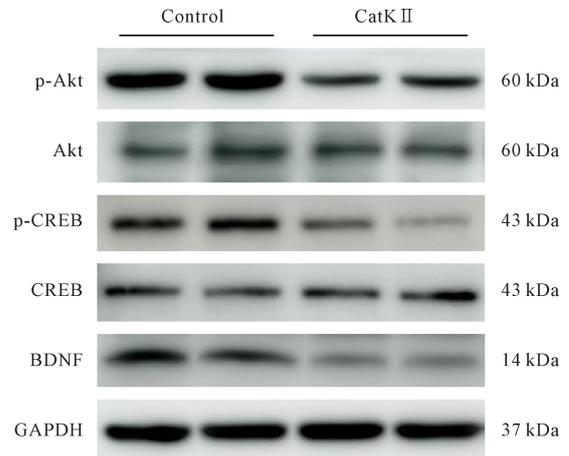
\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control group

### 2.5 Catk 影响海马神经元细胞 Notch1 的激活及其下游蛋白的表达

应用小干扰 RNA (siRNA-CatK) 抑制海马神经元细胞 CatK 表达,分析 c-Notch1、Notch1、p-CREB

### 2.4 抑制 Catk 对其它相关信号蛋白表达的影响

为了进一步探讨 CatK 是否通过激活 Notch1,影响下游其他与学习记忆功能有关的信号蛋白表达,观察两组 Akt、p-Akt、CREB、p-CREB 以及 BDNF 等蛋白表达情况。结果显示,与 Control 组相比,CatKII 组海马 p-Akt 和 p-CREB 以及 BDNF 的表达水平显著降低,而 Akt 和 CREB 的表达没有显著变化(图 3,表 5)。



**Fig. 3** Representative bands of p-Akt, Akt, p-CREB, CREB, BDNF, GAPDH expression in rat hippocampus

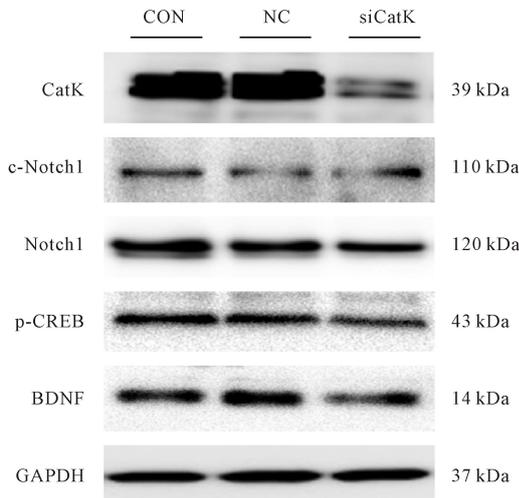
和 BDNF 等信号蛋白的表达情况。结果显示,与 NC 组和 CON 组相比,siCatK 组 c-Notch1、p-CREB 和 BDNF 的表达明显下调(图 4,表 6)。

**Tab. 6** Western blot analyses for CatK, c-Notch1, Notch1, p-CREB and BDNF expressions in neurons ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Group	CatK protein level (CatK/GAPDH)	c-Notch1 protein level (c-Notch1/GAPDH)	Notch1 protein level (Notch1/GAPDH)	p-CREB protein level (p-CREB/GAPDH)	BDNF protein level (BDNF/GAPDH)
CON	0.77±0.06	0.44±0.02	0.83±0.01	0.81±0.05	0.59±0.03
NC	0.78±0.06 <sup>##</sup>	0.40±0.04 <sup>##</sup>	0.79±0.05	0.78±0.05 <sup>##</sup>	0.61±0.05 <sup>#</sup>
siCatK	0.33±0.02 <sup>**</sup>	0.31±0.03 <sup>**</sup>	0.78±0.06	0.62±0.04 <sup>**</sup>	0.53±0.03 <sup>**</sup>

CON: Control; NC: Negative control

<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs CON; <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs siCatK



**Fig. 4** Representative bands of CatK, c-Notch1, Notch1, p-CREB, BDNF, GAPDH expression in primary hippocampal neurons

### 3 讨论

本研究旨在探讨 CatK 对大鼠海马空间学习记忆功能的影响及其神经化学机制。主要发现如下：(1) 在活体大鼠海马 DG 区抑制 CatK, 导致大鼠出现空间学习和记忆功能显著减弱, 伴有学习过程中 DG 区 Glu 的相对释放减少; (2) 抑制海马 CatK, 可抑制 Notch1 的激活, 并显著降低下游 p-Akt、CREB、BDNF 等学习记忆相关信号蛋白的表达; (3) 应用基因沉默技术抑制海马神经元细胞中 CatK 表达, 同样观察到 c-Notch1 及下游相关信号蛋白表达明显下调。

CatK 是机体主要的弹性蛋白酶和胶原酶, 在小鼠大脑皮层、海马、纹状体和小脑等脑区均有表达, 尤其在学习记忆的关键脑区-海马 DG 区的其活性最高。为了探讨 CatK 对海马学习记忆功能的影响及其机制, 本研究利用 Morris 水迷宫实验观察到, CatK 特异性阻断剂显著减弱大鼠海马空间学习记忆能力, 并且在动物清醒自由活动状态下, 观察到减弱空间学习训练过程中 Glu 含量的增加幅度。我们的结果与 Dauth 等<sup>[3]</sup>报道相一致, 他们发现 CatK 基因敲除小鼠在新物体识别和高架十字迷宫等行为学

实验中均表现出学习记忆功能的损伤和多巴胺水平的变化。研究报道, 学习过程中 LTP 的产生依赖于海马 DG 区内 Glu 水平和 NMDA 受体的激活<sup>[7]</sup>; 实验表明大鼠空间学习和记忆过程中, 海马 DG 内的多巴胺可通过加强兴奋性氨基酸 (Glu 和天冬氨酸) 的兴奋传递过程, 易化空间学习记忆过程<sup>[8,9]</sup>。虽然本实验中我们未能同时观察 CatK 对 DG 区同一部位 LTP 的产生和 Glu 释放的关系, 仍可见抑制 DG 区 CatK 可显著减弱 MWM 训练过程中 Glu 的变化幅度, 提示抑制 CatK 可减弱大鼠空间学习记忆能力及相关的突触可塑性, 这可能与减少突触前 Glu 释放有关, 但是 CatK 如何影响学习记忆过程中 Glu 的释放量需要进一步研究。

最近多数学者认为包括 CatK 在内的组织蛋白酶不仅在细胞质内发挥作用, 而且在细胞膜内外也显示出蛋白酶活性<sup>[5]</sup>。本实验在海马组织和神经元细胞中均观察到, 抑制 CatK 显著降低 c-Notch1 蛋白表达, 提示 CatK 对海马空间学习记忆的作用与激活 Notch1 有关。Notch 信号通路是进化过程中高度保守的信号通路, 在记忆形成、神经再生中均发挥着重要作用。Alberi 等<sup>[10]</sup>提出, Notch 信号通路在学习记忆功能和突触可塑性的改变有关; 出生后海马 RBP-J 基因 (Notch 基因转录因子) 的条件性破坏可导致 LTD 及学习记忆障碍<sup>[4]</sup>; 降低 Notch1 表达可抑制 LTP<sup>[11]</sup>。Notch1 引起生理功能的关键环节在于 Notch1 在  $\gamma$ -分泌酶等蛋白水解酶的作用下活化成活性片段 (c-Notch1), 转入核内影响基因转录过程。Asai 等<sup>[12]</sup>发现组织蛋白酶 B 与  $\gamma$ -分泌酶具有共同底物如淀粉样前体蛋白。利用免疫荧光跟踪标记法及重组人 CatK 的前期研究中, 我们发现 CatK 具有类似  $\gamma$ -分泌酶的蛋白水解作用, 能够水解释放出 Notch 活性片段; 并且在动物实验中也证明 CatK 可激活 Notch1 及相关信号通路, 参与缺血性血管再生过程<sup>[6]</sup>。本实验中观察到, 抑制海马 CatK 显著降低 c-Notch1 表达, 同时明显降低 p-Akt、p-CREB 和 BDNF 等蛋白表达水平。提示 CatK 可激活海马 Notch1 及其信号通路, 调节与学习记忆功能相关的因子如

CREB、BDNF 的生成,调节记忆的形成过程。多数学者认为,CREB 的下调和信号缺失是导致认知功能障碍的主要原因<sup>[13,14]</sup>。Notch1 基因缺失导致 CREB 磷酸化水平显著降低<sup>[15]</sup>,进而影响 BDNF 的转录。BDNF 是一种有促进和维持神经元生长、存活、执行功能作用的活性蛋白因子,在突触可塑性及神经递质的释放中发挥着重要的调控作用。BDNF 水平的上调有助于维持突触可塑性,并其水平的减少与 AD 小鼠突触传递异常有关<sup>[16,17]</sup>;Notch1 可以正向调控 BDNF 的表达<sup>[18]</sup>。

由此本研究认为 CatK 参与海马学习记忆功能,其作用与 Notch1 的激活有关。提示 CatK 通过介导 Notch1 活化,调节 CREB、BDNF 等信号蛋白的表达和突触处 Glu 等神经递质的含量变化,影响空间学习和记忆功能。本研究不能完全确定在海马神经元上 CatK 切割 Notch1 的作用位点及其蛋白水解作用是否发生在膜内区域,但在体内外实验中均观察到 CatK 激活 Notch1 即改变 c-Notch1 表达。另外,激活的 Notch1 是否通过 CREB/BDNF 以外的其它途径参与学习记忆过程仍需要进一步研究。

#### 【参考文献】

- [1] Dai R, Wu Z, Chu HY, *et al.* Cathepsin K: The action in and beyond bone[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 433.
- [2] Hsu A, Podvin S, Hook V. Lysosomal cathepsin protease gene expression profiles in the human brain during normal development[J]. *J Mol Neurosci*, 2018, 65(4): 420-431.
- [3] Dauth S, Sirbulescu RF, Jordans S, *et al.* Cathepsin K deficiency in mice induces structural and metabolic changes in the central nervous system that are associated with learning and memory deficits[J]. *BMC Neurosci*, 2011, 12: 74.
- [4] Liu S, Wang Y, Worley PF, *et al.* The canonical Notch pathway effector RBP-J regulates neuronal plasticity and expression of GABA transporters in hippocampal networks[J]. *Hippocampus*, 2015, 25(5): 670-678.
- [5] Vidak E, Javoresek U, Vizovisek M, *et al.* Cysteine cathepsins and their extracellular roles; Shaping the micro-environment[J]. *Cells*, 2019, 8(3): 264.
- [6] Jiang H, Cheng XW, Shi GP, *et al.* Cathepsin K-mediated Notch1 activation contributes to neovascularization in response to hypoxia[J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 3838.
- [7] Wang S, Pan DX, Wang D, *et al.* Nitric oxide facilitates active avoidance learning via enhancement of glutamate levels in the hippocampal dentate gyrus[J]. *Behav Brain Res*, 2014, 271: 177-183.
- [8] Wang F, Wan P, Wang W, *et al.* Dopamine in the hippocampal dentate gyrus modulates spatial learning via D1-like receptors[J]. *Brain Res Bull*, 2019, 144: 101-107.
- [9] Wan P, Wang S, Zhang Y, *et al.* Involvement of dopamine D1 receptors of the hippocampal dentate gyrus in spatial learning and memory deficits in a rat model of vascular dementia[J]. *Pharmazie*, 2014, 69(9): 709-710.
- [10] Alberi L, Liu S, Wang Y, *et al.* Activity-induced Notch signaling in neurons requires Arc/Arg3.1 and is essential for synaptic plasticity in hippocampal networks[J]. *Neuron*, 2011, 69(3): 437-444.
- [11] Wang Y, Chan SL, Miele L, *et al.* Involvement of Notch signaling in hippocampal synaptic plasticity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(25): 9458-9462.
- [12] Asai M, Yagishita S, Iwata N, *et al.* An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model[J]. *Faseb J*, 2011, 25(10): 3720-3730.
- [13] Rosa E, Fahnstock M. CREB expression mediates amyloid  $\beta$ -induced basal BDNF downregulation[J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(8): 2406-2413.
- [14] Bartolotti N, Segura L, Lazarov O. Diminished CRE-induced plasticity is linked to memory deficits in familial Alzheimer's disease mice[J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 50(2): 477-489.
- [15] Brai E, Marathe S, Astori S, *et al.* Notch1 regulates hippocampal plasticity through interaction with the reelin pathway, glutamatergic transmission and CREB signaling. *Front Cell Neurosci*, 2015, 9: 447.
- [16] 李清山, 杨威, 潘艳芳, 等. 脑源性神经营养因子拮抗  $\beta$  淀粉样蛋白所致大鼠在体海马长时程增强的伤害[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(5): 425-429.
- [17] 董雪帆, 王婷, 李甜, 等. APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> 转基因小鼠小脑内突触素及 BDNF /Trk-B 蛋白表达的变化[J]. 中国应用生理学杂志, 2017, 33(6): 488-492.
- [18] He W, Tian X, Yuan B, *et al.* Rosuvastatin improves neurite extension in cortical neurons through the Notch 1/BDNF pathway[J]. *Neurol Res*, 2019, 41(7): 658-664.