

Humanin及其衍生物结构、生理功能与作用机制研究

闫冰 钟历勇*

(首都医科大学附属北京天坛医院内分泌科, 北京 100050)

摘要 Humanin(HN)是在阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者大脑枕叶皮层未受损的脑区发现的一种由24个氨基酸组成的线性多肽,能有效抑制多种家族性阿尔茨海默病(familial Alzheimer's disease, FAD)基因突变和 β -淀粉样肽(β -amyloid peptide, A β)诱发的神经元凋亡,起初被认为是AD特异性的神经保护肽。然而近年来研究发现, humanin具有广谱的神经保护、细胞保护与抗炎作用,可改善胰岛素敏感性,延缓糖尿病的发生。Humanin在多种疾病模型中,如AD、2型糖尿病、动脉粥样硬化、心肌缺血、脑卒中等发挥保护作用,在以上疾病的防治中可能具有重要意义。

关键词 humanin; 衍生物结构; 生理功能; 神经保护; 细胞保护

Research Progress of Structure, Physiological Function and Action Mechanism of Humanin and Its Derivatives

Yan Bing, Zhong Liyong*

(Department of Endocrinology, Beijing Tiantan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract Humanin (HN), a 24-amino-acid polypeptide, was first identified from the surviving neurons in occipital lobe of Alzheimer's disease (AD) patients. Humanin inhibits neuronal cell death induced by various kinds of familial Alzheimer's disease gene mutations and β -amyloid peptide, which was thought to be an AD specific neuroprotective peptide at first. However, many recent studies demonstrated that humanin possesses diverse neuroprotective, cytoprotective and anti-inflammatory effects. Meanwhile, humanin can also improve insulin sensitivity, then delay onset of diabetes. Humanin offers protection in many disease models, such as AD, type 2 diabetes mellitus, atherosclerosis, myocardial ischemia, stroke and so on. Humanin probably plays important roles in the prevention and treatment of these diseases.

Keywords humanin; structure of derivatives; physiological function; neuroprotection; cytoprotection

Humanin(HN)是2001年由日本学者 Hashimoto 对阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)患者进行尸检时,在其大脑枕叶皮层未受损脑区提取出一种含有开放阅读框(open reading frame, ORF)的cDNA文库,在对其表达进行功能检测后发现的一种编码24个氨基酸的线性多肽^[1]。最初发现, humanin能有效抑制多种家族性阿尔茨海默病(familial Alzheimer's

disease, FAD)基因突变和 β -淀粉样肽(β -amyloid peptide, A β)诱发的神经元凋亡,被认为是AD特异性的神经保护肽。然而近年来研究发现, humanin在多种应激和疾病模型中发挥保护作用。在体外实验中, humanin能保护细胞免于氧化性应激、血清剥夺、低氧、星状孢子素、链脲佐菌素等所致的损伤^[2];在体内实验中, humanin可以改善AD模型小鼠的学习和记忆障碍^[3-9]、调节糖尿病模型小鼠的血糖稳态^[10-11]、减小心肌缺血损伤模型小鼠的心肌梗死面积^[12]、改善动脉粥样硬化模型小鼠的血管内皮功能以及减慢动脉粥样硬化斑块的进展^[13]等。目前, humanin的作用机制尚未阐明,推测 humanin由细胞内线粒体DNA

收稿日期: 2014-08-20 接受日期: 2014-10-10

*通讯作者。Tel: 010-67096618, E-mail: zhongliyong@126.com

Received: August 20, 2014 Accepted: October 10, 2014

*Corresponding author. Tel: +86-10-67096618, E-mail: zhongliyong@126.com

网络出版时间: 2015-03-04 10:45

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20150304.1045.006.html>

编码, 转录为相应 mRNA, 转运至胞质后翻译为 humanin 多肽, 分泌到胞外, 形成同源二聚体或多聚体, 作用于相应的膜受体或再次进入胞内与胞浆内受体或蛋白相结合, 激活相应的信号转导通路, 从而发挥相应的保护作用。

1 Humanin及其衍生物的结构和功能

Humanin 是一种由 24 个氨基酸残基组成的线性多肽, 其一级结构为: Met-Ala-Pro-Arg-Gly-Phe-Ser-Cys-Leu-Leu-Leu-Leu-Thr-Ser-Glu-Ile-Asp-Leu-Pro-Val-Lys-Arg-Arg-Ala, 分子量 2 687.3 Da。研究表明, humanin 的 cDNA 由 1 567 个碱基对组成, 与线粒体 DNA 1 680~3 231 位碱基序列有 99% 的同源性, 该线粒体区域与 16s rRNA 序列相对应。另有证据显示, humanin cDNA 与位于人类 5、11 和 X 染色体上超过 1 000 个碱基对的区域显示出 92%~95% 的一致性。Humanin 来源尚未明确, 可能由线粒体 DNA 编码, 或由细胞核 DNA 编码, 也有可能由线粒体与核 DNA 共同参与编码。多数学者认为, humanin 是一种新的具有生物学活性的线粒体来源多肽 (mitochondrial derived peptides, MDPs)。分子生物学研究显示, humanin 的结构与功能之间关系密切。Pro3-Pro19 是 humanin 的功能核心区域, 是发挥保护活性所必要的, 在这个区域中,

Pro3、Cys8、Leu9、Leu12、Thr13、Ser14 和 Pro19 是必不可少的, 用 Ala 替代上述任何一个残基, 将会使 humanin 失去保护活性^[14]。Cys8 被 His 替代会显著减弱 humanin 的生物学活性, 但被 Lys 或 Arg 替代却不影响其功能^[15]。当 Leu9-Leu11、Pro19-Val20 之中的任何一个氨基酸被 Lys 取代之后, 突变体将不能被分泌至细胞外, 表明亲脂性区域 Leu9-Leu11、Pro19-Val20 对 humanin 的分泌是必不可少的^[16]。在 Leu9-Leu11 亲脂性区域内, 用 Asp 替代 Leu10, humanin 将失去分泌功能, 表明 Leu10 在 humanin 的分泌中起着至关重要的作用。用 Ala 取代 Pro3-Arg23 之间的任何一个氨基酸, 对 humanin 分泌功能没有影响。另外, Ser7 和 Leu9 两个位点与 humanin 形成自身二聚体关系密切, 用 Ala 取代 humanin 全长中任何一个氨基酸, 发现只有当 Ser7 或 Leu9 被取代时, 不出现 humanin 二聚体。

Arakawa 等^[17]将已知的人类 humanin 衍生物分为 6 种 (表 1)。种类 1: L9R-HN (L9R-humanin), Leu9 突变为 Arg, 无分泌能力。种类 2: HNG, Ser14 突变为 Gly 或 D-Ser, 生物活性提高了近 1 000 倍, 在低至纳摩尔每升水平即可起到神经保护作用。种类 3: HNA 和 S7A-HN, Cys8 突变为 Ala 形成衍生物 HNA, Ser7 突变为 Ala 形成 S7A-HN, 两者均无生物活性。种类 4: AGA-HNG 和 AGAC8R-HNG17, 有较高的生物活性, 化学

表1 HN及其衍生物的结构及功能(根据参考文献[17]修改)

Table 1 Structure and function of HN and its derivatives (modified from reference [17])

种类	名称	突变	活性	备注
Class	Name	Mutation	Activity	Remark
Class-1	HN	MAPRGFSCLLLTSEIDL PVKRR	1~10 $\mu\text{mol/L}^*$	Wild-type peptide
	L9R-HN	Leu9-Arg	1~10 $\mu\text{mol/L}^{\#}$	Secretion defective Bax-binding defective (extracellular treatment)
Class-2	HNG	Ser14-Gly	1~10 nmol/L [*]	Aggregation by sedimentation
	D-Ser14	L-Ser14-D-Ser14	1~10 nmol/L [*]	
Class-3	HNA	Cys8-Ala	Inactive	Dimerization defective
	S7A-HN	Ser7-Ala	Inactive	
Class-4	AGA-HNG	Arg4-Ala, Phe6-Ala, Ser14-Gly	0.1~0.3 nmol/L [*]	Chemical stability
	AGAC8R-HNG17	Deletion of N-terminal MA Arg4-Ala, Phe6-Ala, Cys8-Ala, Ser14-Gly Deletion of C-terminal VKRR	10 ⁻² nmol/L [*]	Chemical and biological stability Monomer by sedimentation
Class-5	EF-S7A-HN	Ser7-Ala N-terminal addition of EFLIVIKS	10 nmol/L [*]	
Class-6	Colivelin	ADNF9-AGAC8R-HNG17	10 ⁻⁴ nmol/L [*]	Monomer by sedimentation

HN: 神经保护肽 humanin 的缩写。*表示拮抗 A β 诱导的毒性发挥神经保护作用所需的浓度; #表示拮抗 FAD 相关的 V642I-APP 诱导的神经细胞凋亡所需的有效浓度。

HN: abbreviation of neuroprotective peptide humanin. *: concentrations required for the complete neuroprotection against A β -induced toxicity; #: effective concentrations against neuronal death caused by familial AD-linked V642I-APP.

和生物稳定性高。种类5: EF-S7A-HN, 无活性HN突变体复活。种类6: colivelin, ADNF9-AGAC8R-HNG17, 融合了活性依赖神经营养因子9(activity-dependent neurotrophic factor 9, ADNF9)和AGAC8R-HNG17的新型杂交肽, 在极低浓度(10^{-6} nmol/L)即可发挥生物活性, 具有更高的化学和生物稳定性。

2 Humanin在体内的表达

Humanin在正常情况下表达量很少。Humanin在AD病人枕部未受损的神经元中表达, 一些海马神经元及神经胶质细胞中也有表达, 尤其在海马部位高表达, 在其他脑区或年龄相似的正常人脑中则没有表达。目前, 研究者已在小鼠、大鼠、猴子、线虫等多种动物体内发现了humanin的衍生物。Humanin衍生物在小鼠睾丸和结肠中被检测到, 其表达具有时间依赖性。另外, 在脑脊液、精液、血浆中也发现humanin的存在, 其浓度在生物活性范围内。

Rattin是存在于大鼠体内的humanin衍生物, 由38个氨基酸残基组成, 与humanin的保守区域有73%的一致性, 能够拮抗A β 诱导的细胞毒性, 发挥神经元保护作用。Rattin在中枢神经系统中高表达, 在心肌和骨骼肌中也有表达。Wang等^[18]研究发现, 用Rattin处理可以保护大鼠的空间记忆和突触可塑性免受A β 31-35诱导的损伤, 其保护机制可能与STAT3和Caspase-3通路有关。

3 Humanin及其衍生物的生理功能

3.1 Humanin及其衍生物的神经保护作用

3.1.1 抗AD相关神经毒性的神经保护作用 AD是一种以记忆减退、认知障碍、人格改变为主要临床表现, 以大脑皮层、海马等部位出现大量细胞外老年斑(senile plaque, SP)、细胞内神经元纤维缠结(neurofibrillary tangle, NFT)以及神经元进行性缺失为主要病理特征的神经系统退行性疾病, 其中老年斑主要成分为 β -淀粉样肽(A β)。AD的病因及发病机制目前仍不完全明确, 但普遍认为, β -淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)、早老素-1(presenilin-1, PS-1)、早老素-2(presenilin-2, PS-2)基因突变在FAD发病过程中发挥重要作用。Humanin是在AD病人大脑未受损的脑区发现的神经生存因子, 因而早年对于humanin的研究主要集中在AD相关的神经毒性方面。

最早对于humanin的研究主要集中于体外的细胞培养。研究显示, humanin能够保护细胞免于A β 1-43诱导的凋亡^[1]。A β 在脑内可以沉积在脑血管平滑肌细胞表面, 引起平滑肌细胞内 α -肌动蛋白的降解及细胞死亡。Jung等^[19]用humanin(10 μ mol/L)预处理培养的脑血管平滑肌细胞, 发现A β 引起的 α -肌动蛋白降解明显减轻, 细胞死亡明显减少, 表明humanin能拮抗A β 对脑血管平滑肌细胞的毒性作用。离体实验表明, humanin衍生物HNG可以通过改变A β 1-40的纤维缠结从而减弱A β 1-40引起的细胞内钙离子浓度升高和细胞凋亡^[20]。在体外实验中, 用APP、PS-1或PS-2转染F11神经细胞诱导细胞凋亡, 而humanin处理能够保护神经细胞免于FAD相关毒性所致的损伤^[1]。

后续的研究先后应用在体的药理学AD模型(包括胆碱能受体拮抗剂东莨菪碱、抗胆碱能药物对二苯羟乙酸-3-奎宁环酯诱导AD模型)^[3-4]、基因突变AD模型(A β 及APP、PS1、PS2突变等)^[5-7]及转基因AD模型^[8-9], 来验证humanin对于AD模型小鼠学习和记忆功能障碍的改善。

第一个研究humanin生理功能的在体实验使用东莨菪碱, 这是一种胆碱能受体拮抗剂, 可以引起类似于AD的记忆障碍。2001年, Mamiya等^[3]的实验显示, 在小鼠脑室内注射humanin衍生物HNG可以改善因注射东莨菪碱导致的短期记忆障碍。2004年, Krejcová等^[4]用一种抗胆碱能药物对二苯羟乙酸-3-奎宁环酯诱导小鼠记忆障碍, 证实humanin衍生物HNG经腹腔内注射可以改善此药引起的小鼠记忆障碍。

2005年, Tajima等^[5]首次用A β 诱导小鼠记忆障碍模型证明humanin衍生物HNG可以改善因A β 25-35注射诱导的小鼠记忆障碍。之后于2010年, Guo等^[6]用小鼠大脑海马切片证实, 给予humanin衍生物HNG治疗可以保护大鼠海马CA1区区长时程增强(long-term potentiation, LTP), 免受A β 引起的损伤。2012年, Yuan等^[7]利用Morris水迷宫试验发现, HNG预处理可以拮抗双侧海马内注射A β 31-35引起的大鼠空间学习和记忆功能障碍, 并且呈现剂量依赖性。

越来越多的研究关注不同的转基因AD小鼠模型。2011年, Niikura等^[8]经鼻内给予1月龄三重转基因AD小鼠模型S14G-humanin治疗3个月。ELISA和免疫组化分析显示, 大脑内A β 水平显著下降; 行为学研究发现, 小鼠认知和记忆功能障碍得到明显改

善。2012年,有研究证实,给予双重转基因小鼠HNG可以减少A β 的积聚、改善小鼠的认知障碍^[9]。Humanin能够改善外周血注射胆碱能受体拮抗剂引起的小鼠记忆损伤及脑室内注射A β 引起的记忆障碍,并且能改善家族性阿尔茨海默病转基因小鼠的记忆力下降。因此, humanin对于治疗和预防AD具有广阔的应用前景。

3.1.2 非AD相关的神经保护作用 2006年, Xu等^[21]建立小鼠局部脑缺血再灌注模型,在缺血前或缺血后不同时段用 humanin衍生物HNG脑室内或腹腔内注射处理。对比处理前后神经系统功能和脑梗死的体积发现,以上处理手段均可显著减小脑梗死体积,并且抑制神经细胞凋亡,改善神经系统功能。2013年, Wang等^[22]再次证实, humanin衍生物HNG处理能够改善小鼠脑出血后的行为学及形态学上的改变,包括脑水肿、脑损伤的体积等。Chiba等^[23]在家族性肌萎缩性侧索硬化(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)模型G93A-SOD1转基因小鼠的脑室内注射 colivelin,发现它可以保护脊髓前角运动神经元,并延长小鼠的生存期。另外有研究发现, humanin衍生物HNG可以抑制A β 1-42对神经干细胞的毒性作用,且在低浓度的情况下可以促进神经干细胞增殖分化为神经元^[24]。

Humanin可以有效拮抗不同实验环境下非AD相关毒性所致的神经细胞凋亡,包括拮抗超氧化物歧化酶1(superoxide dismutase 1, SOD1)基因突变诱导的运动神经元凋亡,拮抗无血清培养诱导的PC12细胞凋亡以及拮抗多聚谷氨酰胺、朊蛋白118~135片段、星状孢子素、链脲佐菌素和脑缺血缺氧诱导的神经细胞凋亡。尽管 humanin具有广泛的神经保护作用,但仍不能拮抗Fas配体、依托泊苷、多聚谷氨酸Q79诱导的神经毒性所致的细胞凋亡^[1]。

3.2 细胞保护作用

深入研究发现, humanin不仅具有广谱的神经保护作用,还具有广泛的细胞保护作用。对各种类型的细胞,如心肌细胞、血管内皮细胞、视网膜神经节细胞、胰岛细胞和生殖细胞等均具有保护作用。

2010年, Muzumdar等^[12]建立左冠状动脉闭塞小鼠心肌缺血损伤模型,用 humanin衍生物HNG在闭塞前预处理或闭塞后治疗均使小鼠获益,减小了心肌梗塞面积,改善了心脏功能。在有临床症状的不稳定颈动脉粥样硬化斑块的患者中, humanin水平是无症状患者的两倍,表明 humanin在动脉粥样硬化中

发挥作用^[25]。2010年的一项体外研究发现, humanin在血管内皮细胞中表达,并且能够保护内皮细胞不被氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, oxLDL)诱导的氧化性应激所损伤^[26]。2011年,后续的在体实验研究中,给予载脂蛋白E缺乏的小鼠高胆固醇饮食建立小鼠动脉粥样硬化模型,显示腹腔内注射 humanin能够改善动脉粥样硬化模型小鼠的斑块进展、稳定心血管系统的功能^[13]。依据以上数据推测,动脉粥样硬化斑块中发现的 humanin水平增高,可能是对应激的一种保护性反应。

Lue等^[27]研究发现,在促性腺激素释放激素拮抗剂处理睾丸生殖细胞的啮齿类动物模型中, humanin对睾丸生殖细胞的凋亡具有拮抗作用。过量促凋亡因子胰岛素样生长因子结合蛋白-3(insulin-like growth factor binding protein-3, IGFBP-3)所致的睾丸激素剥夺可诱导小鼠睾丸生殖细胞的凋亡,睾丸内给予 humanin可以减弱此种情况下的生殖细胞凋亡。此外还发现, humanin可以调节睾丸的生精作用、防止睾丸的功能障碍^[27]。

3.3 提高胰岛素敏感性

随着年龄的增长,在啮齿类的大脑皮层、下丘脑、骨骼肌中可检测到 humanin含量的降低,而在人类可检测到血循环中 humanin水平下降,推测 humanin含量的下降可能在增龄相关疾病(如AD和T2DM等)的发病机制中发挥重要作用。

Regina等^[10]研究发现, humanin衍生物HNGF6A可以增强葡萄糖依赖的胰岛素分泌、改善胰岛素敏感性与胰岛 β 细胞的生存。Humanin能够改善胰岛素敏感性,部分是通过下丘脑信号转导和转录激活因子-3(signal transducers and activators of transcription-3, STAT-3)激活实现的。Hoang等^[11]研究发现, humanin治疗6周可以改善糖尿病模型(nonobese diabetic model, NOD)小鼠的糖耐量,其胰腺淋巴细胞聚集明显减少,表明 humanin治疗在体外可以减少细胞因子介导的胰岛 β 细胞凋亡,在体内可以改善NOD小鼠的糖耐量、延缓糖尿病起病。以上均表明, humanin对胰岛细胞的生存起保护作用。

在T2DM模型(Zucker diabetic fatty rats, ZDF大鼠)中, HNGF6A可以显著降低血糖水平, humanin及其衍生物在体内血糖的稳态中发挥重要作用。Humanin通过作用于中枢神经系统(central nervous system, CNS)调节外周胰岛素信号,推测 humanin及其

衍生物可能成为防治T2DM的潜在药物。

3.4 抗炎作用

早在2008年, Miao等^[28]实验发现, A β 25-35处理小鼠会导致大脑内激活的星形胶质细胞、小神经胶质细胞增多, 大脑局部IL-6、TNF- α 升高, 小鼠空间学习及记忆能力下降。通过腹膜内注射humanin衍生物HNG, 可以改善小鼠的认知功能障碍, 减少海马和额颞皮层神经胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)免疫阳性的星形胶质细胞和CD11b免疫阳性的小神经胶质细胞, 降低A β 25-35诱导的IL-6和TNF- α 升高及减少前额皮层TUNEL阳性的凋亡细胞。以上结果提示, humanin具有抗炎活性。

2013年, Zhao等^[29]用脂多糖诱导体外培养的星形胶质细胞发生炎症反应, 表现为GFAP表达的显著增加。不同浓度的humanin预处理可通过降低脂多糖诱导的促炎性细胞因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的水平, 显著降低星形胶质细胞的过度激活, 并且这种保护作用呈现浓度依赖性, 表明神经保护肽humanin能够部分抑制脂多糖诱导的星形胶质细胞的炎症反应。神经退行性疾病中普遍存在神经炎症反应, 我们推测humanin作为一种保护剂, 广泛拮抗神经炎症反应。

3.5 降低化疗药物的副作用

研究发现, 蛋白酶体抑制剂硼替佐米治疗2周, 能够有效减弱神经母细胞瘤的生长, 同时也显著抑制小鼠的骨生长。腹腔内注射humanin衍生物每周2

次, 能够逆转小鼠的骨生长抑制, 并且能保证硼替佐米的抗肿瘤效果^[30-31]。

4 Humanin及其衍生物的作用机制

4.1 Humanin分泌至胞外、形成二聚体或多聚体发挥作用

Humanin是一种分泌性多肽, 当胞内Ca²⁺及cAMP升高时, humanin分泌增加。内质网-高尔基体转运抑制剂brefedin A可以阻断humanin的分泌。Humanin中Leu9残基与分泌功能有关, 实验发现, 插入L9R-humanin的质粒转染的杂交瘤神经元, 合成的L9R-humanin不能向培养基分泌, 仍逗留于胞浆中, 因而不表现对被转染细胞的神经保护作用; 当给予外源性L9R-humanin时, 则可保护神经元免受损伤而发生凋亡^[16]。可见, humanin分泌至胞外是其发挥保护作用的前提。其次, humanin需形成二聚体或多聚体才能发挥保护作用。实验发现, 突变体P3A-humanin、L12A-humanin、S14A-humanin、P19A-humanin不能发生同二聚体化, 因而不能发挥神经保护作用^[32]。Humanin是一个具有信号肽序列的多肽, 推测humanin由细胞内产生后分泌到胞外, 形成同源二聚体或多聚体, 作用于相应的膜受体或胞浆内受体, 激活相应的信号转导通路起作用(图1)。

4.2 细胞膜受体

4.2.1 甲酰胺样受体-1(formyl-peptide receptor-like-1,

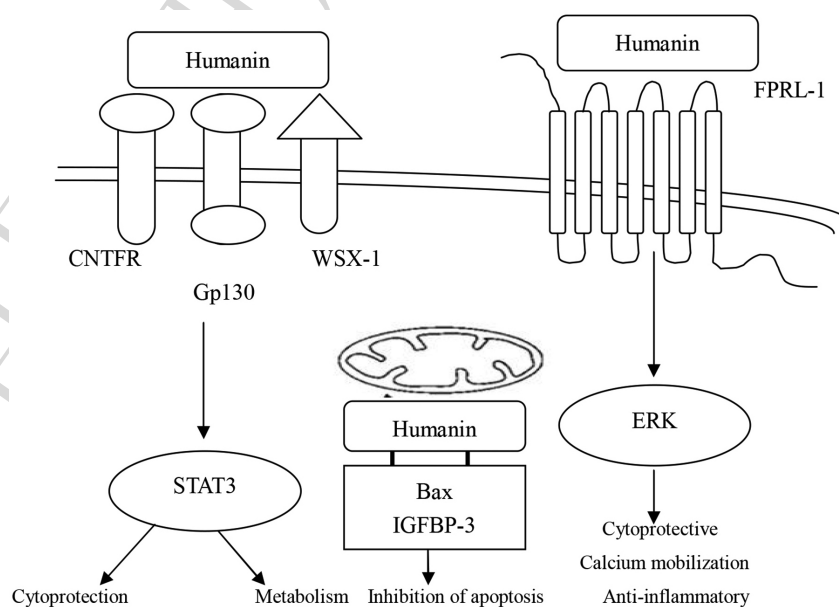


图1 Humanin作用机制(根据参考文献[33]修改)

Fig.1 Mechanism of humanin action (modified from reference [33])

FPRL-1) 2004年, Ying等^[34]发现了第一个AD相关的 humanin受体。研究发现, 在神经母细胞中 A β 1-42 与 humanin都能够激活细胞表面G蛋白偶联的甲酰胺样受体-1(FPRL-1), A β 1-42诱导的神经细胞毒性能够被 humanin所逆转, 表明 humanin通过与 A β 1-42 竞争性结合细胞表面G蛋白偶联的 FPRL-1, 从而阻止 A β 在细胞内的聚集和纤维化, 降低 A β 的神经毒作用, 抑制 A β 诱导的细胞凋亡。因此推测, humanin作为 A β 的拮抗剂, 通过作用于 FPRL-1, 诱导 Ca²⁺动员、激活细胞外调节激酶(extracellular-signal regulated kinase, ERK)信号通路, 从而发挥神经保护作用。

4.2.2 白介素-6受体家族复合物 近来, Hashimoto等^[35]发现了一种位于细胞膜表面的 humanin受体, 可介导 humanin的神经保护作用。该受体属于白介素-6(interleukin-6, IL-6)受体家族, 又被称为异源三聚体 humanin受体(heterotrimeric humanin receptor, htHNR), 由睫状神经营养因子受体(ciliary neurotrophic factor receptor, CNTFR)/WSX-1和 gp130组成。gp130是 IL-6受体家族的共同组成成分, 可以激活 JAK/STATs和 ERK介导的信号通路。CNTFR是已知的 IL-6家族的细胞因子, WSX-1是在检测 gp130偶联蛋白时发现的, 因此推测, humanin也可以通过与两个细胞因子受体二聚体, 包括 gp130/WSX-1、gp130/CNTFR或 CNTFR/WSX-1相结合, 从而抑制神经元凋亡。

4.3 细胞内机制

4.3.1 细胞内受体 Bcl-2家族成员——Bax、tBid、BimEL 正常情况下, Bax以非活性状态存在于多种细胞的胞质溶胶中, 当受到凋亡信号刺激时, Bax发生构象改变, 暴露出与膜作用的区域, 转位至线粒体, 插入线粒体膜, 引起细胞色素C及其他凋亡蛋白的释放。Humanin通过 Ser7-Asp17区域在胞质区与 Bax相结合, 该区域与神经保护核心区域 Pro3-Pro19部分重叠。Humanin一方面可以阻止 Bax从胞质向线粒体的移位; 另一方面, 在离体情况下能阻断 Bax与分离出的线粒体结合, 抑制细胞色素C的释放, 通过干扰 Bax的作用发挥抑制细胞凋亡的作用^[36]。免疫共沉淀实验证实, humanin可以特定地与 Bax、tBid和 BimEL相结合, 但是不能与 Bcl-2家族的其他蛋白结合, 如 Bcl-2和 Bcl-B^[37]。

Li等^[38]采用原代培养皮层神经元的方法, 使用 humanin预处理神经元, 明显抑制了 Bax从胞浆向线粒体的移位及 Caspase-3的活性, 有效抑制了 A β 31-

35诱导的皮层神经元凋亡。实验发现, humanin结合并抑制 Bax, 从而抑制星状孢子素、血清剥夺以及紫外线照射诱导的细胞凋亡, 其对小鼠睾丸生殖细胞凋亡的调节也是通过此途径发挥作用的^[39]。

4.3.2 细胞内相互作用的蛋白质 Humanin可以与细胞凋亡过程中的许多蛋白质相互作用而发挥功能。胰岛素样生长因子结合蛋白-3(insulin-like growth factor-binding protein-3, IGFBP-3)与 humanin既可以相互拮抗, 又可以相互协同。如离体条件下, humanin与 IGFBP-3相互作用, 拮抗 IGFBP-3诱导的神经胶质细胞的凋亡^[40]。然而, 在保护神经元细胞免受 A β 损伤方面, humanin与 IGFBP-3则起到积极的协同作用^[41]。

2003年, Niikura等^[41]利用酵母双杂交系统发现了 TRIM11(tripartite motif 11), 属于 TRIM/RBCC蛋白家族, 是一种能够与 humanin相互作用的蛋白质, 通过蛋白酶体降解途径调节细胞内的 humanin水平。2011年, Rossini等^[42]利用不同的酵母双杂交系统发现了 VSTM2L(V-set and transmembrane domain containing 2 like), 一种能够与 humanin相互作用的蛋白质, 能够抑制 humanin对神经元凋亡的保护作用, 可能是人体内调节 humanin作用的另一种方式。在中枢神经系统和原代培养的神经元中均有表达, 在人类和啮齿类动物血清中存在, 但具有中枢神经系统特异性, 单独 VSTM2L过表达不会导致细胞凋亡。推测在细胞外, VSTM2L可能通过干扰 humanin二聚化的能力或干预 humanin与细胞表面受体相结合来发挥抑制其活性的作用。

4.3.3 细胞内信号转导通路 Hashimoto等^[43]提出, humanin的神经保护作用可能涉及某些酪氨酸激酶的激活和转录过程中信号转导和转录激活因子(signal transducers and activators of transcription, STATs), 尤其是 STAT-3的激活。实验证实, humanin介导的神经保护作用可以被 genistein(一种酪氨酸激酶抑制剂)所阻断, 然而磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)和丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)抑制剂不能阻断 humanin的保护作用^[1]。有报道称, humanin可以抑制 c-jun氨基端激酶(c-jun N-terminal kinases, JNK)和细胞凋亡信号调节激酶(apoptosis signal regulating kinase, ASK)/JNK介导的神经细胞凋亡^[44]。

4.4 其他途径

最新研究发现, 缺氧导致的钾外流及细胞内钾

缺乏,可引起中枢神经元凋亡^[45]。而humanin通过减弱缺氧所致海马神经元电压依赖性钾电流的变化,从而发挥保护神经元的作用^[46]。

Kariya等^[47]研究发现, humanin可以提高无血清培养条件下细胞的代谢率和三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)水平,从而对抗无血清培养诱发的细胞凋亡。Humanin同时可以提高有血清培养细胞的ATP水平。因此推测, humanin可能通过提高神经元的代谢率及ATP水平,从而拮抗A β 诱发的线粒体功能障碍导致的能量危机,维持细胞生理活动过程的稳态,减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生。

随着研究的逐步深入,发现 humanin可以降低Ca²⁺超载,维持胞内Ca²⁺稳态^[48];可以提高胞内ATP水平,改善细胞功能;能保护ProCaspase-3免受V6542-APP介导的剪切,从而阻断Caspase-3的产生。这可能是humanin具有广泛的神经及细胞保护作用的理论基础。

5 展望

Humanin是在AD患者大脑枕叶皮层未受损的脑区发现的,大脑局部humanin分泌相对不足可能诱发AD,如能提高AD病人脑局部humanin的表达水平,可能对AD的治疗产生积极影响。研究发现, humanin具有广泛的神经保护及细胞保护作用,能够改善胰岛素敏感性,对胰岛 β 细胞的存活起到保护作用,延缓糖尿病的发生。糖尿病患者认知功能下降与海马神经元凋亡有关,我们前期的研究发现,高糖环境下原代培养的胎鼠海马神经元凋亡率增加^[49],那么给予humanin预处理是否可以改善糖毒性诱导的海马神经元凋亡,有待于进一步的研究证实。Humanin作为一种具有抗凋亡和抗炎特性的神经和细胞保护肽能否应用于临床,也有待更多的循证医学研究证实。对humanin的深入研究,将为增龄相关疾病包括AD、T2DM、动脉粥样硬化和缺血性心脏病等疾病的防治开辟新的途径。

参考文献 (References)

- 1 Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, Ito Y, *et al.* A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A β . *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98(11): 6336-41.
- 2 Matsuoka M, Hashimoto Y. Humanin and the receptors for humanin. *Mol Neurobiol* 2010; 41(1): 22-8.

- 3 Mamiya T, Ukai M. [Gly(14)]-Humanin improved the learning and memory impairment induced by scopolamine *in vivo*. *Br J Pharmacol* 2001; 134(8): 1597-9.
- 4 Krejcová G, Patocka J, Slaninová J. Effect of humanin analogues on experimentally induced impairment of spatial memory in rats. *J Pept Sci* 2004; 10(10): 636-9.
- 5 Tajima H, Kawasumi M, Chiba T, Yamada M, Yamashita K, Nawa M, *et al.* A humanin derivative, S14G-HN, prevents amyloid-beta-induced memory impairment in mice. *J Neurosci Res* 2005; 79(5): 714-23.
- 6 Guo F, Jing W, Ma CG, Wu MN, Zhang JF, Li XY, *et al.* [Gly(14)]-humanin rescues long-term potentiation from amyloid beta protein-induced impairment in the rat hippocampal CA1 region *in vivo*. *Synapse* 2010; 64(1): 83-91.
- 7 Yuan L, Han WN, Li SF, Liu XJ, Wu MN, Qi JS. [Gly14]-humanin protects against A β 31-35-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *Sheng Li Xue Bao* 2012; 64(6): 625-32.
- 8 Niikura T, Sidahmed E, Hirata-Fukae C, Aisen PS, Matsuoka Y. A humanin derivative reduces amyloid Beta accumulation and ameliorates memory deficit in triple transgenic mice. *PLoS One* 2011; 6(1): e16259.
- 9 Zhang W, Zhang W, Li Z, Hao J, Zhang Z, Liu L, *et al.* S14G-humanin improves cognitive deficits and reduces amyloid pathology in the middle-aged APPswe/PS1dE9 mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2012; 100(3): 361-9.
- 10 Kuliawat R, Klein L, Gong Z, Nicoletta-Gentile M, Nemkal A, Cui L, *et al.* Potent humanin analog increases glucose-stimulated insulin secretion through enhanced metabolism in the β cell. *FASEB J* 2013; 27(12): 4890-8.
- 11 Hoang PT, Park P, Cobb LJ, Paharkova-Vatchkova V, Hakimi M, Cohen P, *et al.* The neurosurvival factor Humanin inhibits beta-cell apoptosis via signal transducer and activator of transcription 3 activation and delays and ameliorates diabetes in nonobese diabetic mice. *Metabolism* 2010; 59(3): 343-9.
- 12 Muzumdar RH, Huffman DM, Calvert JW, Jha S, Weinberg Y, Cui L, *et al.* Acute humanin therapy attenuates myocardial ischemia and reperfusion injury in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30(10): 1940-8.
- 13 Oh YK, Bachar AR, Zacharias DG, Kim SG, Wan J, Cobb LJ, *et al.* Humanin preserves endothelial function and prevents atherosclerotic plaque progression in hypercholesterolemic ApoE deficient mice. *Atherosclerosis* 2011; 219(1): 65-73.
- 14 Niikura T, Yamada M, Chiba T, Aiso S, Matsuoka M, Nishimoto I. Characterization of V642I-A β PP-induced cytotoxicity in primary neurons. *J Neurosci Res* 2004; 77(1): 54-62.
- 15 Hashimoto Y, Niikura T, Ito Y, Sudo H, Hata M, Arakawa E, *et al.* Detailed characterization of neuroprotection by a rescue factor humanin against various Alzheimer's disease-relevant insults. *J Neurosci* 2001; 21(23): 9235-45.
- 16 Yamagishi Y, Hashimoto Y, Niikura T, Nishimoto I. Identification of essential amino acids in Humanin, a neuroprotective factor against Alzheimer's disease relevant insults. *Peptides* 2003; 24(4): 585-95.
- 17 Arakawa T, Kita Y, Niikura T. A rescue factor for Alzheimer's diseases: Discovery, activity, structure, and mechanism. *Curr Med Chem* 2008; 15(21): 2086-98.
- 18 Wang ZJ, Han WN, Yang GZ, Yuan L, Liu XJ, Li QS, *et al.* The neuroprotection of Rattin against amyloid β peptide in spatial

- memory and synaptic plasticity of rats. *Hippocampus* 2014; 24(1): 44-53.
- 19 Jung SS, van Nostrand WE. Humanin rescues human cerebrovascular smooth muscle cells from Abeta-induced toxicity. *J Neurochem* 2003; 84(2): 266-72.
 - 20 Zou P, Ding Y, Sha Y, Hu B, Nie S. Humanin peptides block calcium influx of rat hippocampal neurons by altering fibrogenesis of Abeta (1-40). *Peptides* 2003; 24(5): 679-85.
 - 21 Xu X, Chua CC, Gao J, Hamdy RC, Chua BH. Humanin is a novel neuroprotective agent against stroke. *Stroke* 2006; 37(10): 2613-9.
 - 22 Wang T, Huang Y, Zhang M, Wang L, Wang Y, Zhang L, *et al.* [Gly14]-Humanin offers neuroprotection through glycogen synthase kinase-3 β inhibition in a mouse model of intracerebral hemorrhage. *Behav Brain Res* 2013; 247: 132-9.
 - 23 Chiba T, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, Aiso S, Matsuoka M, *et al.* Colivelin prolongs survival of an ALS model mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 343(3): 793-8.
 - 24 胥显民, 王廷杰, 陈显久, 张悦红, 程牛亮, 蔡大勇, 等. [Gly14]-humanin多肽对 β 淀粉样蛋白引起的神经干细胞毒性的拮抗作用研究. *中国病理生理杂志* (Xu Xianmin, Wang Tingjie, Chen Xianjiu, Zhang Yuehong, Cheng Niuliang, Cai Dayong, *et al.* Protective effects of [Gly14]-humanin on cultured neural stem cells treated with β -amyloid protein *in vitro*. *Chinese Journal of Pathophysiology*) 2006; 22(8): 1623-7.
 - 25 Zacharias DG, Kim SG, Massat AE, Bachar AR, Oh YK, Herrmann J, *et al.* Humanin, a cytoprotective peptide, is expressed in carotid atherosclerotic plaques in humans. *PLoS One* 2012; 7(2): e31065.
 - 26 Bachar AR, Scheffer L, Schroeder AS, Nakamura HK, Cobb LJ, Oh YK, *et al.* Humanin is expressed in human vascular walls and has a cytoprotective effect against oxidized LDL-induced oxidative stress. *Cardiovasc Res* 2010; 88(2): 360-6.
 - 27 Lue Y, Swerdloff R, Liu Q, Mehta H, Hikim AS, Lee KW, *et al.* Opposing roles of insulin-like growth factor binding protein 3 and humanin in the regulation of testicular germ cell apoptosis. *Endocrinology* 2010; 151(1): 350-7.
 - 28 Miao J, Zhang W, Yin R, Liu R, Su C, Lei G, *et al.* S14G-Humanin ameliorates A β 25-35-induced behavioral deficits by reducing neuroinflammatory responses and apoptosis in mice. *Neuropeptides* 2008; 42: 557-67.
 - 29 Zhao ST, Zhao L, Li JH. Neuroprotective peptide humanin inhibits inflammatory response in astrocytes induced by lipopolysaccharide. *Neurochem Res* 2013; 38(3): 581-8.
 - 30 Eriksson E, Wickström M, Perup LS, Johnsen JJ, Eksborg S, Kogner P, *et al.* Protective role of humanin on bortezomib-induced bone growth impairment in anti-cancer treatment. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(3): djt459.
 - 31 Cohen P. New role for the mitochondrial peptide humanin: Protective agent against chemotherapy-induced side effects. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(3): dju006.
 - 32 Hashimoto Y, Terashita K, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kanekura K, *et al.* Humanin antagonists: Mutants that interfere with dimerization inhibit neuroprotection by Humanin. *Eur J Neurosci* 2004; 19(9): 2356-64.
 - 33 Lee C, Yen K, Cohen P. Humanin: A harbinger of mitochondrial-derived peptides? *Trends Endocrinol Metab* 2013; 24(5): 222-8.
 - 34 Ying G, Iribarren P, Zhou Y, Gong W, Zhang N, Yu ZX, *et al.* Humanin, a newly identified neuroprotective factor, uses the G protein-coupled formylpeptide receptor-like-1 as a functional receptor. *J Immunol* 2004; 172(11): 7078-85.
 - 35 Hashimoto Y, Kurita M, Aiso S, Nishimoto I, Matsuoka M. Humanin inhibits neuronal cell death by interacting with a cytokine receptor complex or complexes involving CNTF receptor alpha/WSX-1/gp130. *Mol Biol Cell* 2009; 20(12): 2864-73.
 - 36 Guo B, Zhai D, Cabezas E, Welsh K, Nouraini S, Satterthwait AC, *et al.* Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 2003; 423(6938): 456-61.
 - 37 Luciano F, Zhai D, Zhu X, Bailly-Maitre B, Ricci JE, Satterthwait AC, *et al.* Cytoprotective peptide humanin binds and inhibits proapoptotic Bcl-2/Bax family protein BimEL. *J Biol Chem* 2005; 280(16): 15825-35.
 - 38 Li LM, Zhang Y, Qiao JT, Zhang C. Humanin protects neurons against apoptosis induced by Abeta31-35 through suppression of intrinsic pathway. *Sheng Li Xue Bao* 2010; 62(2): 93-100.
 - 39 Jia Y, Lue YH, Swerdloff R, Lee KW, Cobb LJ, Cohen P, *et al.* The cytoprotective peptide humanin is induced and neutralizes Bax after pro-apoptotic stress in the rat testis. *Andrology* 2013; 1(4): 651-9.
 - 40 Ikonen M, Liu B, Hashimoto Y, Ma L, Lee KW, Niikura T, *et al.* Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(22): 13042-7.
 - 41 Niikura T, Hashimoto Y, Tajima H, Ishizaka M, Yamagishi Y, Kawasumi M, *et al.* A tripartite motif protein TRIM11 binds and destabilizes Humanin, a neuroprotective peptide against Alzheimer's disease relevant insults. *Eur J Neurosci* 2003; 17(6): 1150-8.
 - 42 Rossini L, Hashimoto Y, Suzuki H, Kurita M, Gianfriddo M, Scali C, *et al.* VSTM2L is a novel secreted antagonist of the neuroprotective peptide Humanin. *FASEB J* 2011; 25(6): 1983-2000.
 - 43 Hashimoto Y, Suzuki H, Aiso S, Niikura T, Nishimoto I, Matsuoka M. Involvement of tyrosine kinases and STAT3 in Humanin-mediated neuroprotection. *Life Sci* 2005; 77(24): 3092-104.
 - 44 Hashimoto Y, Niikura T, Chiba T, Tsukamoto E, Kadowaki H, Nishitoh H, *et al.* The cytoplasmic domain of Alzheimer's amyloid β protein precursor causes sustained apoptosis signal-regulating kinase 1/c-Jun NH2 terminal kinase-mediated neurotoxic signal via dimerization. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 889-902.
 - 45 Shimoda LA, Polak J. Hypoxia. 4. Hypoxia and ion channel function. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011; 300(5): C951-67.
 - 46 Liu W, Zhang XP, Yang DL, Song SW. Humanin attenuated the change of voltage-dependent potassium currents in hippocampal neurons induced by anoxia. *CNS Neurosci Ther* 2014; 20(1): 95-7.
 - 47 Kariya S, Takahashi N, Hirano M, Ueno S. Humanin improves impaired metabolic activity and prolongs survival of serum-deprived human lymphocytes. *Mol Cell Biochem* 2003; 254(1/2): 83-9.
 - 48 Zou P, Ding Y, Sha Y, Hu B, Nie S. Humanin peptides block calcium influx of rat hippocampal neurons by altering fibrogenesis of Abeta(1-40). *Peptides* 2003; 24(5): 679-85.
 - 49 Qi WW, Zhong LY, Li XR, Li G, Liu ZX, Hu JF, *et al.* Hyperglycemia induces the variations of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and peroxisome proliferator-activated receptor- γ expression in hippocampus and hypothalamus of diabetic rats. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012: 107130.