

DOI: 10.13376/j.cbbs/20250230

CSTR: 32203.14.cbbs.2026060

文章编号: 1004-0374(2026)03-0428-16

·评述与综述·

## 组织蛋白酶X在疾病中的新作用和治疗意义

孟 瑞,倪军军\*

(北京理工大学生命学院,北京 100081)

**摘要:** 组织蛋白酶X(cathepsin X, Cat X)是半胱氨酸组织蛋白酶家族的一员。它是一种溶酶体蛋白酶,只具备羧基肽酶活性,不具备内肽酶活性,参与细胞黏附、细胞迁移与信号转导等多种生物学过程。此外,越来越多的证据表明,Cat X表达或活性失调可能导致多种疾病的发展。本综述旨在阐明Cat X蛋白质结构、底物特异性、抑制剂调控等生物学特性,并总结Cat X参与各种生理和病理过程的机制,进而探讨其作为创新治疗靶点的潜力和面临的挑战。

**关键词:** 组织蛋白酶X;蛋白酶底物;抑制剂;病理生理学;治疗意义

中图分类号:Q55 文献标识码:A

## Cathepsin X in human diseases: Novel roles and therapeutic implications

MENG Rui, NI Jun-Jun\*

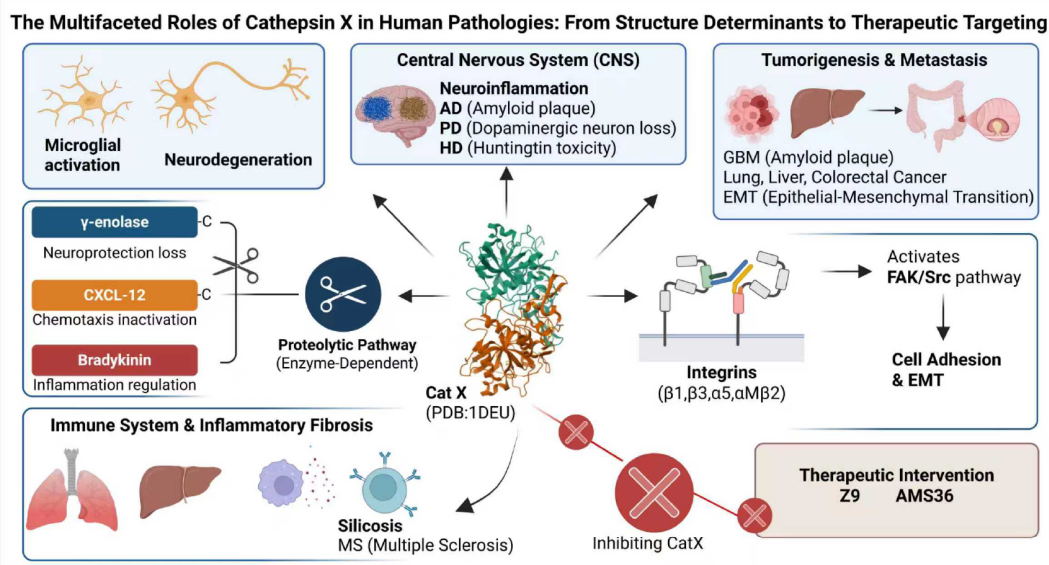
(School of Life Sciences, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

**Abstract:** Cathepsin X (Cat X), a unique lysosomal cysteine protease encoded by the *CTSZ* gene, distinguishes itself through exclusive carboxypeptidase activity and a specialized protein architecture. Unlike other family members, Cat X possesses an exceptionally short propeptide, which facilitates non-proteolytic interactions with integrins alongside its traditional enzymatic functions. This review clarifies the molecular hallmarks of Cat X, emphasizing how its structural insertions dictate substrate specificity towards critical signaling molecules. Recent evidence underscores the pivotal role of Cat X dysregulation in driving the progression of various human pathologies. In neurodegenerative disorders such as Alzheimer's and Parkinson's diseases, Cat X modulates neuroinflammation and neuronal survival by proteolytically inactivating neurotrophic factors or processing toxic protein fragments. Within the oncology landscape, Cat X promotes epithelial-mesenchymal transition, cell invasion, and tumor microenvironment remodeling across diverse malignancies, including glioblastoma and hepatocellular carcinoma. Beyond these, Cat X is implicated in autoimmune conditions and inflammatory fibrotic diseases. We further evaluate the development of small-molecule inhibitors, transitioning from irreversible probes like AMS36 to highly selective, reversible agents such as Compound 25, which demonstrate substantial therapeutic potential in preclinical models. By integrating structural biology with clinical pathology, this review positions Cat X as a versatile molecular hub. Ultimately, deciphering the upstream regulatory networks and the dynamic balance of Cat X activity between the central nervous system and peripheral circulation will be essential for validating Cat X as a robust diagnostic biomarker and a precision therapeutic target.

收稿日期:2025-06-15; 修回日期:2025-07-28

基金项目:国家自然科学基金项目(3207954);北京市自然科学基金项目(7212066)

\*通信作者:E-mail:nijunjun@bit.edu.cn



**Key words:** cathepsin X; protease substrates; inhibitors; pathophysiology; therapeutic significance

## 1 组织蛋白酶X

组织蛋白酶Z (cathepsin Z, Cat Z) 与组织蛋白酶X (cathepsin X, Cat X) 是同一蛋白质实体的不同名称,均由 *CTSZ* 基因编码。国际生物化学与分子生物学联合会 (IUBMB) 的酶学委员会 (EC) 将其系统命名为组织蛋白酶X,并分配了唯一的酶学编号 EC 3.4.18.1,该蛋白于1974年从大鼠肝脏中分离纯化<sup>[1]</sup>。Cat X 又被称为 Cat B2、Cat IV、溶酶体羧肽酶B、酸性羧肽酶、半胱氨酸型羧肽酶,是人类11个溶酶体半胱氨酸蛋白酶家族 (Cat B、C、F、H、K、L、O、S、V、W、X) 中的一员<sup>[2]</sup>。该酶在人体多种组织中呈现中高水平表达,包括胎盘、肺、肝脏、肾脏、胰腺、结肠、卵巢、外周血白细胞、前列腺和小肠以及脾脏等部位;而在心脏、脑、骨骼肌、睾丸及胸腺中,表达则相对较低<sup>[3]</sup>。

与其他的半胱氨酸蛋白酶相比,Cat X 具有以下独特的特征:(1) Cat X 具有羧基单肽酶和羧基二肽酶活性,没有内肽酶活性<sup>[4]</sup>;(2) Cat X 的前肽异常短,仅包含38个氨基酸残基,是所有半胱氨酸组织蛋白酶中最短的,而且前肽中包含整合素结合基序 Arg-Gly-Asp (RGD);(3) Cat X 在保守基序 CGXC (Cys28-Gly29-Ser30-Cys31) 序列之前存在三个氨基酸残基的插入,在推定的氧阴离子孔谷氨酰胺 (Gln22) 位点和活性位点半胱氨酸 (Cys31) 之间的高度保守区域出现这样的插入对于木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶来说极不寻常,可能是 Cat X 具有独特的羧肽酶活性的原因<sup>[3,5,6]</sup>。

## 2 Cat X的结构特性和活性

### 2.1 基因

人 Cat X 最初是通过 PCR 扩增从人卵巢 cDNA 文库中获得的<sup>[3]</sup>。人 Cat X 的 mRNA 长度约为 12 kb,由6个外显子和5个内含子组成。人 Cat X 基因定位于染色体20q13区域,该基因的染色体定位与当时已发现的所有其他半胱氨酸组织蛋白酶基因均不相同,提示其在基因组中处于一个独立的位置<sup>[4,5,7]</sup>。人 Cat X cDNA 包含 912 bp 的开放阅读框,编码由303个氨基酸残基组成的蛋白<sup>[3]</sup>。人 Cat X 启动子缺乏 TATA 基序,且存在几个潜在的 Sp1 结合位点,因此被认为是不受调节的管家基因<sup>[7]</sup>。

### 2.2 蛋白质结构特性和活性

#### 2.2.1 结构

目前解析的人 Cat X 晶体结构分辨率为 2.67 Å。研究表明,人源 Cat X 是同型二聚体,目前已解析人源 Cat X 26~303位氨基酸的蛋白结构 (PDB:1DEU),如图1中非红色部分所示<sup>[4]</sup>。使用 Alpha Fold 3 对 Cat X 全长进行结构预测,发现其1~25位氨基酸蛋白结构如图1红色部分所示;由于缺少同源结构的解析,所以预测结构为 LOOP 环。目前已经解析的 Cat X 结构具有木瓜蛋白酶样半胱氨酸蛋白酶的典型折叠,由两个大小相等的结构域组成,根据标准视图方向分别被称为左结构域和右结构域。左侧 N 端结构域的主要次级结构特征是 α 螺旋,而右侧 C 端结构域具有 β 桶形折叠。在顶部,两个结构域分开并形成

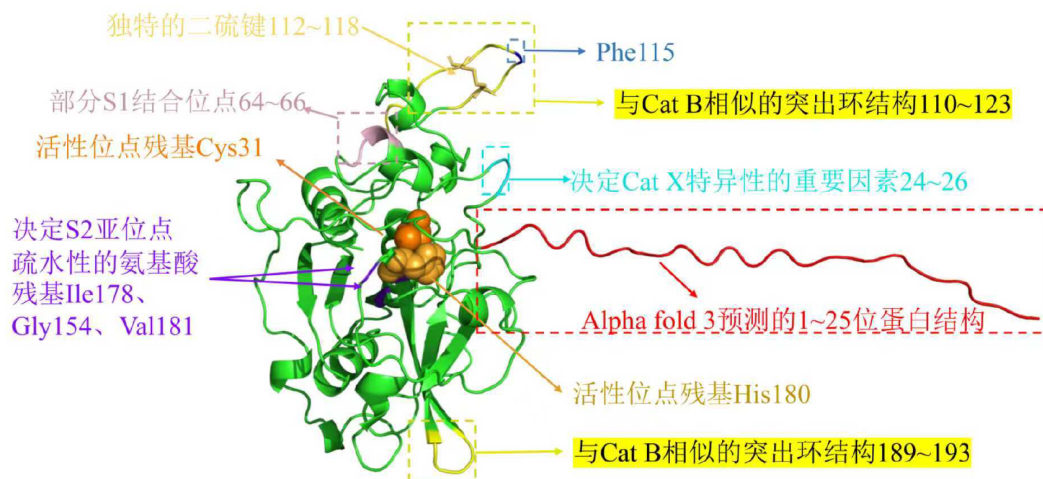


图1 Cat X的蛋白结构

Figure 1 Protein structure of Cat X

一个“V形”活性位点裂隙。Cat X活性位点Cys31和His180分别来自不同的结构域<sup>[4]</sup>。Cat X结构中一些突出环(110~123和189~193)的位置与Cat B(132~139和208~212)相似。特别引人注目的是,Phe115环暴露在110~123环的尖端。短的三氨基酸插入(Ile24、Pro25和Gln26)和二硫键(112~118)是Cat X特异性的,如图1所示<sup>[4]</sup>。根据Schechter和Berger命名法,Cat的底物特异性由其S和S'亚位点定义,S2亚位点被认为是决定半胱氨酸组织蛋白酶底物特异性的主要因素<sup>[8,9]</sup>。在Cat X中,该亚位点的疏水特性主要由右侧残基Ile178、Gly154和底部残基Val181贡献,如图1所示。此外,Cat X中S2口袋的特异性受Asp76调节,而在其他相关蛋白酶结构中,该对应位置通常为疏水残基(如Met或Pro)<sup>[4]</sup>。研究发现,Cat X的结构与人Cat K的结构非常相似(在1.5 Å的阈值距离处产生145个等位Cα对),与人Cat B和猪Cat H最不相似(分别有89对和73对)<sup>[4]</sup>。

### 2.2.2 激活

Cat X酶原与成熟Cat X在构象上无显著差异。在体外,Cat X酶原可在还原条件下由Cat L催化转化为成熟的Cat X,而不是像其他半胱氨酸组织蛋白酶那样通过自催化成熟。具体来说,Cat L在预测的成熟Cat X N端上游4个残基处进行切割,将43 kDa的糖基化前体加工为约39 kDa的成熟酶<sup>[6]</sup>。Cat X酶原不容易在体外自催化加工,其前肽是迄今为止半胱氨酸蛋白酶中最短的,并且与其他组织蛋白酶没有任何显著相似性,这表明Cat X酶原活性和加工

成熟的结构基础可能与木瓜蛋白酶超家族的其他成员不同<sup>[6,10]</sup>。

### 2.2.3 底物特异性

Cat X是一种羧肽酶,具有羧基单肽酶和羧基二肽酶活性<sup>[4,6]</sup>。Cat X活性位点裂隙中没有类似于Cat B闭塞环或氨肽酶Cat H微链的结构特征,因此其活性位点裂隙没有被占据,能够沿其全长结合底物<sup>[11,12]</sup>。Cat X的活性位点裂隙包含底物结合位点S1'、S1和S2,此外在所有已知结构的同类组织蛋白酶中,Cat X拥有规模最大的S1'结合亚位点<sup>[4,13,14]</sup>。此外,结合底物P1残基和Cat X的S1结合位点之间的相互作用似乎比其他相关蛋白酶更紧密,也更具选择性<sup>[4]</sup>。与其他相关蛋白酶一样,P2残基侧链与Cat X结合的位点是唯一可以称为口袋的底物位点<sup>[14]</sup>。Asp76-His234排列可能使Cat X能够处理具有长侧链的底物,并在P2位置具有亲水尾部<sup>[4]</sup>。Cat X作为羧肽酶,其作用底物和切割位点如图2所示。

Profilin 1在调节细胞分裂中发挥重要作用,Profilin 1缺失会引发皮质肌动蛋白减少,阻碍细胞圆形化,延长细胞分裂时长并增加胞质分裂失败风险,最终导致染色体排列错位及多极纺锤体形成等有丝分裂缺陷<sup>[15]</sup>。在分子机制层面,Cat X通过水解作用调控Profilin 1的功能:反向高效液相色谱和质谱分析表明,Profilin 1是Cat X的作用底物,后者可切割其C末端至多5个氨基酸残基,从而影响Profilin 1与网格蛋白的相互作用。这种由Cat X介

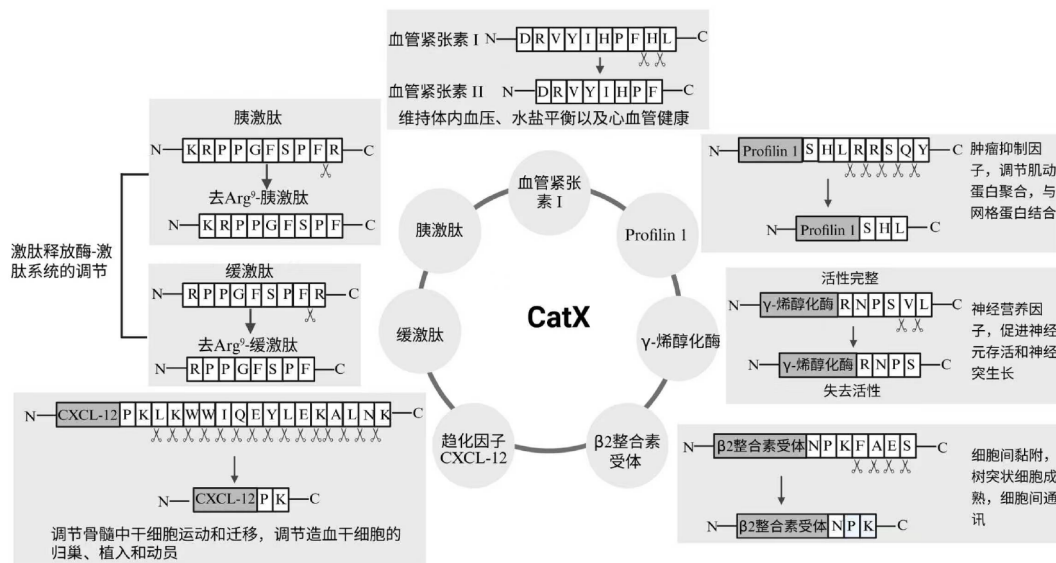


图2 Cat X的作用底物  
Figure 2 Substrates of Cat X

导的Profilin 1功能受损可能导致肿瘤细胞迁移和侵袭增加<sup>[16,17]</sup>。

$\gamma$ -烯醇化酶( $\gamma$ -enolase)是一种重要的神经营养因子,在促进神经元存活、神经突生长及少突胶质细胞分化中发挥关键作用。研究发现,Cat X通过特异性切割 $\gamma$ -烯醇化酶C末端的两个氨基酸残基(L433和V432),破坏其与 $\gamma$ 1-突触结合蛋白的相互作用,阻止其向细胞膜易位,进而抑制其促分化功能。实验证明,在少突胶质细胞分化过程中,Cat X的表达和活性显著下降;而通过抑制剂阻断Cat X,则能有效增强 $\gamma$ -烯醇化酶活性并促进细胞分化,证实了Cat X对该过程的负向调控作用<sup>[19]</sup>。

$\beta$ 2整合素是一类二聚体糖蛋白,其中巨噬细胞-1抗原(macrophage-1 antigen,Mac-1;CD11b/CD18)和淋巴细胞功能相关抗原1(lymphocyte function-associated antigen-1,LFA-1;CD11a/CD18)对于树突状细胞的成熟是必不可少的。 $\beta$ 2整合素功能缺陷会显著削弱树突状细胞的整体代谢活性,并导致活性氧生成与ATP/ADP比率下降<sup>[20]</sup>。体外研究发现,重组Cat X可切割Mac-1的 $\beta$ 2链胞质结构域C末端(去除4个氨基酸残基),导致Mac-1被激活,从而驱动树突状细胞的黏附、伪足形成及成熟进程。这一过程是树突状细胞获得免疫激活能力的关键步骤,其缺失将导致树突状细胞停滞在未成熟状态,最终导致适应性免疫应答受到抑制<sup>[21]</sup>。

趋化因子CXC配体12(chemokine (C-X-C motif) ligand 12,CXCL-12)是调节造血干细胞动态平衡的核心因子,负责骨髓内干细胞的归巢、植入及动员过程。在炎症微环境中,CXCL12强力驱动T细胞/B细胞/单核细胞/中性粒细胞向受损部位迁移;其中,单核细胞经CXC趋化因子受体4(CXCR4)诱导分化为促进动脉粥样硬化的巨噬细胞,同时协同增强树突状细胞成熟并诱导T细胞分泌IFN- $\gamma$ ,放大炎症级联反应<sup>[22]</sup>。研究表明,Cat X可根据底物浓度特异性地切割CXCL-12 C末端至多15个氨基酸残基,这种截短效应导致CXCL-12彻底丧失趋化迁移能力,构成了炎症消散或反馈调节的重要环节<sup>[23]</sup>。

缓激肽和胰激肽负责激肽释放酶-激肽系统的调节。缓激肽是关键的炎症和致痛介质,通过激活B1和B2受体发挥作用。在炎症和疼痛反应急性期,B2受体激活感觉神经元导致痛觉过敏,放大血管通透性、水肿和疼痛;而在慢性期,组织损伤或细胞因子诱导B1受体表达上调,参与免疫调节<sup>[24]</sup>。胰激肽作为强效的血管舒张剂和血管通透性增强因子,通过激活内皮细胞上的缓激肽B2受体,直接导致局部组织水肿、炎症和疼痛反应<sup>[25]</sup>。反向高效液相色谱分析证实,Cat X可通过切除底物C末端的精氨酸残基,将缓激肽/胰激肽转化为去Arg<sup>9</sup>-缓激肽/去Arg<sup>9</sup>-胰激肽。这一转变不仅改变了配体的受体亲和力,更标志着激肽信号从急性促炎转向慢性免疫调节。

血管紧张素 I 是肾素-血管紧张素系统中的关键中间体,其主要作用是在血管紧张素转换酶的催化下被水解为具有生物活性的血管紧张素 II;血管紧张素 II 作为强效血管收缩剂,通过结合血管平滑肌细胞上的血管紧张素 I 受体,直接引发血管收缩,促进醛固酮分泌和交感神经激活,从而显著升高血压并参与心血管疾病病理过程,是高血压发病的核心机制<sup>[26]</sup>。实验证据表明,Cat X能切割血管紧张素 I C末端两个氨基酸残基,直接将其转化为血管紧张素 II。这意味着在炎症条件下,Cat X可能是维持血管紧张素 II 活性的关键代偿因子。

综上所述,Cat X通过羧肽酶活性重塑肽激素信号,将激肽释放酶-激肽和肾素-血管紧张素系统在炎症微环境中耦合,促进从急性到慢性炎症的转化及血管病理改变,其作用机制可能成为治疗慢性炎症和心血管疾病的新靶点<sup>[27]</sup>。Cat X作为一种多功能羧肽酶,通过特异性切割多种信号蛋白的C末端残基,在免疫调控、神经发育及炎症稳态中扮演核心枢纽角色。从结构生物学角度看,其底物结合裂隙(尤其是突出的S1'位点)和独特的Asp76-His234结构基序,使其能够选择性水解具有长侧链或亲水尾部的底物,这一特性为理解其多样化的生物学功能提供了结构基础。Cat X作为“分子剪刀”的广谱底物特异性,使其成为免疫应答及病理进程中的核心调控因子。

#### 2.2.4 上游调控因子

Toll样受体9(Toll like receptor 9, TLR9)作为一种关键的胞内模式识别受体,广泛参与免疫与非免疫细胞的活化。TLR9识别细菌DNA后,通过核因子 $\kappa$ B(nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B)信号通路显著提升内皮细胞组织因子的表达及活性,并伴随组织因子途径抑制物(tissue factor pathway inhibitor, TFPI)分泌受阻,而TFPI失衡可导致促凝表型转化<sup>[28]</sup>。TLR9激动剂(如CpG)激活树突状细胞分泌白细胞介素(interleukins, IL)-6,通过糖蛋白130受体亚基触发信号转导,显著上调Cat X的表达及酶活性。使用抑制剂LMT-28阻断糖蛋白130信号可显著抑制Cat X的上调,进一步证实了IL-6在TLR9调控Cat X过程中的必要性<sup>[29]</sup>。

赖氨酸特异性N-甲基转移酶2A(lysine methyltransferase 2A, KMT2A)是调控组蛋白H3第4位赖氨酸残基甲基化(histone H3 lysine 4 methylation,

H3K4me)的核心表观遗传修饰酶。这种表观遗传修饰在转录激活、基因组稳定性维持、染色质动态重塑以及细胞分化等生物学进程中发挥关键调控作用。值得注意的是,KMT2A基因位点(位于11q23)频繁发生染色体易位/重排,是急性髓系白血病和急性淋巴细胞白血病等血液系统恶性肿瘤中一种特征性的分子病理学改变<sup>[30-32]</sup>。在HCT116细胞模型中,敲除KMT2A会导致Cat X mRNA水平及蛋白丰度急剧下降,使其成为下调最显著的靶基因之一<sup>[33]</sup>。这一发现从表观遗传学角度确立了KMT2A对Cat X的直接调控关系。

Mizrachi等<sup>[34]</sup>的最新研究表明,氧化应激触发三角褐指藻和莱茵衣藻中Cat X转录上调,进而介导程序性死亡;缺失Cat X的突变株对过氧化氢及溴化氰等氧化应激源表现出显著抗性,证实了其在促死亡功能中的核心地位;此外,Cat X在真核生物中高度保守,且在自然水华衰亡事件前表达激增,揭示了其在环境压力响应中协调群体水平死亡-存活平衡的生态作用。

综上所述,TLR9和KMT2A-H3K4me两条核心通路分别从炎症信号转导和表观遗传调控层面深刻影响Cat X的表达和活性。深入解析这些复杂的调控网络,不仅有助于阐明相关炎症与肿瘤的发病机制,也为开发以Cat X为核心靶点的新型干预策略提供了坚实的理论依据。

### 3 Cat X在疾病中的表达

#### 3.1 自身免疫性疾病

多发性硬化症(multiple sclerosis, MS)是一种以中枢神经系统(central nervous system, CNS)慢性、炎性、脱髓鞘性与神经退行性病变为主要特征的自身免疫性疾病。Huynh等<sup>[35]</sup>比较了健康大脑和MS患者大脑非病变区域的全基因组DNA甲基化差异,发现MS患者脑部非病变区域的Cat X基因座呈现显著的低甲基化状态,进而导致该区域Cat X表达水平升高。鉴于Cat X并不广泛表达,而仅限于免疫细胞,主要包括单核细胞、巨噬细胞、小胶质细胞和树突状细胞,推测Cat X与神经炎症的发生发展密切相关<sup>[36,37]</sup>。Allan等<sup>[38]</sup>使用实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)小鼠揭示了Cat X通过激活NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal

protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体,促进IL-1 $\beta$ 的产生,进而导致小鼠在EAE期间出现更严重的神经炎症。

Wu等<sup>[39]</sup>在基因水平上讨论了Cat X和1型糖尿病(type 1 diabetes, T1D)之间的关系,在该研究中总共纳入了11个单核苷酸多态性作为工具变量,其中,位于Cat X基因编码区的*rs1135945*可能导致氨基酸发生变化,从而影响Cat X蛋白的结构和功能,并可能对抗原呈递和T细胞活化产生不利影响,促进自身免疫反应并增加对T1D的易感性。此外,位于Cat X基因启动子区域的*rs116920068*可能会改变基因转录活性,影响Cat X表达水平。与此相反,在溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)中,Cat X表达下调<sup>[40]</sup>。Gordon等<sup>[41]</sup>对健康人和UC患者的结肠进行检测发现,UC患者的Cat X基因表达显著降低,其表达降低可能与以下病理过程相关:(1)组织屏障功能受损,蛋白酶活性失衡可能导致E-钙黏蛋白等细胞黏附分子异常降解;(2)炎症微环境发生改变,使Cat X丧失对中性粒细胞过度浸润的负向调控能力。

原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis, PBC)是一种自身免疫性肝病,其特征是肝内胆管破坏和进行性胆汁淤积,导致肝硬化、黄疸和终末期肝功能衰竭,病程可能持续数十年<sup>[42,43]</sup>。Aiba等<sup>[44]</sup>通过全基因组关联研究发现,负延伸因子复合体成员C/D(negative elongation factor complex member C/D, NELFCD)/Cat X基因座(含Cat X基因)的遗传多态性(*rs13720*和*rs163800*)与日本人PBC进展至黄疸期显著相关,提示Cat X是影响PBC病理进展的一个遗传因素。随疾病进展,Cat X不仅在血清中显著升高,且在肝细胞内从溶酶体向胞质转位(溶酶体泄漏),这使其成为评估PBC终末期进展的高特异性指标。

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种系统性自身免疫性疾病,其特征是滑膜关节慢性炎症,最终导致关节软骨破坏和永久性残疾。蛋白质组学分析确立了Cat X为RA滑膜组织中特异性高表达的蛋白,其表达量显著高于骨关节炎患者<sup>[45]</sup>。这提示Cat X可作为辅助早期诊断及鉴别诊断的潜在标志物,但其在关节病变中的具体致病机制仍有待深入探究。

### 3.2 神经退行性疾病

Cat X在多种神经退行性疾病中异常表达,通过

多个途径发挥不同作用,其具体作用机制如图3所示。

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)是一种进行性神经退行性疾病,临床表现包括认知障碍和异常行为。AD的主要病理特征是 $\beta$ 淀粉样蛋白(amyloid  $\beta$ -protein, A $\beta$ )形成的淀粉样斑块和磷酸化tau形成的神经原纤维缠结<sup>[46]</sup>。通过微阵列基因表达分析发现,Cat X基因在AD小鼠大脑海马体中的表达量显著升高<sup>[47]</sup>。与健康人相比,AD患者大脑中的Cat X免疫反应性显著增强<sup>[48]</sup>。在机制层面,脂多糖或A $\beta$ 可激活小胶质细胞,诱导Cat X表达上调;随后,Cat X通过对具有神经保护作用的 $\gamma$ -烯醇化酶的C端进行水解加工,导致其活性降低或丧失,从而打破神经元存活的动态平衡<sup>[49,50]</sup>。尽管具体机制尚待挖掘,但目前的研究可以表明Cat X参与调控神经炎症、小胶质细胞活化以及神经元存活等。

亨廷顿病(Huntington disease, HD)是一种进行性的、致命的、常染色体显性遗传的神经退行性疾病,其特征是不受控制的过度运动以及认知和情感缺陷,由亨廷顿蛋白基因1号外显子中CAG重复序列的扩增引起,该扩增编码了一个延长的多聚谷氨酰胺(poly Q)重复序列<sup>[51-53]</sup>。Ratovitski等<sup>[54]</sup>的研究表明Cat X负责切割突变的亨廷顿蛋白,在Arg167位点附近产生具有神经毒性的短N末端片段,干预Cat X可减轻这种毒性。但Bhutani等<sup>[55]</sup>的研究表明Cat X能有效降解含有poly Q的肽段及不溶性聚集体,其功能缺失反而会加剧突变亨廷顿蛋白聚集和细胞毒性,暗示Cat X在HD发展进程中能保护细胞,免受细胞毒性。Cat X在HD病理过程中扮演双重角色,使其成为HD治疗中一个极具挑战性且富有前景的潜在靶点。

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种神经退行性疾病,其特征是黑质致密部多巴胺能神经元进行性丢失。 $\alpha$ -突触核蛋白积累和异常蛋白质降解在疾病进展过程中扮演重要角色<sup>[56]</sup>,多项研究表明在此过程中,蛋白酶,特别是Cat起关键作用<sup>[57-60]</sup>。Pišlar等<sup>[60]</sup>发现,在6-羟基多巴胺(6-OHDA)诱导的PD模型中,Cat X的mRNA及蛋白质表达显著上调,促进多巴胺能神经元进行性丢失,因此可将Cat X作为PD干预治疗的潜在靶点。

肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种成人发病的神经肌肉疾病,其特征是上

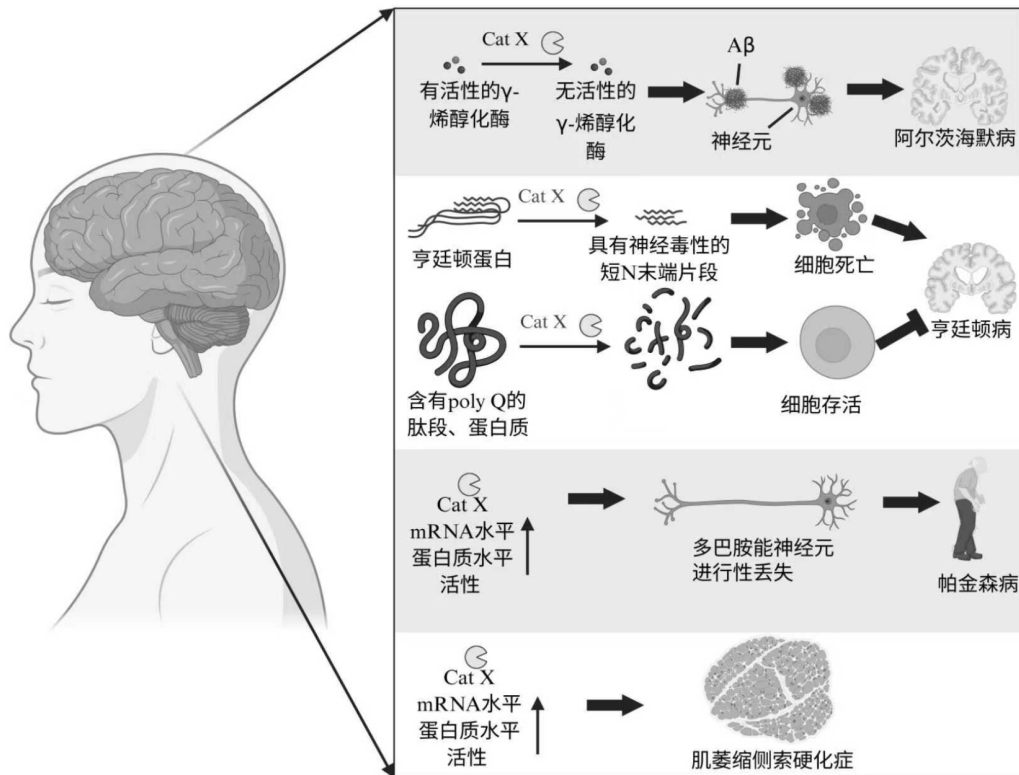


图3 Cat X与神经退行性疾病

Figure 3 Cat X and neurodegenerative diseases

下运动神经元选择性变性、进行性肌肉萎缩和偏瘫，部分病例是由Cu/Zn-超氧化物歧化酶1(Cu/Zn-superoxide dismutase 1, SOD1)编码基因突变引起的<sup>[61,62]</sup>。在ALS小鼠脊髓中, Cat X蛋白表达和酶活性升高<sup>[63]</sup>。在G86R SOD1转基因ALS小鼠模型中, 脊髓及骨骼肌中Cat X的表达与酶活性在瘫痪期显著升高<sup>[64]</sup>。但是, Cat X在ALS发病过程中的确切作用尚未阐明, 具体机制仍有待探究。

### 3.3 癌症

Cat X在Cat家族中具有独特的结构生物学特性, 它包含一个RGD基序, 使其能够与整合素相互作用来促进细胞黏附<sup>[3,65]</sup>。整合素是一类跨膜蛋白质, 调节细胞增殖、黏附、迁移和存活。在恶性肿瘤演进过程中, 肿瘤细胞常利用整合素介导的异常信号转导, 参与癌症进展的各个阶段, 包括肿瘤发生、肿瘤细胞增殖和侵袭、循环肿瘤细胞存活、转移前微环境构建、免疫抑制和远端定植<sup>[66]</sup>。此外, Cat X-整合素相互作用也存在于不同的免疫过程中, 包括树突状细胞成熟和淋巴细胞增殖和侵袭等<sup>[21,67,68]</sup>。因此, Cat X在癌症发生发展过程中发挥重要作用。Cat X在多种癌症中的作用机制如

图4所示。

Cat X通过RGD基序与胰腺神经内分泌肿瘤细胞表面的整合素 $\beta 1$ 和 $\beta 3$ 亚基结合, 随后激活下游的黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)-肉瘤病毒蛋白(sarcoma, Src)激酶信号通路, 促进癌细胞增殖、存活和迁移<sup>[69]</sup>。

KMT2A在结直肠癌组织中过表达且与癌症分期呈正相关, Cat X被证明是KMT2A的重要下游基因。进一步的研究表明, 转录因子 p53 可募集 KMT2A 至 Cat X 启动子区, 通过催化组蛋白H3第4位赖氨酸三甲基化(histone H3 lysine 4 trimethylation, H3K4me3)增强其转录活性, 进而诱导上皮-间质转化, 驱动肿瘤侵袭和转移<sup>[33]</sup>。而在非小细胞肺癌中, Cat X则主要通过其结构特性发挥促癌效应。Cat X通过其RGD基序与整合素 $\beta 3$ 结合, 激活下游FAK/Src/Paxillin信号通路; 该通路调控细胞黏附、骨架重组和运动相关基因表达, 是肺癌细胞迁移的关键驱动力, 这使得Cat X成为潜在的肺癌治疗靶点<sup>[70]</sup>。

临床样本分析发现, 与非肿瘤肝组织相比, 43.7%的肝癌患者肿瘤组织中Cat X 基因表达显著上调, Cat X通过诱导上皮-间质转化和激活基质金

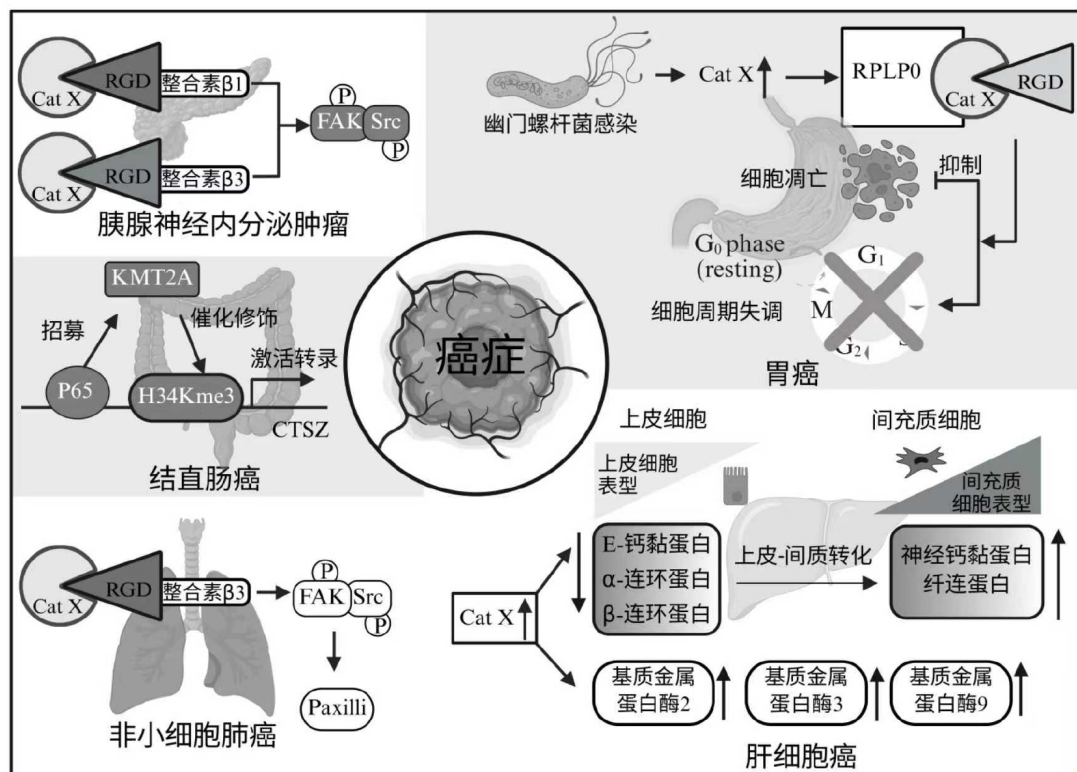


图4 Cat X与癌症

Figure 4 Cat X and cancer

属蛋白酶2/3/9,显著增强肝癌细胞的迁移和侵袭能力,驱动肿瘤转移。Cat X mRNA高表达患者5年生存率和3年生存率显著降低,提示了其作为预后因子的潜力<sup>[71]</sup>。

在胃癌中,Cat X的mRNA表达量是正常黏膜的3~12倍。在部分肠型胃癌中,Cat X在肿瘤-宿主界面的基底侧细胞质中富集,提示其在局部侵袭过程中发挥作用。Cat X的基因表达受幽门螺杆菌毒力因子和炎症因子调控,是连接慢性炎症与胃癌进展的关键分子,其在胃炎向胃癌发展的早期阶段即出现上调,显示出其作为幽门螺杆菌相关胃癌分子标志物的潜力<sup>[72]</sup>。2015年,研究人员首次在胃癌细胞和组织中证实核糖体蛋白侧柄亚基P0(ribosomal protein lateral stalk subunit P0,RPLP0)与Cat X存在物理结合。敲低Cat X基因导致N87胃癌细胞G<sub>1</sub>期阻滞,并在48 h后显著诱导细胞凋亡,双敲除(RPLP0+Cat X)会协同增强凋亡效应。抑制二者相互作用可协同诱导肠型胃癌细胞凋亡,为幽门螺杆菌相关胃癌提供了新的干预治疗策略<sup>[73]</sup>。

胶质母细胞瘤(glioblastoma,GBM)是成人最常见和最致命的原发性脑肿瘤<sup>[74]</sup>。与正常脑组织相

比,Cat X在GBM组织中的表达和活性显著上调,其主要定位于肿瘤组织中的巨噬细胞和小胶质细胞。在GBM组织中,Cat X同样通过剪切 $\gamma$ -烯醇化酶的C末端来消除其神经营养活性。理论上抑制Cat X会提升具有促存活作用的完整态 $\gamma$ -烯醇化酶的水平,进而有利于GBM细胞生长;但实验结果显示,Cat X抑制剂实际上显著降低了GBM细胞的活力以及增殖和侵袭能力。这一现象暗示,在复杂的GBM微环境中,Cat X可能通过 $\gamma$ -烯醇化酶之外的途径发挥更为关键的促肿瘤效应,其在GBM进展中展现出独特的双重调控特征<sup>[75]</sup>。

在透明细胞肾细胞癌中,Cat X则与免疫微环境重塑密切相关。研究分析表明,Cat X启动子区的低甲基化与其高表达显著相关,且与B细胞、巨噬细胞及树突状细胞等多种免疫细胞的浸润水平呈正相关。此外,Cat X高表达常伴随广泛的耐药性,提示其可作为透明细胞肾细胞癌诊断、预后及疗效评价的综合生物标志物<sup>[76]</sup>。

研究发现,与健康对照相比,乳腺癌患者外周血中Cat X基因显著低甲基化,这种低甲基化可能导致Cat X基因异常表达,进而促进肿瘤微环境重塑和

癌症发展。因此, Cat X具有作为早期检测标志物的潜力<sup>[77]</sup>。有趣的是,在辅助前列腺癌诊断时,血液中Cat X mRNA的低表达展现出极高的特异性,可作为前列腺特异性抗原的有效补充,有助于提高临床活检决策的准确性,减少不必要的穿刺伤害<sup>[78]</sup>。

### 3.4 其他疾病

矽肺病是一种进行性且不可逆的呼吸系统疾病,由暴露于可吸入结晶二氧化硅引起。结晶二氧化硅导致持续的炎症、组织损伤和纤维化,最终导致呼吸衰竭和死亡<sup>[79]</sup>。二氧化硅被肺泡巨噬细胞吞噬后,导致溶酶体破裂,释放Cat X。分泌到胞外的Cat X通过其RGD结构域与细胞表面的整合素 $\alpha 5$ 结合,触发下游信号,增强NLRP3炎症小体的活化,促进IL-1 $\beta$ 产生,驱动肺部炎症和纤维化<sup>[80]</sup>。这一研究的临床意义在于通过Cat X-整合素信号通路而非依赖其蛋白酶活性调控炎症的机制,为开发非蛋白酶抑制剂类药物(如阻断RGD结构域)提供了新思路。

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI) 伴随严重的神经炎症与退行性变,常导致运动及感觉功能永久性丧失<sup>[81]</sup>。在急性SCI阶段,大鼠及患者血清中神经元特异性烯醇化酶(neuron specific enolase, NSE)水平显著升高,预示严重的神经损伤<sup>[82-85]</sup>。在此阶段, Cat X切割膜结合NSE和非神经元烯醇酶的C端,通过消除同工酶的神经营养活性来损害烯醇酶活性<sup>[19,50]</sup>。Cat X切割NSE的C末端后,阻断其激活磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B和丝裂原活化蛋白激酶/胞外信号调节激酶信号通路的能力,导致神经元分化、轴突再生及生长相关蛋白表达受阻<sup>[83,86]</sup>。研究发现,烯醇化酶抑制剂ENOblock能有效抑制Cat X对NSE的灭活,在临床前模型中展现出神经存活改善与轴突保护的潜力<sup>[87]</sup>。

肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)的特征是进行性小肺动脉重塑,导致阻力血管系统性丧失,血管横截面积减小,肺动脉血压升高,最终导致右心衰甚至死亡<sup>[88]</sup>。全表观基因组关联研究发现,在PAH患者的血液DNA甲基化谱中,位于Cat X基因上游约2 kb的CpG位点(*cg04917472*)显著超甲基化,且这种超甲基化在PAH患者中普遍存在。该位点位于Cat X转录起始位点附近,其超甲基化可能导致基因表达被抑制。Cat X的mRNA水平在PAH患者血液中降低,但是,与健康对照相比,

PAH患者血浆中Cat X水平升高。在PAH患者肺组织中(尤其是血管丛样病变区), Cat X在内皮细胞和巨噬细胞中高表达。在人肺动脉内皮细胞(human pulmonary artery endothelial cells, hPAEC)中敲低Cat X导致细胞凋亡显著增加<sup>[89]</sup>,这表明Cat X表达下调可能促进内皮细胞凋亡。此外, Cat X被认为是过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator activated-receptors  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )的下游调控基因,而PPAR $\gamma$ 的激动剂已被证明可以缓解PAH,这进一步提示Cat X可能在PAH发生发展中参与血管重塑<sup>[90,91]</sup>。

缺血性脑卒中是由于大脑局部供血障碍导致脑组织缺血、缺氧性坏死,并引发神经功能缺损的一类脑血管疾病,占中国全部脑卒中患者的70%左右<sup>[92]</sup>,其复杂的病理生理机制主要包括炎症反应、氧化应激、酸中毒、兴奋性毒性等<sup>[93-96]</sup>。Tseveleki等<sup>[97]</sup>进行的转录组学分析发现, Cat X基因的表达在AD、MS以及缺血性脑卒中三种疾病中均发生显著变化。但Cat X在缺血性脑卒中病理进程中的具体功能及调控机制仍未阐明。结合Cat X在免疫细胞中的特异性分布及其在炎症反应中的调控潜力,推测其极可能深度参与缺血性脑卒中后的级联免疫反应。

### 3.5 Cat X敲除动物模型在疾病研究中的应用

在EAE模型中, Cat X缺陷小鼠临床评分显著降低,脊髓中炎性细胞浸润减少,脱髓鞘病变减轻,同时血清中IL-1 $\beta$ 水平下降,而IL-1 $\beta$ 水平与神经炎症严重程度呈正相关。Cat X可能通过其RGD结构域与整合素结合,激活炎症小体,或直接参与IL-1 $\beta$ 前体切割<sup>[38]</sup>。

在RT2小鼠胰腺神经内分泌肿瘤模型中, Cat X基因敲除显著抑制多个关键肿瘤发展进程。(1)抑制肿瘤起始和生长:血管生成减少,胰岛内肿瘤数量下降,累积肿瘤体积减小,同时总体生存率提高;(2)抑制侵袭和转移:微侵袭和侵袭性癌比例显著降低,肿瘤多停留在低级别包裹性阶段;(3)细胞微环境改变:肿瘤相关巨噬细胞浸润减少,提示 Cat X 是巨噬细胞向肿瘤组织迁移及募集的关键驱动因子<sup>[69]</sup>。

在二氧化硅诱导的矽肺病模型中, Cat X<sup>-/-</sup>小鼠肺部的宏观及微观炎症程度均远低于野生型,表现为炎症灶减少及综合病理评分显著下降。在体外实验中,经二氧化硅刺激后, Cat X<sup>-/-</sup>抗原呈递细胞胞内

活性半胱天冬蛋白酶-1和成熟IL-1 $\beta$ 水平下降,IL-1 $\beta$ 分泌减少,表明Cat X可通过非蛋白酶依赖的信号通路调控NLRP3炎症小体激活<sup>[80]</sup>。

在幽门螺杆菌感染的胃黏膜中,野生型小鼠Cat X蛋白水平显著上调,主要表达于巨噬细胞、上皮细胞及深部腺体,与促炎因子同步升高。感染50周后,Cat X<sup>-/-</sup>小鼠的痉挛性多肽表达及化生严重程度显著高于野生型小鼠,并伴随肠型酸性黏蛋白腺体形成。研究发现,Cat X缺陷会导致胃上皮细胞增殖失控及分化程序紊乱,同时诱发巨噬细胞持续性浸润。这提示,Cat X在慢性炎症微环境中可能在调节免疫应答及维持上皮稳态中发挥关键作用<sup>[98]</sup>。

## 4 Cat X抑制剂的研究

### 4.1 Cat X抑制剂发展概况

鉴于Cat X在多种病理进程中的显著上调及其关键的调控作用,开发具有高特异性与优良药理活性的Cat X小分子抑制剂已成为当前研究热点。然而,相较于研究已较为深入的Cat B或Cat L等半胱氨酸组织蛋白酶,针对Cat X的特异性抑制剂研发仍面临较大挑战,相关候选化合物的报道也相对有限。目前已报道的Cat X抑制剂及其分子结构分类如图5所示。

2006年,Obermajer等<sup>[99]</sup>发现GEPWGERG基序在Cat X活性位点裂隙附近形成一个环,基于此发现

研发的2F12单克隆抗体能特异性结合该基序,通过空间位阻效应阻止底物进入酶活性中心。蛋白质印迹及酶联免疫吸附分析证实,2F12仅特异性识别成熟态Cat X,而与同家族的Cat B、L、H、S及C均无交叉反应<sup>[37]</sup>。这种高度的表位特异性为后续开发高选择性靶向工具奠定了基础。

2007年,Sadaghiani等<sup>[100]</sup>对半胱氨酸蛋白酶环氧琥珀酰基抑制剂进行了体内效能和选择性的设计、合成和评价,并设计出了对Cat X具有一定程度特异性的不可逆抑制剂AMS36。体外实验显示,AMS36对Cat X的抑制活性极强,同时对Cat B、H、C的抑制较弱。体内实验显示,在RIP1-Tag2胰腺癌小鼠模型中,口服AMS36能显著抑制肿瘤组织的Cat X活性,对Cat B的抑制较弱,未抑制Cat H/C,与体外结果一致;在正常的肝脏和肾脏组织中,Cat X也是敏感的靶点。然而,AMS36水溶性较差,需借助高浓度DMSO助溶,由此产生的给药毒性限制了其向临床转化的可能。

2017年,Fonović等<sup>[101]</sup>通过化合物库筛选获得基于三唑的Cat X可逆抑制剂化合物22(又被称为Z9),其对Cat X具有高度选择性,对Cat B(外肽酶活性)的抑制常数比对Cat X高125倍,对Cat L、H、S等的抑制常数差异更大,且能在细胞裂解物中特异性抑制Cat X。研究还发现,Z9对PC-3前列腺癌细胞或PC-12嗜铬细胞瘤细胞无细胞毒性,可抑制PC-3

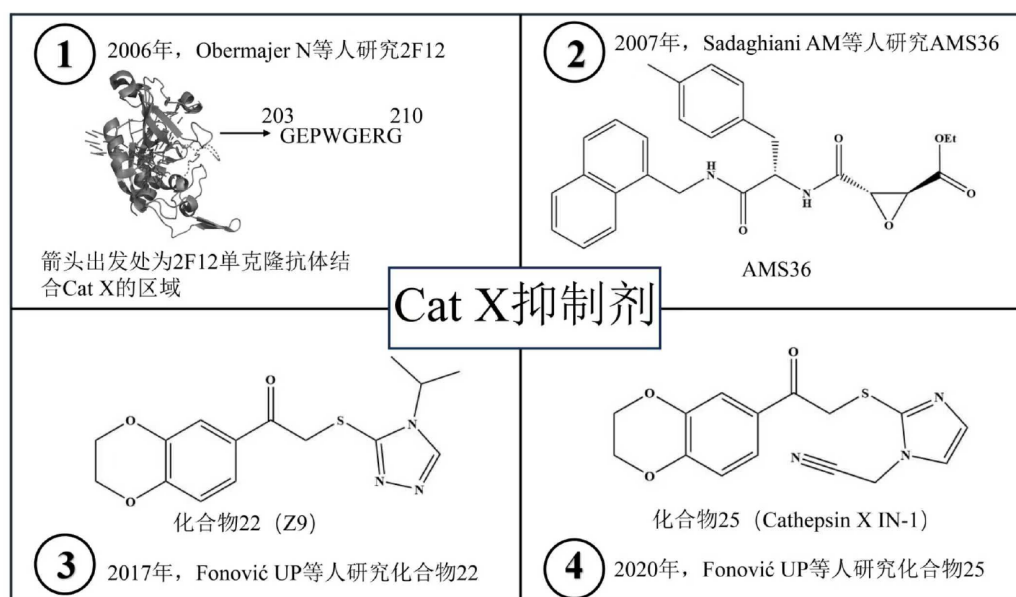


图5 Cat X抑制剂的研究

Figure 5 Research on Cat X inhibitors

细胞迁移,促进PC-12神经突生长。与不可逆抑制剂AMS36相比,Z9在细胞迁移和神经突生长中的作用效果更强;而且通过稀释实验证实,Z9与Cat X的结合可逆,降低了脱靶风险。这一抑制剂的潜在应用价值巨大:一方面可以抗肿瘤,通过抑制Cat X依赖性迁移和侵袭可能阻断肿瘤转移;另一方面可以发挥神经保护作用,促进神经突生长,有望用于神经退行性疾病的治疗。

2020年,Fonović等<sup>[102]</sup>针对其在2017年获得的Cat X抑制剂Z9设计了一系列变体。实验表明,具有氰亚甲基残基的化合物25是Cat X的非时间依赖性抑制剂,对Cat B、L、S抑制效力较低,验证了其具有良好的选择性。化合物25在低浓度( $\leq 20 \mu\text{mol/L}$ )时即可在保证细胞活力的同时显著抑制细胞迁移能力。化合物25(Cathepsin X IN-1)作为高选择性Cat X抑制剂,是为数不多的商业可获得的化合物,目前在临床前动物实验阶段,成为全球首批具备市场转化前景的Cat X靶向疗法候选物。

#### 4.2 Cat X抑制剂在疾病中的应用

在PD机制研究中,6-OHDA常被用于模拟多巴胺能神经元的毒性损伤与生化病理特征。在PC12和SH-SY5Y细胞中,6-OHDA显著增加Cat X的蛋白表达量和酶活性。AMS36预处理可显著减轻6-OHDA诱导的细胞毒性,降低乳酸脱氢酶释放和细胞凋亡率,表明其直接参与6-OHDA诱导的毒性机制。更为重要的是,6-OHDA还能下调酪氨酸羟化酶(多巴胺合成的限速酶)表达,而AMS36可逆转这一效应,提示AMS36可能参与维持多巴胺能神经元功能。此外,AMS36抑制NF- $\kappa$ B抑制因子 $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )降解,阻止NF- $\kappa$ B核转位,阻断其介导的炎症反应和凋亡信号通路。以上研究证实,AMS36具有维持多巴胺能神经元功能的潜力<sup>[103]</sup>。

小胶质细胞介导的慢性炎症是多种中枢神经系统疾病(如AD、PD)的共同病理基础。Cat X抑制剂AMS36可通过多靶点作用减轻此类神经炎症:(1)抑制小胶质细胞过度活化,减少促炎介质和神经毒性物质的分泌;(2)阻断Cat X对神经营养因子 $\gamma$ -烯醇酶的切割失活,维持其神经保护功能;(3)降低半胱天冬蛋白酶-3活性,抑制小胶质细胞和神经元凋亡。综上,Cat X是神经炎症性疾病潜在的治疗靶点<sup>[49,104]</sup>。

在肿瘤治疗领域,Cat X抑制剂展现了从调节微

环境到直接抑癌的多重潜力。不可逆抑制剂AMS36和可逆抑制剂Z9都能显著抑制GBM细胞增殖,并降低肿瘤相关巨噬细胞及小胶质细胞的活力。尽管抑制剂对GBM干细胞的增殖无显著影响,但可抑制其侵袭能力<sup>[75]</sup>。在乳腺癌研究中,Mitrović等<sup>[105]</sup>在体外实验中证实Z9显著降低肿瘤细胞MCF-10A neoT的迁移能力和侵袭能力;在体内实验中,Z9治疗显著降低肿瘤细胞增殖标志物Ki67的表达,同时促进凋亡标志物半胱天冬蛋白酶-3的表达,表明其通过抑制增殖和促进凋亡抑制肿瘤生长。此外,Z9与Cat B抑制剂联用表现出显著的协同潜力,为优化抗肿瘤联合给药方案及调控免疫微环境提供了新方向。

## 5 结论和展望

Cat X作为多功能分子枢纽,已突破传统溶酶体蛋白酶的局限,展现出多维度的调控作用:通过非酶依赖的RGD-整合素互作和酶活性依赖的底物切割调控病理进程;通过表观遗传修饰和免疫微环境重编程驱动疾病发展;在神经系统中扮演双重角色,切割突变亨廷顿蛋白产生毒性片段却降解poly Q聚集物。研究已证实Cat X在多种疾病中具备临床价值:血清Cat X水平可预测原发性胆汁性胆管炎终末期进展,血液Cat X基因低甲基化助力乳腺癌早期诊断;选择性抑制剂通过阻断肿瘤增殖、侵袭及协同治疗,为神经退行性疾病和癌症提供精准干预策略。这种跨越酶活性与信号转导、贯穿基础机制与临床转化的多功能性,标志着Cat X已成为连接细胞稳态与病理重构的核心。

当前综述重点总结了Cat X在生理与病理过程中的多维作用:其组织特异性表达模式、独特的羧肽酶活性及结构功能关系共同构成了其调控基础。值得注意的是,尽管该蛋白酶的研究深度尚不及Cat B/L/S等经典成员,但日益增多的证据揭示,Cat X在神经退行性疾病以及恶性肿瘤的发生发展中发挥关键驱动作用,提示靶向干预Cat X具有重要临床转化潜力。

目前,亟待解决的核心问题包括:(1)当前对Cat X上游调控因子的了解仍然较少,研究多聚焦于检测技术而忽视调控机制解析;(2)中枢神经系统与外周循环中的Cat X活性是否存在动态平衡尚需证实,若该平衡机制成立,则有望通过调控外周Cat X活性

间接干预中枢系统疾病(如神经退行性疾病),从而突破血脑屏障限制。

未来研究应聚焦于两大价值维度:一方面,作为某些疾病的生物标志物,Cat X可为精准诊断提供新路径;另一方面,作为治疗靶点,特异性抑制策略的研发将推动对Cat X依赖性疾病的有效防治。破译Cat X的精确调控机制不仅能够提升对组织蛋白酶家族功能多样性的基础认知,更将确立其在转化医学中的独特治疗价值。

## 参考文献

- [1] Ninjoor V, Taylor SL, Tappel AL. Purification and characterization of rat liver lysosomal cathepsin B2. *Biochim Biophys Acta*, 1974, 370: 308–21.
- [2] Dolenc I, Štefe I, Turk D, et al. Human cathepsin X/Z is a biologically active homodimer. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2021, 1869: 140567.
- [3] Nägler DK, Ménard R. Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett*, 1998, 434: 135–9.
- [4] Guncar G, Klemencic I, Turk B, et al. Crystal structure of cathepsin X: a flip-flop of the ring of His23 allows carboxy-monopeptidase and carboxy-dipeptidase activity of the protease. *Structure*, 2000, 8: 305–13.
- [5] Santamaría I, Velasco G, Pendás AM, et al. Cathepsin Z, a novel human cysteine proteinase with a short propeptide domain and a unique chromosomal location. *J Biol Chem*, 1998, 273: 16816–23.
- [6] Nägler DK, Zhang R, Tam W, et al. Human cathepsin X: a cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry*, 1999, 38: 12648–54.
- [7] Deussing J, von Olshausen I, Peters C. Murine and human cathepsin Z: cDNA-cloning, characterization of the genes and chromosomal localization. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1491: 93–106.
- [8] Schechter I, Berger A. On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun*, 1967, 27: 157–62.
- [9] Storer AC, Ménard R. Recent insights into cysteine protease specificity: lessons for drug design. *Perspect Drug Discovery Des*, 1996, 6: 33–46.
- [10] Cygler M, Mort JS. Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie*, 1997, 79: 645–52.
- [11] Musil D, Zucic D, Turk D, et al. The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J*, 1991, 10: 2321–30.
- [12] Guncar G, Podobnik M, Pungercar J, et al. Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function. *Structure*, 1998, 6: 51–61.
- [13] McGrath ME. The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 1999, 28: 181–204.
- [14] Turk D, Guncar G, Podobnik M, et al. Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem*, 1998, 379: 137–47.
- [15] Scotto di Carlo F, Russo S, Muiyas F, et al. Profilin 1 deficiency drives mitotic defects and reduces genome stability. *Commun Biol*, 2023, 6: 9.
- [16] Witke W. The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol*, 2004, 14: 461–9.
- [17] Pečar Fonović U, Jevnikar Z, Rojnik M, et al. Profilin 1 as a target for cathepsin X activity in tumor cells. *PLoS One*, 2013, 8: e53918.
- [18] Horvat S, Fonović UP, Mitrović A, et al. The  $\alpha$ - to  $\gamma$ -enolase switch: the role and regulation of  $\gamma$ -enolase during oligodendrocyte differentiation. *Int J Biol Macromol*, 2025, 301: 140464.
- [19] Obermajer N, Doljak B, Jamnik P, et al. Cathepsin X cleaves the C-terminal dipeptide of  $\alpha$ - and  $\gamma$ -enolase and impairs survival and neuritogenesis of neuronal cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41: 1685–96.
- [20] Harjunpää H, Somermäki R, Saldo Rubio G, et al. Loss of  $\beta$ 2-integrin function results in metabolic reprogramming of dendritic cells, leading to increased dendritic cell functionality and anti-tumor responses. *Oncoimmunology*, 2024, 13: 2369373.
- [21] Obermajer N, Svajger U, Bogyo M, et al. Maturation of dendritic cells depends on proteolytic cleavage by cathepsin X. *J Leukoc Biol*, 2008, 84: 1306–15.
- [22] Murad HAS, Rafeeq MM, Alqurashi TMA. Role and implications of the CXCL12/CXCR4/CXCR7 axis in atherosclerosis: still a debate. *Ann Med*, 2021, 53: 1598–612.
- [23] Staudt ND, Aicher WK, Kalbacher H, et al. Cathepsin X is secreted by human osteoblasts, digests CXCL-12 and impairs adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells to osteoblasts. *Haematologica*, 2010, 95: 1452–60.
- [24] Couture R, Harrisson M, Vianna RM, et al. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur J Pharmacol*, 2001, 429: 161–76.

- [25] Dickeson SK, Kumar S, Sun MF, et al. A mechanism for hereditary angioedema caused by a methionine-379-to-lysine substitution in kininogens. *Blood*, 2024, 143: 641–50.
- [26] Xiong W, Guo L, Zhang Y, et al. Identification of novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from walnut (*Juglans sigillata* Dode) protein hydrolysates and their vascular endothelial protective properties: *in silico* and *in vitro* studies. *Curr Res Food Sci*, 2025, 11: 101135.
- [27] Nägler DK, Kraus S, Feierler J, et al. A cysteine-type carboxypeptidase, cathepsin X, generates peptide receptor agonists. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10: 134–9.
- [28] El Kebir D, Damlaj A, Makhezer N, et al. Toll-like receptor 9 signaling regulates tissue factor and tissue factor pathway inhibitor expression in human endothelial cells and coagulation in mice. *Crit Care Med*, 2015, 43: e179–89.
- [29] Xu B, Anderson BM, Mintern JD, et al. TLR9-dependent dendritic cell maturation promotes IL-6-mediated upregulation of cathepsin X. *Immunol Cell Biol*, 2024, 102: 787–800.
- [30] Milne TA. Chromatin and aberrant enhancer activity in KMT2A rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Curr Opin Genet Dev*, 2024, 86: 102191.
- [31] Ogino J, Dou Y. Histone methyltransferase KMT2A: developmental regulation to oncogenic transformation. *J Biol Chem*, 2024, 300: 107791.
- [32] van Weelderen RE, Harrison CJ, Klein K, et al. Optimized cytogenetic risk-group stratification of KMT2A-rearranged pediatric acute myeloid leukemia. *Blood Adv*, 2024, 8: 3200–13.
- [33] Fang Y, Zhang D, Hu T, et al. KMT2A histone methyltransferase contributes to colorectal cancer development by promoting cathepsin Z transcriptional activation. *Cancer Med*, 2019, 8: 3544–52.
- [34] Mizrachi A, Sadeh M, Ben-Dor S, et al. Cathepsin X is a conserved cell death protein involved in algal response to environmental stress. *Curr Biol*, 2025, 35: 2240–55.e6.
- [35] Huynh JL, Garg P, Thin TH, et al. Epigenome-wide differences in pathology-free regions of multiple sclerosis-affected brains. *Nat Neurosci*, 2014, 17: 121–30.
- [36] Pišlar A, Kos J. Cysteine cathepsins in neurological disorders. *Mol Neurobiol*, 2014, 49: 1017–30.
- [37] Kos J, Sekimik A, Premzl A, et al. Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res*, 2005, 306: 103–13.
- [38] Allan ERO, Campden RI, Ewanchuk BW, et al. A role for cathepsin Z in neuroinflammation provides mechanistic support for an epigenetic risk factor in multiple sclerosis. *J Neuroinflammation*, 2017, 14: 103.
- [39] Wu Y, Li Q, Lou Y, et al. Cysteine cathepsins and autoimmune diseases: a bidirectional mendelian randomization. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103: e40268.
- [40] Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis. *Lancet*, 2012, 380: 1606–19.
- [41] Gordon MH, Anowai A, Young D, et al. N-Terminomics/TAILS profiling of proteases and their substrates in ulcerative colitis. *ACS Chem Biol*, 2019, 14: 2471–83.
- [42] Younossi ZM, Bernstein D, Shiffman ML, et al. Diagnosis and management of primary biliary cholangitis. *Am J Gastroenterol*, 2019, 114: 48–63.
- [43] Hohenester S, Oude-Elferink RP, Beuers U. Primary biliary cirrhosis. *Semin Immunopathol*, 2009, 31: 283–307.
- [44] Aiba Y, Harada K, Ito M, et al. Increased expression and altered localization of cathepsin Z are associated with progression to jaundice stage in primary biliary cholangitis. *Sci Rep*, 2018, 8: 11808.
- [45] Hayashi J, Kihara M, Kato H, et al. A proteomic profile of synovioyte lesions microdissected from formalin-fixed paraffin-embedded synovial tissues of rheumatoid arthritis. *Clin Proteomics*, 2015, 12: 20.
- [46] Roda AR, Serra-Mir G, Montoliu-Gaya L, et al. Amyloid- $\beta$  peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*, 2022, 17: 1666–74.
- [47] Hou Y, Chu X, Park JH, et al. Urolithin A improves Alzheimer's disease cognition and restores mitophagy and lysosomal functions. *Alzheimers Dement*, 2024, 20: 4212–33.
- [48] Thygesen C, Ilkjær L, Kempf SJ, et al. Diverse protein profiles in CNS myeloid cells and CNS tissue from lipopolysaccharide- and vehicle-injected APP<sub>SWE</sub>/PS1 <sub>$\Delta$ E9</sub> transgenic mice implicate cathepsin Z in Alzheimer's disease. *Front Cell Neurosci*, 2018, 12: 397.
- [49] Pišlar A, Božić B, Zidar N, et al. Inhibition of cathepsin X reduces the strength of microglial-mediated neuroinflammation. *Neuropharmacology*, 2017, 114: 88–100.
- [50] Hafner A, Glavan G, Obermajer N, et al. Neuroprotective role of  $\gamma$ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. *Aging*

- Cell, 2013, 12: 604–14.
- [51] Finkbeiner S. Huntington's disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3: a007476.
- [52] Pandey M, Rajamma U. Huntington's disease: the coming of age. *J Genet*, 2018, 97: 649–64.
- [53] MacDonald ME, Ambrose CM, Duyao MP, et al. A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. The Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell*, 1993, 72: 971–83.
- [54] Ratovitski T, Chighladze E, Waldron E, et al. Cysteine proteases bleomycin hydrolase and cathepsin Z mediate N-terminal proteolysis and toxicity of mutant huntingtin. *J Biol Chem*, 2011, 286: 12578–89.
- [55] Bhutani N, Piccirillo R, Hourez R, et al. Cathepsins L and Z are critical in degrading polyglutamine-containing proteins within lysosomes. *J Biol Chem*, 2012, 287: 17471–82.
- [56] Rai M, Curley M, Coleman Z, et al. Contribution of proteases to the hallmarks of aging and to age-related neurodegeneration. *Aging Cell*, 2022, 21: e13603.
- [57] Yelamanchili SV, Chaudhuri AD, Flynn CT, et al. Upregulation of cathepsin D in the caudate nucleus of primates with experimental parkinsonism. *Mol Neurodegener*, 2011, 6: 52.
- [58] Milanowski LM, Hou X, Bredenberg JM, et al. Cathepsin B p.Gly284Val variant in Parkinson's disease pathogenesis. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 7086.
- [59] McGlinchey RP, Lacy SM, Huffer KE, et al. C-terminal  $\alpha$ -synuclein truncations are linked to cysteine cathepsin activity in Parkinson's disease. *J Biol Chem*, 2019, 294: 9973–84.
- [60] Pišlar A, Tratnjek L, Glavan G, et al. Upregulation of cysteine protease cathepsin X in the 6-hydroxydopamine model of Parkinson's disease. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 412.
- [61] Feldman EL, Goutman SA, Petri S, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet*, 2022, 400: 1363–80.
- [62] Goutman SA, Hardiman O, Al-Chalabi A, et al. Recent advances in the diagnosis and prognosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet Neurol*, 2022, 21: 480–93.
- [63] Wendt W, Zhu XR, Lübbert H, et al. Differential expression of cathepsin X in aging and pathological central nervous system of mice. *Exp Neurol*, 2007, 204: 525–40.
- [64] Gonzalez de Aguilar JL, Niederhauser-Wiederkehr C, Halter B, et al. Gene profiling of skeletal muscle in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Physiol Genomics*, 2008, 32: 207–18.
- [65] Bellis SL. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 2011, 32: 4205–10.
- [66] Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18: 533–48.
- [67] Jevnikar Z, Obermajer N, Bogyo M, et al. The role of cathepsin X in the migration and invasiveness of T lymphocytes. *J Cell Sci*, 2008, 121: 2652–61.
- [68] Obermajer N, Repnik U, Jevnikar Z, et al. Cysteine protease cathepsin X modulates immune response via activation of  $\beta$ 2 integrins. *Immunology*, 2008, 124: 76–88.
- [69] Akkari L, Gocheva V, Kester JC, et al. Distinct functions of macrophage-derived and cancer cell-derived cathepsin Z combine to promote tumor malignancy via interactions with the extracellular matrix. *Genes Dev*, 2014, 28: 2134–50.
- [70] Li W, Yu X, Ma X, et al. Deguelin attenuates non-small cell lung cancer cell metastasis through inhibiting the CtsZ/FAK signaling pathway. *Cell Signal*, 2018, 50: 131–41.
- [71] Wang J, Chen L, Li Y, et al. Overexpression of cathepsin Z contributes to tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *PLoS One*, 2011, 6: e24967.
- [72] Krueger S, Kalinski T, Hundertmark T, et al. Upregulation of cathepsin X in *Helicobacter pylori* gastritis and gastric cancer. *J Pathol*, 2005, 207: 32–42.
- [73] Teller A, Jechorek D, Hartig R, et al. Dysregulation of apoptotic signaling pathways by interaction of RPLP0 and cathepsin X/Z in gastric cancer. *Pathol Res Pract*, 2015, 211: 62–70.
- [74] LeBlanc VG, Trinh DL, Aslanpour S, et al. Single-cell landscapes of primary glioblastomas and matched explants and cell lines show variable retention of inter-and intratumor heterogeneity. *Cancer Cell*, 2022, 40: 379–92.
- [75] Majc B, Habič A, Novak M, et al. Upregulation of cathepsin X in glioblastoma: interplay with  $\gamma$ -enolase and the effects of selective cathepsin X inhibitors. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 1784.
- [76] Zhang F, Liang J, Lu Y, et al. Macrophage-specific cathepsin as a marker correlated with prognosis and tumor microenvironmental characteristics of clear cell renal cell carcinoma. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 6275–92.
- [77] Li J, Zhou X, Li L, et al. The association between CTSZ methylation in peripheral blood and breast

- cancer in Chinese women. *Front Oncol*, 2023, 13: 1148635
- [78] Batista AAS, Franco BM, Perez MM, et al. Decreased levels of cathepsin Z mRNA expressed by immune blood cells: diagnostic and prognostic implications in prostate cancer. *Braz J Med Biol Res*, 2021, 54: e11439.
- [79] Leung CC, Yu IT, Chen W. Silicosis. *Lancet*, 2012, 379: 2008–18.
- [80] Campden RI, Warren AL, Greene CJ, et al. Extracellular cathepsin Z signals through the  $\alpha_5$  integrin and augments NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem*, 2022, 298: 101459.
- [81] McDonald JW, Sadowsky C. Spinal-cord injury. *Lancet*, 2002, 359: 417–25.
- [82] Shimizu A, Suzuki F, Kato K. Characterization of  $\alpha\alpha$ ,  $\beta\beta$ ,  $\gamma\gamma$  and  $\alpha\gamma$  human enolase isozymes, and preparation of hybrid enolases ( $\alpha\gamma$ ,  $\beta\gamma$  and  $\alpha\beta$ ) from homodimeric forms. *Biochim Biophys Acta*, 1983, 748: 278–84.
- [83] Haque A, Polcyn R, Matzelle D, et al. New insights into the role of neuron-specific enolase in neuroinflammation, neurodegeneration, and neuroprotection. *Brain Sci*, 2018, 8: 33.
- [84] Polcyn R, Capone M, Matzelle D, et al. Enolase inhibition alters metabolic hormones and inflammatory factors to promote neuroprotection in spinal cord injury. *Neurochem Int*, 2020, 139: 104788.
- [85] Du W, Li H, Sun J, et al. The prognostic value of serum neuron specific enolase (NSE) and S100B level in patients of acute spinal cord injury. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 4510–5.
- [86] Hafner A, Obermajer N, Kos J.  $\gamma$ -Enolase C-terminal peptide promotes cell survival and neurite outgrowth by activation of the PI3K/Akt and MAPK/ERK signalling pathways. *Biochem J*, 2012, 443: 439–50.
- [87] McCoy HM, Polcyn R, Banik NL, et al. Regulation of enolase activation to promote neural protection and regeneration in spinal cord injury. *Neural Regen Res*, 2023, 18: 1457–62.
- [88] Boucly A, Gerges C, Savale L, et al. Pulmonary arterial hypertension. *Presse Med*, 2023, 52: 104168.
- [89] Ulrich A, Wu Y, Draisma H, et al. Blood DNA methylation profiling identifies cathepsin Z dysregulation in pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun*, 2024, 15: 330.
- [90] Shen Y, Su Y, Silva FJ, et al. Shared PPAR $\alpha/\gamma$  target genes regulate brown adipocyte thermogenic function. *Cell Rep*, 2020, 30: 3079–91.e5.
- [91] Lai YJ, Yeh YH, Huang YL, et al. Empagliflozin attenuates pulmonary arterial remodeling through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2024, 7: 2725–38.
- [92] Wang W, Jiang B, Sun H, et al. Prevalence, incidence, and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults. *Circulation*, 2017, 135: 759–71.
- [93] DeLong JH, Ohashi SN, O'Connor KC, et al. Inflammatory responses after ischemic stroke. *Semin Immunopathol*, 2022, 44: 625–48.
- [94] Sun MS, Jin H, Sun X, et al. Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: An obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3804979.
- [95] M Tóth O, Menyhart Á, Frank R, et al. Tissue acidosis associated with ischemic stroke to guide neuroprotective drug delivery. *Biology (Basel)*, 2020, 9: 460.
- [96] Shen Z, Xiang M, Chen C, et al. Glutamate excitotoxicity: potential therapeutic target for ischemic stroke. *Biomed Pharmacother*, 2022, 151: 113125.
- [97] Tseveleki V, Rubio R, Vamvakas SS, et al. Comparative gene expression analysis in mouse models for multiple sclerosis, Alzheimer's disease and stroke for identifying commonly regulated and disease-specific gene changes. *Genomics*, 2010, 96: 82–91.
- [98] Krueger S, Bernhardt A, Kalinski T, et al. Induction of premalignant host responses by cathepsin X/Z-deficiency in *Helicobacter pylori*-infected mice. *PLoS One*, 2013, 8: e70242.
- [99] Obermajer N, Premzl A, Zavasnik Bergant T, et al. Carboxypeptidase cathepsin X mediates  $\beta_2$ -integrin-dependent adhesion of differentiated U-937 cells. *Exp Cell Res*, 2006, 312: 2515–27.
- [100] Sadaghiani AM, Verhelst SH, Gocheva V, et al. Design, synthesis, and evaluation of *in vivo* potency and selectivity of epoxysuccinyl-based inhibitors of papain-family cysteine proteases. *Chem Biol*, 2007, 14: 499–511.
- [101] Fonović UP, Mitrović A, Knez D, et al. Identification and characterization of the novel reversible and selective cathepsin X inhibitors. *Sci Rep*, 2017, 7: 11459.
- [102] Fonović UP, Knez D, Hrast M, et al. Structure-activity relationships of triazole-benzodioxine inhibitors of cathepsin X. *Eur J Med Chem*, 2020, 193: 112218.
- [103] Pišlar AH, Zidar N, Kikelj D, et al. Cathepsin X promotes 6-hydroxydopamine-induced apoptosis of PC12 and SH-SY5Y cells. *Neuropharmacology*, 2014, 82: 121–31.

- 
- [104] Pišlar A, Nedeljković BB, Perić M, et al. Cysteine peptidase cathepsin X as a therapeutic target for simultaneous TLR3/4-mediated microglia activation. *Mol Neurobiol*, 2022, 59: 2258–76.
- [105] Mitrović A, Završnik J, Mikhaylov G, et al. Evaluation of novel cathepsin-X inhibitors *in vitro* and *in vivo* and their ability to improve cathepsin-B-directed antitumor therapy. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79: 34.