

泛素羧基末端水解酶-1 在神经退行性疾病中的作用及临床应用

杨 依 赵 丽

摘 要 泛素羧基末端水解酶 1 (UCH-L1), 又称蛋白基因产物 9.5 (PGP9.5), 主要通过泛素-蛋白酶体系统 (UPS) 和自噬-溶酶体途径 (ALP) 间接影响体内蛋白的降解代谢, 参与包括阿尔兹海默病、帕金森病在内的多种神经退行性疾病的发病和调控机制。本文主要概述了 UCH-L1 结构和功能、UCH-L1 及其突变型在阿尔兹海默病、帕金森病中的作用、机制以及临床应用意义。

关键词 泛素羧基末端水解酶 1 (UCH-L1) 神经退行性疾病 阿尔兹海默症 帕金森症

中图分类号 R3

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.04.006

神经退行性疾病是由神经元和(或)髓鞘的丧失所致, 病情随着时间的推移而恶化, 最终出现功能障碍。常见的神经退行性疾病有: 阿尔兹海默病 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease, PD) 等。目前这些疾病的发病机制尚不清楚, 主要有兴奋毒性学说、细胞凋亡学说、氧化应激学说等, 这些学说均与泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitin proteasome system, UPS) 密切相关。泛素羧基末端水解酶 1 (ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1, UCH-L1) 作为 UPS 中的重要组成蛋白, 在神经退行性疾病的发生、发展中发挥重要的作用。

一、UCH-L1 与 UPS

UPS 是真核细胞内蛋白降解的重要途径, 泛素 (Ub) 是 UPS 核心, 是由 76 个氨基酸组成的高度保守的小分子蛋白。UPS 有两类重要的酶: 泛素化酶和去泛素化酶 (deubiquitinating enzymes, DUB), UCH 是去泛素化酶中的一个重要家族。UCH 有 3 种异构体: UCH-L1、UCH-L2、UCH-L3。UCH-L1 主要分布在大脑神经元中, 可以达到脑内总蛋白量的 2%。用组织原位杂交的方法发现其多分布在黑质致密部, 或者存在于周围神经系统如三叉神经节等处。此外, UCH-L1 也存在于卵母细胞及精母细胞。

UCH-L1 主要有 3 种功能: ①水解多聚泛素链,

使泛素单体可以重复使用; ②以二聚体形式作为一种不依赖 ATP 的泛素连接酶催化 k-63 形式泛素链的形成, 从而竞争性抑制 k-48 形式泛素链与异常蛋白的结合, 使异常蛋白不能被蛋白酶体识别、降解; ③稳定泛素分子单体, 并可以通过调节泛素单体水平起到对 UPS 的调控。

二、UCH-L1 与阿尔兹海默病

阿尔兹海默病 (AD) 是一种中枢神经系统变性病, 为老年期痴呆最常见的一种类型, 表现为进行性认知功能障碍和行为损害。临床及组织病理学研究表明, AD 主要有两个病理特征: 因病理性 β 淀粉样蛋白 (amyloid β , A β) 沉积而生成的老年斑; 因微管相关蛋白 tau 蛋白过度磷酸化而形成的神经原纤维缠结 (neurofibrillary tangles, NFTs)。UCH-L1 已被证明在突触可塑性、学习记忆的调节中发挥重要作用, 与 AD 的发生密切相关^[1]。

1. UCH-L1 参与 AD 的可能发病机制: 相关研究通过质谱分析的方法发现 AD 患者脑中可溶性 UCH-L1 与颗粒性 UCH-L1 的比例发生明显改变^[2]。可溶性 UCH-L1 是功能的主要执行者, 它的改变可能参与 AD 发病。与野生型小鼠比较, 作为 AD 模型的 APP/PS1 双转基因小鼠海马区可溶性 UCH-L1 含量下降约 30%, 且海马区长时程增强效应 (long-term potentiation, LTP) 受到抑制, 出现认知障碍; 而转染 UCH-L1 后的小鼠能够恢复 UCH-L1 活性且 LTP 恢复到正常水平^[3]。

(1) UCH-L1 与 A β : UCH-L1 可影响 A β 含量和神经元的活动。缺血性脑损伤处理后的小鼠脑中 UCH-L1 含量与活性均会降低, 导致 BACE1 水平上

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (7192016); 首都医科大学长学制导师基金资助项目 (7NZDS2019008); 首都医科大学学生科研创新项目 (XSKY2019008)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学基础医学院 2017 级五年制临床医学 5 班 (杨依), 神经生物学系 (赵丽)

通讯作者: 赵丽, 博士, 副教授, 电子信箱: zhaoli@ccmu.edu.cn

调,BACE1 作为 β 分泌酶可以促进 APP 向 $A\beta$ 方向的分解,从而导致 $A\beta$ 聚集。而小鼠经过注射外源 UCH-L1 蛋白后大脑中 BACE1 含量下降,神经元的存活率得到提高^[4]。同时,小鼠原代神经元经此处理后由 $A\beta$ 引起的脑源性神经营养因子(BDNF)逆向运输减少的现象得到明显改善,使神经元的生存率和可塑性得到提高^[5]。

(2)UCH-L1 与 NFTs:研究发现敲除 UCH-L1 基因的小鼠出现类似 AD 症状。该小鼠脑中可溶性 UCH-L1 含量下降,而脑神经元中神经元纤维缠结(NFTs)数量增多,提示 UCH-L1 可能参与神经原纤维缠结的形成^[6]。具体体现为:一方面,UCH-L1 的下调可促进 tau 蛋白高磷酸化而形成 NFTs。LDN 是 UCH-L1 抑制剂,经 LDN 处理后的小鼠 N2a 细胞中微管结合 tau 蛋白含量下降,说明 UCH-L1 影响 tau 蛋白的微管结合能力,而未与微管结合的 tau 蛋白容易聚集。利用高磷酸化 tau(Ser202、Thr205)特异性抗体 AT8 进行免疫荧光与硫黄素染色发现 tau 蛋白高磷酸化并异常聚集,且都以 LDN 剂量依赖性增加^[7]。另一方面,UCH-L1 的下调还可减少异常聚集 tau 蛋白的降解。在 tau 相关神经系统疾病中,UPS 由于超出其所能承受的负荷或功能受损而无法有效降解蛋白质。此时组蛋白去乙酰化酶(HDAC6)可与泛素化蛋白形成复合物,运输到微管组织中心形成聚集体,减小异常聚集蛋白对细胞产生毒性作用的范围,并通过自噬-溶酶体途径(autophagy-lysosome pathway,ALP)将其降解。转染 tau441 后的 HEK293 细胞可过量表达 tau 蛋白,此后,与单独应用蛋白酶体抑制剂 MG132 比较,同时应用 MG132 和 LDN 处理的细胞中 HDAC6 与 tau 蛋白的结合下降,不能形成标志性的核周球状聚集体结构,而此时 UCH-L1 寡聚体水平显著降低,k-63 形式的泛素链水平降低。表明在 tau 蛋白过量表达、异常聚集的情况下,UCH-L1 寡聚体的下调会减少 k-63 形式泛素链的产生,抑制 HDAC6 的激活,从而影响 HDAC6 与 tau 蛋白的结合,使得小分子泛素化的 tau 蛋白在细胞质中分散,影响聚集体的形成,阻止异常聚集的蛋白质经自噬-溶酶体途径降解^[8]。

2. UCH-L1 多态性对 AD 的保护:UCH-L1 多态性对 AD 的保护作用一直存在争议。UCH-L1 基因的 3 号外显子上第 54 位胞嘧啶突变为腺嘌呤(C54A)可使得相应位点出现 S18Y 多态性。2006 年,Xue 等对中国汉族散发 AD 患者和健康人的基因

分析结果表明 A 等位基因和 AA 基因型可能对女性散发 AD 有保护作用。然而,2010 年 Zetterberg 等对瑞典 AD 患者和健康人群的调查统计则发现 S18Y 多态性未对 AD 产生保护机制。此外,有研究通过 Meta 分析发现,UCH-L1 基因的 5 种常见的单核苷酸多态性(SNPs),即 rs11556271、rs3756002、rs3775256、rs4861387、rs28581187 与日本 AD 患者发病无相关性,不能作为评估 AD 发病的风险因素^[9]。

三、UCH-L1 与帕金森病

帕金森病(PD)是仅次于阿尔兹海默病的第 2 大神经退行性疾病,PD 可分为家族性 PD(FPD)和散发型 PD(SPD)。中脑黑质多巴胺神经元的变性以及细胞蛋白内含物——路易小体的出现是帕金森症的两个病理学标志, α -突触核蛋白是路易小体的重要组成成分。特异性敲除其多巴胺神经元 UCH-L1 基因后的黑腹果蝇出现神经退行性改变,导致其脑内多巴胺含量下降,从而出现运动功能障碍^[10]。UCH-L1 对 PD 的作用主要通过引发 UPS 异常而实现,而某些突变型 UCH-L1 的致病作用还与自噬-溶酶体途径有关。

1. UCH-L1 调节 α -突触核蛋白的细胞间传递:尽管诸如 α -突触核蛋白等蛋白质包涵体在细胞间传递的详细机制尚未得到充分了解,但预计这种传递可以解释许多神经退行性疾病的发病机制^[11]。近年来,脂筏(lipid raft)被认为可通过影响神经元中特异性细胞内含物的转运、传播从而与神经退行性疾病的发生、发展密切相关。研究发现,UCH-L1 与脂筏功能密切相关:在 UCH-L1 含量下降的原代神经元中,脂筏依赖性内吞作用增强,内源性 α -突触核蛋白的含量没有明显变化但其在细胞间的传递显著增加。考虑到 UCH-L1 的去泛素化作用及其与脂筏的联系,UCH-L1 可能是通过调节脂筏蛋白的泛素化和去泛素化状态而调节脂筏依赖性的内吞作用^[12]。

2. UCH-L1 突变与 PD

(1)UCH-L1^{193M}突变与 PD:1998 年 Leroy 等在德国一个 PD 家系中发现 UCH-L1 基因突变(C277G),这一突变导致 UCH-L1 编码的第 93 位异亮氨酸(I)变为甲硫氨酸(M),水解酶活性降低约 50%。2004 年 Ardley 等研究发现,相比于对照组,转染 UCH-L1^{193M}突变质粒后的 COS-7 细胞中呈聚集状态的内含物含量更高。UCH-L1^{193M}产生的毒性作用可能参与 PD 的发病。与野生型小鼠比较,转染 UCH-L1^{193M}基因的 gad 小鼠在行为学上表现出自发

活动的减少,而在神经病理学改变上表现出黑质多巴胺神经元减少,一部分黑质神经元中出现致密核心小泡和嗜银颗粒,这些表现都与 PD 症状极为相似。免疫印迹显示中脑不溶性 UCH - L1 比率大大提高,提示 I93M 突变引发的毒性作用可能导致了多巴胺神经元的退行性改变,从而参与了 PD 的发病^[13]。UCH - L1^{I93M}活性的下降也是引发 PD 重要因素。DUB 活性下降的 UCH - L1^{I93M}可通过影响自噬 - 溶酶体途径而抑制 α - 突触核蛋白的降解。用 mRFP - GFP - LC3 双荧光自噬指示体系追踪 HeLa 细胞系的 LC3 水平和自噬流发现 UCH - L1^{I93M}突变细胞中 GFP/RFP 比率没有明显改变,但 LC3 斑点轻微增加且细胞中 p62 含量明显积累,表明自噬体和溶酶体的融合过程未受影响,但自噬体的形成受到一定程度的抑制,自噬功能出现严重障碍。此时, α - 突触核蛋白以及异常蛋白的清除必然受到影响,过多的有毒产物聚集形成路易小体,导致 PD 的发病^[14]。

(2)UCH - L1^{S18Y}多态性与 PD:S18Y 多态性被发现在 PD 中起到神经保护作用:UCH - L1^{S18Y}基因所转录的 UCH - L1 蛋白二聚化趋势降低,具有水解酶活性高而连接酶活性低的特点。此时底物 α - 突触核蛋白更容易被蛋白酶体识别,经 UPS 降解而减少 PD 的发病^[15]。S18Y 多态性的保护作用在小鼠身上已经得到证明。经腺病毒转染 UCH - L1^{S18Y}基因的小鼠可明显减少因 MPTP 诱导引起的黑质神经元损失,同时纹状体多巴胺含量的下降幅度也降低^[16]。然而,S18Y 多态性对于人类的保护作用却一直受到质疑。Liu 等^[17]将 22 项遍及各大洲的研究进行 Meta 分析后发现,UCH - L1 多态性与人群患 PD 风险中度相关;而对亚洲、欧洲和美国人群 UCH - L1 多态性进行的亚组分析未显示任何与 PD 风险有关的种族依赖性;对年龄进行亚组分析时,仍未观察到明显关联;但剔除其中 3 项低质量研究后的 Meta 分析显示,UCH - L1 等位基因 A 与 PD 风险显著相关;同时,在隐性模型(CC vs CA + AA)中也显示出 S18Y 多态性与 PD 风险密切相关^[17]。

四、脑脊液 UCH - L1 水平对于神经退行性病变的诊断

近期的研究发现,脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)中 UCH - L1 水平对于 PD、AD 的诊断起重要作用。与正常人群比较,AD 患者 CSF 中 UCH - L1 水平明显升高。因此,CSF 中 UCH - L1 可作为 AD 的诊断依据和分子标志物^[18]。相反,与正常人群比较,

PD 患者 CSF 中 UCH - L1 含量明显下降,也可用于 PD 的诊断。此外,研究发现 PD 患者 CSF 中 UCH - L1 浓度与发病年龄亦呈正相关,且用于突触核蛋白病(包括 PD 和 MSA)患者病情程度分级的 Hoehn and Yahr(H&Y)量表得分与 CSF 中 UCH - L1 水平呈正相关,提示 CSF 中 UCH - L1 水平可能作为突触核蛋白病的阶段分层指标^[19]。

五、展 望

近年来临床研究发现,脑脊液中 UCH - L1 水平在 AD、PD 患者与健康人群中存在显著差异,UCH - L1 有望对临床确诊、疾病程度分级工作起到辅助诊断作用。然而尽管已有众多研究探讨了 UCH - L1 的结构和功能,发现 UCH - L1 对神经退行性疾病有着重要的作用,但是 UCH - L1 在 AD、PD 发生、发展中的作用机制尚不清楚。

UCH - L1 对神经退行性疾病中的特殊内含物或标志物都有重要影响,其中可溶性 UCH - L1 的作用尤为重要。脂筏模型是近年来神经退行性疾病中的讨论热点,UCH - L1 被发现可以通过脂筏蛋白调节 α - 突触核蛋白的细胞间传递,且与目前一些已知蛋白对于脂筏的影响机制明显不同,但这一具体作用机制还未被发现。关于 UCH - L1^{S18Y}多态性、UCH - L1^{I93M}突变对神经退行性疾病的保护或促进作用仍然存在分歧,不同的研究调查显示出不同的结果,因此还需要更多数据统计来源和人群分类方法以得出最终结论。

综上所述,鉴于 UCH - L1 对于神经退行性疾病的重要影响,进一步深入研究 UCH - L1 在神经系统中的功能和作用底物对明确神经退行性疾病的发病机制有十分重要的指导意义,同时也可作为神经退行性疾病的早期预防、早期诊断、早期治疗以及新药的开发提供新的思路和靶点。同时也应当认识到,不仅要探讨 UCH - L1 的下游通路以发现其在神经退行性疾病中的作用,更要追根溯源,探索导致 UCH - L1 发生改变的原因,如导致 UCH - L1 不同形式之间转换以及导致 UCH - L1 发生不同翻译后修饰的影响因素,从根本上降低神经退行性疾病的发生概率。

参考文献

- 1 Guo YY, Lu Y1, Zheng Y, *et al.* Ubiquitin C - terminal hydrolase L1 (UCH - L1) promotes hippocampus - dependent memory via its deubiquitinating effect on TrkB [J]. J Neurosci, 2017, 37(25): 5978 - 5995
- 2 Chen J, Huang RY, Turko IV. Mass spectrometry assessment of ubiquitin carboxyl - terminal hydrolase L1 partitioning between soluble and

- particulate brain homogenate fractions [J]. *Anal Chem*, 2013, 85 (12): 6011–6017
- 3 Gong B, Cao ZX, Zheng P, *et al.* Ubiquitin hydrolase Uch – L1 rescues beta – amyloid – induced decreases in synaptic function and contextual memory [J]. *Cell*, 2006, 126(4): 775–788
- 4 Michela G, Debora M, Valeria V, *et al.* The decrease of Uch – L1 activity Is a common mechanism responsible for A β 42 accumulation in Alzheimer’s and vascular disease [J]. *Front Aging Neurosci*, 2017, 9: 320
- 5 Wayne WP, Anthony JC, Brittany LA, *et al.* β – Amyloid (A β) oligomers impair brain – derived neurotrophic factor retrograde trafficking by down – regulating ubiquitin C – terminal hydrolase, UCH – L1 [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(23): 16937–16948
- 6 Nobuto S, Yumiko M, Hiroyuki T, *et al.* Lack of genetic association of the UCHL1 gene with Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease with dementia [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2012, 33 (4): 250–254
- 7 Xie M, Han Y, Yu Q, *et al.* UCH – L1 inhibition decreases the microtubule – binding function of tau protein [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 49(2): 353–363
- 8 Yu Q, Zhang H, Li Y, *et al.* UCH – L1 inhibition suppresses tau aggregates formation during proteasomal impairment [J]. *Mol Neurobiol*, 2018, 55(5): 3812–3821
- 9 Shibata N, Motoi Y, Tomiyama H, *et al.* Lack of genetic association of the UCHL1 gene with Alzheimer’s disease and Parkinson’s disease with dementia [J]. *Dement Geriatr Cognit Disord*, 2012, 33 (4): 250–254
- 10 Tran HH, Dang SNA, Nguyen TT, *et al.* Drosophila ubiquitin C – terminal hydrolase knockdown model of Parkinson’s disease [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4468
- 11 Stopschinski BE, Diamond MI. The prion model for progression and diversity of neurodegenerative diseases [J]. *Lancet Neurol*, 2017, 16: 323–332
- 12 Kang SJ, Kim JS, Park SM. Ubiquitin C – terminal hydrolase L1 regulates lipid raft – dependent endocytosis [J]. *Exp Neurobiol*, 2018, 27(5): 377–386
- 13 Setsuie R, Wang YL, Mochizuki H, *et al.* Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson’s disease – associated UCH – L1 I93M mutant [J]. *Neurochem Int*, 2007, 50(1): 119–129
- 14 Yan C, Huo H, Yang C, *et al.* Ubiquitin C – terminal hydrolase L1 regulates autophagy by inhibiting autophagosome formation through its deubiquitinating enzyme activity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 497(2): 726–733
- 15 Lee YC, Hsu SD. Familial mutations and post – translational modifications of UCH – L1 in Parkinson’s disease and neurodegenerative disorders [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2017, 18(7): 733–745
- 16 Xilouri M, Kyratzi E, Pitychoutis PM, *et al.* Selective neuroprotective effects of the S18Y polymorphic variant of UCH – L1 in the dopaminergic system [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(4): 874–889
- 17 Liu Y, Chen YY, Liu H, *et al.* Association between ubiquitin carboxy – terminal hydrolase – L1 S18Y variant and risk of Parkinson’s disease: the impact of ethnicity and onset age [J]. *Neurol Sci*, 2015, 36(2): 179–188
- 18 Öhrfelt A, Johansson P, Wallin A, *et al.* Increased cerebrospinal fluid Levels of ubiquitin carboxyl – terminal hydrolase L1 in patients with alzheimer’s disease [J]. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra*, 2016, 6 (2): 283–294
- 19 Mondello S, Constantinescu R, Zetterberg H, *et al.* CSF α – synuclein and UCH – L1 levels in Parkinson’s disease and atypical parkinsonian disorders [J]. *Parkinsonism Relat Disord*, 2014, 20 (4): 382–387

(收稿日期:2019 – 09 – 05)

(修回日期:2019 – 09 – 28)

(上接第 15 页)

- 16 杨俊华. 星形胶质细胞来源的 ATP 促进丘脑中的突触删除 [D]. 杭州:浙江大学, 2015
- 17 Gerstner JR, Bremer QZ, Heyden WMV, *et al.* Brain fatty acid binding protein (Fabp7) is diurnally regulated in astrocytes and hippocampal granule cell precursors in adult rodent brain [J]. *PLoS One*, 2008, 3(2): e163
- 18 Gerstner JR, Perron IJ, Riedy SM, *et al.* Normal sleep requires the astrocyte brain – type fatty acid binding protein FABP7 [J]. *Sci Adv*, 2017, 3(4): e1602663
- 19 Gerstner JR, Lenz O, Vanderheyden WM, *et al.* Amyloid – β induces sleep fragmentation that is rescued by fatty acid binding proteins in drosophila [J]. *J Neurosci Res*, 2017, 95(8): 1548–1564
- 20 Poskanzer KE, Yuste R. Astrocytes regulate cortical state switching in vivo [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2016, 113(19): E2675–E2684
- 21 Nadjar A, Wigren HKM, Tremblay ME. Roles of microglial phagocytosis and inflammatory mediators in the pathophysiology of sleep disorders [J]. *Front Cell Neurosci*, 2017, 11: 250
- 22 Ingiosi AM, Opp MR, Krueger JM. Sleep and immune function: glial contributions and consequences of aging [J]. *Curr Opin Neurobiol*, 2013, 23(5): 806–811
- 23 Bellesi M, Vivo LD, Chini M, *et al.* Sleep loss promotes astrocytic phagocytosis and microglial activation in mouse cerebral cortex [J]. *J Neurosci*, 2017, 37(21): 5263–5273
- 24 Kincheski GC, Valentim IS, Clarke JR, *et al.* Chronic sleep restriction promotes brain inflammation and synapse loss, and potentiates memory impairment induced by amyloid – β oligomers in mice [J]. *Brain Behav Immun*, 2017, 64: 140–151
- 25 Manchanda S, Singh H, Kaur T, *et al.* Low – grade neuroinflammation due to chronic sleep deprivation results in anxiety and learning and memory impairments [J]. *Mol Cell Biochem*, 2018, 449 (1 – 2): 63–72
- 26 Wisor JP, Schmidt MA, Clegern WC. Evidence for neuroinflammatory and microglial changes in the cerebral response to sleep loss [J]. *Sleep*, 2011, 34(3): 261–272
- 27 Wadhwa M, Prabhakar A, Ray K, *et al.* Inhibiting the microglia activation improves the spatial memory and adult neurogenesis in rat hippocampus during 48h of sleep deprivation [J]. *J Neuroinflamm*, 2017, 14(1): 222
- 28 Shemer A, Emy D, Jung S, *et al.* Microglia plasticity during health and disease: an immunological perspective [J]. *Trends Immunol*, 2015, 36 (10): 614–624

(收稿日期:2019 – 09 – 27)

(修回日期:2019 – 10 – 11)