

JJS 激活泛素蛋白酶系统降解亨廷顿病相关的错误折叠蛋白

潘 蓉, 冼桂羽, 卿即娜*

长沙医学院口腔医学院 湖南长沙

【摘要】目的 深入探讨 JJS 抑制亨廷顿病 (HD) 相关的致病蛋白 (mHTT) 和激活泛素-蛋白酶体途径 (UPS) 系统的作用, 进一步开发 JJS 的功效。**方法** 通过构建神经退行性疾病相关的 HD 和 UPS 调控的细胞模型, 使用细胞免疫荧光、流式细胞法和免疫印迹法检测不同浓度 JJS 处理的细胞中 mHTT 的表达。**结果** JJS 激活 UPS 减少 HT22 细胞中 EGFP-mHTT74 的过表达。**结论** JJS 可以通过激活 UPS 抑制 mHTT。

【关键词】 亨廷顿病; JJS; 亨廷顿病相关致病蛋白; 泛素-蛋白酶体途径

【基金项目】 2021 年湖南省教育厅科学研究项目 (21C0892)

【收稿日期】 2023 年 7 月 29 日 **【出刊日期】** 2023 年 9 月 20 日 **【DOI】** 10.12208/j.jcmbr.20230003

JJS activates the ubiquitin protease system to degrade Huntington's disease-associated misfolded proteins

Rong Pan, Guiyu Xian, Jina Qing*

School of Stomatology, Changsha Medical College, Changsha, Hunan

【Abstract】Objective To investigate in depth the role of JJS in inhibiting Huntington's disease (HD)-associated pathogenic proteins (mHTT) and activating the ubiquitin-proteasome pathway (UPS) system, and to further develop the efficacy of JJS. **Methods** By constructing a cellular model of neurodegenerative disease-associated HD and UPS regulation, the expression of mHTT in cells treated with different concentrations of JJS was examined using cellular immunofluorescence, flow cytometry and immunoblotting. **Results** JJS activation of UPS reduced overexpression of EGFP-mHTT74 in HT22 cells. **Conclusion** JJS can inhibit mHTT by activating UPS.

【 Keywords 】 Huntington's disease; JJS; Huntington's disease-associated pathogenic protein; ubiquitin-proteasome pathway

亨廷顿病 (Huntington's disease, HD) 是一种慢性神经退行性疾病, 患者常常以认知障碍和精神异常为主要病症^[1]。该病的患者脑内普遍存在神经元数目进行性减少。该病病例在全球分布较广, 西方国家的患病率为每十万人人口中有四至十个, 在亚洲, 其发病率则是百万分之五^[2]。HD 具有遗传性, 其具遗传早现的特性^[3]。许多研究表明, 神经退行性疾病中相关致病蛋白的积累和聚集被认为是导致神经元减少的主要原因^[4]。经资料记载, 早期 HD 主要与突变亨廷顿蛋白 (mutant Huntingtin, mHTT) 激发的神经炎症相关。因此, 抑制 mHTT 的积累和聚集从而减少脑中神经元数目的丢失来治疗 HD 是一项新的举

措。据证实, 泛素-蛋白酶体途径 (ubiquitin-proteasome pathway, UPS) 介导的蛋白降解是机体调节细胞内蛋白水平与功能的一个重要机制^[5], 且越来越多的证据表明 UPS 的功能障碍是引发和加重 HD 等神经退行性疾病的关键因素。因此, 促进 UPS 介导的蛋白降解从而抑制 mHTT 的积累和聚集是重要研究途径。

中药在治疗神经退行性疾病很有优势。针对 mHTT 的积累和聚集, 至今仍无有效的治疗方法。因西药副作用大、手术治疗创伤大, 基因治疗风险大, 且无法解决病程中潜在的进行性神经病变^[6]。因此, 开发治疗 HD 的中药具有很大价值。中

共同第一作者: 潘蓉, 冼桂羽

*通讯作者: 卿即娜

药由于其含有多种化学成分, 能够针对疾病的多种途径和多个作用靶点^[7], 在治疗 HD 这样多因素、多病理靶点的复杂性疾病方面就具有独特的优势。中药在延缓慢性神经退行性疾病进程、提高西药疗效、减轻副作用、控制疾病症状、促进细胞修复与再生、保护神经元、抑制氧化应激反应, 抗兴奋性毒性等方面研究也取得了一定的进展, 这或许就是中药治疗慢性神经退行性疾病新的发展方向^[8]。因此, 基于中药在治疗 HD 等慢性神经退行性疾病的独特优势, 研发更多有效的中药成分就成为了本研究热点与新颖点。本研究通过基于质粒 YFP-CL1 构建 UPS 活性检测的 HT22 细胞模型, 从天然产物库中成功筛选出的代号为 JJS 的天然化合物可显著激活 UPS, 且进一步研究发现 JJS 可显著抑制与 HD 的相关的关键致病蛋白 mHTT 的表达。因此, 本实验拟从促进 HD 的致病蛋白 mHTT 降解的途径入手, 深入探讨 JJS 抑制 mHTT 的作用, 在进一步开发 JJS 的功效, 以及其临床应用于 HD 提供科学依据等方面均具有重要的研究意义。

1 实验方法

1.1 构建质粒转染的 HD 细胞模型

按照转染试剂盒说明书将 HD 疾病相关的致病蛋白的质粒 HD: EGFP-mHTT74 瞬时转染入 HT22 细胞构建蛋白过表达的细胞模型。

1.2 构建泛素-蛋白酶活性的检测体系

基于检测蛋白酶体的活性, 以 YFP-CL1、pmCherry-Ubiquitin 瞬时转染 HT22, 6h 后加入药物进行干预, 应用荧光共聚焦显微镜观察并拍照检测 HT22 细胞中的荧光表达; 应用流式细胞法, 检测荧光细胞的比例; Western blotting 检测 GFP 蛋白的表达。

1.3 荧光共聚焦显微镜观察并拍照检测 HD 相关的荧光表达情况

HT22 细胞药物处理结束后, 进行 DAPI 染细胞核, 荧光共聚焦显微镜下观察并拍照细胞中的荧光表达。

1.4 流式细胞仪检测 HD 相关的荧光表达情况

HT22 细胞药物处理结束后, 消化细胞并收集起来, 应用流式细胞仪的 FITC 通道检测 HT22 细胞中的含荧光的细胞比例, 应用 FlowJo 软件对数据进行定量分析。

1.5 免疫印记法 (Western blotting) 检测关键蛋白的表达水平

HT22 细胞药物处理结束后, 加入 RIPA 裂解液进行裂解, 收集总蛋白, 进行 SDS-PAGE 进行凝胶电泳, 检测 GFP 融合的目的蛋白的表达, 应用 Image J 软件对条带进行定量分析。

1.6 统计学方法

所有统计数据均来自三个或更多独立实验。数据以平均±标准差 (SD) 表示, 并通过 GraphPad Prism 5.0 统计分析软件进行分析。采用单因素方差分析, 然后进行 T 检验, 比较各组之间的统计学差异。P<0.05 被认为具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 JJS 减少 HT22 细胞中 EGFP-mHTT74 的过表达。

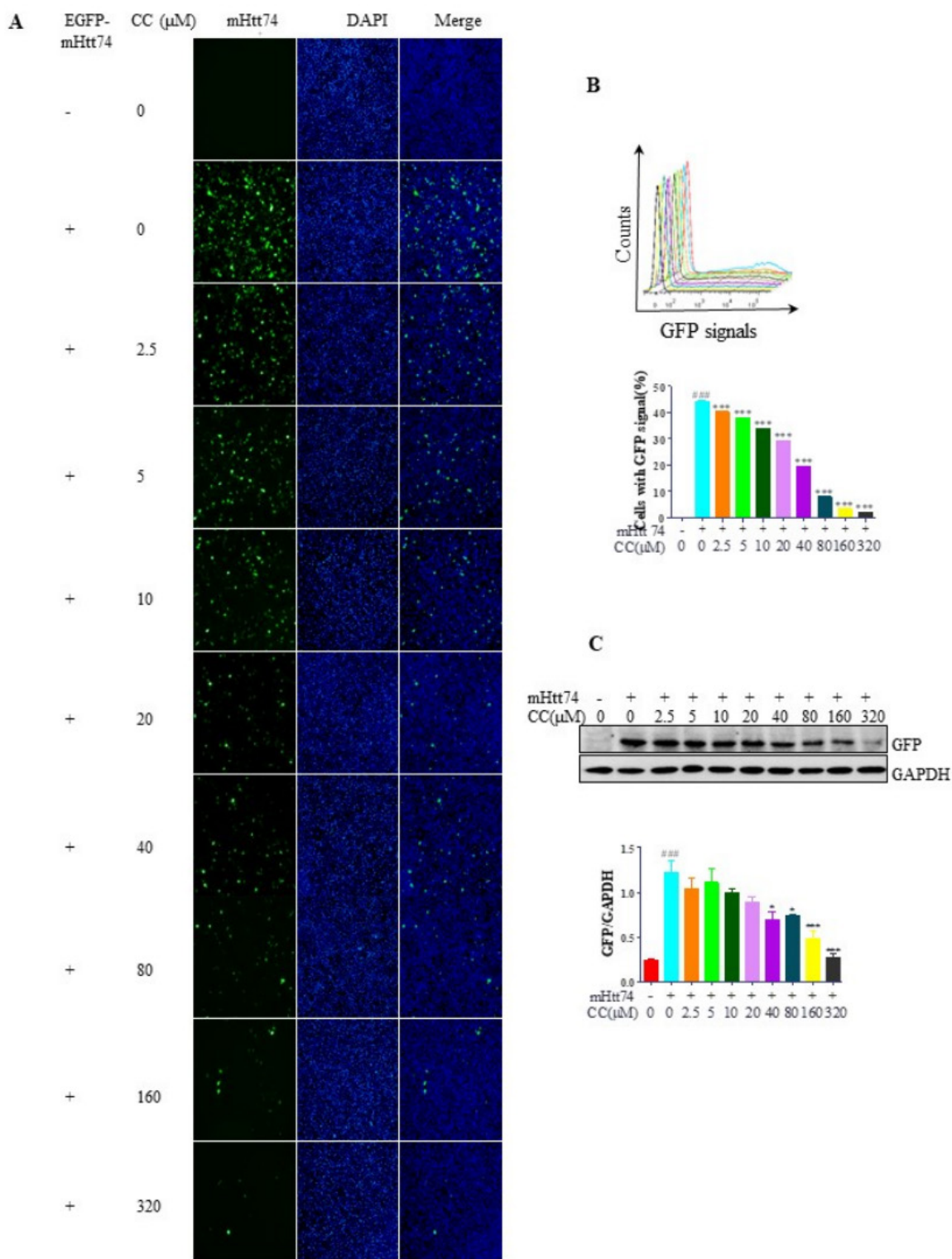
以密度为 5×10^4 /孔将 HT22 细胞接种于 24 孔板中, 分别转染 EGFP-mHTT74 于 HT22 细胞中; 6h 后, 2.5、5、10、20、40、80、160、320 μM 的 JJS 处理 HT22 细胞 24h, 设置未转染组、转染模型组与转染+JJS 组。药物处理 24-48h 完后, 应用显微镜观察 HT22 细胞中的荧光 HTT 包涵体的表达, 结果显示 HTT 包涵体的表达随着 JJS 的浓度增大而减少 (图 1A)。消化细胞, 应用流式细胞仪检测 GFP 的荧光强度, 结果显示 JJS 可显著抑制 HT22 细胞中的 GFP 的荧光表达, 说明 JJS 可以激活 HT22 的泛素化蛋白酶系统 (图 1B)。收集蛋白, 应用 western blotting 检测 GFP 蛋白的表达, 结果显示 GFP 蛋白的表达逐渐降低, 说明 JJS 可以降解 mHTT74 的作用 (图 1C)。

2.2 JJS 激活 UPS 减少 HT22 细胞中 EGFP-mHTT74 的过表达。

以密度为 2×10^5 /孔接种 HT22 细胞于 6 孔板中, 使用 HT22 细胞转染 YFP-CL1 后, 2.5、5、10、20、40、80、160、320 μM 的 JJS 干预 HT22 细胞 24h。应用荧光共聚焦显微镜检测 GFP 在 HT22 细胞中的表达, 结果显示荧光拍照检测 JJS 减少过表达 YFP-GFP-mHTT74 的 HT22 细胞的 GFP (图 2A)。收集蛋白, 应用 western blotting 检测 GFP 蛋白的表达, 结果显示 JJS 减少过表达 YFP-GFP-mHTT74 的 HT22 细胞的 GFP (图 2B)。以密度为 2×10^5 /孔接种 HT22 细胞于 6 孔板中, 转染 EGFP-mHTT74+pmCherry-C1-Ubiquitin。转染 6h 后, 以

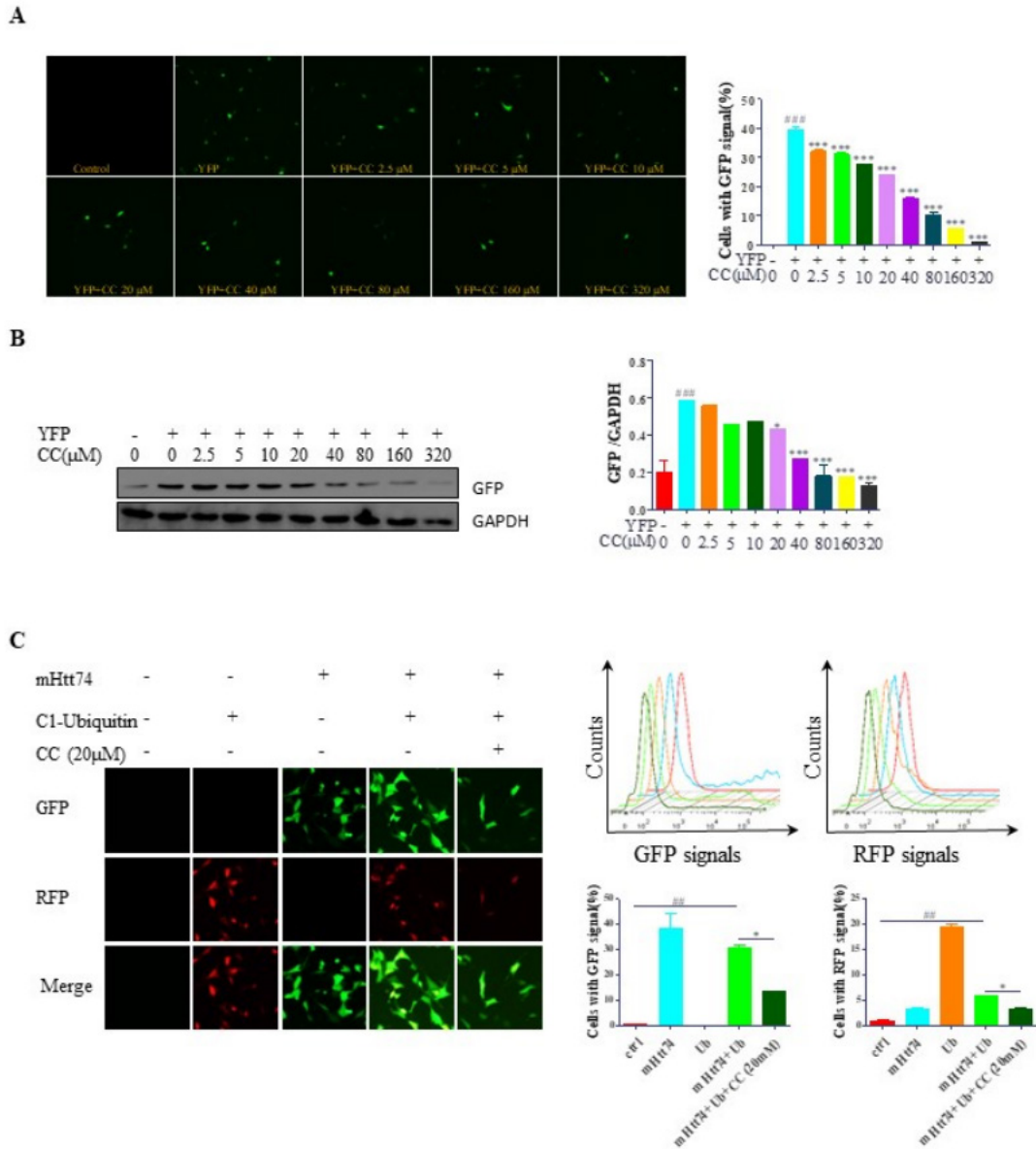
20μM 的 JJS 分别处理各组。应用免疫荧光法和流式细胞法检测, 结果显示 JJS 激活 UPS 减少过表达

EGFP-mHTT74 的 HT22 细胞的 GFP (图 2C)。



A 荧光拍照检测 JJS 减少过表达 EGFP-mHTT74 的 HT22 细胞的 GFP; B 流式细胞法检测 JJS 减少过表达 EGFP-mHTT74 的 HT22 细胞的 GFP; C Western blotting 检测 JJS 减少过表达 EGFP-mHTT74 的 HT22 细胞的 GFP ($P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$, $P^{***} < 0.001$)。

图 1 JJS 减少 HT22 细胞中 EGFP-mHTT74 的过表达



A 荧光拍照检测 JJS 减少过表达 YFP-GFP-mHTT74 的 HT22 细胞的 GFP; B Western blotting 检测 JJS 减少过表达 YFP-GFP-mHTT74 的 HT22 细胞的 GFP; C 荧光拍照和流式细胞法检测 JJS 激活 UPS 减少过表达 EGFP-mHTT74 的 HT22 细胞的 GFP ($P^* < 0.05$, $P^{**} < 0.01$, $P^{***} < 0.001$)。

图 2 JJS 激活 UPS 减少 HT22 细胞中 EGFP-mHTT74 的过表达。

3 讨论

人口老龄化正成为 21 世纪的主要人口和健康问题。一直以来, 患有老年相关神经退行性疾病诸如 HD 的人数正在迅速增加^[9]。研究表明在 HD 患者以及转基因动物的大脑神经细胞内发现了大量聚集的 mHTT, 其扰乱了神经元及胶质细胞的稳态和功能^[10]。这些聚集的错误折叠蛋白会优先影响大脑的认知功能以及机体的行为学功能^[11-15]。因此, 脑内聚集的错误折叠蛋白 mHTT 是导致 HD 发病的关键所在,

故抑制和减少该蛋白的聚集是预防和减轻 HD 疾病发病程度的重要治疗思路。JJS 是天然药物 JJ 中极为重要的免疫活性成分之一, 已有资料证明 JJ 在慢性全身性疾病的治疗中具有积极作用^[16]。基于此, 而本研究通过体外细胞实验, 结合小分子抑制剂的应用以及采用高内涵细胞成像法、荧光共聚焦成像法、流式细胞法、免疫印迹等方法, 开展探讨 JJS 激活 UPS 的作用和对相关蛋白的影响。实验发现, 从而阐明了 JJS 通过激活 UPS 降解 HD 的错误折叠蛋

白 mHTT 的作用机理。本研究为 JJS 的临床应用及临床治疗 HD 提供新的方向。

(致谢: 在本论文完成之际, 向本实验参与人员贾波老师、彭玉丹老师、曾莎老师、邱珊老师和李媛铎老师致以崇高的敬意和衷心的感谢。)

参考文献

- [1] 闫森. 亨廷顿舞蹈病神经发育障碍的研究进展[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2022, 43(05): 691-696.
- [2] 林丽山, 苏凤娟, 吴腾腾, 等. 中国南方地区亨廷顿患者不同运动分型的临床特征 [J]. 中山大学学报(医学科学版), 2021, 42(6): 944-949.
- [3] 张元, 郭晓红, 刘国荣, 等. 亨廷顿病一家系报道及相关文献回顾分析[J]. 中风与神经疾病杂志, 2022, 39(01): 78-80.
- [4] 唐一鸣, 姚逸飞, 杨中元等. 神经退行性疾病相关蛋白病理理性聚集和液液相分离研究进展[J]. 合成生物学, 2023, 4(03): 590-610.
- [5] 熊朝栋. 基于泛素-蛋白酶体系统(UPS)的新型抑制剂的设计、合成及抗肿瘤活性研究[D]. 中国科学院大学(中国科学院上海药物研究所), 2022.
- [6] 郭园园, 郑琴, 胡鹏翼等. 中药调控能量代谢治疗神经退行性疾病的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(11): 1384-1388.
- [7] 应春苗, 刘飞祥, 潘小龙等. 中药延缓神经血管单元衰老治疗神经退行性疾病的研究进展[J/OL]. 中国中药杂志: 1-12 [2023-07-26].
- [8] Law B Y K, Wu A G, Wang M J, et al. Chinese Medicine: A Hope for Neurodegenerative Diseases? [J]. J Alzheimers Dis, 2017, 60(s1): S151-S60.
- [9] Sheikh S, Safia, Haque E, et al. Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions [J]. J Neurodegener Dis, 2013, 2013(563481).
- [10] Popovic D, Vucic D, Dikic I. Ubiquitination in disease pathogenesis and treatment [J]. Nat Med, 2014, 20(11): 1242-53.
- [11] Fu Y, Sun X, Lu B. HIPK3 modulates autophagy and HTT protein levels in neuronal and mouse models of Huntington disease [J]. Autophagy, 2018, 14(1): 169-70.
- [12] Veldman M B, Yang X W. Molecular insights into cortico-striatal miscommunications in Huntington's disease [J]. Curr Opin Neurobiol, 2018, 48(79-89).
- [13] Yu M, Fu Y, Liang Y, et al. Suppression of MAPK11 or HIPK3 reduces mutant Huntingtin levels in Huntington's disease models [J]. Cell Res, 2017, 27(12): 1441-65.
- [14] Zhao T, Hong Y, Li X J, et al. Subcellular Clearance and Accumulation of Huntington Disease Protein: A Mini-Review [J]. Front Mol Neurosci, 2016, 9(27).
- [15] Zhou X, Li G, Kaplan A, et al. Small molecule modulator of protein disulfide isomerase attenuates mutant huntingtin toxicity and inhibits endoplasmic reticulum stress in a mouse model of Huntington's disease [J]. Hum Mol Genet, 2018, 27(9): 1545-55.
- [16] Liu Q, Chen Y, Shen C, et al. Chicoric acid supplementation prevents systemic inflammation-induced memory impairment and amyloidogenesis via inhibition of NF-kappaB [J]. FASEB J, 2017, 31(4): 1494-507.

版权声明: ©2023 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS