

综述

TRAF6与神经退行性疾病关系的研究进展

罗瑞昌^{1,2}, 吴昕怡^{1,2}, 俞雯雯³, 郑永坚^{1,2}, 王丹^{1,2,*}

浙江理工大学¹全省家蚕生物反应器和生物医药重点实验室; ²生命科学与医药学院, 杭州 310018; ³余姚市中医医院药剂科, 余姚 315400

摘要: 世界人口老龄化趋势愈发明显, 神经退行性疾病(neurodegenerative diseases, NDDs)作为一类多发于老年人的常见病备受关注。研究表明, 神经炎症是NDDs的一个重要病理特征, 肿瘤坏死因子受体相关因子6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6)参与了对神经炎症的调控, 并影响NDDs的发生和发展; 进一步研究发现TRAF6的这种调控作用与其泛素化作用有关。故本文就TRAF6的分子结构、生物学功能、泛素化机制及其与阿尔茨海默症、帕金森病、多发性硬化症和肌萎缩侧索硬化症这4种常见NDDs的关系加以分析和总结, 试图阐明TRAF6调控NDDs发生的可能分子机制, 为探讨NDDs病因以及治疗提供一定的理论依据。

关键词: 肿瘤坏死因子受体相关因子6; 神经退行性疾病; 神经炎症; 泛素化

Research progress on the relationship between TRAF6 and neurodegenerative diseases

LUO Rui-Chang^{1,2}, WU Xin-Yi^{1,2}, YU Wen-Wen³, ZHENG Yong-Jian^{1,2}, WANG Dan^{1,2,*}

¹Zhejiang Key Laboratory of Silkworm Bioreactor and Biomedicine; ²College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; ³Pharmacy Department, Traditional Chinese Medicine Hospital of Yuyao, Yuyao 315400, China

Abstract: Given the increasing trend of aging population in the world, neurodegenerative diseases (NDDs), a common type of diseases that mostly occur in the elderly, have attracted much more attention. It has been shown that tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) is involved in the regulation of neuroinflammation, an important pathological feature of NDDs, and affects the occurrence and development of NDDs. Most importantly, the regulatory effect of TRAF6 is related to its ubiquitination. Therefore, in the present paper, the molecular structure, biological function, and ubiquitination mechanism of TRAF6, and its relationship with some common NDDs, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease, multiple sclerosis, and amyotrophic lateral sclerosis, were analyzed and summarized. The possible molecular mechanisms by which TRAF6 regulates the occurrence of NDDs were also elucidated, providing a theoretical basis for exploring the etiology and treatment of NDDs.

Key words: tumor necrosis factor receptor-associated factor 6; neurodegenerative diseases; neuroinflammation; ubiquitination

神经退行性疾病 (neurodegenerative diseases, NDDs) 是因神经元或 / 和其髓鞘丢失所引起的一种病理状态, 病情随时间推移会逐渐加重, 阿尔茨海默症 (Alzheimer's disease, AD)、帕金森病 (Parkinson's disease,

PD)、多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 和肌萎缩侧索硬化症 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 等均为常见的慢性 NDDs^[1]。研究表明, NDDs 的发病机制复杂多样, 分子机制尚不明确, 目前还无法

This work was supported by College Student Science and Technology Innovation Activity Plan (New Talent Plan Project) of Zhejiang Province (2023), Traditional Chinese Medicine Science and Technology Planning Project of Zhejiang Province (No. 2022ZB336), and Medical Science and Technology Project of Ningbo, China (No. 2022Y51).

*Corresponding author. Tel: +86-571-86843199; E-mail: februarydan@zstu.edu.cn

治愈, NDDs 不但降低患者生活质量, 还会增加家庭负担^[2]。小胶质细胞介导的神经炎症参与了上述几种 NDDs 的发病, 使小胶质细胞从促炎的 M1 型向抗炎的 M2 型转变, 减轻其诱导的神经炎症和神经毒性将是治疗 NDDs 的一个潜在策略^[3]。信号通路作为促使小胶质细胞表型转变的重要途径, 一直备受关注, 而肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, TRAF6) 是这些信号通路中的一个重要分子。在 TRAF 家族中, TRAF6 是同源性差异最大的蛋白, 其 TRAF-C 结构域识别的氨基酸序列与其他 TRAF 家族成员不同, 具有重要的生理和病理功能, 更重要的是 TRAF6 的泛素化作用与 NDDs 的发生和发展密切相关^[4]。

泛素是普遍存在于真核细胞中的一种小蛋白, 在依次经过泛素活化酶 (ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素缀合酶 (ubiquitin-conjugating enzyme, E2) 和泛素连接酶 (ubiquitin-ligase enzyme, E3) 催化作用后, 泛素能够结合在底物蛋白的赖氨酸残基位点上, 从而参与蛋白质翻译后的泛素化修饰。目前, 共有 9 种不同连接位点的泛素化修饰方式^[5], 即: M1、K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63 和 G76, 且由于泛素连接的赖氨酸残基位点的不同发挥的生物学效应也不同, 如: 以 K48 形式连接的泛素链通常与蛋白酶体降解有关; 与 K63 连接的泛素化修饰则被认为参与调节蛋白质之间的相互作用或蛋白质功能^[6]。而 TRAF6 作为 E3 泛素连接酶, 其所介导的 K63 多聚泛素化具有重要作用^[4]。TRAF6 参与的信号转导对多种免疫细胞的发育、稳态和活化具有重要作用, 与 NDDs 的发病也密切相关^[7], 对其相关机制的研究可能为治疗 NDDs 提供新靶点。本文将对 TRAF6 介导的泛素化系统与多种 NDDs 之间的关系进行分析和总结, 为阐明 NDDs 的发病机制提供一定的参考借鉴。

1 TRAF 蛋白家族的结构特点及 TRAF6 发挥泛素化功能的结构基础

TRAF 蛋白家族是肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 超家族和 Toll/IL-1 受体 (Toll/IL-1 receptor, TIR) 超家族的重要结合蛋白, 目前共发现 7 种 TRAF 蛋白家族成员, 它们负责调控体内多种受体的信号转导途径^[1]。除 TRAF7 外, 其余 TRAF 蛋白家族成员的共同特征是均含有一个由 180 个氨基

酸残基盘曲折叠形成的 7~8 个反平行排列的 β 折叠片——TRAF-C 结构域; 其后是一个螺旋线圈状 (coiled-coil, CC) 结构域, 这两者共同构成 TRAF 结构域, 这种独特的结构是其作为衔接蛋白调控不同蛋白质之间相互交流的结构基础^[8]。此外, 除 TRAF1 外, 其余 TRAF 蛋白都含有一个 N 端环指 (ring finger, RF) 结构域以及数个锌指 (zinc finger, ZF) 结构域, 并且 RF 可作为 E3 泛素连接酶, 产生非降解的 K63 连接泛素链并介导自身的多泛素化^[9], 进而参与核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 以及丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路的活化, 在介导炎症免疫反应、骨代谢、细胞生长和分化以及凋亡等方面具有重要作用。

通过对 TRAF 家族 TRAF-C 结构域进行同源性比对, TRAF6 与其他 TRAF 家族蛋白的结构同源性最小。其独特之处有两点^[10, 11]: 一是 TRAF6 结合 CD40 细胞质结构域的位点不同于 TRAF1、TRAF2、TRAF3 和 TRAF5; 二是 TRAF6 与白细胞介素 -1 (interleukin-1, IL-1) 信号转导有关, 超出了 TRAF 家族的信号转导范畴。TRAF6 的 N 端 RF 结构域具有 E3 活性, 可以通过与 E2 Ubc13/Uev1A 结合, 将 K63 形式连接的多聚泛素链连接到自身或其他分子上, 从而介导靶蛋白的泛素化或者多种蛋白质之间的相互作用^[12]。TRAF6 中间连续的 ZF 结构域的具体作用目前尚未完全解析, 但是, 对 ZF 结构域的点突变实验结果表明: 第一段 ZF 的完整性是帮助协调 RF 结构域发挥 E3 功能必不可少的^[13]。C 端 TRAF 结构域则主要促进 TRAF6 本身的寡聚化, 以及与其受体或接头蛋白的相互作用。此外, CC 结构域在 TRAF6 行使泛素连接酶功能时发挥极其关键的作用, 这主要体现在两方面: 一是 CC 结构域具有诱导 TRAF6 本身大量聚集形成大的寡聚复合物, 进而使 TRAF6 在发挥作用时能够一次性结合大量的 E2; 二是 CC 结构域本身也具有结合 E2 的功能, 上述两方面的综合作用最终使 TRAF6 在短时间内就能高效合成长的自由多泛素链^[14] (图 1)。

2 TRAF6 介导的泛素化系统调节信号转导路径

TRAF6 的泛素化参与了多条信号通路的调控, 本文重点介绍 TRAF6 介导的泛素化系统对 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的调控。

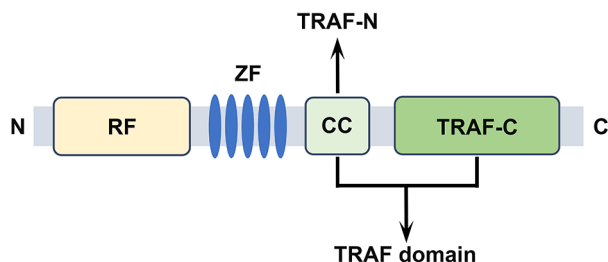


图 1. TRAF6蛋白结构特征

Fig. 1. Structural characteristics of TRAF6 protein. RF: ring finger; ZF: zinc finger; CC (TRAF-N): coiled-coil.

2.1 TRAF6的泛素化在NF- κ B信号通路中的作用

TRAF6 作为经典炎症通路 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)/NF- κ B 中的关键分子, 在各种炎症相关性疾病的发生和发展中起着重要作用。NF- κ B 广泛存在于各种细胞中, 因受 NF- κ B 抑制剂 (inhibitor of NF- κ B, I κ B) 的作用, 在大部分细胞中 NF- κ B 的活性均被抑制^[15]。但是, 在炎症条件下 TLR4 与配体结合后, 将使下游的白细胞介素-1 受体相关激酶 (interleukin-1 receptor associated kinase, IRAK) 1 和 4 借助髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 的介导同时结合在 TLR4 受体上; IRAK4 进而与 TRAF6 的 C 端 TRAF 结构域相互作用引起 TRAF6 的募集和活化; 活化的 TRAF6 将以 K63 的泛素化形式介导转化生长因子- β -活化激酶 1 (transforming growth factor- β -activated kinase 1, TAK1) 和转化生长因子- β 活化激酶 1 结合蛋白 (transforming growth factor- β -activated kinase 1 binding protein, TAB) 的磷酸化并形成 TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2 复合体, 该复合体又使抑制性核因子激酶 κ B (inhibitory nuclear factor kinase- κ B, IKK) 的三个亚基磷酸化, 最终导致 I κ B 以 K48 连接的泛素化修饰降解, 解除了 I κ B 对 NF- κ B 的抑制作用, NF- κ B 进而入核并启动下游炎症相关基因的表达^[16, 17] (图 2)。研究表明, 应用过氧化还原蛋白 1 (peroxiredoxin 1, PRDX1) 抑制 TRAF6 泛素连接酶活性后, TLR4/NF- κ B 信号通路将被抑制^[18]。

2.2 TRAF6的泛素化在MAPK信号通路中的作用

被活化的 TRAF6 除了可以解除 I κ B 对 NF- κ B 的抑制作用外, 还会影响 MAPK 信号通路, MAPK 是连接细胞外刺激和细胞反应的重要信号蛋白^[19, 20]。根据 MAPK 亚族的不同, MAPK 通路可划分为 4 条, 即: 细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated

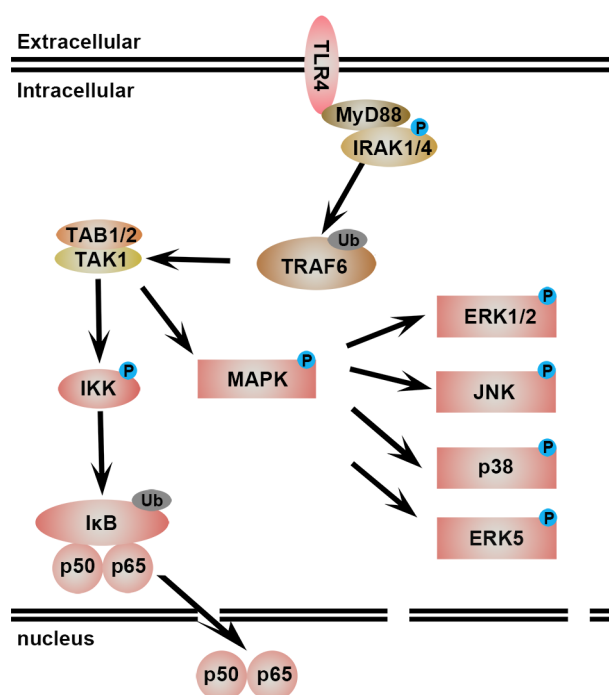
图 2. TRAF6在NF- κ B和MAPK信号通路中的作用

Fig. 2. The role of TRAF6 in NF- κ B and MAPK signaling pathways. Upon binding of TLR4 to its receptor under inflammatory conditions, the downstream IRAK1 and IRAK4 bind together to the TLR4 receptor with the help of MyD88. IRAK4 further interacts with the C-terminal TRAF domain, leading to the recruitment and activation of TRAF6. Activated TRAF6 mediates the phosphorylation of TAK1 and TAB in the form of K63 ubiquitination, which subsequently forms the complex of TRAF6-TAK1-TAB1-TAB2. This complex in turn phosphorylates the three subunits of IKK, ultimately resulting in I κ B degradation mediated by the K48 ubiquitin chain. And then NF- κ B enters the nucleus and initiates the expression of downstream inflammation-related genes. The regulatory pathway of MAPK is similar to that of NF- κ B. After activation, TRAF6 forms an ubiquitin chain complex through the ubiquitination form of K63 and activates kinase TAK1 through TAB containing a ubiquitin binding domain, finally activating the MAPK signaling pathway. TLR4: Toll-like receptor 4; IRAK1/4: interleukin-1 receptor associated kinase 1/4; MyD88: myeloid differentiation factor 88; TAK1: transforming growth factor- β -activated kinase 1; TAB: transforming growth factor- β -activated kinase 1 binding protein; IKK: inhibitory nuclear factor kinase- κ B; NF- κ B: nuclear factor κ B; I κ B: inhibitor of NF- κ B; ERK: extracellular regulated protein kinase; JNK: c-Jun N-terminal kinase; MAPK: mitogen-activated protein kinase; p50, p65: subunits of NF- κ B.

protein kinases 1/2, ERK1/2) 介导的 MAPK 经典通路、c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK)

介导的 JNK/MAPK 通路、p38 介导的 p38/MAPK 通路以及 ERK5 介导的 MAPK 通路 (图 2)。MAPK 通路通过三级信号级联将细胞外信号传递到细胞内,进而介导调控细胞的增殖、分化、凋亡以及炎症等多种细胞生命活动,是将细胞信号转导到细胞核内部的重要传递者^[21]。与 NF- κ B 的调控途径类似,在 MAPK 信号通路中,TRAF6 在激活后,通过 K63 的泛素化形式形成泛素链复合物,并借助含有泛素结合结构域的 TAB 使激酶活化从而募集激酶 TAK1,并最终磷酸化下游激酶 MAPK,从而启动 p38、JNK 和 ERK1/2 的激活,随后将进一步引起环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB) 和激活蛋白 -1 (activator protein 1, AP-1) 转录因子发生磷酸化。最终 CREB 和 AP-1 与 NF- κ B 相互作用启动促炎基因转录^[12, 16, 22](图 2)。

3 TRAF6 的泛素化调控机制在 NDDs 发病中的作用

3.1 TRAF6 与 AD

AD 是最常见的一种 NDDs, 它的发病具有缓慢性、不可逆性、进行性、复杂性和致死性的特征^[23]。AD 患者可表现为进行性认知能力下降、定向障碍、行为改变甚至死亡,潜伏期没有临床症状,但病理生理过程仍会进行^[24],起初是大脑皮层的颞叶和顶叶神经损伤,后来逐渐发展至海马体和杏仁核^[23],导致患者语言功能丧失、记忆力下降和妄想,是痴呆的主要原因^[25]。关于 AD 发病机制,目前“ β -淀粉样蛋白 (amyloid β -protein, A β) 假说”受到广泛关注:过量的 A β 积累引起的神经毒性和 Tau 蛋白过度磷酸化导致神经纤维缠结,且其诱发的炎症级联反应会削弱血脑屏障,使得神经毒性能够进入并被神经元摄取,这些最终导致神经元功能障碍和神经元死亡^[26]。因此,关于 AD 的治疗可从两方面入手,一是改善 A β 和异常 Tau 蛋白的积累;二是抑制神经炎症。

众所周知, A β 的积累是 AD 的关键标志, A β 可以激活小胶质细胞,从而启动炎症反应,产生一系列促炎因子和趋化因子,造成脑损伤。而调控 TLR4/MyD88/TRAF6 信号轴可调节炎症因子 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 等的产生,进而改善 A β 诱导的炎症反应^[27]。 γ -分泌酶蛋白复合体的催化成分——早老素 (PS1 和 PS2) 的突变与 AD 的发病机制有关,早老素能切割 β 淀粉样前体蛋白 (β -amyloid precursor

protein, APP) 从而产生 A β 。TRAF6 能与 PS1 相互作用并促进 K63 连接的 PS1 和 PS2 的泛素化,而泛素化修饰对 PS2 的稳定性和活性具有重要作用^[28],这意味着可通过抑制 TRAF6 表达来减少泛素化从而破坏 PS2 的稳定性和活性,但仍需进一步实验证实^[29]。还有研究表明,TLR4 被 A β 激活后,使其下游的 MyD88 磷酸化,并进一步激活 IRAK4,导致 TRAF6 的募集和 NF- κ B 的 p65 亚基的核易位,从而促进炎症因子的表达^[30]。并且 Yao 等人的研究发现, A β 多肽诱导的细胞凋亡与 JNK4 的激活有关^[31], JNK 可能是 A β 死亡通路的关键介质^[32]。Tau 蛋白过度磷酸化会使其与微管分离,从而形成神经元缠结,最终导致神经元死亡,这也是 AD 发病的原因之一^[33]。Tau 蛋白是 TRAF6 的 K63 的多泛素化底物,与 p62 的 UBA 结构域相互作用, Tau 蛋白经 K63 连接的泛素化后在 p62 的作用下降解^[34]。肌钙蛋白受体激酶 A (tropomyosin receptor kinase A, TrkA) 的激活导致下游的 Ras/MAPK 和 PI3K/Akt 等通路的信号传导,从而阻断细胞核和线粒体的死亡程序,促进神经元的生长与分化。TRAF6 与 p62 相互作用促进 TrkA 的多泛素化会激活 TrkA 信号通路,改善神经细胞的死亡情况^[35](图 3)。目前,在 AD 的各种治疗方法中通过逆转神经元死亡而减缓解 AD 是缺乏可行性的;但是,抑制神经炎症可以恢复神经元功能,促进神经元再生,从而改善 AD 的症状。因此,后者可能成为未来的研究方向^[36]。

3.2 TRAF6 与 PD

PD 是世界第二大 NDDs, 其临床表现具有个体差异,有以运动、迟缓、震颤、强直和姿势不稳等为特征的运动亚型;还有以认知障碍、情感淡漠和疲劳等形式呈现的非运动亚型^[37, 38]。PD 的主要病理特征包括两方面:一是黑质中多巴胺能神经元的缺失;二是形成以 α -核突触蛋白 (α -synuclein, α SYN) 为主要成分的路易小体 (Lewy bodies, LBs)^[39]。前者将导致大脑中负责协调精细运动控制区域的基底节区的多巴胺丢失,最终引发 PD 症状^[40];而后者具有神经毒性,抑制细胞正常功能^[24]。小胶质细胞的激活可引发多巴胺能神经元丢失^[41, 42],而改善小胶质细胞介导的神经炎症、减少神经元损伤是治疗 PD 的关键。

在 PD 发病中, TRAF6 在小胶质细胞介导的神经炎症中起着重要作用。K63 连接的 TRAF6 的泛素化是 TLR4 介导的 TAK1 激活的关键因素,活化

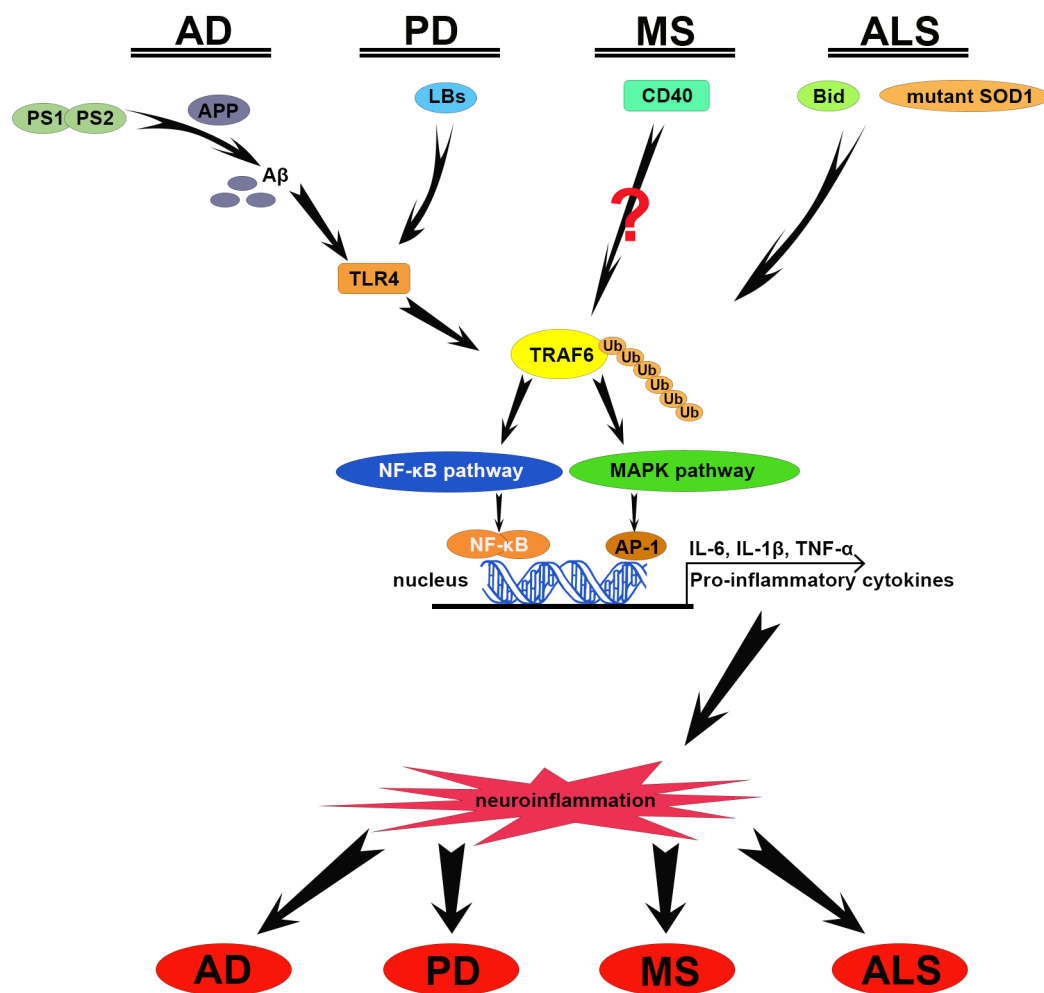


图 3. TRAF6与一些神经退行性疾病的关系

Fig. 3. The relationship between TRAF6 and some neurodegenerative diseases. Aβ, LBs, Bid and mutant SOD1 were all able to ubiquitinate TRAF6. TRAF6 ubiquitination activated the signaling pathways of NF-κB and MAPK, and then NF-κB and AP-1, as two transcription factors, entered the nucleus to initiate the transcription of pro-inflammatory genes, such as *Il6*, *Il1β*, and *Tnf-α*. The production of pro-inflammatory cytokines induced neuroinflammation, which resulted in the aggravation of NDDs, including AD, PD and ALS. However, TRAF6 is also associated with MS, but it is uncertain whether the ubiquitination mechanism of TRAF6 is at work. AD: Alzheimer's disease; PD: Parkinson's disease; MS: multiple sclerosis; ALS: amyotrophic lateral sclerosis; APP: β-amyloid precursor protein; Aβ: amyloid β-protein; PS1/2: presenilin 1/2; LBs: Lewy bodies; Bid: BH3 interacting domain death agonist, a Bcl-2 family protein; SOD1: superoxide dismutase 1.

的 TAK1 与 NEMO 结合后激活 IKK 复合物, 从而使 NF-κB 入核, 促进炎症因子基因转录。Han 等发现 BV2 细胞中 Pleckstrin 同源域家族 A 成员 1 (Pleckstrin homology-like domain family A member 1, PHLDA1) 的缺失可避免 PHLDA1 与 TRAF6 直接作用, 于是干扰 TRAF6 K63 连接的泛素化介导的 NF-κB 信号通路的激活, 进而抑制小胶质细胞的炎症反应^[43]。TRAF6 通过 K6、K27、K29 和 K33 的非典型泛素链促使突变蛋白 DJ-1、L166P 和 αSYN 泛素化; TRAF

和 TNF 受体关联蛋白 (TRAF and TNF receptor associated protein, TTRAP) 是一个新鉴定的 5'-酪氨酰 DNA 磷酸二酯酶, 可修复拓扑异构酶介导的 DNA 损伤^[44]。TRAF6 结合 TTRAP 和突变体 DJ-1 促进 L166P 非典型泛素化的发生, 使含 L166P 的聚集体在细胞质中积累, 并调节 TTRAP 在核仁和细胞质聚集体中的分配, 改变 TTRAP 的核定位, 破坏 TTRAP 的神经保护作用从而影响正确 rRNA 的转录, 最终导致海马和多巴胺能神经元的神经变性^[45]。

关于 TRAF6 与野生型 α SYN 之间的相互作用的研究结果表明, 这两者的相互作用会激活 NF- κ B 信号通路, 最终增加细胞的死亡^[46]。同时 TRAF6 介导的非典型泛素化在溶酶体/自噬途径降解 α SYN 的作用尚不清楚, 但其在 LBs 中可作为非典型泛素 E3 连接酶帮助降解易聚集的错误折叠蛋白^[47]。从帕金森病蛋白 2 (Parkinson's disease protein 2, PARK2) 位点分离出的 E3 连接酶 Parkin 能够直接抑制 TRAF2/6 的表达, 从而抑制 NF- κ B 和 JNK 信号通路的激活, 减少慢性炎症的发生和细胞凋亡^[48]。此外, 已有报道富亮氨酸重复激酶 2 (leucine-rich repeat kinase 2, LRRK2) 过度表达将诱导神经元产生毒性物质, 造成神经元损伤甚至死亡^[49]。进一步研究发现, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 可促进 LRRK2 和 TRAF6 的相互作用, 而 LRRK2 抑制剂 68 能减弱这种相互作用从而减少 LPS 诱导的 MAPK (JNK1/2、p38 和 ERK1/2) 和 I κ B α 磷酸化^[50]。抑制 ERK5 可减少 LRRK2 的表达, 且 ERK5 和 LRRK2 可能有调节巨噬细胞的形态和功能的作用^[51] (图 3)。JNK 作为 LRRK2 的下游效应物, 阻断该信号通路可能是干预 PD 的潜在治疗靶点^[52]。由此可见, TRAF6 与 PD 的发病密切相关。

3.3 TRAF6与MS

MS 是一种以血-脑屏障破坏、多灶性炎性病变、脱髓鞘、反应性胶质增生、轴突变性和神经变性等病理改变为特征的 NDDs。与其他 NDDs 相比, MS 是一种“年轻”的疾病, 其患者平均诊断年龄在 30 岁左右, 且女性更为常见^[53]。MS 的发病机制主要由自身反应性免疫细胞攻击中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 的髓鞘和轴突, 导致脑和脊髓的破坏性病变, 从而使患者产生运动、感觉、认知和自主神经功能障碍^[54–56]。研究表明抑制免疫细胞向 CNS 迁移可能是治疗 MS 的一种有效手段。

CD40 属于 TNF 受体家族成员之一, 它是一种膜结合共刺激蛋白。当发生神经炎症时, 表达 CD40 的细胞, 如: 单核细胞、巨噬细胞、B 细胞和其他 CNS 固有细胞将被激活, 从而持续扩大炎症反应, 最终导致 CNS 组织损伤和神经功能缺损^[57]。在巨噬细胞中, CD40 与 TRAF6 相互作用主导神经炎症反应; 而抑制 CD40-TRAF6 信号通路可阻止巨噬细胞迁入脑组织, 抑制 CNS 内炎性细胞的浸润, 进而减轻神经炎症^[58]。小分子抑制剂 (small molecule inhibitor, SMI) 6877002 可靶向 CD40-

TRAF6 信号通路。SMI 6877002 可拮抗 CD40 诱导的单核细胞的促炎作用, 并增加抑炎细胞因子 IL-10 的水平。为研究在神经炎症反应中 SMI 6877002 阻断 CD40-TRAF6 信号通路的能力, 有研究组诱导建立了啮齿类动物的实验性自身免疫性脑脊髓炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE) (一种人类 MS 的理想动物模型)。但是研究结果表明, 在大鼠 EAE 中, SMI 6877002 通过阻断 CD40-TRAF6 信号通路的作用, 可以减少 EAE 大鼠脑实质中巨噬细胞和活化的小胶质细胞的数量, 减轻神经炎症, 改善 EAE 大鼠的临床评分; 而在小鼠的 EAE 中, SMI 6877002 虽然可以减少 CNS 中巨噬细胞的浸润, 但却不能有效缓解小鼠 EAE 的临床症状, 这表明抑制 CNS 内巨噬细胞的浸润并不能完全减轻 EAE 的临床表现^[59]。炎症小体 Nod 样受体蛋白 3 (Nod-like receptor pyrin domain 3, NLRP3) 是一种主要表达于 CNS 小胶质细胞胞质中的 caspase-1 激活蛋白复合物, 它能够激活 caspase-1, 促进炎症因子的成熟和分泌, 从而触发一系列炎症反应, 导致神经功能障碍。研究表明, 在 MS/EAE 中 NLRP3 炎症小体可能通过焦亡影响 CNS 的生理病理并发挥促炎放大器的作用^[60, 61]。IRAK-M 是抑制炎症的关键信号分子, 它可抑制 IRAK1 的磷酸化从而阻断 IRAK1/TRAF6 介导的 NLRP3 炎症小体的激活, 从而减少炎症因子的释放^[62]。此外研究也表明, 小胶质细胞中 MAPK 信号通路尤其是 ERK 的过度活化与 MS 的发病密切相关^[63] (图 3)。目前, 关于 MS 发病机制的研究相对较少, 但上述研究结果或许也可以为 MS 的治疗提供一些思路。

3.4 TRAF6与ALS

ALS 是以神经元选择性丧失导致瘫痪为特征的一种致死性 NDDs, 患者可表现为进行性肌肉无力和消瘦^[64]。ALS 的发病机制尚不明确, 但学者们认为可能与神经炎症和多种信号通路造成神经元代谢紊乱产生神经毒性进而造成神经元死亡有关^[65, 66]。研究发现, 超氧化物歧化酶 1 (superoxide dismutase 1, SOD1) 基因突变是 ALS 的致病因素, 由于突变使 SOD1 蛋白质错误折叠或者 SOD1 毒性增加, 而 TRAF6 作为错误折叠的 SOD1 的新型结合伴侣, 其中 A4V 突变体对 TRAF6 的反应性最高^[67], 可以通过 E3 泛素连接酶活性依赖的方式刺激突变的 SOD1 多泛素化, 以 K6、K27、K29 连接的泛素化占据主

导地位,这种多泛素化会导致突变体 SOD1 的积累,因此抑制 TRAF6 的表达能够减少突变体 SOD1 的积累^[68, 69](图 3)。在小胶质细胞和巨噬细胞中,重组的 BH3 相互作用结构域死亡激动剂(BH3 interacting domain death agonist, Bid)作为一种 Bcl-2 家族蛋白,它的缺失会导致肿瘤坏死因子诱导蛋白 3 基因(tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 gene, TNFAIP3)与 E3 泛素连接酶(包括 TRAF3 和 TRAF6)之间以 smad6 依赖的方式增加相互作用,促进 K48 和 K63 连接的泛素链断裂,从而抑制 TLR3/TLR4 向 NF- κ B、MAPK 和 IRF3 下游的信号转导;因此抑制 Bid 有可能会调节炎症信号通路^[70, 71]。

4 结论与展望

TRAF6 是一种具有泛素连接酶活性并且可参与多条信号通路的关键衔接分子,通过其泛素化调控机制参与 NDDs 的发生和发展。因此,以 TRAF6 为靶点,抑制 TRAF6 表达或抑制其活性也许是预防和治疗 NDDs 的有效途径。然而,TRAF6 作为细胞中重要的多功能信号分子,参与调节炎症免疫、胚胎发育和骨代谢等多种生理病理过程;同时,目前关于 TRAF6 在各种信号通路中的作用以及 TRAF6 与其他信号分子的相互作用还有待进一步研究。因此,基于上述两点可见:完全抑制 TRAF6 的活性可能会导致严重的副作用从而对身体的正常生理功能造成损害。如果能够在不破坏 TRAF6 的 RF 结构域的情况下,抑制其泛素连接酶活性进而影响小胶质细胞的炎症反应,在未来或许可以成为治疗以 NDDs 为代表的多种相关疾病的重要手段;同时,基于 TRAF6 的独特结构与其泛素连接酶活性的关系,从 ZF 结构域的第一区段或者 CC 结构域入手探究其在 NDDs 发病中的作用机理,从而寻求更好的治疗 NDDs 的方法或许也是可行的,而这些都需要未来更加深入的研究。

参考文献

- 1 Dou Y, Tian X, Zhang J, Wang Z, Chen G. Roles of TRAF6 in central nervous system. *Curr Neuropharmacol* 2018; 16(9): 1306–1313.
- 2 Guo C, Chen L, Wang Y. Substance abuse and neurodegenerative diseases: focus on ferroptosis. *Arch Toxicol* 2023; 97(6): 1519–1528.
- 3 Guo S, Wang H, Yin Y. Microglia polarization from M1 to M2 in neurodegenerative diseases. *Front Aging Neurosci* 2022; 14: 815347.
- 4 Yamamoto M, Gohda J, Akiyama T, Inoue JI. TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) plays crucial roles in multiple biological systems through polyubiquitination-mediated NF- κ B activation. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 2021; 97(4): 145–160.
- 5 Chen RH, Chen YH, Huang TY. Ubiquitin-mediated regulation of autophagy. *J Biomed Sci* 2019; 26(1): 80.
- 6 Martínez-Férriz A, Ferrando A, Fathinajafabadi A, Farràs R. Ubiquitin-mediated mechanisms of translational control. *Semin Cell Dev Biol* 2022; 132: 146–154.
- 7 Wang J, Wu X, Jiang M, Tai G. Mechanism by which TRAF6 participates in the immune regulation of autoimmune diseases and cancer. *Biomed Res Int* 2020; 2020: 4607197.
- 8 Zapata JM, Martínez-García V, Lefebvre S. Phylogeny of the TRAF/MATH domain. *Adv Exp Med Biol* 2007; 597: 1–24.
- 9 Megas C, Hatzivassiliou EG, Yin Q, Marinopoulou E, Hadweh P, Vignali DA, Mosialos G. Mutational analysis of TRAF6 reveals a conserved functional role of the RING dimerization interface and a potentially necessary but insufficient role of RING-dependent TRAF6 polyubiquitination towards NF- κ B activation. *Cell Signal* 2011; 23(5): 772–777.
- 10 Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996; 383(6599): 443–446.
- 11 Ishida T, Mizushima S, Azuma S, Kobayashi N, Tojo T, Suzuki K, Aizawa S, Watanabe T, Mosialos G, Kieff E, Yamamoto T, Inoue J. Identification of TRAF6, a novel tumor necrosis factor receptor-associated factor protein that mediates signaling from an amino-terminal domain of the CD40 cytoplasmic region. *J Biol Chem* 1996; 271(46): 28745–28748.
- 12 Walsh MC, Lee J, Choi Y. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) regulation of development, function, and homeostasis of the immune system. *Immunol Rev* 2015; 266(1): 72–92.
- 13 Lamothe B, Campos AD, Webster WK, Gopinathan A, Hur L, Darnay BG. The RING domain and first zinc finger of TRAF6 coordinate signaling by interleukin-1, lipopolysaccharide, and RANKL. *J Biol Chem* 2008; 283(36): 24871–24880.
- 14 Hu L (胡林). Biochemical mechanism of ubiquitin ligase TRAF6 [D/OL]. Hangzhou: Zhejiang University (浙江大学), 2018 (in Chinese). https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=FC2wxXHna7pVQ3IhUrojGS0kZaPbELgXRPM-cOIVkMda4j4B3UuYE-5njZQ0IHVU1y1L0Vo1vUT_ikAj-4fIPXHU4F14cp6aO3WHOxcoGMS_IIJS_TztGxyMHDM-rUgHulU&uniplatform=NZKPT&language=gb.

- 15 Singh S, Singh TG. Role of nuclear factor kappa B (NF- κ B) signalling in neurodegenerative diseases: an mechanistic approach. *Curr Neuroparmacol* 2020; 18(10): 918–935.
- 16 Stierschneider A, Wiesner C. Shedding light on the molecular and regulatory mechanisms of TLR4 signaling in endothelial cells under physiological and inflamed conditions. *Front Immunol* 2023; 14: 1264889.
- 17 Zhang T, Ma C, Zhang Z, Zhang H, Hu H. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *MedComm* 2021; 2(4): 618–653.
- 18 Min Y, Kim MJ, Lee S, Chun E, Lee KY. Inhibition of TRAF6 ubiquitin-ligase activity by PRDX1 leads to inhibition of NFKB activation and autophagy activation. *Autophagy* 2018; 14(8): 1347–1358.
- 19 Bonny C, Borsello T, Zine A. Targeting the JNK pathway as a therapeutic protective strategy for nervous system diseases. *Rev Neurosci* 2005; 16(1): 57–67.
- 20 Liu J, Lin A. Role of JNK activation in apoptosis: a double-edged sword. *Cell Res* 2005; 15(1): 36–42.
- 21 Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1802(4): 396–405.
- 22 Kawasaki T, Kawai T. Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 2014; 5: 461.
- 23 Hampel H, O'Bryant SE, Durrleman S, Younesi E, Rojkova K, Escott-Price V, Corvol JC, Broich K, Dubois B, Lista S. A Precision Medicine Initiative for Alzheimer's disease: the road ahead to biomarker-guided integrative disease modeling. *Climacteric* 2017; 20(2): 107–118.
- 24 Reitz C. Toward precision medicine in Alzheimer's disease. *Ann Transl Med* 2016; 4(6): 107.
- 25 Braak H, Braak E. Morphological criteria for the recognition of Alzheimer's disease and the distribution pattern of cortical changes related to this disorder. *Neurobiol Aging* 1994; 15(3): 355–356; discussion 379–380.
- 26 Dias-Carvalho A, Sá SI, Carvalho F, Fernandes E, Costa VM. Inflammation as common link to progressive neurological diseases. *Arch Toxicol* 2024; 98(1): 95–119.
- 27 Cui Y, Wang Y, Zhao D, Feng X, Zhang L, Liu C. Loganin prevents BV-2 microglia cells from A β_{1-42} -induced inflammation via regulating TLR4/TRAF6/NF- κ B axis. *Cell Biol Int* 2018; 42(12): 1632–1642.
- 28 Ford DL, Monteiro MJ. Studies of the role of ubiquitination in the interaction of ubiquitin with the loop and carboxyl terminal regions of presenilin-2. *Biochemistry* 2007; 46(30): 8827–8837.
- 29 Yan R, Farrelly S, McCarthy JV. Presenilins are novel substrates for TRAF6-mediated ubiquitination. *Cell Signal* 2013; 25(9): 1769–1779.
- 30 Li X, Wang X, Huang B, Huang R. Sennoside A restrains TRAF6 level to modulate ferroptosis, inflammation and cognitive impairment in aging mice with Alzheimer's disease. *Int Immunopharmacol* 2023; 120: 110290.
- 31 Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. Beta-amyloid-induced neuronal apoptosis involves c-Jun N-terminal kinase-dependent downregulation of Bcl-w. *J Neurosci* 2005; 25(5): 1149–1158.
- 32 Borsello T, Forloni G. JNK signalling: a possible target to prevent neurodegeneration. *Curr Pharm Des* 2007; 13(18): 1875–1886.
- 33 Ma YR (马亦然), Liu SY, Zhang XR, Zhu L. Research progress of anti-Alzheimer's disease drugs targeting pathological feature. *Chin J New Drugs Clin Rem (中国新药与临床杂志)* 2023; 42(5): 273–278 (in Chinese).
- 34 Babu JR, Geetha T, Wooten MW. Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J Neurochem* 2005; 94(1): 192–203.
- 35 Zheng C, Geetha T, Gearing M, Babu JR. Amyloid β -abrogated TrkA ubiquitination in PC12 cells analogous to Alzheimer's disease. *J Neurochem* 2015; 133(6): 919–925.
- 36 Chu J, Zhang W, Liu Y, Gong B, Ji W, Yin T, Gao C, Lian-gwen D, Hao M, Chen C, Zhuang J, Gao J, Yin Y. Biomaterials-based anti-inflammatory treatment strategies for Alzheimer's disease. *Neural Regen Res* 2024; 19(1): 100–115.
- 37 Lenka A, Padmakumar C, Pal PK. Treatment of older Parkinson's disease. *Int Rev Neurobiol* 2017; 132: 381–405.
- 38 Varma P, Narayan L, Alty J, Painter V, Padmakumar C. An innovative personalised management program for older adults with Parkinson's disease: new concepts and future directions. *J Pers Med* 2021; 11(1): 43.
- 39 Chen LL (陈连连), Zeng ZF. Post-translational modification of α -synuclein in Parkinson disease. *Laser J (激光杂志)* 2010; 31(4): 82–84 (in Chinese).
- 40 Wong YC, Krainc D. α -synuclein toxicity in neurodegeneration: mechanism and therapeutic strategies. *Nat Med* 2017; 23(2): 1–13.
- 41 Mogi M, Harada M, Narabayashi H, Inagaki H, Minami M, Nagatsu T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-2, IL-4, IL-6 and transforming growth factor-alpha levels are elevated in ventricular cerebrospinal fluid in juvenile parkinsonism and Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 1996; 211(1): 13–16.
- 42 Mogi M, Harada M, Riederer P, Narabayashi H, Fujita K, Nagatsu T. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) increases both in the brain and in the cerebrospinal fluid from parkinsonian patients. *Neurosci Lett* 1994; 165(1–2): 208–210.
- 43 Han C, Yan P, He T, Cheng J, Zheng W, Zheng LT, Zhen X. PHLDA1 promotes microglia-mediated neuroinflammation

- via regulating K63-linked ubiquitination of TRAF6. *Brain Behav Immun* 2020; 88: 640–653.
- 44 Cortes Ledesma F, El Khamisy SF, Zuma MC, Osborn K, Caldecott KW. A human 5'-tyrosyl DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase-mediated DNA damage. *Nature* 2009; 461(7264): 674–678.
 - 45 Vilotti S, Codrich M, Dal Ferro M, Pinto M, Ferrer I, Colavin L, Gustincich S, Zucchelli S. Parkinson's disease DJ-1 L166P alters rRNA biogenesis by exclusion of TTRAP from the nucleolus and sequestration into cytoplasmic aggregates via TRAF6. *PLoS One* 2012; 7(4): e35051.
 - 46 Yshii LM, Manfiolli AO, Denadai-Souza A, Kinoshita PF, Gomes MD, Scavone C. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 interaction with alpha-synuclein enhances cell death through the Nuclear Factor-kB pathway. *IBRO Rep* 2020; 9: 218–223.
 - 47 Zucchelli S, Codrich M, Marcuzzi F, Pinto M, Vilotti S, Biagioli M, Ferrer I, Gustincich S. TRAF6 promotes atypical ubiquitination of mutant DJ-1 and alpha-synuclein and is localized to Lewy bodies in sporadic Parkinson's disease brains. *Hum Mol Genet* 2010; 19(19): 3759–3770.
 - 48 Chung JY, Park HR, Lee SJ, Lee SH, Kim JS, Jung YS, Hwang SH, Ha NC, Seol WG, Lee J, Park BJ. Elevated TRAF2/6 expression in Parkinson's disease is caused by the loss of Parkin E3 ligase activity. *Lab Invest* 2013; 93(6): 663–676.
 - 49 Wang X, Yan MH, Fujioka H, Liu J, Wilson-Delfosse A, Chen SG, Perry G, Casadesus G, Zhu X. LRRK2 regulates mitochondrial dynamics and function through direct interaction with DLP1. *Hum Mol Genet* 2012; 21(9): 1931–1944.
 - 50 Li T, Ning B, Kong L, Dai B, He X, Thomas JM, Sawa A, Ross CA, Smith WW. A LRRK2 GTP binding inhibitor, 68, reduces LPS-induced signaling events and TNF- α release in human lymphoblasts. *Cells* 2021; 10(2): 480.
 - 51 Kuss M, Adamopoulou E, Kahle PJ. Interferon- γ induces leucine-rich repeat kinase LRRK2 via extracellular signal-regulated kinase ERK5 in macrophages. *J Neurochem* 2014; 129(6): 980–987.
 - 52 Yang D, Thomas JM, Li T, Lee Y, Liu Z, Smith WW. The *Drosophila hep* pathway mediates Lrrk2-induced neurodegeneration. *Biochem Cell Biol* 2018; 96(4): 441–449.
 - 53 Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, Robertson N, La Rocca N, Uitdehaag B, van der Mei I, Wallin M, Helme A, Angood Napier C, Rijke N, Baneke P. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Mult Scler* 2020; 26(14): 1816–1821.
 - 54 Araki I, Matsui M, Ozawa K, Takeda M, Kuno S. Relationship of bladder dysfunction to lesion site in multiple sclerosis. *J Urol* 2003; 169(4): 1384–1387.
 - 55 Burfeind KG, Yadav V, Marks DL. Hypothalamic dysfunction and multiple sclerosis: implications for fatigue and weight dysregulation. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2016; 16(11): 98.
 - 56 Sbardella E, Petsas N, Tona F, Prosperini L, Raz E, Pace G, Pozzilli C, Pantano P. Assessing the correlation between grey and white matter damage with motor and cognitive impairment in multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2013; 8(5): e63250.
 - 57 Aarts S, Seijkens TTP, van Dorst KJF, Dijkstra CD, Kooij G, Lutgens E. The CD40-CD40L dyad in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Front Immunol* 2017; 8: 1791.
 - 58 Aarts SA, Seijkens TT, Kusters PJ, van Tiel CM, Reiche ME, den Toom M, Beckers L, van Roomen CP, de Winther MP, Kooij G, Lutgens E. Macrophage CD40 signaling drives experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pathol* 2019; 247(4): 471–480.
 - 59 Aarts S, Seijkens TTP, Kusters PJH, van der Pol SMA, Zarzycka B, Heijnen P, Beckers L, den Toom M, Gijbels MJJ, Boon L, Weber C, de Vries HE, Nicolaes GAF, Dijkstra CD, Kooij G, Lutgens E. Inhibition of CD40-TRAF6 interactions by the small molecule inhibitor 6877002 reduces neuroinflammation. *J Neuroinflammation* 2017; 14(1): 105.
 - 60 Malhotra S, Río J, Urcelay E, Nurtidinov R, Bustamante MF, Fernández O, Oliver B, Zettl U, Brassat D, Killestein J, Lechner-Scott J, Drulovic J, Chan A, Martinelli-Boneschi F, García-Merino A, Montalban X, Comabella M. NLRP3 inflammasome is associated with the response to IFN- β in patients with multiple sclerosis. *Brain* 2015; 138(Pt 3): 644–652.
 - 61 McKenzie BA, Mamik MK, Saito LB, Boghozian R, Monaco MC, Major EO, Lu JQ, Branton WG, Power C. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018; 115(26): E6065–E6074.
 - 62 Wang Y, Pei S, Liu Z, Ding Y, Qian T, Wen H, Hsu SW, Zhou Z, Zhang J, Wang H. IRAK-M suppresses the activation of microglial NLRP3 inflammasome and GSDMD-mediated pyroptosis through inhibiting IRAK1 phosphorylation during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Death Dis* 2023; 14(2): 103.
 - 63 Ten Bosch GJA, Bolk J, 't Hart BA, Laman JD. Multiple sclerosis is linked to MAPK^{ERK} overactivity in microglia. *J Mol Med (Berl)* 2021; 99(8): 1033–1042.
 - 64 Martinelli I, Zucchi E, Simonini C, Gianferrari G, Zamboni G, Pinti M, Mandrioli J. The landscape of cognitive impairment in superoxide dismutase 1-amyotrophic lateral sclerosis.

- Neural Regen Res 2023; 18(7): 1427–1433.
- 65 Leis AA, Ross MA, Verheijde JL, Leis JF. Immunoablation and stem cell transplantation in amyotrophic lateral sclerosis: the ultimate test for the autoimmune pathogenesis hypothesis. *Front Neurol* 2016; 7: 12.
- 66 Zhou W, Xu R. Current insights in the molecular genetic pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Front Neurol* 2023; 17: 1189470.
- 67 Garg P, Semmler S, Baudouin C, Vande Velde C, Plotkin SS. Misfolding-associated exposure of natively buried residues in mutant SOD1 facilitates binding to TRAF6. *J Mol Biol* 2022; 434(16): 167697.
- 68 Semmler S, Gagné M, Garg P, Pickles SR, Baudouin C, Hamon-Keromen E, Destroismaisons L, Khalfallah Y, Chaineau M, Caron E, Bayne AN, Trempe JF, Cashman NR, Star AT, Haqqani AS, Durcan TM, Meiering EM, Robertson J, Grandvaux N, Plotkin SS, McBride HM, Vande Velde C. TNF receptor-associated factor 6 interacts with ALS-linked misfolded superoxide dismutase 1 and promotes aggregation. *J Biol Chem* 2020; 295(12): 3808–3825.
- 69 Saleki K, Mohamadi MH, Banazadeh M, Alijanizadeh P, Javanmehr N, Pourahmad R, Nouri HR. In silico design of a TLR4-mediating multiepitope chimeric vaccine against amyotrophic lateral sclerosis via advanced immunoinformatics. *J Leukoc Biol* 2022; 112(5): 1191–1207.
- 70 Kinsella S, Fichtner M, Watters O, König HG, Prehn JHM. Increased A20-E3 ubiquitin ligase interactions in bid-deficient glia attenuate TLR3- and TLR4-induced inflammation. *J Neuroinflammation* 2018; 15(1): 130.
- 71 Kinsella S, König HG, Prehn JH. Bid promotes K63-linked polyubiquitination of tumor necrosis factor receptor associated factor 6 (TRAF6) and sensitizes to mutant SOD1-induced proinflammatory signaling in microglia. *eNeuro* 2016; 3(2): ENEURO.0099-15.2016.