

DOI:10.16781/j.0258-879x.2021.11.1217

· 论 著 ·

泛素羧基末端水解酶 L1 C90S 和 I93M 点突变不影响小鼠卵母细胞成熟

许亚军¹, 张瑜², 石燕², 印惠荣¹, 汪伟伟¹, 胡婷婷¹, 松迪^{1*}, 孙兆贵^{2*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)长海医院生殖医学中心, 上海 200433

2. 上海市生物医药技术研究院, 国家卫生健康委员会计划生育药具重点实验室, 上海 200032

[摘要] **目的** 通过观察泛素羧基末端水解酶 L1 (UCHL1) 点突变蛋白与野生型蛋白过量对小鼠卵母细胞成熟的影响, 并分析其小鼠卵母细胞离体成熟过程中的作用及作用方式。**方法** 通过原核重组蛋白技术制备 UCHL1 点突变 (C90S 和 I93M) 和野生型蛋白与谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 的融合蛋白, 通过显微注射技术将 UCHL1 野生型蛋白与 GST 的融合蛋白、UCHL1 点突变蛋白与 GST 的融合蛋白、GST、PBS 分别注射到小鼠未成熟卵母细胞, 或在体外培养基中添加 UCHL1 野生型蛋白与 GST 的融合蛋白, 分析野生型 UCHL1 过量、UCHL1 (I93M) 点突变蛋白添加及泛素水解酶活性缺失的 UCHL1 (C90S) 点突变蛋白添加对卵母细胞生发泡破裂 (GVBD) 率的影响。分离 UCHL1 (I93M) 点突变小鼠与野生型小鼠的生发泡期卵母细胞, 体外培养 3 h 后比较其 GVBD 率。**结果** 显微注射 UCHL1 野生型蛋白及其点突变体与 GST 的融合蛋白的各组之间、注射 GST 组、注射 PBS 组卵母细胞 GVBD 率差异均无统计学意义, 在培养基中添加 UCHL1 蛋白与 GST 的融合蛋白组卵母细胞 GVBD 率与无注射无添加对照组相比差异也无统计学意义 ($P > 0.05$)。注射 UCHL1 (C90S) 与 GST 的融合蛋白组有少量生发泡期卵母细胞体外发育为 M II 期卵母细胞后呈现极体较对照组偏大的现象。UCHL1 (I93M) 点突变小鼠生发泡期卵母细胞体外 GVBD 率与野生型小鼠比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 在小鼠卵母细胞中添加外源性 UCHL1、有致病作用的 UCHL1 (I93M) 突变体或泛素水解酶活性丧失的 UCHL1 (C90S) 突变体均不影响卵母细胞成熟的 GVBD 进程, UCHL1 (I93M) 点突变小鼠卵母细胞 GVBD 率亦无异常, 但 UCHL1 (C90S) 点突变可能影响极体的形成。

[关键词] 泛素羧基末端水解酶 L1; 生发泡破裂; 卵母细胞; 蛋白显微注射; 重组蛋白质类

[中图分类号] R 321.11

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2021)11-1217-07

C90S and I93M mutations of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 do not affect mouse oocyte maturation

XU Ya-jun¹, ZHANG Yu², SHI Yan², YIN Hui-rong¹, WANG Wei-wei¹, HU Ting-ting¹, SONG Di^{1*}, SUN Zhao-gui^{2*}

1. Department of Reproductive Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. NHC Key Lab of Reproduction Regulation (Shanghai Institute for Biomedical and Pharmaceutical Technologies), Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1) mutant protein and wild-type protein overdose on mouse oocyte maturation, and analyze its role and interaction mode in mouse oocyte maturation *in vitro*. **Methods** The fusion proteins of UCHL1 mutations (C90S and I93M) and wild-type UCHL1 proteins with glutathione S-transferase (GST) were prepared by recombinant protein expression technology. The fusion proteins, GST and phosphate buffered solution (PBS) were injected into immature oocytes by microinjection technology, or wild-type proteins were added to *in vitro* culture medium to analyze the effects of wild-type UCHL1 overdose, UCHL1 (I93M) mutant protein addition or addition of UCHL1 (C90S) mutant protein with loss of ubiquitin hydrolase activity on oocyte germinal vesicle breakdown (GVBD). The germinal vesicle oocytes of UCHL1 (I93M) mutant mice and wild-type mice were isolated and cultured *in vitro* for 3 h, and then the GVBD rates were compared. **Results** There was no significant difference in the GVBD rates of oocytes between microinjection groups with UCHL1- or its mutants-GST fusion protein, GST injection group or PBS injection group (all $P < 0.05$). There was also no significant difference in the GVBD rates of oocytes in the group added with UCHL1-GST fusion protein in the culture medium compared with the control group without injection or addition ($P > 0.05$).

[收稿日期] 2021-08-01 **[接受日期]** 2021-10-19

[基金项目] 上海市计划生育科学研究所青年科技创新基金(Q2016-5)。Supported by Youth Science and Technology Innovation Fund of Shanghai Institute of Planned Parenthood Research (Q2016-5).

[作者简介] 许亚军, 主管技师. E-mail: 1524360728@qq.com

*通信作者(Corresponding authors). Tel: 021-31162048, E-mail: songdi1983@126.com; Tel: 021-64438467, E-mail: sunzgbio@126.com

A small number of germinal vesicle oocytes in the UCHL1 (C90S)-GST fusion protein injected group progressed to M II stage oocytes *in vitro*, and the polar body was larger than that of the control group. There was no significant difference in GVBD rates of germinal vesicle oocytes *in vitro* between UCHL1 (I93M) mutant mice and wild-type mice ($P>0.05$). **Conclusion** The addition of exogenous UCHL1, UCHL1 (I93M) mutant with toxic effects, or UCHL1 (C90S) mutant with loss of hydrolase activity in mouse oocytes do not affect the GVBD process of oocyte maturation. The GVBD rate of mouse oocytes with UCHL1 (I93M) mutation is normal. However, the mutation of UCHL1 (C90S) may affect the formation of polar bodies.

[**Key words**] ubiquitin C-terminal hydrolase L1; germinal vesicle breakdown; oocytes; protein microinjection; recombinant proteins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(11): 1217-1223]

卵母细胞的核成熟在形态学上表现为生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD) 和第一极体的排出^[1]。研究发现, 脑和生殖腺组织特异高表达泛素羧基末端水解酶 L1 (ubiquitin C-terminal hydrolase L1, UCHL1), 其蛋白含量占可溶性蛋白提取物的 1%~5%^[2-3]。UCHL1 是进化上高度保守的基因, 在卵母细胞中高表达, 并可能在卵母细胞成熟过程中发挥作用, 如在猪卵母细胞中抑制 UCHL1 的作用后, 细胞停滞在第 1 次减数分裂中后期^[4]。本课题组前期对蟾蜍卵母细胞的离体研究结果表明, 卵母细胞的成熟启动依赖一种泛素羧基末端水解酶, 但进一步研究发现其成熟过程不依赖该酶的水解酶活性^[5-6]。已有神经生物学领域的研究发现 UCHL1 的几个位点突变具有致病作用。例如, 小鼠脑组织中 UCHL1 的第 90 位半胱氨酸突变为丝氨酸 (C90S) 后, 其水解酶活性消失, 但在细胞内仍表现出稳定单体泛素的作用^[7]; 在散发性帕金森病家系中发现, *UCHL1* 基因第 277 位的胞嘧啶突变为鸟嘌呤, 导致 UCHL1 蛋白第 93 位异亮氨酸突变为甲硫氨酸 (I93M)^[8], 进而引起帕金森病^[9]。本研究拟通过观察 UCHL1 点突变蛋白与过量野生型 UCHL1 蛋白对离体卵母细胞成熟过程的影响, 分析 UCHL1 在小鼠卵母细胞成熟中发挥的作用及作用方式。

1 材料和方法

1.1 实验动物、质粒载体和试剂 3~4 周龄雌性野生型 ICR 小鼠购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司 [动物生产许可证号: SCXK (沪) 2013-0016], UCHL1 (I93M) 点突变 C57 雌鼠由本课题组张瑜制备^[10]。pGEX4T-3-UCHL1 载体与 pGEX4T-3 空载体由国家卫生健康委员会计划生育药具重点实验室保存, 于 -80 °C 冷冻保存含载体质粒的 DH5 α 甘油菌。DH5 α 和 DE3 感受态菌、

TOP10 细菌、质粒抽提试剂盒及 D2000 DNA 分子量标准物 (marker) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司, 核固红染料、吐温 -20、DNA 回收试剂盒购自北京鼎国昌盛有限公司, DMEM/F12 培养基购自美国 ThermoFisher Scientific 公司, 异丙基硫代 - β -D- 半乳糖苷 (isopropylthio- β -D-galactoside, IPTG) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 氯仿、异丙醇购自北京化工厂, 酵母抽提物 (yeast extract) 购自英国 OXOID 公司, 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 购自美国 BBI Life Science 公司, 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、高保真酶 (DR010)、10 \times CutSmart 限制性内切酶缓冲液购自宝生物工程 (大连) 有限公司。

1.2 原核重组蛋白技术制备 UCHL1 (I93M) 和 UCHL1 (C90S) 点突变蛋白 用 Primer Premier 5.0 软件设计引物。UCHL1 (I93M) 编码序列引物: UCHL1-u5 (5'-TAGTCGACGTGCCATCCGCGAAG-ATGCAG-3'), UCHL1-u3-mu (5'-ATCAACCCCATGGTACCACAGGAGTTTCC-3'), UCHL1-d5-mu (5'-GGAAACTCCTGTGGTACCATGGGGTTGAT-3'), UCHL1-d3 (5'-TTGCGCCGCAGACTTAAGCTGCTTTGCAG-3'); UCHL1 (C90S) 编码序列引物: UCHL1-u5 (5'-TAGTCGACGTGCCATCCGCGAAGATGCAG-3'), UCHL1-u3-mu (5'-ATCAACCCGATGGTACC~~C~~GAGGAGTTTCC-3'), UCHL1-d5-mu (5'-GGAAACTCCTCGGGTACCATCGGGTTGAT-3'), UCHL1-d3 (5'-TTGCGCCGCAGACTTAAGCTGCTTTGCAG-3')。引物序列中加下划线的碱基为突变位点。

点突变蛋白的构建方法参照文献 [6], 步骤简述如下: (1) 配制 LB 液体培养基与 LB 固体培养基, 铺板保存; (2) 扩增菌液, 离心; (3) 抽提质粒, 测定浓度后保存; (4) 以 pGEX4T-3-UCHL1 质粒为模板, 分别以 UCHL1-u5

和 UCHL1-u3-mu、UCHL1-d5-mu 和 UCHL1-d3 为引物进行分段 PCR, 构建 UCHL1 (C90S) 和 UCHL1 (I93M) 编码序列全长片段 (点突变 UCHL1 片段); (5) 酶切获得 UCHL1 点突变片段; (6) 连接 pGEX4T-3 质粒与 UCHL1 点突变片段, 转化 TOP10 细菌, 扩增提取质粒, 利用 PCR 方法进行验证; (7) 挑选单克隆, 进行预测序; (8) 从测序正确的菌株中抽提质粒, 转化 DE3 感受态菌, 挑取单克隆扩大培养, 保存甘油菌; (9) 纯化蛋白并进行鉴定。获得的谷胱甘肽 S- 转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 与 UCHL1 野生型或点突变蛋白的融合蛋白分别记为 GST-UCHL1、GST-UCHL1 (I93M)、GST-UCHL1 (C90S)。

1.3 UCHL1 点突变蛋白在小鼠卵母细胞成熟过程中的作用观察 参照文献 [11] 方法获取与培养小鼠未成熟卵母细胞 (生发泡期卵母细胞)。将获得的未成熟卵母细胞分为无注射无添加对照组、无注射添加 GST-UCHL1 组、注射 PBS 组、注射 GST 组、注射 GST-UCHL1 组、注射 GST-UCHL1 (I93M) 组、注射 GST-UCHL1 (C90S) 组、添加 100 $\mu\text{mol/L}$ 3- 异丁基 -1- 甲基黄嘌呤 (3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX; 美国 Sigma 公司) 组 (阳性对照组), 根据分组情况, 通过显微注射技术将相应的蛋白或试剂注射到未成熟卵母细胞, 或在体外培养基中添加相应的蛋白或试剂, 每组均按蛋白添加剂量设 0.1 和 0.2 pmol 亚组 (或相应的对照组)。培养 3 h 后, 在显微镜下观察卵母细胞成熟情况 (是否发生 GVBD)。GVBD 率 (%) = (存活的卵母细胞数 - 生发泡期卵母细胞数) / 存活的

卵母细胞数 $\times 100\%$ 。

1.4 UCHL1 (I93M) 点突变小鼠生发泡期卵母细胞体外成熟率的观察 取 UCHL1 (I93M) 点突变小鼠与野生型小鼠各 3 只, 参照文献 [11] 方法获取与培养小鼠生发泡期卵母细胞, 培养 3 h 后观察卵母细胞成熟情况并计算 GVBD 率。每只小鼠各取 6~7 个生发泡期卵母细胞添加 IBMX 作为阳性对照。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 21 软件进行数据处理。计数资料以细胞数和百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 UCHL1 点突变蛋白重组表达与纯化 通过分段 PCR 方法在 UCHL1 编码序列中引入点突变, 成功扩增出小鼠 UCHL1 (C90S) 和 UCHL1 (I93M) 编码序列片段, 并且在两端分别引入 *Sal* I 和 *Not* I 重组内切酶位点。扩增的片段经过琼脂糖凝胶电泳, 片段长度符合预期 (650 bp, 图 1A), 利用凝胶 DNA 回收试剂盒回收 DNA 片段, 紫外分光光度计检测其浓度为 127 ng/ μL 。利用 *Sal* I 和 *Not* I 双酶切 pGEX4T-3 质粒与 UCHL1 点突变片段 (图 1B), 凝胶 DNA 回收后, 测得空载体和目的片段 DNA 浓度分别为 47 和 64 ng/mL。将经过双酶切的载体和 UCHL1 点突变片段连接构成重组表达质粒, 转化 TOP10 细菌扩增质粒, 提取质粒, 利用 PCR 方法筛选重组质粒克隆, 所选 8 个克隆均含有插入的 UCHL1 点突变片段 (图 1C)。

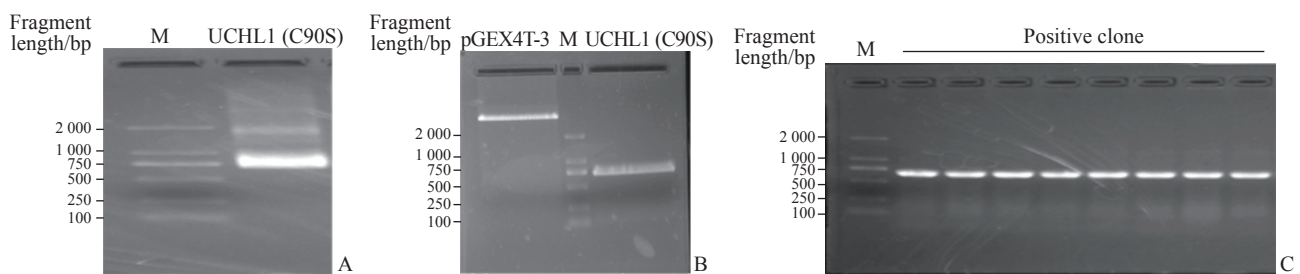


图 1 UCHL1 (C90S) 编码序列扩增与重组表达质粒克隆的构建

Fig 1 Amplification of UCHL1 (C90S) coding sequence and construction of recombinant expression plasmid clone

A: Electrophoresis of UCHL1 (C90S) coding sequence amplified bands; B: Electrophoresis detection of empty plasmid pGEX4T-3 and UCHL1 (C90S) coding sequence amplified fragments after double enzyme digestion; C: After the recombinant plasmid was transformed into TOP10 bacteria, the extracted plasmids from different clones were detected by PCR, and the positive clones successfully recombined were screened and initially identified. UCHL1: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1; PCR: Polymerase chain reaction; M: DNA molecular marker.

为了进一步明确挑选细菌单克隆中重组质粒构建是否正确,提取单克隆细菌质粒 DNA,通过 PCR 扩增插入片段后送测序,测序结果提示载体与 UCHL1 点突变片段连接正确,所有编码序列及突变位点序列均正确(图 2)。经原核重组表达、鉴

定、谷胱甘肽亲和柱纯化及电泳后,采用考马斯亮蓝染色法鉴定纯化结果,显示重组表达的 UCHL1 融合蛋白分子量大小符合预期(50 000,图 3),而且纯度符合显微注射技术初步研究的要求。

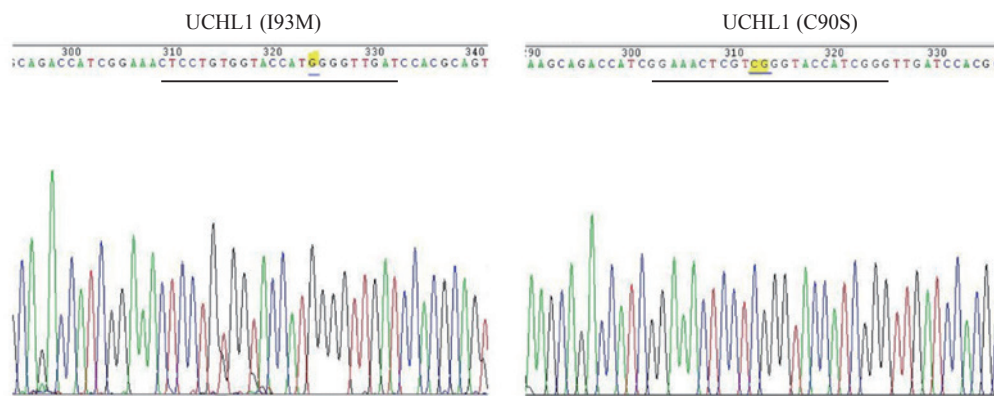


图 2 UCHL1 (I93M) 和 UCHL1 (C90S) 编码序列测序结果

Fig 2 Sequencing results of UCHL1 (I93M) and UCHL1 (C90S) coding sequences

The sequencing peak map of the calibration area is showed by the black horizontal line, and the mutated bases are underlined. UCHL1: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1.

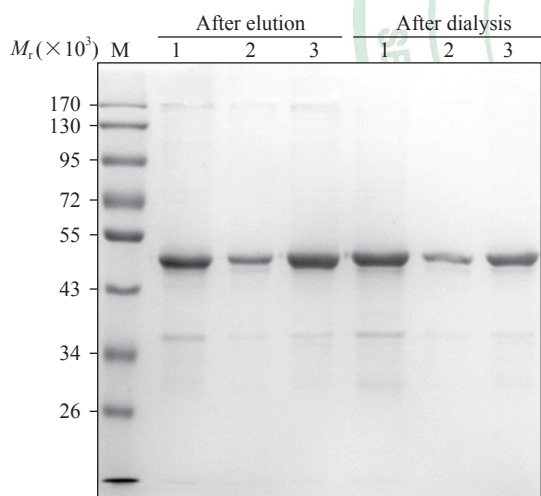


图 3 原核重组表达 GST-UCHL1 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析结果

Fig 3 Prokaryotic recombinant expression of GST-UCHL1 fusion protein analyzed by SDS-PAGE

1: GST-UCHL1; 2: GST-UCHL1 (C90S); 3: GST-UCHL1 (I93M). GST: Glutathione S-transferase; UCHL1: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1; SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis; M: Protein molecular marker.

向未成熟卵母细胞内显微注射 0.1 pmol 或 0.2 pmol 融合蛋白 GST-UCHL1、GST-UCHL1 (I93M)、GST-UCHL1 (C90S), 以显微注射 GST 与 PBS 作为对照,培养 3 h 后,观察各组 GVBD 的发生情况。本实验 0.1 pmol 剂量采取 3 次独立重复实验,0.2 pmol 剂量采取 2 次独立重复实验,综合数据后进行统计分析。由表 1 可见,显微注射 GST-UCHL1、GST-UCHL1 (I93M)、GST-UCHL1 (C90S)、GST、PBS 各组之间 GVBD 率差异无统计学意义 ($P>0.05$)。同时,在培养基中添加 GST-UCHL1 组 GVBD 率与无注射无添加对照组相比差异也无统计学意义 ($P>0.05$)。说明 UCHL1 野生型及其 C90S 和 I93M 点突变蛋白的显微注射,以及在培养基中添加 UCHL1 对于小鼠卵母细胞 GVBD 率均没有显著影响。注射 PBS 组 GVBD 率低于无注射无添加对照组 ($P<0.05$),说明显微注射操作可能对于卵母细胞的 GVBD 产生了影响,导致 GVBD 率偏低。此外,本研究还在注射 0.2 pmol GST-UCHL1 (C90S) 融合蛋白组观察到,少量生发泡期卵母细胞体外发育为 M II 期卵母细胞后呈现极体较对照组偏大的现象(图 4),因数量较少未进行统计学分析。

2.2 向细胞内显微注射或在培养基中添加 UCHL1 蛋白或其点突变体对卵母细胞 GVBD 率的影响 分别

表 1 各组卵母细胞培养 3 h 后 GVBD 率的比较

Tab 1 Comparison of GVBD rates of oocytes in each group after 3 h of culture

Group	Injection protein dose/pmol	Baseline GV oocyte, <i>N</i>	After 3 h of culture		
			Alive oocyte, <i>N</i>	GV oocyte, <i>n</i>	GVBD rate, % (<i>n/N</i>)
Control without injection or addition	0.1	85	83	21	74.70 (62/83)
	0.2	42	41	5	87.80 (36/41)
Non-injection and adding UCHL1	0.1	85	82	24	70.73 (58/82)
	0.2	40	38	8	78.95 (30/38)
Injecting PBS	0.1	92	44	21	52.27 (23/44)*
	0.2	56	33	12	63.64 (21/33)*
Injecting GST	0.1	84	39	17	56.41 (22/39)
	0.2	60	42	15	64.29 (27/42)
Injecting GST-UCHL1	0.1	104	44	25	43.18 (19/44)
	0.2	60	42	19	54.76 (23/42)
Injecting GST-UCHL1 (I93M)	0.1	122	72	35	51.39 (37/72)
	0.2	72	43	24	44.19 (19/43)
Injecting GST-UCHL1 (C90S)	0.1	120	56	28	50.00 (28/56)
	0.2	78	56	30	46.43 (26/56)
Adding IBMX control	0.1	60	60	60	0
	0.2	40	40	40	0

* $P < 0.05$ vs control without injection or addition group of the same protein dose. GVBD: Germinal vesicle breakdown; GV: Germinal vesicle; PBS: Phosphate buffered saline; GST: Glutathione S-transferase; UCHL1: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1; IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine.



图 4 两组 GV 期卵母细胞体外成熟后极体大小比较

Fig 4 Comparison of polar body sizes of GV oocytes after *in vitro* maturation between 2 groups

A: GV oocytes progressed to M II stage oocytes *in vitro* after the injection of GST-UCHL1 (C90S) fusion protein; B: GV oocytes progressed to M II stage oocytes *in vitro* without the injection as control group. The arrows indicate the polar body, and the scale bar is 50 μm . GV: Germinal vesicle; GST: Glutathione S-transferase; UCHL1: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1.

2.3 UCHL1 (I93M) 点突变小鼠卵母细胞体外 GVBD 率 分别取 3 只 UCHL1 (I93M) 点突变小鼠与 3 只野生型小鼠的生发泡期卵母细胞进行培

养, 3 h 后两组卵母细胞 GVBD 率差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 2)。该结果进一步表明 UCHL1 (I93M) 点突变不会影响小鼠卵母细胞的成熟。

表 2 UCHL1 (I93M) 点突变小鼠与野生型小鼠 GV 期卵母细胞 GVBD 率比较

Tab 2 Comparison of GVBD rates of GV oocytes between UCHL1 (I93M) mutant and wild-type mice

Group	Baseline GV oocyte, <i>N</i>	After 3 h of culture		
		Alive oocyte, <i>N</i>	GV oocyte, <i>n</i>	GVBD rate, % (<i>n/N</i>)
Wild type	118	118	15	87.29 (103/118)
UCHL1 (I93M)	136	136	18	86.76 (118/136)
UCHL1 (I93M) adding IBMX	20	20	20	0
Wild type adding IBMX	20	20	20	0

UCHL1: Ubiquitin C-terminal hydrolase L1; GV: Germinal vesicle; GVBD: Germinal vesicle breakdown; IBMX: 3-isobutyl-1-methylxanthine.

3 讨论

本实验以添加 IBMX 的培养基为阳性对照,该药物可以非选择性抑制磷酸二酯酶,有效抑制去除颗粒细胞卵后母细胞的 GVBD。本实验结果提示添加过量 UCHL1 蛋白、注射有致病作用的 UCHL1 (I93M) 突变蛋白及注射去泛素化水解酶活性的 UCHL1 (C90S) 突变蛋白均不会影响剥离颗粒细胞后卵母细胞的体外 GVBD 率。

本课题组前期研究中以泛素 -7-氨基 -4-甲基香豆素 (ubiquitin C-terminal 7-amino-4-methylcoumarin, UB-AMC) 作为底物进行体外实验,验证了重组获得的小鼠 GST-UCHL1 具有水解酶活性^[6],并且通过体外实验发现 C90S 位点突变会导致 UCHL1 水解 UB-AMC 的能力丧失。也有研究发现,一种针对细胞周期蛋白的人泛素载体蛋白酶突变体 (C114S) 可以竞争性结合野生型蛋白酶的生理底物^[12]。由于 GST 融合蛋白具有增加外源蛋白可溶性的特点^[13],借助 GST-UCHL1 融合蛋白研究 UCHL1 的活性与功能是可行的。有研究者在体内与体外实验中发现,UCHL1 通过泛素化途径降低了微管蛋白聚合成微管的能力^[14],而微管细胞骨架对于卵母细胞成熟过程中染色质的重组具有重要作用^[15]。还有研究者发现,在过表达 UCHL1 小鼠的精子形成过程中,减数分裂的早期阶段(粗线期)存在发育阻滞^[16]。在本研究中,添加外源 UCHL1 及其 I93M、C90S 突变体均没有影响卵母细胞的 GVBD 率。一项体外实验发现,UCHL1 (I93M) 突变体的添加会降低神经元内源性 UCHL1 水溶性^[17],本实验中 UCHL1 (I93M) 添加的量经估算已经超出了卵母细胞内源性 UCHL1 丰度,理论上讲,已能有效降低内源性 UCHL1 溶解性从而影响其生物学功能,但并没有观察到其对 GVBD 率的显著影响。有一种可能是,GST 融合蛋白具有增加外源蛋白可溶性的特点,可能会抵消 I93M 突变蛋白溶解度降低作用。另外,本课题组制备的 UCHL1 (I93M) 点突变小鼠生育力正常并且卵母细胞体外 GVBD 率与野生型小鼠无显著差异,也进一步证明了 UCHL1 (I93M) 点突变蛋白对于游离的小鼠卵母细胞的体外成熟率并没有影响。在肿瘤细胞系的研究中发现,UCHL1 参与

肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭,且均依赖其酶活性^[18-20]。本研究结果表明,通过显微注射添加去泛素化水解酶活性的 UCHL1 (C90S) 蛋白,并没有影响小鼠卵母细胞去除颗粒细胞后的体外成熟率。综合以上实验结果,认为 UCHL1 过量或添加其 I93M、C90S 突变体,均不干扰小鼠游离的卵母细胞 GVBD 进程。

在本实验中还观察到,一些注射了 UCHL1 (C90S) 蛋白的生发泡期卵母细胞在体外发育为 M II 期卵母细胞后,其极体相较于未注射组偏大,提示与 UCHL1 水解酶活性丧失可能影响极体的形成。有研究指出,抑制泛素羧基末端水解酶活性会导致异常大的极体,其机制可能涉及纺锤体定位破坏或卵母细胞皮质微纤维骨架功能障碍^[2]。UCHL1 和相关的泛素羧基末端水解酶在极体向卵母细胞边缘的挤压过程中,可能参与调节含有肌动蛋白和肌球蛋白的微丝形成。秀丽隐杆线虫的早期胚胎中微丝控制的细胞分裂、分裂沟的形成和细胞极性的建立受泛素羧基末端水解酶 CYK3 的调控^[21],CYK3 蛋白包含哺乳动物泛素特异性蛋白酶 (ubiquitin-specific protease, USP) 11 和 USP32 同源的泛素羧基末端水解酶结构域。最近一项研究发现,小分子泛素相关修饰物 (small ubiquitin-related modifier, SUMO) 通过 Akt 通路调控 GVBD^[22]。因为 UCHL1 与泛素分子的稳定性有关,所以虽然改变卵母细胞中 UCHL1 不影响 GVBD 进程,但是不排除其间接参与小鼠卵母细胞 GVBD 过程,而且其机制值得进一步研究。另一方面,UCHL1 在小鼠卵母细胞成熟过程中可能并不占主导作用,其含量或功能变化很容易被其他泛素羧基末端水解酶代偿。

综上所述,本研究结果显示在小鼠卵母细胞中添加外源性 UCHL1、有致病作用的 UCHL1 (I93M) 突变体或水解酶活性丧失的 UCHL1 (C90S) 突变体均不影响卵母细胞成熟的 GVBD 进程,UCHL1 (I93M) 点突变小鼠卵母细胞的 GVBD 率亦无异常改变,但 UCHL1 (C90S) 突变可能影响极体的形成。本研究的不足之处在于只观察了生发泡期卵母细胞培养 3 h 后的 GVBD 率,今后需要细化到不同的时间点观察,同时可以构建 UCHL1 (C90S) 点突变小鼠进一步明确 UCHL1 在卵母细胞成熟中的作用。

[参 考 文 献]

- [1] BRUNET S, MARO B. Cytoskeleton and cell cycle control during meiotic maturation of the mouse oocyte: integrating time and space[J]. *Reproduction*, 2005, 130: 801-811.
- [2] MTANGO N R, SUTOVSKY M, VANDEVOORT C A, LATHAM K E, SUTOVSKY P. Essential role of ubiquitin C-terminal hydrolases UCHL1 and UCHL3 in mammalian oocyte maturation[J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227: 2022-2029.
- [3] BHEDA A, GULLAPALLI A, CAPLOW M, PAGANO J S, SHACKELFORD J. Ubiquitin editing enzyme UCHL1 and microtubule dynamics: implication in mitosis[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9: 980-994.
- [4] SUSOR A, ELLEDEROVA Z, JELINKOVA L, HALADA P, KAVAN D, KUBELKA M, et al. Proteomic analysis of porcine oocytes during *in vitro* maturation reveals essential role for the ubiquitin C-terminal hydrolase-L1[J]. *Reproduction*, 2007, 134: 559-568.
- [5] SUN Z G, KONG W H, ZHANG Y J, YAN S, LU J N, GU Z, et al. A novel ubiquitin carboxyl terminal hydrolase is involved in toad oocyte maturation[J]. *Cell Res*, 2002, 12: 199-206.
- [6] 孙兆贵, 孔维华, 颜山, 顾正, 左嘉睿. 蟾蜍泛素羧基末端水解酶(tUCH)以不依赖其UCH活性的方式参与卵母细胞成熟调控[J]. *实验生物学报*, 2003, 36: 105-112.
- [7] NAKASHIMA R, GOTO Y, KOYASU S, KOBAYASHI M, MORINIBU A, YOSHIMURA M, et al. UCHL1-HIF-1 axis-mediated antioxidant property of cancer cells as a therapeutic target for radiosensitization[J/OL]. *Sci Rep*, 2017, 7: 6879. DOI: 10.1038/s41598-017-06605-1.
- [8] LEROY E, BOYER R, AUBURGER G, LEUBE B, ULM G, MEZEY E, et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease[J]. *Nature*, 1998, 395: 451-452.
- [9] SHARMA A, LIU H D, TOBAR-TOSSE F, CHAND DAKAL T, LUDWIG M, HOLZ F G, et al. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases (UCHs): potential mediators for cancer and neurodegeneration[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 3910. DOI: 10.3390/ijms21113910.
- [10] 张瑜, 孙兆贵. *UCHL1* 基因缺陷细胞和小鼠模型的构建及其基因功能研究[D]. 上海: 复旦大学, 2018.
- [11] 松迪, 孙兆贵. *UCHL1* 突变导致小鼠生殖障碍及其分子机制[D]. 上海: 复旦大学, 2020.
- [12] TOWNSLEY F M, ARISTARKHOV A, BECK S, HERSHKO A, RUDERMAN J V. Dominant-negative cyclin-selective ubiquitin carrier protein E2-C/UbcH10 blocks cells in metaphase[J]. *PNAS*, 1997, 94: 2362-2367.
- [13] KIMPLE M E, BRILL A L, PASKER R L. Overview of affinity tags for protein purification[J/OL]. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013, 73: 9.9.1-9.9.23. DOI: 10.1002/0471140864.ps0909s36.
- [14] TOKUMOTO T. Nature and role of proteasomes in maturation of fish oocytes[J]. *Int Rev Cytol*, 1999, 186: 261-294.
- [15] KIDANE D, SAKKAS D, NOTTOLI T, MCGRATH J, SWEASY J B. Kinesin 5B (KIF5B) is required for progression through female meiosis and proper chromosomal segregation in mitotic cells[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8: e58585. DOI: 10.1371/journal.pone.0058585.
- [16] MATUSZCZAK E, TYLICKA M, KOMAROWSKA M D, DEBEK W, HERMANOWICZ A. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1-physiology and pathology[J]. *Cell Biochem Funct*, 2020, 38: 533-540.
- [17] SETSUIE R, WANG Y L, MOCHIZUKI H, OSAKA H, HAYAKAWA H, ICHIHARA N, et al. Dopaminergic neuronal loss in transgenic mice expressing the Parkinson's disease-associated UCH-L1 I93M mutant[J]. *Neurochem Int*, 2007, 50: 119-129.
- [18] GU Y Y, YANG M, ZHAO M, LUO Q, YANG L, PENG H, et al. The de-ubiquitinase UCHL1 promotes gastric cancer metastasis via the Akt and Erk1/2 pathways[J]. *Tumor Biol*, 2015, 36: 8379-8387.
- [19] XIANG T X, LI L L, YIN X D, YUAN C F, TAN C, SU X W, et al. The ubiquitin peptidase UCHL1 induces G₀/G₁ cell cycle arrest and apoptosis through stabilizing p53 and is frequently silenced in breast cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e29783. DOI:10.1371/journal.pone.0029783.
- [20] ZHONG J L, ZHAO M, MA Y M, LUO Q, LIU J, WANG J, et al. UCHL1 acts as a colorectal cancer oncogene via activation of the β -catenin/TCF pathway through its deubiquitinating activity[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30: 430-436.
- [21] KAITNA S, SCHNABEL H, SCHNABEL R, HYMAN A A, GLOTZER M. A ubiquitin C-terminal hydrolase is required to maintain osmotic balance and execute actin-dependent processes in the early *C. elegans* embryo[J]. *J Cell Sci*, 2002, 115: 2293-2302.
- [22] FEITOSA W B, MORRIS P L. SUMOylation regulates germinal vesicle breakdown and the Akt/PKB pathway during mouse oocyte maturation[J/OL]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2018, 315: C115-C121. DOI: 10.1152/ajpcell.00038.2018.

[本文编辑] 孙岩