

## USP22 参与雌激素受体 $\alpha$ 基因转录调控及其在血管钙化中的作用

李蕊<sup>1</sup>, 许海涛<sup>1</sup>, 王佳子<sup>3</sup>, 田文<sup>2</sup>

(1. 锦州医科大学附属第三医院心内科, 辽宁省锦州市 121000; 2. 中国医科大学附属第一医院老年病科, 辽宁省沈阳市 110001; 3. 93263 部队锦州场站医院, 辽宁省锦州市 121000)

[关键词] 血管钙化; 雌激素受体  $\alpha$ ; 去泛素化酶 USP22

[摘要] **目的** 证实去泛素化酶 USP22 参与雌激素受体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 介导的基因转录调控进而在血管钙化中发挥重要作用。**方法** 将人主动脉平滑肌细胞 (hASMC) 分别接种于正常培养基、含 1.25 mmol/L CAL、2.5 mmol/L CAL、5 mmol/L CAL 的培养基中培养 0、3、7、9 天。用 1%/2% 茜素红染色, 倒置相差显微镜观察钙化情况; 在 5 mmol/L CAL 条件下培养 0、3、7、9 天, Western blot 实验检测钙化相关蛋白骨形态发生蛋白 2 (BMP-2)、核因子  $\kappa$ B 的受体激活剂配体 (RANKL)、环氧合酶 2 (COX-2)、vitk 依赖的分泌性蛋白 (Gas6)、ER $\alpha$  的蛋白表达; 双荧光素酶报告基因实验检测在 hASMC 中, USP22 是否参与 ER $\alpha$  介导的基因转录调控; 过表达 USP22, Western blot 实验检测钙化相关因子 BMP-2、RANKL、COX-2、Gas6 和 ER $\alpha$  的蛋白表达。**结果** 在 1.25 mmol/L CAL 条件下培养到第 9 天, hASMC 有明显的钙沉积; 在 2.5 mmol/L CAL、5 mmol/L CAL 条件下培养到第 7 天 hASMC 出现钙沉积, 第 9 天有明显钙沉积。hASMC 在 5 mmol/L CAL 培养条件下, RANKL、BMP-2、USP22 蛋白表达增加。双荧光素酶报告基因实验检测结果表明, 在 hASMC 中 USP22 抑制 ER $\alpha$  介导的基因转录调控; Western blot 实验结果显示, 过表达 USP22, ER $\alpha$  的下游基因 Gas6 蛋白表达减少。**结论** 在 5 mmol/L CAL 培养的条件下, hASMC 钙化模型建立成功; USP22 可能通过抑制 ER $\alpha$  介导的下游基因 Gas6 的基因转录进而促进 hASMC 钙化。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

### The effects of deubiquitin ubiquitin-specific peptidase USP22 via participating in ER $\alpha$ on vascular calcification

LI Rui<sup>1</sup>, XU Haitao<sup>1</sup>, WANG Jiazi<sup>3</sup>, TIAN Wen<sup>2</sup>

(1. Department of Cardiovascular Medicine, the Third Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China; 2. Department of Geriatric Cardiology, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China; 3. Jinzhou Station Hospital of 93263 Army, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

[KEY WORDS] vascular calcification; estrogen receptor  $\alpha$ ; ubiquitin-specific peptidase

[ABSTRACT] **Aim** To verify the effects and mechanism of the deubiquitin enzyme USP22 participating in the estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) mediated gene transcription on vascular calcification (VC). **Methods** Human aortic smooth muscle cells (hASMC) were vaccinated respectively in the normal DMEM, 1.25 mmol/L CAL DMEM, 2.5 mmol/L CAL DMEM, 5 mmol/L CAL DMEM culture for 0, 3, 7, 9 days, with a 1%/2% Alizarin red staining, and the inverted phase contrast microscope imaging; Under the condition of 5 mmol/L CAL cultivating 0, 3, 7, 9 days, Western blot experiment was used to test the expression of calcification associated protein bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand (RANKL), cyclooxygenase-2 (COX-2), growth arrest-specific protein 6 (Gas6), ER $\alpha$ ; Luciferase double gene report experiment was used to detect USP22 whether to participate in the ER $\alpha$  mediated gene transcription in hASMC; With overexpression of USP22, Western blot test was used to detect the expression of calcification associated protein BMP-2, RANKL, COX-2, Gas6, ER $\alpha$ . **Results** hASMC had significant calcium dep-

[收稿日期] 2021-02-05

[修回日期] 2021-03-29

[基金项目] 沈阳市科技计划人口与健康专项(19-112-4-063)

[作者简介] 李蕊, 硕士, 住院医师, 研究方向为雌激素在老年血管钙化中的作用, E-mail 为 994861093@qq.com。通信作者 田文, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病发病机制, E-mail 为 dr\_wentian@163.com。

osition at the 9th day of 1.25 mmol/L CAL condition culturing. In the condition of 2.5 mmol/L CAL and 5 mmol/L CAL culture condition, hASMC had small amount of calcium deposition at the 7th day, but at the 9th day, hASMC had obvious calcium deposition; In 5 mmol/L CAL conditions to developing, the expression of the RANKL, BMP-2, USP22 protein increased; Luciferase double gene report experimental results demonstrated that USP22 inhibited ER $\alpha$  mediated target gene transcription regulation; With overexpression of USP22, Western blot test demonstrated decreased expression of Gas6 protein. **Conclusion** With the condition of 5 mmol/L CAL concentration culture time, the model of hASMC calcification is successfully established; USP22 may inhibit ER $\alpha$  mediated target genes Gas6 gene transcription, and then facilitates hASMC calcification.

血管钙化(vascular calcification, VC)是动脉粥样硬化、糖尿病、慢性肾脏病(chronic kidney diseases, CKD)等普遍存在的病理过程<sup>[1-2]</sup>,是心血管疾病独立的风险因子,增加高血压病、心衰等心血管疾病的发病率和死亡率<sup>[3]</sup>。血管钙化形成过程与骨及软骨形成相似,在其进程中,血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cell, VSMC)表型转变成成骨样细胞表型<sup>[4]</sup>,即骨形态发生蛋白2(bone morphogenetic protein-2, BMP-2)等成骨样基因表达增加<sup>[5]</sup>。钙磷盐代谢等危险因素促进血管钙化<sup>[6-7]</sup>,随着老龄化的发展,血管钙化越来越受关注。

临床研究表明,接近绝经期的女性给予雌激素疗法降低亚临床和临床冠心病的风险<sup>[8]</sup>;相关实验表明雌激素/雌激素受体 $\alpha$ (estrogen receptor  $\alpha$ , ER $\alpha$ )、血管核因子 $\kappa$ B的受体激活剂配体(receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand, RANKL)、环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)在血管钙化中发挥重要作用<sup>[9-10]</sup>;另有研究显示,雌激素/ER $\alpha$ 通过介导其靶基因vitk依赖的分泌性蛋白(growth arrest-specific protein 6, Gas6)的转录调控来抑制血管平滑肌细胞钙化<sup>[11]</sup>。综上可知,雌激素/ER $\alpha$ 在血管钙化中发挥重要抑制作用,但具体机制尚不完全清楚。在雌激素存在的条件下,被激活的ER $\alpha$ 进入细胞核内形成二聚体,同时可能招募其辅调节因子共同发挥作用;形成二聚体的ER $\alpha$ 直接或间接与下游靶基因启动子区的雌激素应答元件(estrogen response element, ERE)结合,进而诱导下游靶基因(target gene)的转录,从而发挥其生物学作用<sup>[12-13]</sup>;ER $\alpha$ 也可以通过非基因转录作用或在不依赖配体条件下通过基因转录发挥重要生物学功能<sup>[12]</sup>。

去泛素化酶USP22作为ER $\alpha$ 辅调节因子参与其介导的基因转录调控及其在乳腺癌中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。USP22是泛素蛋白酶系统中去泛素化酶(USP)家族成员之一<sup>[15]</sup>。研究证明泛素蛋白酶体系在心血管疾病的发生发展中起重要作用。USP22的去泛素化修饰主要体现在两个方面:①对组蛋白

H2A/H2B去泛素化进而参与基因转录。②对底物蛋白的去泛素化从而稳定底物蛋白<sup>[15-16]</sup>;USP22作为辅调节因子参与雄激素受体(androgen receptor, AR)介导的基因转录调控在前列腺癌中发挥作用<sup>[14]</sup>;USP22也对非组蛋白COX-2起去泛素化作用,从而维持COX-2的稳定<sup>[17]</sup>。综上可知,USP22可能在血管钙化中发挥重要作用。为进一步解析USP22及ER $\alpha$ 在血管钙化中的作用,本研究探究USP22是否通过参与ER $\alpha$ 介导的Gas6基因转录在血管钙化中发挥重要作用,进而为血管钙化的预防提供实验和理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和试剂

人主动脉平滑肌细胞(human aortic smooth muscle cells, hASMC)购买于湖南湘雅细胞库;高糖DMEM培养基(Gibco);胎牛血清(Gibco, Serapo); $\beta$ -磷酸甘油、茜素红和雌二醇(E2)(Sigma);转染试剂Lipo2000(Invitrogen)和Polyplus Transfection Reagent;表达的质粒Flag-usp22(PCDNA3-FLAG-USP22)、ERE(PGL3-GGTCA nnn TGGCC)、PRL(PRL/TK)、ER $\alpha$ (PCDNA-ER $\alpha$ );双荧光素酶报告基因检测试剂盒(Promega, Dual-Luciferase Reporter Assay System, E1960);BCA蛋白浓度测定试剂盒(凯基生物);PVDF(聚乙烯膜);BMP-2抗体(Santa Cruz)、ER $\alpha$ 抗体(CST)、USP22抗体(Sigma)、GAPDH抗体(上海康城生物)、Gas6抗体(SAB Signalway antibody)、RANKL抗体(CST)、COX-2抗体(万类生物)、Flag monoclonal antibody(Santa Cruz)、抗鼠二抗、抗兔二抗和抗羊二抗。

### 1.2 细胞培养

hASMC接种在DMEM(10%胎牛血清PBS和1/1 000青-链霉素)培养基中,置于5%CO<sub>2</sub>、37℃孵箱中培养。贴壁长到80%左右,用1 mL 0.25%胰酶消化细胞传代。建立钙化模型时,将hASMC分

别接种于含 1.25 mmol/L 的  $\beta$ -磷酸甘油和 0.625 mmol/L 氯化钙(1.25 mmol/L CAL)、2.5 mmol/L 的  $\beta$ -磷酸甘油和 1.25 mmol/L 氯化钙(2.5 mmol/L CAL)、5 mmol/L 的  $\beta$ -磷酸甘油和 2.5 mmol/L 氯化钙(5 mmol/L CAL)的钙化 DMEM 中培养 0、3、7、9 天,每 3 天更换一次培养基。

### 1.3 茜素红染色

室温下,首先用 1×磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗掉细胞多余的 DMEM 培养基,然后用 4% 多聚甲醛固定 15 min, 1×PBS 清洗细胞 1~2 次,再用 1%/2% 茜素红染料染色 5 min, 1×PBS 洗掉多余的染料,在倒置相差显微镜下成像,染成橘红色即为钙沉积。

### 1.4 转染

hASMC 悬液分别均匀加入 5 个培养皿(直径为 10 cm)中,5% CO<sub>2</sub>、37 °C 细胞培养箱中培养 20 h 左右;每个 EP 管(共 4 个)中加 1 mL 转染 Buffer(双无 DMEM),然后 2 个 EP 管分别加质粒 PC 10  $\mu$ g,另 2 个 EP 管分别加质粒 USP22 10  $\mu$ g,再每个 EP 管加入转染试剂 Lipo2000 20  $\mu$ L,涡旋混匀,瞬离;将混合物在室温下反应 15 min;然后将混合物均匀加入 4 个培养皿中,摇匀;4~8 h 后更换培养基;更换含钙的 DMEM 培养基 48 h 后可进行后续实验。

### 1.5 Western blot 实验

收取处理后的 hASMC;提取蛋白,用 BCA 方法测蛋白浓度;配置蛋白液置于浓缩胶内进行电泳,在浓缩胶时需电压 80 V,到分离胶时可调到 110 V;电泳结束后,用甲醇泡膜 3 min;准备冰袋,待转膜用;恒流 400 mA 约 2 h(4 °C 冰箱,槽内加冰袋);转膜后用 5% 牛奶(5 g 牛奶+100 mL PBST)室温孵育 1~1.5 h;切膜 GAPDH(36 kDa)26~43 kDa, BMP-2(18 kDa)10~26 kDa, RANKL(35 kDa)26~43 kDa, Gas6(75 kDa)55~90 kDa, ER $\alpha$ (55 kDa)43~90 kDa, COX-2(68 kDa)55~90 kDa, USP22(65 kDa)55~90 kDa;孵一抗 4 °C 过夜;PBST 洗 3 次,10 min/次;上二抗室温 1.5 h;PBST 洗 3 次,10 min/次;ECL 发光。A 液和 B 液按 1:1 配置发光液,混匀滴加到膜上,进行发光;Western blot 条带进行量化分析。

### 1.6 双荧光素酶报告基因实验

hASMC 铺于 24 孔板中,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养 24 h;设计空白对照组和实验组,每组 3 个平行,利用 jetPRIME™ DNA Transfection Reagent 转染试剂,每孔转入 ER $\alpha$  0.05  $\mu$ g, ERE-luci 0.25  $\mu$ g,

PRL 5 ng, PC/USP22 0.25  $\mu$ g,转染 4 h 后更换正常 DMEM 培养基并加雌激素 E2(10<sup>-6</sup>)干预;转染后加雌激素 24 h 后,用 PBS 清洗 2 遍细胞,每孔加 80  $\mu$ L lysis buffer (lysis buffer 5×用 PBS 稀释成 1×lysis buffer),在摇床上摇 20 min,充分吹打,吸 30  $\mu$ L 混合液放于双报告管中;测双报告时,先加 15  $\mu$ L luci buffer,每管测完后,再加 15  $\mu$ L stop buffer 再测一遍;分析数据。

### 1.7 统计学方法

应用 Image J 软件对蛋白条带及钙化面积进行分析;本实验所有数据采用 SPSS 软件进行统计分析,连续变量采用  $\bar{x}\pm s$  表示,计量资料两组间比较采用独立样本 *t* 检验进行差异性分析,多组间比较运用 Two-Way ANOVA 分析, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 茜素红染色验证 hASMC 钙化模型建立

1% 茜素红染色结果显示,对照组(0 mmol/L CAL)培养 0、3、7、9 天后没有染成橘红色,即没有出现钙沉积;1.25 mmol/L CAL 培养条件下,第 9 天出现明显橘红色,即有明显钙沉积出现(钙化面积明显增加);2.5 mmol/L CAL、5 mmol/L CAL 培养条件下,第 7 天出现少量钙沉积(钙化面积增加),第 9 天出现明显钙沉积(钙化面积明显增加)(图 1)。

用含 5 mmol/L CAL 的 DMEM 培养基培养 hASMC 9 天,分别用 1% 茜素红和 2% 茜素红染料染色,倒置相差显微镜下观察染色程度,结果提示,1% 茜素红为最佳 hASMC 钙化染色浓度(图 2)。

综上所述,由于加入  $\beta$ -磷酸甘油和氯化钙的时间和浓度不同,hASMC 钙化程度及细胞状态等综合因素影响,后续实验选择用含 5 mmol/L CAL 的 DMEM 培养基培养 hASMC,用 1% 茜素红染料染色。

### 2.2 hASMC 在 5 mmol/L CAL 培养条件下,随着培养时间的不同钙化相关蛋白的表达情况

hASMC 在 5 mmol/L CAL 培养条件下,促钙因子 RANKL 和 BMP-2 蛋白表达增加,提示平滑肌细胞表型向成骨细胞表型转化;炎症因子 COX-2 蛋白表达在第 3 天、第 7 天增加,但在第 9 天蛋白表达下降,再次证明炎症因子 COX-2 在 hASMC 钙化中发挥重要作用;ER $\alpha$  及其靶基因抑钙因子 Gas6 在第 3 天蛋白表达增加,但在第 7 天、第 9 天蛋白表达又减少;在 5 mmol/L CAL DMEM 培养条件下 USP22 第 3 天、第 7 天、第 9 天蛋白表达增加,提示其可能起到促进 hASMC 钙化的作用。综上所述,USP22、

ER $\alpha$  及其靶基因 Gas6 在 hASMC 钙化进程中发挥重要作用(图 3)。

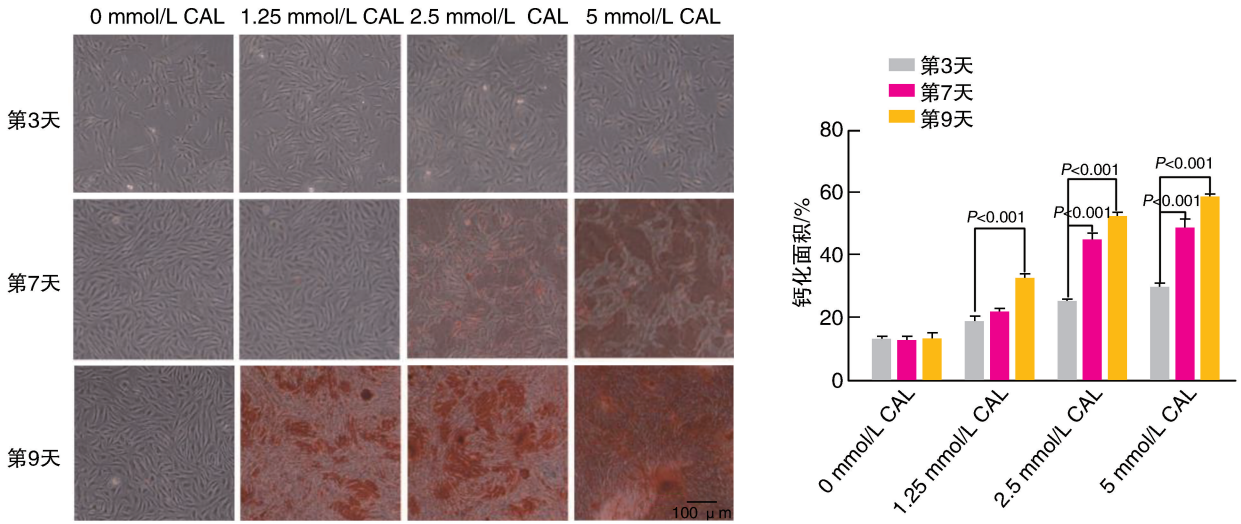


图 1. 倒置相差显微镜观察不同钙化时间和浓度梯度的 hASMC 钙化程度

Figure 1. The calcification degree of HASMC with different calcification time and concentration gradient was observed by inverted phase contrast microscope

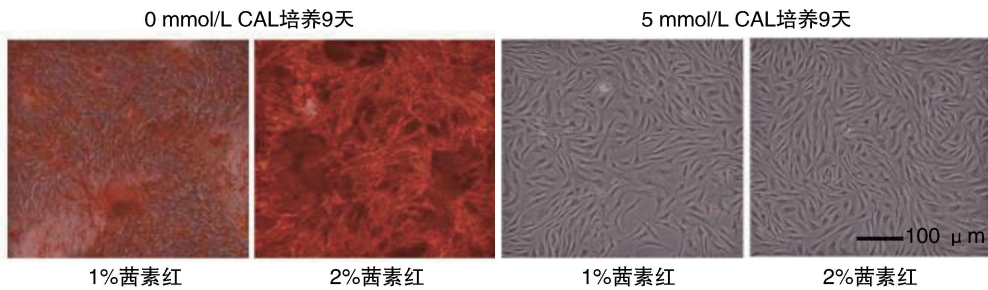


图 2. 倒置相差显微镜观察钙化的 hASMC 用不同浓度染料染色情况

Figure 2. The calcification of the different Alizarin red concentrations is observed by inverted phase contrast microscope

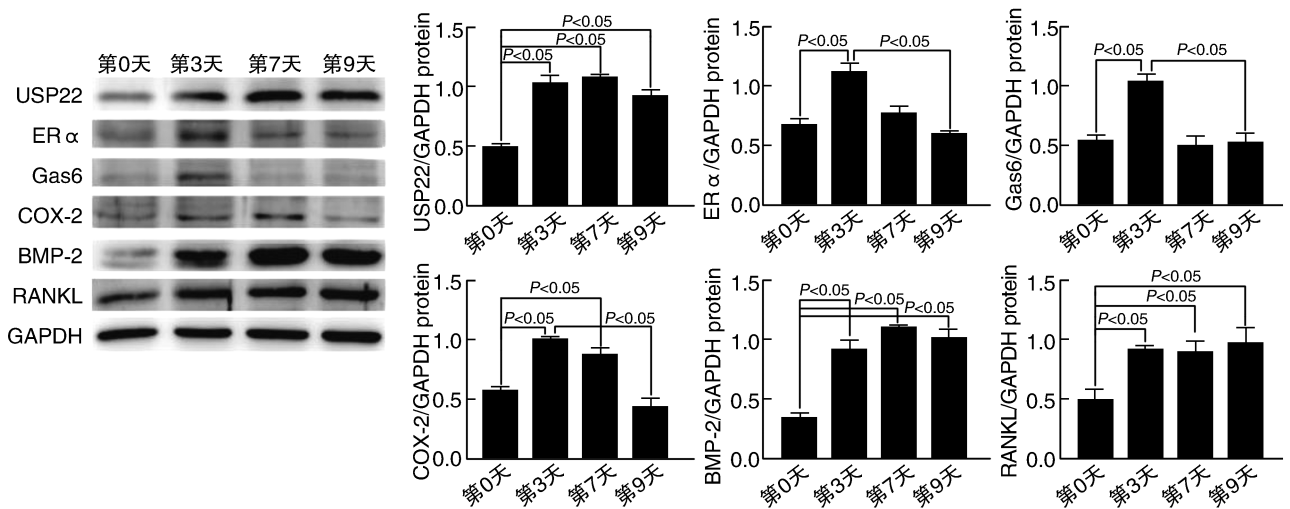


图 3. hASMC 在含 5 mmol/L CAL 的 DMEM 培养条件下, 钙化相关因子的蛋白表达

Figure 3. Protein expression of calcification related factors in hASMC cultured in DMEM containing 5 mmol/L CAL

### 2.3 去泛素化酶 USP22 对雌激素受体 $\alpha$ 介导基因转录调控的作用

为了探讨 USP22 是否参与 ER $\alpha$  介导基因转录调控作用,进而在血管细胞钙化中发挥重要作用,用 hASMC 铺 24-well 板,次日转入 ER $\alpha$ 、ERE-luci、PRL-TK(内对照)、PC 质粒(空白对照)、USP22

(0.25  $\mu$ g、0.5  $\mu$ g、1  $\mu$ g)质粒,4 h 后换液加雌激素( $10^{-6}$  mol/L)干预,24 h 后检测结果。双荧光素酶报告基因实验结果显示,在 hASMC 中,过表达 USP22 后抑制 ER $\alpha$  介导的基因转录调控,进而与 ER $\alpha$  起相反的作用(图 4)。

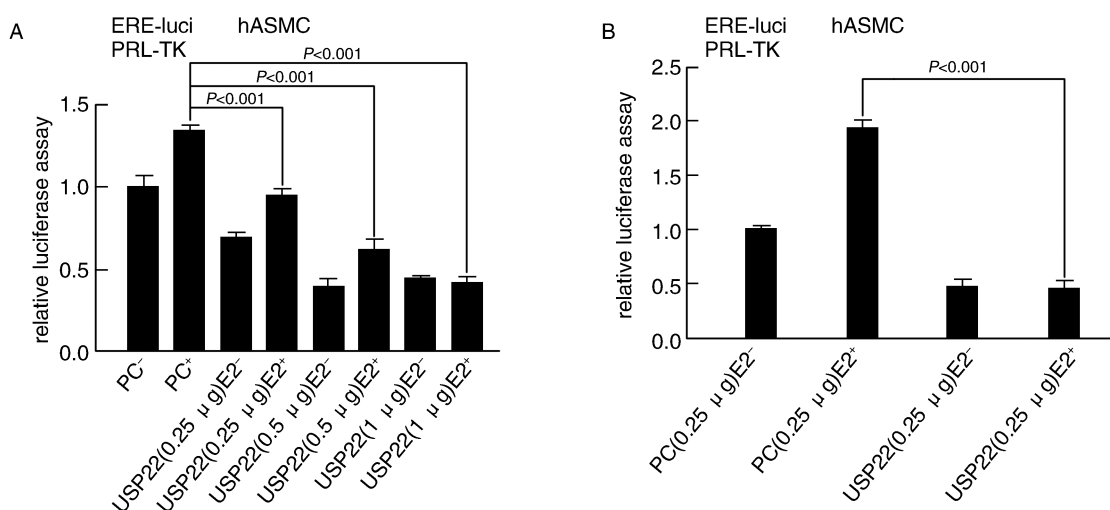


图 4. 在去泛素化酶 USP22 对雌激素受体  $\alpha$  介导的基因转录调控作用

A 为不同浓度(0.25  $\mu$ g、0.5  $\mu$ g、1  $\mu$ g)USP22 对 ER $\alpha$  介导转录作用;B 为 0.25  $\mu$ g USP22 对 ER $\alpha$  介导转录作用。

PC<sup>-</sup>为对照组不加雌激素干预,PC<sup>+</sup>为对照组加雌激素干预,E<sup>2-</sup>为不加雌激素干预,E<sup>2+</sup>为加雌激素干预。

Figure 4. The role of deubiquitin enzyme USP22 in the regulation of ER $\alpha$  mediated gene transcription

### 2.4 过表达去泛素化酶 USP22 抑制雌激素受体 $\alpha$ 介导下游基因 Gas6 蛋白表达

本研究证明在 hASMC 钙化中,ER $\alpha$  及其靶基因 Gas6 蛋白表达减少;USP22 可能促进 hASMC 钙化。因此,我们假设 USP22 作为 ER $\alpha$  辅调节因子抑制其下游靶基因 Gas6 的转录调控进而促进 hASMC 钙化。为进一步验证 USP22 对 ER $\alpha$  的作用,我们通过过表达 USP22,检测钙化相关因子 BMP-2、Gas6、COX-2、RANKL 及 ER $\alpha$  蛋白表达。我们将实验分为空白对照组(hASMC)、5 mmol/L CAL 组(CAL PC<sup>-</sup>)、5 mmol/L CAL 加雌激素 E2 ( $10^{-6}$  mol/L)干预(CAL PC E<sup>2+</sup>)组、5 mmol/L CAL 加过表达 USP22(CAL USP22 E<sup>2-</sup>)组、5 mmol/L CAL 加过表达 USP22 加 E2 ( $10^{-6}$  mol/L)干预(CAL USP22 E<sup>2+</sup>)组,并对各组进行蛋白检测,结果发现,BMP-2、RANKL 蛋白表达 CAL 组较非 CAL(hASMC)组表达增加,再次提示 hASMC 向成骨表型转化;过表达 USP22 组(CAL USP22 E<sup>2+</sup>)ER $\alpha$  及其靶基因 Gas6 蛋白表达明显下降。因此,Western blot 实验证实 USP22 可能抑制 ER $\alpha$  介导下游基因 Gas6 转录进而

促进 hASMC 钙化(图 5)。

## 3 讨论

相关临床研究提示,女性绝经前血管钙化发病率比男性低,提示女性雌激素可能在血管钙化中起到保护作用<sup>[18]</sup>;雌激素/雌激素受体  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) 在血管钙化中发挥重要的保护作用。但 ER $\alpha$  在血管钙化中的具体机制未见深入报道。泛素蛋白酶系统在心血管疾病中发挥重要作用,去泛素化酶 USP22 是泛素蛋白酶系统重要成员之一。本实验建立了 hASMC 钙化模型,并发现 USP22 可能通过抑制 ER $\alpha$  介导的基因转录在血管钙化中发挥促进作用。

ER $\alpha$  在依赖配体或非依赖配体依赖条件下,可能通过基因或快速非基因途径在血管钙化中发挥重要作用。但雌激素受体(estrogen receptor, ER)包括两个亚型:ER $\alpha$  和雌激素受体  $\beta$  (estrogen receptor  $\beta$ , ER $\beta$ )。一些研究表明,ER $\alpha$  和 ER $\beta$  主要在动脉中膜的平滑肌细胞中表达;而在钙沉积区附近 ER $\beta$  表达多于 ER $\alpha$ ;因此 ER $\beta$  表达增加并可能参与血管钙化的进程<sup>[19]</sup>。ER $\beta$  这种效应与 ER $\alpha$  相

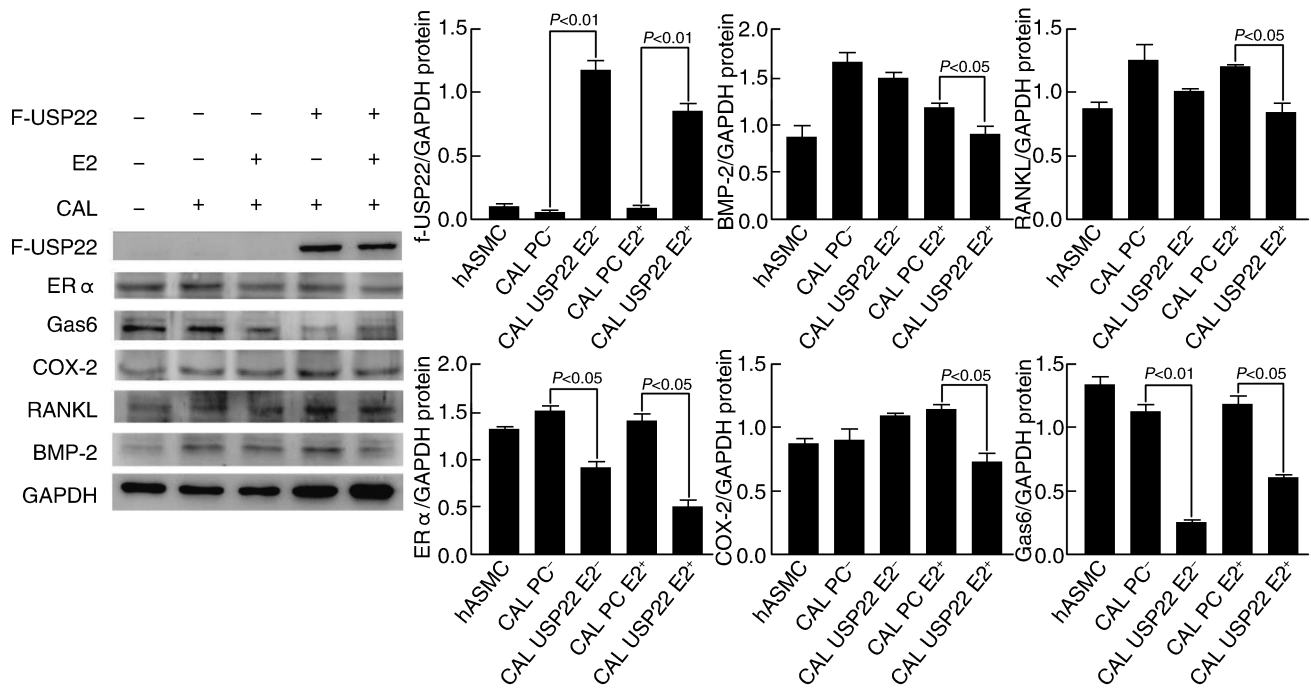


图 5. 过表达去泛素化酶 USP22 对 hASMC 钙化相关因子蛋白表达的影响

Figure 5. Effect of overexpression of deubiquitinase USP22 on the protein expression of calcification related factors in hASMC

反,可见 ER 在血管钙化中的复杂性。ER $\alpha$  与 ER $\beta$  有不同的特异性配体,所以产生不同的生物学效应。两种受体都可以与雌激素反应元件结合而启动基因的转录,但 ER $\alpha$  的转录活性大于 ER $\beta$ ,这可能与 ER $\alpha$ /ER $\beta$  值有关系<sup>[20]</sup>。在 hASMC 中,ER $\alpha$  mRNA 水平高于 ER $\beta$  mRNA 水平,ER $\alpha$  兴奋剂比 ER $\beta$  兴奋剂有更强的抑制血管钙化作用<sup>[8]</sup>,因此本实验主要研究 ER $\alpha$  在血管钙化中的作用。

本实验中用 1%/2% 茜素红染料染色进行钙化模型鉴定,是参考《Caspase-1 抑制剂对大鼠血管平滑肌细胞钙化的初步影响》研究报告中的鉴定方法,即用茜素红染料染色验证 hASMC 钙化模型建立成功<sup>[21]</sup>。钙含量检测分析进一步鉴定钙化模型中,本实验条件存在局限性,这也是要进一步完善的实验研究。本研究发现给予 5 mmol/L CAL 的 DMEM 培养基培养 hASMC,COX-2 在第 9 天蛋白表达减少,提示 COX-2 有可能发生降解;血管钙化抑制因子 Gas6、ER $\alpha$  在第 3 天蛋白表达增加,但在第 7、第 9 天又减少,分析 Gas6、ER $\alpha$  可能在第 3 天出现代偿作用;在 5 mmol/L CAL DMEM 培养条件下,BMP-2、RANKL 蛋白表达增加;BMP-2 表达增加有两种情况:一是可能直接由钙刺激引起,二是有可能钙促进 RANKL 的蛋白表达,然后 RANKL 促进下游 BMP-2 的表达<sup>[9]</sup>。BMP-2 表达的增加促进成骨基

因的表达如 Runx2,进而促进 hASMC 向成骨表型转变。

本实验证实,在 hASMC 中 USP22 抑制 ER $\alpha$  介导的基因转录调控。ER $\alpha$  由 595 个氨基酸构成,有 A/B、C、D、E 和 F 五个结构域,其中主要包括配体非依赖的转录激活 AF1 (activation function-1) 区、DNA 结合结构域 (DBD)、包含配体依赖转录激活 AF2 区的配体结合结构域 (LBD)<sup>[22]</sup>。相关研究提示,在 tamoxifen/ER $\alpha$  的动脉保护作用中,ER $\alpha$  的 AF-1 发挥重要作用<sup>[23]</sup>。但本实验中 USP22 通过影响 ER $\alpha$  的哪个功能区发挥作用尚不清楚,USP22 在血管钙化中的具体机制需要进一步研究。

过表达 USP22 实验中,过表达 USP22 组较对照组 BMP-2 蛋白表达未见明显变化,提示 USP22 抑制血管钙化不依赖于 BMP-2 发挥作用。雌激素 E2 干预组与其对照组相比,BMP-2 蛋白表达减少,提示雌激素 E2/ER $\alpha$  可能通过其他信号通路抑制 BMP-2,进而抑制血管钙化。本实验中在 CAL USP22 E2<sup>+</sup> 组较对照组 RANKL 及 COX-2 蛋白减少,具体机制有待深入研究,说明 RANKL、COX-2 在血管钙化中作用机制的复杂性。在将来的实验中,需要完善 USP22 在血管钙化中的生物学功能。综上提示,USP22 可能通过参与 ER $\alpha$  介导的基因转录调控在血管钙化中发挥促进作用。

## [参考文献]

- [1] LEE S J, LEE I K, JEON J H. Vascular calcification-new insights into its mechanism[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(8): 2685.
- [2] SHROFF R, LONG D, SHANAHAN C. Mechanistic insights into vascular calcification in CKD[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2013, 24(2): 179-189.
- [3] CHEN N X, MOE S M. Pathophysiology of vascular calcification[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2015, 13(6): 372-380.
- [4] GARCÍA-GÓMEZ M C, VILAHUR G. Osteoporosis and vascular calcification: a shared scenario[J]. *Clin Investig Arterioscler*, 2020, 32(1): 33-42.
- [5] WEI X, WU W, LI L, et al. Bone morphogenetic proteins 2/4 are upregulated during the early development of vascular calcification in chronic kidney disease[J]. *Biomed Res Int*, 2018: 8371604.
- [6] COZZOLINO M, CICERI P, GALASSI A, et al. The key role of phosphate on vascular calcification[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(4): 213.
- [7] 梁英权, 段亚君, 韩际宏. 血管钙化分子机制研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2020, 28(11): 921-929.
- [8] MARKO K I, SIMON J A. Clinical trials in menopause[J]. *Menopause*, 2018, 25(2): 217-230.
- [9] OSAKO M K, NAKAGAMI H, KOIBUCHI N, et al. Estrogen inhibits vascular calcification via vascular RANKL system; common mechanism of osteoporosis and vascular calcification[J]. *Circ Res*, 2010, 107(4): 466-475.
- [10] CHOI B G, VILAHUR G, ZAFAR M, et al. Selective estrogen receptor modulation influences atherosclerotic plaque composition in a rabbit menopause model[J]. *Atherosclerosis*, 2008, 201(1): 76-84.
- [11] NANA-OHAMAI M, SON B K, HASHIZUME T, et al. Protective effects of estrogen against vascular calcification via estrogen receptor  $\alpha$ -dependent growth arrest-specific gene 6 transactivation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(3): 429-435.
- [12] MORSELLI E, SANTOS R S, CRIOLLO A, et al. The effects of oestrogens and their receptors on cardiometabolic health[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2017, 13(6): 352-364.
- [13] HEWITT S C, WINUTHAYANON W, KORACH K S. What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract[J]. *J Mol Endocrinol*, 2016, 56(2): R55-R71.
- [14] WANG S, ZHONG X, WANG C, et al. USP22 positively modulates ER $\alpha$  action via its deubiquitinase activity in breast cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(11): 3131-3145.
- [15] MELO-CARDENAS J, ZHANG Y, ZHANG D D, et al. Ubiquitin-specific peptidase 22 functions and its involvement in disease[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28): 44848-44856.
- [16] ZHAO Y, LANG G, ITO S, et al. A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing[J]. *Mol Cell*, 2008, 29(1): 92-101.
- [17] XIAO H, TIAN Y, YANG Y, et al. USP22 acts as an oncogene by regulating the stability of cyclooxygenase-2 in non-small cell lung cancer[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 460(3): 703-708.
- [18] ZHANG B, MILLER V M, MILLER J D. Influences of sex and estrogen in arterial and valvular calcification[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 622.
- [19] CHRISTIAN R C, LIU P Y, HARRINGTON S, et al. Intimal estrogen receptor (ER) beta, but not ERalpha expression, is correlated with coronary calcification and atherosclerosis in pre-and postmenopausal women[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(7): 2713-2720.
- [20] LIU M M, ALBANESE C, ANDERSON C M, et al. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(27): 24353-24360.
- [21] 彭利静, 拓步雄, 李超民. Caspase-1 抑制剂对大鼠血管平滑肌细胞钙化的初步影响[J]. *生物技术通讯*, 2014, 25(02): 234-236.
- [22] HAMILTON K J, HEWITT S C, ARAO Y, et al. Estrogen hormone biology[J]. *Curr Top Dev Biol*, 2017, 125: 109-146.
- [23] FONTAINE C, ABOT A, BILLON-GALÉS A, et al. Tamoxifen elicits atheroprotection through estrogen receptor  $\alpha$  AF-1 but does not accelerate reendothelialization[J]. *Am J Pathol*, 2013, 183(1): 304-312.

(此文编辑 许雪梅)