

泛素特异性蛋白酶 42 调节人脂肪干细胞成骨向分化

潘 媛¹, 顾 航¹, 肖 涵¹, 赵笠君¹, 汤祎熿^{2△}, 葛雯姝^{1△}

(1. 北京大学口腔医学院·口腔医院综合二科, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 口腔生物材料和数字诊疗装备国家工程研究中心, 北京 100081; 2. 北京大学口腔医学院·口腔医院第四门诊部, 北京 100025)

[摘 要] **目的:** 探索泛素特异性蛋白酶 42 (ubiquitin-specific protease 42, USP42) 在人脂肪干细胞 (human adipose-derived stem cells, hASCs) 体内外成骨向分化中的作用。**方法:** 用慢病毒转染 hASCs, 构建敲低和过表达 USP42 的稳定转染细胞系, 通过碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色及活性定量、茜素红 S 矿化结节染色及定量, 检测实验组 (敲低组和过表达组) 及对照组在成骨诱导下 hASCs 成骨向分化能力的差异, 通过定量逆转录聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测实验组及对照组成骨相关基因的表达水平, 通过蛋白免疫印迹实验检测实验组及对照组成骨相关蛋白的表达水平, 通过裸鼠异位成骨实验评价 USP42 在 hASCs 体内成骨向分化中的作用。**结果:** 敲低组 USP42 的 mRNA 和蛋白表达显著低于对照组, 过表达组显著高于对照组。成骨诱导 7 d 后, 敲低组的 ALP 活性显著高于对照组, 过表达组显著低于对照组; 成骨诱导 14 d 后, 敲低组茜素红 S 染色显著深于对照组, 过表达组显著浅于对照组。qRT-PCR 结果显示, 成骨诱导 14 d 时, 敲低组 ALP、成骨细胞特异性转录因子 (osterix, OSX) 和 I 型胶原 (collagen type I, COL I) 的 mRNA 表达水平显著高于对照组, 过表达组显著低于对照组。蛋白免疫印迹实验结果显示, 成骨诱导 14 d 时敲低组 runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, RUNX2)、OSX 和 COL I 蛋白表达水平显著高于对照组, 过表达组显著低于对照组。裸鼠皮下移植植物苏木精-伊红染色结果显示, 敲低组类骨组织百分比较对照组显著增高。**结论:** 敲低 USP42 显著促进 hASCs 的体内外成骨向分化, 过表达 USP42 显著抑制 hASCs 的体内成骨向分化, USP42 可作为骨组织工程学潜在治疗靶点。

[关键词] 泛素特异性蛋白酶类; 人脂肪干细胞; 细胞分化; 骨和骨组织; 再生医学

[中图分类号] R318 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2024)01-0009-08

doi: 10.19723/j.issn.1671-167X.2024.01.003

Ubiquitin-specific protease 42 regulates osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells

PAN Yuan¹, GU Hang¹, XIAO Han¹, ZHAO Lijun¹, TANG Yiman^{2△}, GE Wenshu^{1△}

(1. Department of General Dentistry II, Peking University School and Hospital of Stomatology & National Center for Stomatology & National Clinical Research Center for Oral Diseases & National Engineering Research Center of Oral Biomaterials and Digital Medical Devices, Beijing 100081, China; 2. Fourth Clinical Division, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100025, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of ubiquitin-specific protease 42 (USP42) on osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells (hASCs) *in vivo* and *in vitro*. **Methods:** A combination of experiments was carried out with genetic depletion of USP42 using a lentiviral strategy. Alkaline phosphatase (ALP) staining and quantification, alizarin red S (ARS) staining and quantification were used to determine the osteogenic differentiation ability of hASCs under osteogenic induction between the experimental group (knockdown group and overexpression group) and the control group. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression levels of osteogenesis related genes in the experimental group and control group, and Western blotting was used to detect the expression levels of osteogenesis related proteins in the experimental group and control group. Nude mice ectopic implantation experiment was used to evaluate the effect of USP42 on the osteogenic differentiation of hASCs *in vivo*. **Results:** The mRNA and protein expressions of USP42 in knockdown group were significantly lower than those in control group, and those in overexpression group were significantly higher than those in control group. After 7 days of osteogenic induction, the ALP activity in the knockdown group was significantly higher than that in the control group, and ALP activity in overexpression group was significantly lower than that in control group. After 14 days of osteogenic induction, ARS staining was significantly

deeper in the knockdown group than in the control group, and significantly lighter in overexpression group than in the control group. The results of qRT-PCR showed that the mRNA expression levels of ALP, osterix (OSX) and collagen type I (COL I) in the knockdown group were significantly higher than those in the control group after 14 days of osteogenic induction, and those in overexpression group were significantly lower than those in control group. The results of Western blotting showed that the expression levels of runt-related transcription factor 2 (RUNX2), OSX and COL I in the knockout group were significantly higher than those in the control group at 14 days after osteogenic induction, while the expression levels of RUNX2, OSX and COL I in the overexpression group were significantly lower than those in the control group. Hematoxylin-eosin staining of subcutaneous grafts in nude mice showed that the percentage of osteoid area in the knockdown group was significantly higher than that in the control group. **Conclusion:** Knockdown of USP42 can significantly promote the osteogenic differentiation of hASCs *in vitro* and *in vivo*, and overexpression of USP42 significantly inhibits *in vivo* osteogenic differentiation of hASCs, and USP42 can provide a potential therapeutic target for bone tissue engineering.

KEY WORDS Ubiquitin-specific proteases; Human adipose-derived stem cells; Cell differentiation; Bone and bones; Regenerative medicine

骨缺损为多种口腔疾病治疗的主要难题,如何促进骨缺损的愈合是口腔医学亟需解决的问题,近年来,骨组织工程学的发展为解决该问题指出了方向,其中干细胞成骨向分化一直是骨再生领域的核心问题。间充质干细胞是骨再生修复的组织工程技术中最有前途的细胞类型,人脂肪干细胞(human adipose-derived stem cells, hASCs)和人骨髓干细胞(human bone marrow-derived stem cells, hBMSCs)是间充质干细胞的主要来源^[1-2]。其中hASCs由于来源广泛、采集容易、患者易于接受和易于扩增等优点,成为骨组织工程中极具吸引力的一种成体干细胞来源。因此,研究hASCs成骨向分化的调控机制有助于寻找新的靶点,具有重要临床应用价值^[3-4]。

细胞的分化由遗传和表观遗传机制决定,这种基因调控方式在干细胞的分化及功能调控中的作用逐渐被证实^[5-7]。表观调控通过调节干细胞分化及影响成骨细胞的增殖和成熟,参与成骨的各个方面。泛素化修饰是一种重要的表观遗传调控方式,其对干细胞的分化方向也有着重要的调控作用^[8]。泛素化过程是可逆的,通过蛋白质去泛素化酶可实现去泛素化^[9]。泛素特异性蛋白酶(ubiquitin-specific protease, USP)家族是目前已知的去泛素化酶中成员最多的一类,亦属半胱氨酸蛋白酶,本课题组前期研究表明 USP7 可以促进 hASC 的成骨向分化^[10]。USP42 也是 USP 家族中的一员,研究表明 USP42 可以通过结合组蛋白 H2B 并使其去泛素化来调控其转录活性^[11],且 USP42 还能选择性地参与抑癌基因 p53 的保护和修复功能,从而对肿瘤性疾病的研究有所帮助^[12]。另有研究表明 USP42 是 Wnt/ β -连环蛋白途径的负调控因子,可促进 Wnt 受体的清除^[13],提示 USP42 可能参与干细胞分化的调节,但具体作用机制尚不清楚。本研究通过敲低和过表达 hASCs 中的

USP42 基因,研究 USP42 对成骨向分化能力的影响,以揭示 USP42 调控 hASCs 成骨分化的作用。

1 资料与方法

1.1 细胞及主要试剂

本实验采用的细胞为 3 株来源于不同人的 hASCs (P0),货号 7510,购自美国 ScienCell 公司。Dulbecco 改良 Eagle 培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶及青-链霉素双抗购自美国 Gibco 公司。敲低 USP42 (short hairpin RNA USP42, shUSP42)慢病毒购自上海吉玛制药技术有限公司,过表达 USP42 (wildtype USP42, WT-USP42)慢病毒购自上海吉凯基因科技有限公司。LipofectamineTM RNAiMAX Transfection Reagent、Lipofectamine 2000 及总 RNA 抽提试剂(TRIzolTM)购自美国 Invitrogen 公司,无水乙醇、异丙醇、氯仿购自北京化工厂试剂公司,FastStart Universal SYBR Green Master (ROX)购自美国 Roche 公司,RNA 逆转录试剂盒购自日本 Takara 公司。RIPA 裂解缓冲液购自北京普利莱公司,预染蛋白 Marker 及二喹啉甲酸(bicinehonin acid, BCA)蛋白定量测试盒购自美国 Thermo Scientific 公司。茜素红 S (alizarin red S, ARS)购自美国 Sigma 公司,BCIP/NBT 碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP/AKP)显色试剂盒购自北京康为世纪公司,AKP 测试盒购自南京建成生物工程研究所。鼠源抗人 USP42 抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,货号 sc-390604;兔源抗人 runt 相关转录因子 2 (runt-related transcription factor 2, RUNX2)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,货号 CST-8486;兔源抗人 I 型胶原(collagen type I, COL I)抗体购自美国 Proteintech 公司,货号 14695-1-AP;鼠源抗人成骨细胞特异性转录因子(osterix,

OSX)抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,货号 sc-393325;兔源抗人甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自英国 Abcam 公司,货号 ab9485。Synthograft™ β -磷酸三钙(β -tricalcium phosphate, β -TCP)购自美国 Bicon 公司,货号 260-400-125。BALB/C 裸鼠购自北京大学医学部实验动物科学部。

1.2 细胞培养

hASCs 在增殖培养基中,置于 37 °C、5% (体积分数) CO₂ 恒温培养箱中培养。增殖培养基的成分为 DMEM + 10% (质量分数) FBS + 1% (质量分数) 青-链霉素,每 2 ~ 3 天更换一次培养基,待细胞汇合度达到 80% ~ 90% 时进行细胞传代,本实验使用的是 P4 代的 hASCs。

1.3 慢病毒构建及细胞转染

构建敲低 USP42 (shUSP42-1、shUSP42-2) 及对照组 (shNC) 慢病毒、过表达 USP42 (WT-USP42) 及对照组 (Vector) 慢病毒。按转染复数 (multiplicity of infection, MOI) 50 加入病毒悬液,再加入终浓度 5 mg/L 的聚凝胺以增强转染效率。24 h 后更换增殖培养基,72 h 后用 5 ~ 10 mg/L 嘌呤霉素筛选 3 d,得到稳定转染 shUSP42-1、shUSP42-2、shNC、WT-USP42 和 Vector 的 hASCs。通过倒置荧光显微镜观察细胞表达绿色荧光蛋白的情况来评估转染效率。

1.4 体外成骨诱导

hASCs 生长至 70% 汇合状态时进行成骨诱导。

成骨诱导培养基成分为 DMEM + 10% FBS + 1% 青-链霉素 + 10 mmol/L β -甘油磷酸钠 + 0.2 mmol/L 抗坏血酸 + 100 nmol/L 地塞米松。

1.5 ALP 染色与活性定量检测

敲低组、过表达组和对照组分别在增殖培养基和成骨诱导培养基中培养 7 d,用 BCIP/NBT ALP 显色试剂盒行 ALP 染色实验,用 AKP 试剂盒行 ALP 定量实验。BCA 法测定总蛋白含量,以定量读数除以总蛋白含量代表 ALP 活性。

1.6 ARS 染色和钙离子浓度测定

敲低组、过表达组和对照组分别在增殖培养基和成骨诱导培养基中培养 14 d,用 1% (质量分数) ARS 染液 [1% (质量分数) KOH 调节 pH 值至 4.2] 行 ARS 矿化检测。向染色后的各孔板加入 100 nmol/L 十六烷基吡啶溶解与钙整合的 ARS 染剂,于酶标仪 562 nm 波长下测量光密度。

1.7 定量逆转录聚合酶链反应

敲低组、过表达组及对照组 hASCs 提取总 RNA,测定浓度后按照 Takara 反转录试剂盒说明书合成 cDNA,按 SYBR Green 说明书进行定量逆转录聚合酶链反应 (quantitative reverse transcription PCR, qRT-PCR),以 GAPDH 为内参基因,检测 USP42、ALP、OSX 和 COL I 基因的 mRNA 表达。PCR 反应条件为:95 °C 热启动 10 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火延伸 1 min,变性、退火及延伸共 40 循环。引物序列见表 1。

表 1 实验相关 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Sequences of experimentally relevant qRT-PCR primers

Gene	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
GAPDH	GGAGCGAGATCCCCTCAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG
USP42	AATCTTCAGACCCATCAGCCT	AGAACCTGCATCCATGCTCC
ALP	ATGGGATGGTGTCTCCACA	CCACGAAGGGGAAGCTGTC
OSX	CCTCTGCGGGACTCAACAAC	TAAAGGGGCTGGATAAGCAT
COL I	TGCTCCCAAGGCTAACAGCG	AACACCAACAGGGCCAGGCT

GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; USP42, ubiquitin-specific protease 42; ALP, alkaline phosphatase; OSX, osterix; COL I, collagen type I.

1.8 蛋白免疫印迹实验

敲低组、过表达组及对照组 hASCs 提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,计算上样量为 20 ~ 30 μ g 蛋白的体积,加入 5 \times 上样缓冲液使其终浓度为 1 \times ,再用 PBS 补齐,99 °C 煮 5 min。根据目的蛋白相对分子质量制备合适浓度的分离胶及浓缩胶,上样,蛋白在浓缩胶中时电压为 80 V,进入分离胶后转为 120 V。聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜冰浴下 100 V 恒压转膜 90 min,5% (质量分数) 脱脂牛奶室温封闭 1 h。一抗 4 °C 孵育过夜,

二抗室温孵育 1 h,将发光液孵育在膜的蛋白侧,曝光拍照。

1.9 裸鼠背部皮下移植

本实验通过北京大学生物医学伦理委员会审查批准 (批准号:LA2021009),实验用 BALB/C 裸鼠 (6 周龄,雌性) 共 15 只。分别取第 4 代慢病毒转染后的 hASCs (shNC、shUSP42-1、shUSP42-2) 体外成骨诱导 7 d,用胰酶消化,培养基重悬。在 1.5 mL 冻存管中放入含 10⁶ 个细胞的细胞悬液及 40 mg β -TCP 支架材料,置于 37 °C 恒温摇床中轻摇 1 h,再于

120 × g 转速下离心 5 min, 弃去上清液, 收集细胞支架复合体。在无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级动物手术室中, 取 BALB/C 裸鼠腹腔注射 1% (质量分数) 戊巴比妥钠麻醉, 碘伏消毒, 于背部中线切开, 做一个 2 cm 左右的纵行切口, 向皮下两侧充分钝性分离出植入腔。每组随机植入 10 个位点, 植入后对位缝合, 分笼饲养, 8 周后取材。

1.10 统计学方法

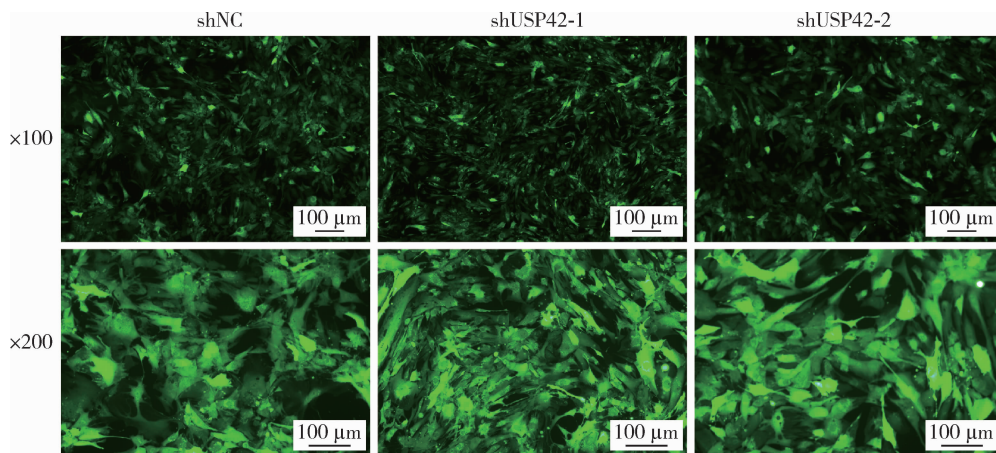
使用 GraphPad Prism 6 软件进行统计学分析。当数据符合正态分布时, 以平均值 ± 标准差表示, 采用双侧独立样本 *t* 检验比较两组间差异, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 比较多组间差异, 并采用

Tukey 事后检验; 当数据不符合正态分布时, 以中位数表示, 使用非参数检验比较。 *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 USP42 敲低和过表达效率的检测

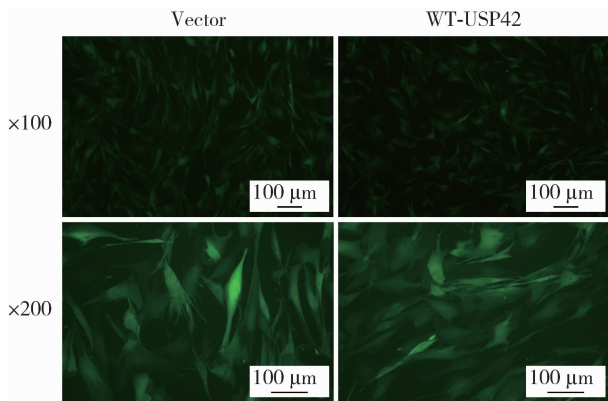
USP42 实验组及对照组慢病毒转染 hASCs 细胞后, 在倒置荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白在细胞中的表达情况 (图 1、2)。qRT-PCR 结果显示, 敲低组中 USP42 基因的 mRNA 表达量显著低于对照组, 过表达组中 USP42 基因的 mRNA 表达量显著高于对照组, 蛋白免疫印迹实验结果与 qRT-PCR 结果一致 (图 3、4)。



shNC, short hairpin RNA normal control; shUSP42, short hairpin RNA ubiquitin-specific protease 42; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 1 敲低组 (shUSP42-1、shUSP42-2) 和对照组 (shNC) 慢病毒转染 72 h 后 hASCs 中绿色荧光蛋白的表达情况

Figure 1 Expression of green fluorescent protein in hASCs after 72 h transfection with lentivirus in knockdown group (shUSP42-1, shUSP42-2) and control group (shNC)



WT-USP42, wildtype ubiquitin-specific protease 42; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 2 过表达组 (WT-USP42) 和对照组 (Vector) 慢病毒转染 72 h 后 hASCs 中绿色荧光蛋白的表达情况

Figure 2 Expression of green fluorescent protein in hASCs after 72 h transfection with lentivirus in overexpression group (WT-USP42) and control group (Vector)

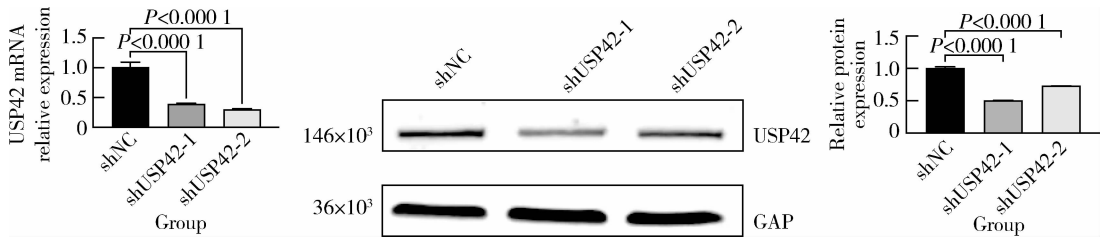
2.2 敲低 USP42 对 hASCs 体外成骨向分化的影响

将敲低组及对照组慢病毒转染后的 hASCs 分

别在普通增殖培养基和成骨诱导培养基中培养 7 d, ALP 染色结果显示敲低组较对照组的蓝紫色染色明显变深, 对应的 ALP 定量分析结果显示, 敲低组较对照组的 ALP 活性显著上升 (图 5)。

将敲低组及对照组慢病毒转染后的 hASCs 分别在普通增殖培养基和成骨诱导培养基中培养 14 d, ARS 染色结果显示敲低组较对照组的钙沉积结节多, 且红色染色明显更深, 对应的 ARS 定量分析结果与染色结果一致 (图 6)。

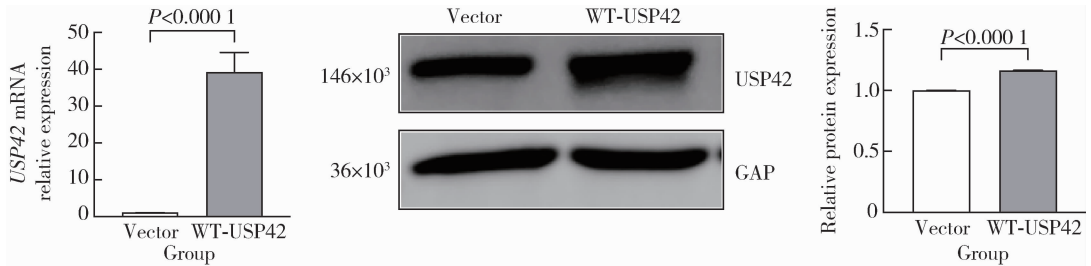
将敲低组及对照组慢病毒转染后的 hASCs 分别在普通增殖培养基和成骨诱导培养基中培养 14 d, 提取总 RNA, 使用 qRT-PCR 检测成骨相关基因 *ALP*、*OSX* 和 *COL 1* 的表达情况。结果显示, 敲低组 *ALP*、*OSX* 和 *COL 1* 的 mRNA 表达水平较对照组升高 (图 7)。蛋白免疫印迹实验结果显示, 在成骨诱导 14 d 后, 敲低组的 RUNX2、OSX 和 COL I 蛋白表达水平较对照组升高 (图 8)。



USP42, ubiquitin-specific protease 42; shNC, short hairpin RNA normal control; shUSP42, short hairpin RNA USP42; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; qRT-PCR, quantitative reverse transcription PCR.

图 3 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹实验检测 USP42 的敲低效率

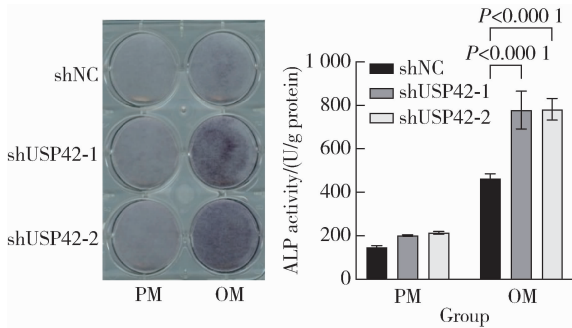
Figure 3 Detection of knockdown efficiency of USP42 by qRT-PCR and Western blotting



USP42, ubiquitin-specific protease 42; WT-USP42, wildtype USP42; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; qRT-PCR, quantitative reverse transcription PCR.

图 4 qRT-PCR 和蛋白免疫印迹实验检测 USP42 的过表达效率

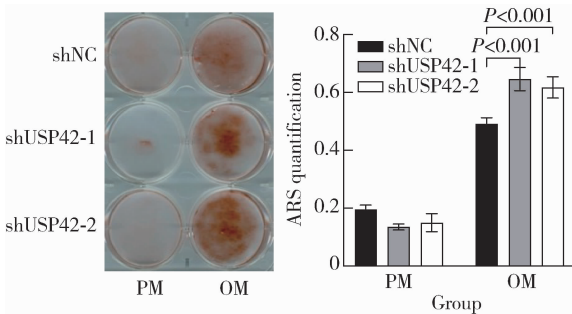
Figure 4 Detection of overexpression efficiency of USP42 by qRT-PCR and Western blotting



shNC, short hairpin RNA normal control; USP42, ubiquitin-specific protease 42; shUSP42, short hairpin RNA USP42; PM, proliferation medium; OM, osteogenic medium; ALP, alkaline phosphatase; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 5 hASCs 敲低 USP42 后成骨诱导 7 d 时 ALP 染色及活性定量

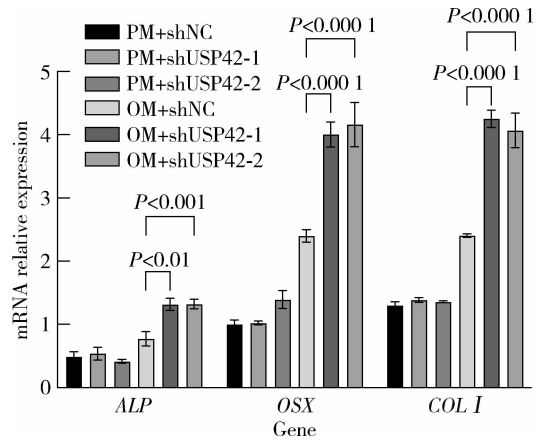
Figure 5 ALP staining and quantification of activity at 7 days of osteogenic induction after USP42 knockdown by hASCs



shNC, short hairpin RNA normal control; USP42, ubiquitin-specific protease 42; shUSP42, short hairpin RNA USP42; PM, proliferation medium; OM, osteogenic medium; ARS, alizarin red S; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 6 hASCs 敲低 USP42 后成骨诱导 14 d 时 ARS 染色及定量

Figure 6 ARS staining and quantification at 14 days of osteogenic induction after USP42 knockdown by hASCs



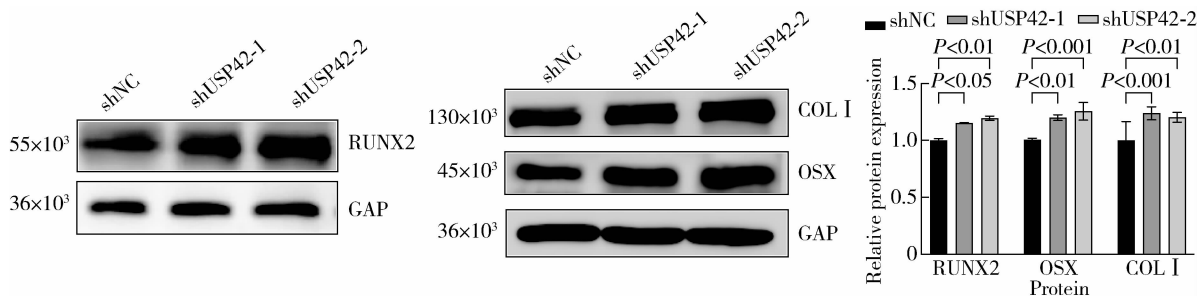
PM, proliferation medium; OM, osteogenic medium; shNC, short hairpin RNA normal control; USP42, ubiquitin-specific protease 42; shUSP42, short hairpin RNA USP42; ALP, alkaline phosphatase; OSX, osterix; COL I, collagen type I; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 7 hASCs 敲低 USP42 后成骨诱导 14 d 时 ALP、OSX 和 COL I 的 mRNA 表达水平

Figure 7 mRNA expression levels of ALP, OSX, and COL I at 14 days of osteogenic induction after USP42 knockdown by hASCs

2.3 过表达 USP42 对 hASCs 体外成骨向分化的影响

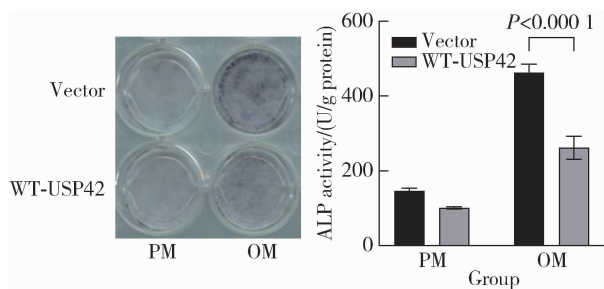
过表达及对照慢病毒转染后的 hASCs 分别在普通增殖培养基和成骨诱导培养基中培养 7 d 时的 ALP 染色结果显示,过表达组较对照组的蓝紫色染色明显变浅,对应的 ALP 定量分析结果显示,过表达组较对照组的 ALP 活性显著下降(图 9);培养 14 d 时,过表达组较对照组的钙沉积结节少,且红色染色明显更浅,对应的 ARS 定量分析结果与染色结果一致(图 10)。



shNC, short hairpin RNA normal control; USP42, ubiquitin-specific protease 42; shUSP42, short hairpin RNA USP42; RUNX2, runt-related transcription factor 2; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; COL I, collagen type I; OSX, osterix; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 8 hASCs 敲低 USP42 后成骨诱导 14 d 时 RUNX2、OSX 和 COL I 的蛋白表达水平

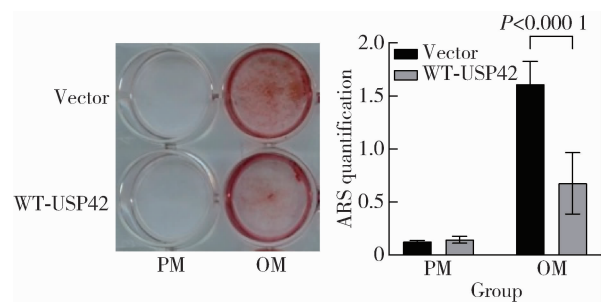
Figure 8 Protein expression levels of RUNX2, OSX, and COL I at 14 days of osteogenic induction after USP42 knockdown by hASCs



USP42, ubiquitin-specific protease 42; WT-USP42, wildtype USP42; PM, proliferation medium; OM, osteogenic medium; ALP, alkaline phosphatase; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 9 hASCs 过表达 USP42 后成骨诱导 7 d 时 ALP 染色及活性定量

Figure 9 ALP staining and quantification of activity at 7 d of osteogenic induction after hASCs overexpression of USP42

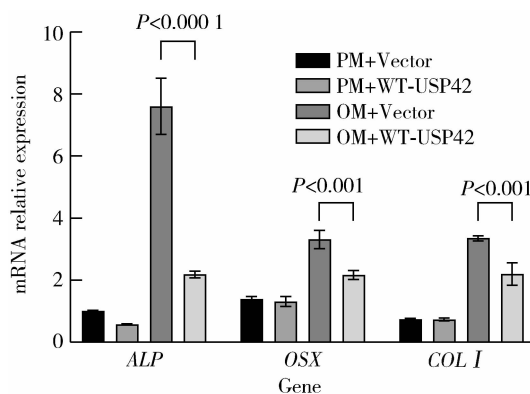


USP42, ubiquitin-specific protease 42; WT-USP42, wildtype USP42; PM, proliferation medium; OM, osteogenic medium; ARS, alizarin red S; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 10 hASCs 过表达 USP42 后成骨诱导 14 d 时 ARS 染色及定量

Figure 10 ARS staining and quantification at 14 d of osteogenic induction after hASCs overexpression of USP42

将过表达及对照慢病毒转染后的 hASCs 分别在普通增殖培养基和成骨诱导培养基中培养 14 d, 提取总 RNA, 使用 qRT-PCR 检测成骨相关基因 *ALP*、*OSX* 和 *COL I* 的表达情况。结果显示, 过表达重组 *ALP*、*OSX* 和 *COL I* 的 mRNA 表达水平较对照组降低(图 11)。Western blotting 结果显示, 在 hASCs 成骨诱导 14 d 后, 过表达组的 RUNX2、OSX 和 COL I 蛋白表达水平较对照组降低(图 12)。



USP42, ubiquitin-specific protease 42; WT-USP42, wildtype USP42; PM, proliferation medium; OM, osteogenic medium; ALP, alkaline phosphatase; OSX, osterix; COL I, collagen type I; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 11 hASCs 过表达 USP42 后成骨诱导 14 d 时 ALP、OSX 和 COL I 的 mRNA 表达水平

Figure 11 mRNA expression levels of ALP, OSX, and COL I at 14 d of osteogenic induction after hASCs overexpression of USP42

2.4 敲低 USP42 对 hASCs 体内成骨能力的影响

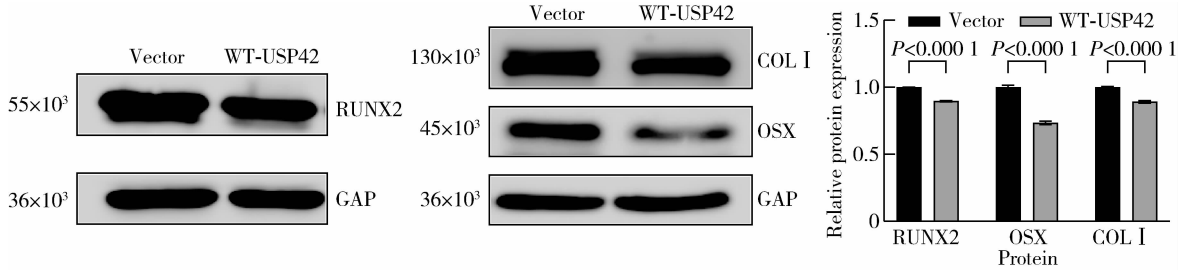
将敲低及对照慢病毒转染后的 hASCs 分别与 β -TCP 骨粉复合植入裸鼠背部皮下, 8 周后收取植入的复合构建体。苏木精-伊红染色结果结合 ImageJ 软件对类骨组织百分比的计算显示, 敲低组类骨组织百分比显著高于对照组(图 13)。

3 讨论

目前的研究表明, 干性调控因子协同染色质重塑复合物、组蛋白修饰或染色质结合因子的翻译后修饰, 在干细胞命运决定过程中发挥着重要作用^[14-15]。泛素化修饰作为蛋白质翻译后修饰的重要形式之一, 它的动态变化调节着蛋白质稳定性、蛋白质定位和信号传递等过程, 进而对细胞周期、增殖、凋亡和分化等产生重要影响^[16-18]。干细胞成骨向分化受多种因素及信号通路调控, 其中泛素化修

饰作为表观遗传调控,通过作用于多种信号转导通路来精密调控干细胞的成骨向分化。其涉及到的主要信号通路包括:转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)/骨形态生成蛋白 (bone morphogenetic protein, BMP)、Wnt/ β -连环蛋白途径 (Wnt/ β -catenin pathway)、刺猬信号通路 (hedgehog

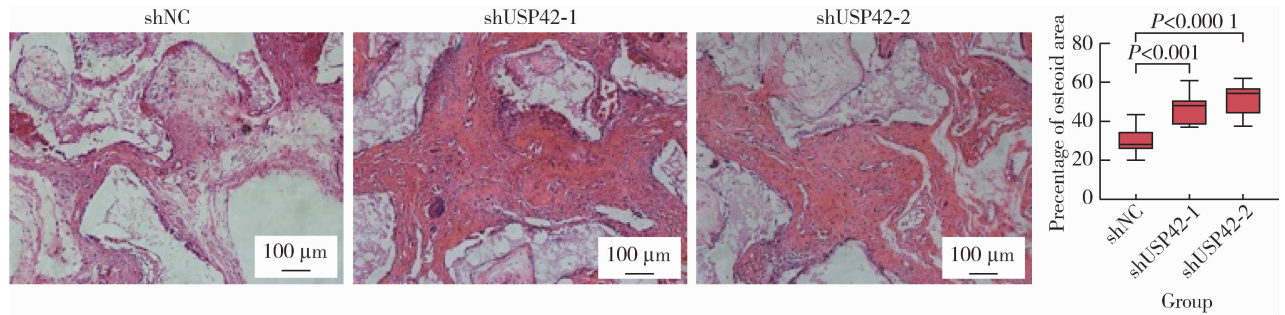
signaling pathway, Hh)、成纤维生长因子 (fibroblast growth factor, FGF)、核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 和甲状旁腺素 (parathyroid hormone, PTH) 信号通路等^[19-21]。此外,泛素化修饰也通过调控转录因子(如 RUNX2),对于干细胞的成骨向分化起到重要作用^[22]。



USP42, ubiquitin-specific protease 42; WT-USP42, wildtype USP42; RUNX2, runt-related transcription factor 2; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; COL I, collagen type I; OSX, osterix; hASCs, human adipose-derived stem cells.

图 12 hASCs 过表达 USP42 后成骨诱导 14 d 时 RUNX2、OSX 和 COL I 的蛋白表达水平

Figure 12 Protein expression levels of RUNX2, OSX, and COL I at 14 d of osteogenic induction after hASCs overexpression of USP42



shNC, short hairpin RNA normal control; shUSP42, short hairpin RNA ubiquitin-specific protease 42.

图 13 苏木精-伊红染色 ($\times 200$) 及骨组织形态计量学分析

Figure 13 Hematoxylin-eosin staining ($\times 200$) and bone morphometrics analysis

回顾以往关于 USP42 的研究可知,在 USP42 的 N 端有一个泛素水解酶结构域,可去除组蛋白 H2B 和 p53 的泛素化^[11]。有研究表明,USP42 可通过去泛素化酶活性保护 Wnt 受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 6 (low-density lipoprotein receptor protein 6, LRP6) 和卷曲蛋白 (frizzled, FZD) 免受泛素依赖性的清除,从而抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路^[13]。一项关于日本脑炎病毒的研究显示,USP42 可以通过去泛素化来稳定细胞内 E3 泛素连接酶三基序蛋白 21 (tripartite-motif protein 21, TRIM21),并提高人类小胶质细胞中寡腺苷酸合成酶 1 (oligoadenylate synthetase 1, OAS1) 的水平^[23]。有研究表明,USP42 是一种核斑点蛋白,可以与 DEAH-box 解旋酶 9 (Asp-Glu-Ala-Asp-box helicase 9, DHX9) 相互作用并参与同源重组^[24]。另有研究认为,USP42 可以通过控制剪接体成分多效调节因子 1 (pleiotropic regulator 1, PLRG1) 的相分离来调节各种 mRNA 的剪接事

件,提示 USP42 具有作为癌症治疗靶点的潜力^[25]。但与其他可能调节成骨的去泛素化酶相比,关于 USP42 的底物、生物学功能和相关分子机制的研究较少。

为明确 USP42 对 hASCs 成骨向分化的作用,本研究通过慢病毒转染 hASCs,使细胞内 USP42 表达水平降低或升高,检测 hASCs 体内外成骨能力的变化。通过体外实验对成骨过程中各个时间点的成骨指标进行定性和定量分析,包括成骨早期指标 RUNX2、成骨前中期指标 ALP 及成骨晚期指标 OSX、COL I 和矿化物沉积,研究结果表明,敲低 USP42 可促进 hASCs 的体外成骨分化,过表达 USP42 可抑制 hASCs 的体外成骨分化。此外,体内裸鼠皮下异位植入实验结果表明,USP42 敲低导致 hASCs 和 β -TCP 支架复合体内新骨形成范围增大。以上体内外实验证明了 USP42 的敲低可以促进 hASCs 成骨分化,但关于 USP42 的底物和相关的分子机制仍需进一步研究。

综上所述,本研究通过体内外研究发现 USP42 敲低促进 hASCs 成骨向分化能力,USP42 过表达抑制 hASCs 成骨向分化能力,表明 USP42 可能是 hASCs 成骨分化的抑制基因。本研究结论有助于为 hASCs 成骨分化提供有效的手段,为骨组织工程学提供潜在的治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明 潘媛:提出研究思路,设计研究方案,收集、分析、整理数据,撰写论文;顾航:分析、整理数据;肖涵、赵笠君:文献检索,修订论文;汤祎熲、葛雯姝:总体把关,审定论文并提供资金支持。

参考文献

- [1] Lin H, Sohn J, Shen H, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing [J]. *Biomaterials*, 2019, 203: 96 – 110.
- [2] Bunpetch V, Zhang Z Y, Zhang X, et al. Strategies for MSC expansion and MSC-based microtissue for bone regeneration [J]. *Biomaterials*, 2019, 196: 67 – 79.
- [3] 刘云松,周永胜,葛雯姝,等. 原代人脂肪基质细胞体内成骨能力的检测[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2012, 44(1): 55 – 58.
- [4] 周永胜,刘云松,葛雯姝,等. 人脂肪基质细胞在骨组织工程学中的应用[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2012, 44(1): 160 – 162.
- [5] Snyder NA, Silva GM. Deubiquitinating enzymes (DUBs): Regulation, homeostasis, and oxidative stress response [J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(3): 101077.
- [6] Ge F, Li Y, Yuan T, et al. Deubiquitinating enzymes: Promising targets for drug resistance [J]. *Drug Discov Today*, 2022, 27(9): 2603 – 2613.
- [7] Wang X. Stem cells in tissues, organoids, and cancers [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(20): 4043 – 4070.
- [8] Guo YC, Zhang SW, Yuan Q. Deubiquitinating enzymes and bone remodeling [J]. *Stem Cells Int*, 2018, 2018: 3712083.
- [9] Suresh B, Lee J, Kim H, et al. Regulation of pluripotency and differentiation by deubiquitinating enzymes [J]. *Cell Death Differ*, 2016, 23(8): 1257 – 1264.
- [10] Tang YM, Lv LW, Li WY, et al. Protein deubiquitinase USP7 is required for osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2017, 8(1): 186.
- [11] Hock AK, Vigneron AM, Vousden KH. Ubiquitin-specific peptidase 42 (USP42) functions to deubiquitylate histones and regulate transcriptional activity [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(50): 34862 – 34870.
- [12] Hock AK, Vigneron AM, Carter S, et al. Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42 [J]. *EMBO J*, 2011, 30(24): 4921 – 4930.
- [13] Giebel N, De Jaime-Soguero A, Garcia Del Arco A, et al. USP42 protects ZNRF3/RNF43 from R-spondin-dependent clearance and inhibits Wnt signalling [J]. *EMBO Rep*, 2021, 22(5): e51415.
- [14] Orkin SH, Hochedlinger K. Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming [J]. *Cell*, 2011, 145(6): 835 – 850.
- [15] Atlasi Y, Stunnenberg HG. The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development [J]. *Nat Rev Genet*, 2017, 18(11): 643 – 658.
- [16] Reyes-Thruu FE, Wilkinson KD. Polyubiquitin binding and disassembly by deubiquitinating enzymes [J]. *Chem Rev*, 2009, 109(4): 1495 – 1508.
- [17] Frezza M, Schmitt S, Dou QP. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway: An emerging concept in cancer therapy [J]. *Curr Top Med Chem*, 2011, 11(23): 2888 – 2905.
- [18] Das T, Shin SC, Song EJ, et al. Regulation of deubiquitinating enzymes by post-translational modifications [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4028.
- [19] Sun X, Xie Z, Ma Y, et al. TGF-beta inhibits osteogenesis by up-regulating the expression of ubiquitin ligase SMURF1 via MAPK-ERK signaling [J]. *J Cell Physiol*, 2018, 233(1): 596 – 606.
- [20] Rahman MS, Akhtar N, Jamil HM, et al. TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: Regulation of osteoblastogenesis and bone formation [J]. *Bone Res*, 2015, 3: 15005.
- [21] Fan Y, Hanai JI, Le PT, et al. Parathyroid hormone directs bone marrow mesenchymal cell fate [J]. *Cell Metab*, 2017, 25(3): 661 – 672.
- [22] Lim KE, Park NR, Che X, et al. Core binding factor beta of osteoblasts maintains cortical bone mass via stabilization of Runx2 in mice [J]. *J Bone Miner Res*, 2015, 30(4): 715 – 722.
- [23] Mishra R, Kumawat KL, Basu A, et al. Japanese encephalitis virus infection increases USP42 to stabilize TRIM21 and OAS1 for neuroinflammatory and anti-viral response in human microglia [J]. *Virology*, 2022, 573: 131 – 140.
- [24] Matsui M, Sakasai R, Abe M, et al. USP42 enhances homologous recombination repair by promoting R-loop resolution with a DNA-RNA helicase DHX9 [J]. *Oncogenesis*, 2020, 9(6): 60.
- [25] Liu S, Wang T, Shi Y, et al. USP42 drives nuclear speckle mRNA splicing via directing dynamic phase separation to promote tumorigenesis [J]. *Cell Death Differ*, 2021, 28(8): 2482 – 2498.

(2023-10-08 收稿)
(本文编辑:赵 波)