

· 实验技术及其应用 ·

# PSME1 调控蛋白酶体功能保护内皮细胞的实验研究

刘畅<sup>1,2</sup>, 谢骞<sup>1</sup>, 刘芬<sup>1</sup>, 张兴<sup>1</sup>, 房彬彬<sup>1</sup>, 张重阳<sup>1</sup>, 皮启星<sup>1</sup>, 杨毅宁<sup>3</sup>, 李晓梅<sup>1</sup>

1. 新疆医科大学第一附属医院心脏中心, 新疆 乌鲁木齐 830054;

2. 阜外华中心血管病医院, 国家心血管病中心华中分中心, 河南省人民医院心脏中心, 河南 郑州 450000;

3. 新疆维吾尔自治区人民医院心内科

**摘要:**目的 探讨蛋白酶体激活因子亚基 1(PSME1)对内皮细胞蛋白酶体功能及抗氧化应激能力的影响。方法 利用重组腺病毒载体(Ad-PSME1)将靶基因转入人脐静脉内皮细胞(HUVEC)以构建过表达 PSME1 的内皮细胞。使用免疫印记(Western blot)检测蛋白酶体相关蛋白的表达水平,斑点印迹(dot blot)检测蛋白质羰基化水平,免疫共沉淀(Co-IP)检测 PSME1 与蛋白酶体激活因子亚基 2(PSME2)之间的相互作用,荧光底物法检测蛋白酶体活性,环己酰亚胺(CHX)追踪实验检测蛋白质降解速率,脉冲追踪实验检测绿色荧光蛋白-泛素-蛋白酶体系统报告蛋白(GFPu)的降解速度,2,4-二硝基苯肼(DNPH)衍生化检测法检测蛋白质羰基化水平。结果 HUVEC 中 PSME1 过表达使 PSME2 的蛋白表达增多且半衰期延长,糜蛋白酶样( $\beta 5$ )蛋白酶体活性及腺苷三磷酸(ATP)依赖性蛋白水解功能增强,同时显著缩短 GFPu 半衰期( $P < 0.05$ );对内源性 UPS 底物(AKT、GATA4 和 PTEN)的稳定性及 19S 和 20S 复合物(RPN2、RPT6 和 PSMB5)丰度无显著影响( $P > 0.05$ );此外,PSME1 过表达显著降低过氧化氢诱导的蛋白质羰基化水平,增强内皮细胞的抗氧化应激能力( $P < 0.05$ )。结论 PSME1 过表达可稳定 PSME2,增强 11S 调节颗粒的功能,提高蛋白酶体对错误折叠和氧化损伤蛋白质的降解能力,从而保护内皮细胞。

**关键词:** PSME1;蛋白酶体;心血管疾病;氧化应激;蛋白质稳态

中图分类号:R329.2 文献标志码:A 文章编号:1003-8507(2025)15-2835-08

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202504022

## Experimental study on the role of PSME1 in regulating proteasome function and protecting endothelial cells

LIU Chang\*, XIE Qian, LIU Fen, ZHANG Xing, FANG Bin-bin, ZHANG Chong-yang, PI Qi-xing, YANG Yi-ning, LI Xiao-mei  
\*Heart Center, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of proteasome activator PSME1 on proteasome function and antioxidant stress capacity in endothelial cells. **Methods** An adenoviral vector (Ad-PSME1) was used to transduce the target gene into human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) to establish PSME1-overexpressing endothelial cells. Western blot was used to detect the expression levels of proteasome-related proteins; dot blot was employed to assess protein carbonylation levels; co-immunoprecipitation (Co-IP) was performed to examine the interaction between PSME1 and PSME2; fluorogenic substrate assays were used to determine proteasome activity; cycloheximide (CHX) chase experiments were conducted to evaluate protein degradation rates; pulse-chase assays were applied to measure the degradation rate of GFPu; and DNPH derivatization was used to detect protein carbonylation levels. **Results** Overexpression of PSME1 in HUVECs increased the expression and prolonged the half-life of PSME2, enhanced chymotrypsin-like ( $\beta 5$ ) proteasome activity and ATP-dependent proteolytic function, and significantly shortened the half-life of misfolded protein GFPu ( $P < 0.05$ ). No significant effects were observed on the stability of endogenous UPS substrates (AKT, GATA4, and PTEN) or on the abundance of the 19S and 20S proteasome complexes (RPN2, RPT6, and PSMB5) ( $P > 0.05$ ). Additionally, PSME1 overexpression significantly reduced hydrogen peroxide-induced protein carbonylation levels and enhanced the antioxidant stress capacity of endothelial cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Overexpression of PSME1 stabilizes PSME2, enhances the function of the 11S regulatory particle, and improves the proteasome's ability to degrade misfolded and oxidatively damaged proteins, thereby protecting endothelial cells.

**Keywords:** PSME1; Proteasome; Cardiovascular diseases; Oxidative stress; Protein homeostasis

**基金项目:** 国家自然科学基金(8216020109);中央引导地方科技发展专项资金(ZYYD2022C21);新疆维吾尔自治区重点研发计划(2022B03022-2);新疆维吾尔自治区“天山英才”培养计划(2023TSYCLJ0035)

**作者简介:** 刘畅(1995—),男,博士,医师,研究方向:心血管基础与临床;谢骞(1996—),男,博士在读,研究方向:冠心病临床与基础研究;刘畅与谢骞为共同第一作者

**通信作者:** 李晓梅, E-mail: Lixm505@163.com

泛素-蛋白酶体系统(ubiquitin-proteasome System, UPS)作为细胞内蛋白质降解的关键途径,负责清除异常及大多数正常细胞内蛋白质<sup>[1]</sup>。蛋白酶体由多个亚基组成,以多种不同的形式存在于细胞内,其中 26S 蛋白酶体是最主要的存在形式,它由 20S 核心颗粒和 19S 调节颗粒结合而成<sup>[2-3]</sup>。此外,20S 核心颗粒可与 11S 调节颗粒或 PA200 调节颗粒结合,形成不同类型的蛋白酶体复合物<sup>[4-5]</sup>。11S 调节颗粒是由蛋白酶体激活因子亚基 1、2 或 3 (PSME1、PSME2 或 PSME3)组合而成,它们在不需 ATP 的情况下即可与 20S 核心颗粒结合成 20S-PSME1/2 或 20S-PSME3 复合物,进而对 20S 的蛋白质降解功能发挥调控作用<sup>[6-7]</sup>。研究表明,蛋白酶体功能障碍可能与内皮功能相关<sup>[8-9]</sup>。有研究表明,11S 在细胞内蛋白质降解中的作用可能大于在抗原加工中的作用<sup>[6]</sup>,这一发现强调了其在维持细胞内蛋白质稳态中的作用可能更加关键。尽管 PSME1 在抗原呈递以外的生理功能仍不明确,但也有观察性研究报道,PSME1 可能与人体血管系统的动脉粥样硬化和内膜增生相关<sup>[10]</sup>。此外,蛋白酶体功能不足已在多种人类心血管疾病动物模型中观察到<sup>[11-13]</sup>,这为其在血管健康中的潜在作用提供了线索。鉴于此,本研究通过相关分子生物学实验,旨在为异常蛋白质的降解研究提供有效思路,同时为后续研究及临床应用提供潜在的理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 主要材料** 人脐静脉内皮细胞(HUVEC)购于深圳豪地华拓生物科技有限公司。胎牛血清购于美国 Gibco 公司。ECM 内皮细胞专用培养基购于美国 Sciencell 公司。PSME1、PSME2、蛋白酶体亚基  $\beta 5$  (PSMB5)、GATA 结合蛋白 4 (GATA4)、蛋白激酶 B (AKT)、磷酸酶和张力蛋白同源物(PTEN)、蛋白酶体调节亚基 2(RPN2)、蛋白酶体调节亚基 6(RPT6)、二硝基苯酚(DNP)、绿色荧光蛋白(GFP)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗及辣根过氧化物酶(HRP)二抗均购于美国 Abcam 公司。蛋白质羰基化氧化检测(OxyBlot)蛋白质氧化检测试剂盒购于德国 Merck KGaA 公司,用于检测蛋白酶活性的三肽底物 Suc-LLVY-AMC( $\beta 5$ )、Z-LLE-AMC( $\beta 2$ )和 Ac-RLLR-AMC( $\beta 1$ )购于美国 MCE 公司。PSME1、绿色荧光蛋白-泛素-蛋白酶体系统报告蛋白(GFPu)和  $\beta$ -Gal 过表达重组腺病毒购于上海莱福思畔基因科技有限公司。细胞培养箱、离心机和超低温冰箱购于美国 Thermo Scientific 公司。倒置显微镜购于德国 Carl Zeiss 公司,电泳仪、凝胶成像仪和垂直电泳槽购于美国 Bio-Rad 公司。PVDF 膜购于美国 Millipore 公司。

**1.2 细胞培养及重组腺病毒感染** 将 HUVEC 接种到含 10%胎牛血清和 1%抗生素的 ECM 培养基中,并置于 37 °C,含 5%二氧化碳和饱和湿空气培养箱中孵育,镜下观察细胞密度约 80%时,按 1:3 的比例传代。镜下观察细胞密度约 60%时,更换无血清培养基,选择优化的感染复数 5 MOI 添加病毒,在 37 °C,含 5%二氧化碳和饱和湿空气培养箱孵育 6~8 h 后更换新鲜培养基,以去除含病毒的培养液,继续在 37 °C,含 5%二氧化碳和饱和湿空气培养箱培养,观察细胞生长状态及污染情况。

**1.3 蛋白质印记(Western blot)实验检测 PSME1 等相关蛋白的表达水平** 当观察到细胞生长到密度约为 80%时,使用细胞刮刀从细胞培养瓶的底部收集细胞,离心得到细胞沉淀;加入预冷的裂解液(5  $\mu$ l 磷酸酶抑制剂、5  $\mu$ l 蛋白酶抑制剂、5  $\mu$ l PMSF)以提取蛋白;随后进行蛋白浓度测定与蛋白质变性;配制蛋白分离胶;蛋白上样按照每孔 30  $\mu$ g,电泳分离蛋白后进行转膜;转膜完毕后 TBST 洗膜 3 遍,随后用含有 5%的脱脂牛奶的 TBST 溶液在室温封闭 1 h;封闭结束后,将 PVDF 膜置于稀释好的一抗中,4 °C 摇床孵育 12 h;TBST 洗膜 3 遍,随后孵育二抗,室温摇床孵育 1 h;配制 ECL 发光液,均匀滴在 PVDF 膜上,通过 BIO-RAD 凝胶成像仪进行显影成像后存档。

**1.4 斑点印迹(dot blot)实验检测蛋白质羰基化水平** 裁剪适当大小的 PVDF 膜并画出数个 1 cm  $\times$  1 cm 的方格,甲醇活化后取 3  $\mu$ l 蛋白样品滴加到方格中央后置于 37 °C 恒温箱中自然晾干;使用预先配制好的 BSA 溶液室温孵育 1 h 进行封闭;加入一抗工作液,4 °C 孵育 12 h;TBST 洗膜 3 遍,随后孵育二抗,室温孵育 1 h;TBST 洗膜 3 遍后,在膜上均匀滴加 DAB 显色液,显影成像后存档。

**1.5 免疫共沉淀实验检测蛋白质相互作用** 收集细胞进行裂解,4 °C 进行高速离心后收集上清液,即为总蛋白。将其与抗 PSME1 抗体或抗 PSME2 抗体以及偶联了蛋白 A/G 的琼脂糖珠一起在 4 °C 下孵育过夜。然后将沉淀产物通过 SDS-PAGE 进行分离,通过 Western blot 实验方法检测 PSME1 和 PSME2 的表达。

**1.6 荧光底物法检测蛋白酶体活性** 在 96 孔黑色透明底板中接种细胞( $1 \times 10^4$  个/孔,设 3 个副孔)。分别构建对照组(control)和 PSME1 过表达组(PSME1 OE),同时使用 2.5  $\mu$ g/ml 寡霉素处理细胞以构建无 ATP 的培养环境。置于 37 °C,含 5%二氧化碳和饱和湿空气培养箱中孵育约 24 h;细胞贴壁后使用 PBS 缓冲液冲洗 3 遍,加入 RIPA 裂解液 100  $\mu$ l/孔,4 °C 孵育 10 min 以促进蛋白释放,使用移液枪轻柔吹打,确保裂解均匀;加入 25  $\mu$ mol/L 的三肽底物

Suc-LLVY-AMC、Z-LLE-AMC 和 Ac-RLR-AMC 分别用于检测糜蛋白酶样( $\beta 5$ )、半胱天冬酶样( $\beta 1$ )和胰蛋白酶样( $\beta 2$ )活性;37 °C恒温箱中避光孵育 30 min 后,使用荧光酶标仪(激发波长 380 nm,发射波长 460 nm)检测荧光强度。酶活性为荧光强度和孵育时间之比,以对照组为基准进行归一化计算得出相对酶活性(AU)。

**1.7 环己酰亚胺(CHX)追踪实验检测 PSME2 蛋白质半衰期** 将 HUVEC 培养于添加有浓度为 50  $\mu\text{M}$  的 CHX 的培养基中,构建表达空病毒的对照组(Ad- $\beta$ -Gal)和过表达 PSME1 的实验组(Ad-PSME1)。在不同的时间点(0、2、6 和 12 h)收集细胞,并通过 Western blot 实验检测相应时间的 PSME2 蛋白水平,以评估过表达 PSME1 对 PSME2 蛋白降解速率的影响。

**1.8 脉冲追踪实验检测 GFPu 的降解速度** 将 HUVEC 与 Ad-GFPu 和 Ad- $\beta$ -Gal 以及 Ad-PSME1 共感染,将细胞分为对照组(CTL)和 PSME1 过表达组(Ad-PSME1)。观察细胞密度达到 70%左右时,使用无甲硫氨酸培养基饥饿处理 30 min,随后在培养基中加入 35S-Met 进行标记 15 min 以标记新合成蛋白。紧接着,弃去放射性培养基,PBS 冲洗两次后更换含非放射性 Met/Cys 的追踪培养基。在不同的时间点(0、5、10、15、30 和 60 min)收集细胞后用 RIPA 裂解液进行裂解。用抗 GFP 抗体检测 GFPu 的蛋白水平。

**1.9 2,4-二硝基苯肼(DNPH)衍生化检测法检测蛋白质羰基化水平** 细胞经 Ad-PSME1 或 Ad- $\beta$ -Gal 感染 48 h 后,用  $\text{H}_2\text{O}_2$ (200  $\mu\text{M}$ , 2 h)处理诱导细胞氧化应激<sup>[14]</sup>。使用 OxyBlot 蛋白质氧化检测试剂盒评估

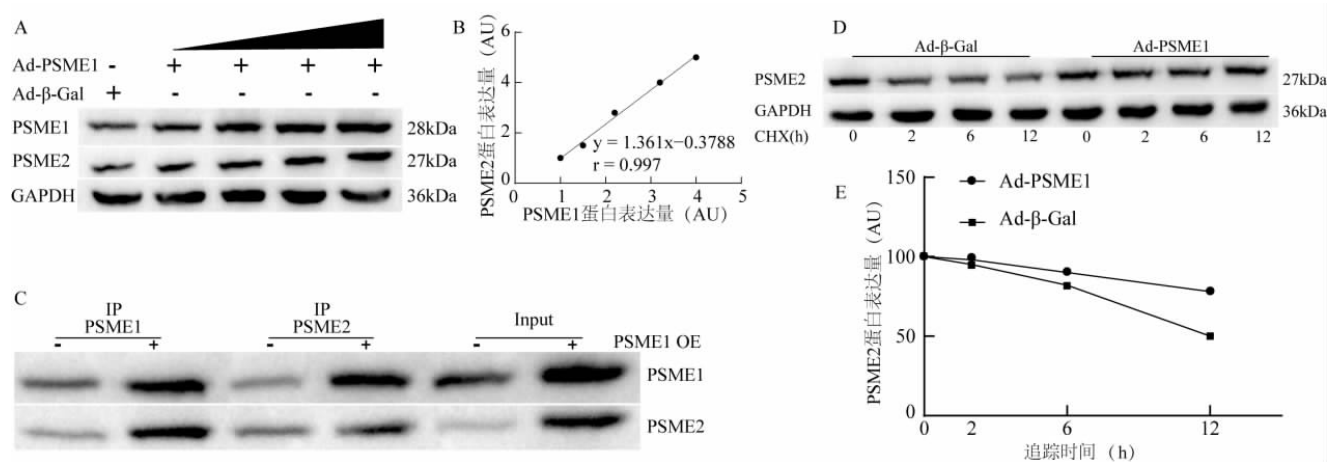
蛋白质羰基化,蛋白羰基化是氧化应激的标志之一。依照说明书进行蛋白提取、DNPH 衍生化等步骤。然后将 DNPH 标记的蛋白质用 Western blot 以及 dot blot 实验加载到 PVDF 膜上,使用 DNP 抗体检测 DNPH 衍生化蛋白质。DNPH 信号表示蛋白质羰基化水平。

**1.10 统计分析** 应用 SPSS 25.0 和 Graphpad Prism 8.0.2 软件对数据进行统计分析,所有实验均重复三次。计量资料使用(均数  $\pm$  标准差)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 在 HUVEC 过表达 PSME1 可上调 11S 调节颗粒的 PSME2** Western blot 实验结果显示,PSME1 的表达水平呈现剂量依赖性增加。同时观察到 PSME1 的表达增加伴随着 PSME2 表达水平的升高。进一步的分析显示,PSME1 和 PSME2 蛋白水平的增加呈显著正相关( $r=0.997$ )。为了验证 PSME1 对 PSME2 表达的影响,免疫共沉淀实验结果表明,与对照 HUVEC 相比,Ad-PSME1 感染的细胞中,PSME1 与 PSME2 之间的结合显著增加。此外,PSME2 与 PSME1 结合的水平也同步提升,PSME1 过表达可促进 HUVEC 中 11S 调节颗粒的 PSME2 的表达水平升高。见图 1A、B。

CHX 追踪实验结果表明,PSME1 过表达显著降低了 PSME2 蛋白的降解速率,见图 1C。在对照细胞中,PSME2 的半衰期约为 12 h,而在 PSME1 过表达的细胞中,PSME2 的半衰期延长至约 28 h。这一结果进一步支持了 PSME1 过表达提高了 PSME2 的蛋白稳定性。



注:A为 Western blot 检测不同剂量 Ad-PSME1 处理下 HUVEC 中 PSME1 和 PSME2 的表达情况;B为 PSME1 与 PSME2 表达水平之间的相关性分析;C为 Co-IP 实验验证 PSME1 与 PSME2 蛋白互作。

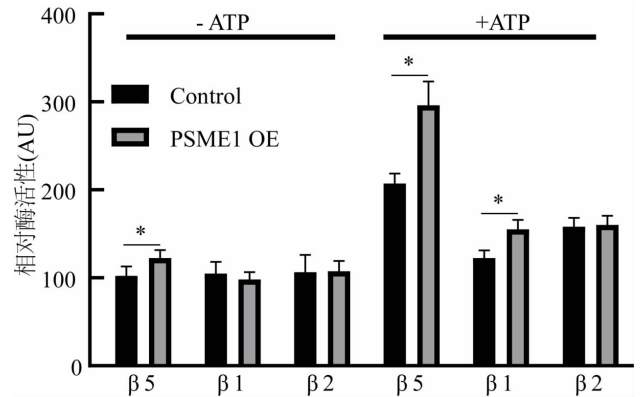
图 1 PSME1 过表达提高 PSME2 蛋白水平并抑制其降解

Figure 1 PSME1 overexpression increases PSME2 protein levels and inhibits its degradation

**2.2 PSME1 上调增强蛋白酶体功能及 UPS 介导的蛋白质降解** 体外蛋白酶体活性检测结果显示,与感染了 Ad-β-Gal 的对照细胞相比,PSME1 过表达显著增强了不依赖于 ATP 的蛋白酶体糜蛋白酶样(β5)活性( $P < 0.05$ ),但对半胱天冬酶样(β1)活性和胰蛋白酶样(β2)活性无明显影响。此外,ATP 处理显著提高 PSME1 过表达组和对照组中 β5、β1 和 β2 的活性。在依赖 ATP 的蛋白酶体活性方面,PSME1 过表达组的 β5 活性和 β1 活性显著高于对照组,但 β2 活性未见明显变化,见图 2。这些结果表明,PSME1 过表达可能对蛋白酶体的蛋白水解功能具有积极调控作用。

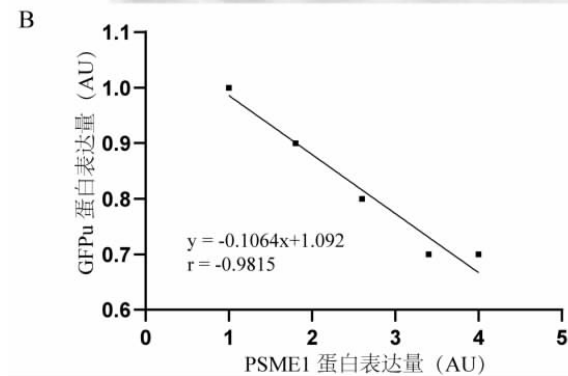
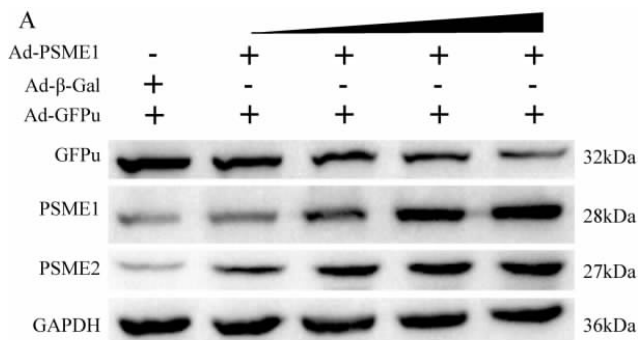
GFPu 是 UPS 的替代底物“绿色荧光蛋白泛素-蛋白酶体系统报告基因(GFP UPS reporter)”,由 GFP 和降解决定子 CL-1 融合而成的短肽,当细胞内蛋白酶体的功能正常时,GFPu 可被蛋白酶体快速降解。若蛋白酶体功能受抑,GFP 则会发生累积。本研究将 HUVEC 分别与重组腺病毒载体 Ad-GFPu、Ad-β-Gal 及不同滴度(1~20 MOI)的 Ad-PSME1 共感染 48 h。Western blot 实验结果显示,PSME1 过表达可导致 GFPu 蛋白水平呈剂量依赖性降低,且 GFPu 蛋白水平与 PSME1 及 PSME2 蛋白水平呈显著负相关( $r =$

$-0.9815$ )。此外,放射性蛋白脉冲追踪实验结果显示,GFPu 蛋白的半衰期由对照组 14 min 显著缩短至 PSME1 OE 内皮细胞 7 min,见图 3。即 PSME1 过表达使 GFPu 半衰期缩短约 1 倍( $P < 0.05$ ),该结果表明 PSME1 过表达可增强内皮细胞蛋白酶体的蛋白水解功能。



注:β1、β2、β5 分别代表蛋白酶体的不同催化亚基;β1 具有半胱天冬酶样活性,β2 具有胰蛋白酶样活性,β5 具有糜蛋白酶样活性;\*表示  $P < 0.05$ 。

图 2 PSME1 过表达对 HUVEC 细胞中蛋白酶体活性的影响  
Figure 2 Effects of PSME1 overexpression on the activity of proteasome in HUVEC cells



注:A 为 PSME1 过表达以剂量依赖性方式降低 GFPu 蛋白水平;B 为 GFPu 蛋白水平与 PSME1 呈负相关;C 为 Western blot 检测在不同追踪时间下 PSME1 过表达与对照细胞中 GFPu 蛋白水平;D 为 GFPu 蛋白半衰期的比较分析。

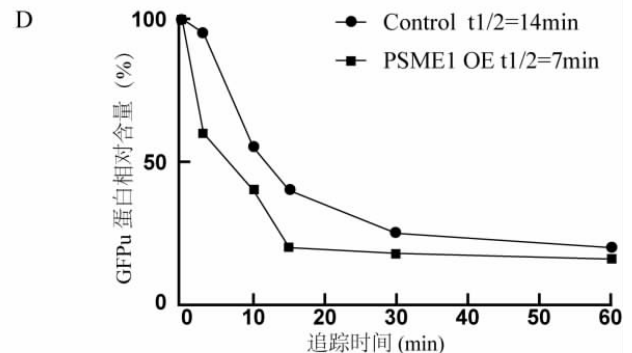
图 3 PSME1 过表达对 UPS 的替代底物 GFPu 蛋白水平的影响

Figure 3 Effects of PSME1 overexpression on the protein level of GFPu, an alternative substrate of the UPS

**2.3 PSME1 过表达不影响内源性 UPS 底物的稳定性及 19S/20S 丰度** 通过 Western blot 技术检测 HUVEC 中典型内源性 UPS 底物 (AKT、GATA4 和 PTEN) 的蛋白水平。实验结果显示,HUVEC 过表达

PSME1 后,AKT、GATA4 和 PTEN 的表达水平无明显改变,见图 4。该结果表明 PSME1 过表达不会影响 HUVEC 内源性 UPS 底物的稳定性。

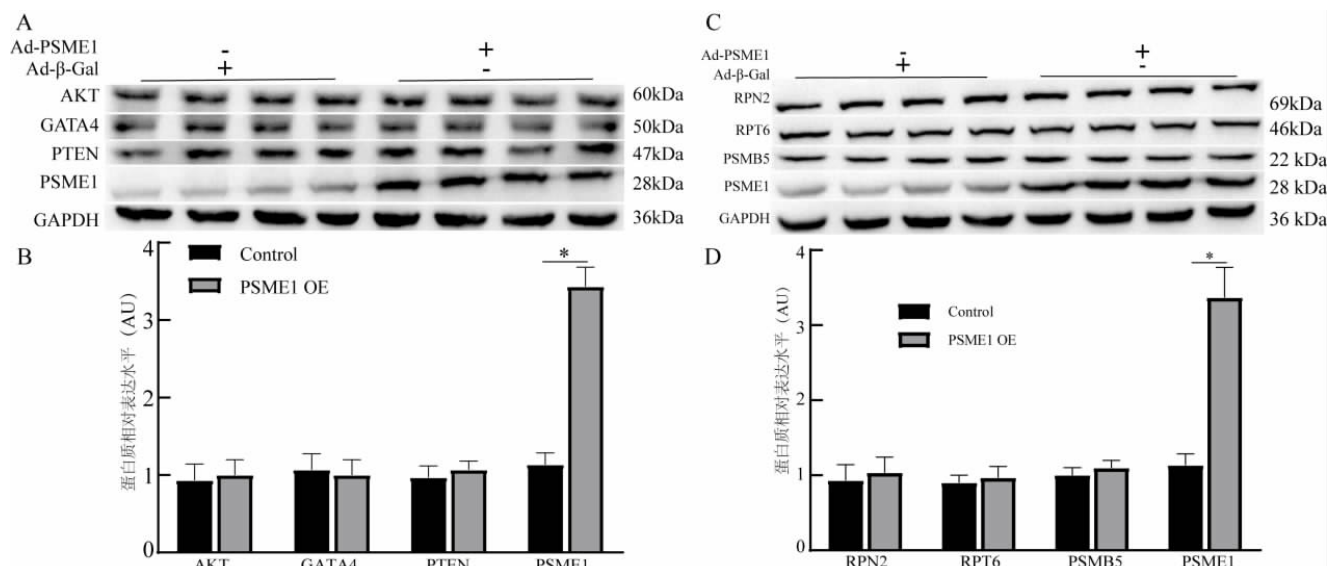
通过 Western blot 技术检测 PSME1 过表达的



HUVEC 中 19S 和 20S 代表性亚基丰度的影响, 见图 4。实验结果显示, 与对照组相比, PSME1 过表达并未显著改变 19S 的亚基 RPN2 和 RPT6 的水平, 也未影响 20S 亚基 PSMB5 的水平。该结果表明 PSME1 过表达不会影响 19S 和 20S 复合物的整体丰度。

**2.4 PSME1 过表达具有抗氧化应激的作用** 在细胞密度为 80% 时, 使用 50  $\mu$ M 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 4 h, 通过 dot blot 和 Western blot 技术检测蛋白羰基化水平, 见图 5。Dot blot 实验结果显示, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理的内皮细胞 DNPH 信号显著增强 ( $P < 0.01$ ), 提示细胞内总蛋白羰基化水平升高。而 PSME1 过表达的内皮细胞,

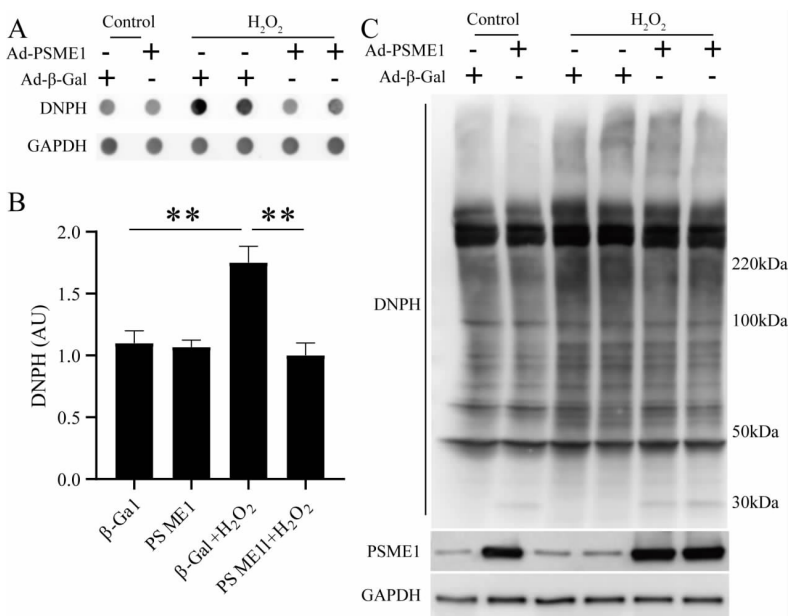
DNPH 信号减弱 ( $P < 0.01$ ), 说明 PSME1 可能促进异常蛋白降解从而减少羰基化水平。Western blot 实验结果进一步证实, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理使得 50 ~ 220 kDa 范围内 DNPH 信号显著增强, 即蛋白质的羰基化水平显著上升, 而 PSME1 过表达可有效抑制该上升趋势 (DNPH 信号显著减弱)。对于未经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的内皮细胞 (control 组), DNPH 信号变化不显著, 表明 PSME1 过表达不会显著改变基础状态下的蛋白质羰基化水平。综上所述, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理可诱导蛋白质羰基化, 促进氧化损伤和错误折叠蛋白质的积累, 而 PSME1 过表达可显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化损伤。



注: 图 A、B 为 PSME1 过表达对 HUVEC 中 AKT、GATA4、PTEN 和 PSME1 蛋白的影响及定量分析; 图 C、D 为 PSME1 过表达对 20S 亚基 (PSMB5) 和 19S 亚基 (RPN2 和 RPT6) 的影响及定量分析; \* 表示  $P < 0.05$ 。

图 4 PSME1 过表达对蛋白酶体底物和 20S/19S 亚基的影响

Figure 4 Effects of PSME1 overexpression on proteasome substrates and 20s/19s subunits



注: A 为 dot blot 检测不同处理组 HUVEC 的蛋白氧化水平 (DNPH); B 为 dot blot 结果定量分析; C 为 Western blot 检测不同处理组 HUVEC 的 DNPH 水平; \* 表示  $P < 0.01$ 。

图 5 PSME1 过表达可抑制过氧化氢诱导的 HUVEC 氧化应激

Figure 5 Overexpression of PSME1 can inhibit hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HUVEC cells

### 3 讨论

**3.1 蛋白酶体的异质性与心血管疾病** 近年来,研究发现蛋白酶体复合物在亚基功能以及单个亚基的生化特性方面存在异质性<sup>[15-16]</sup>。研究表明,细胞内存在多个不同类型的蛋白酶体,它们的亚细胞定位不同或在相同位置但不同时间可能表现出显著生化与生理特性的差异<sup>[17]</sup>。研究表明,死于急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)的患者,其晚期动脉粥样斑块中的蛋白酶体活性显著下降,甚至低于非病变血管的基线水平<sup>[12, 18-19]</sup>。此外,在有症状的颈动脉粥样斑块中也观察到蛋白酶体活性下降,这一变化与氧化应激及细胞凋亡密切相关<sup>[20-21]</sup>。总体而言,蛋白酶体功能的持续受损可导致斑块内皮细胞的凋亡,继而通过诱发炎症反应和细胞外基质降解等机制,促进斑块不稳定性。

#### 3.2 PSME1 过表达对蛋白酶体功能的增强作用

本研究结果表明,HUVEC 中过表达 PSME1 能够上调 11S 调节颗粒亚基 PSME2 的表达水平,并通过与其结合稳定 PSME2,从而增强蛋白酶体功能。进一步通过检测 GFPu 的降解情况,发现 PSME1 过表达可提高蛋白酶体的蛋白水解能力,进而保护内皮免受氧化应激的损伤。考虑到蛋白酶体功能不全在动脉粥样硬化、缺血-再灌注损伤、心肌病和心力衰竭等心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)中普遍存在<sup>[11, 22-25]</sup>,本研究的发现为增强心血管系统蛋白酶体活性提供了一种新的潜在策略,有望为 CVD 的干预与治疗提供新的分子靶点。

**3.3 PSME1 促进 11S 调节颗粒的形成与稳定** 11S 调节颗粒可由 PSME3 组成同源性七聚体,也可由 PSME1 与 PSME2 组成异源性七聚体<sup>[26]</sup>。研究表明,IFN- $\gamma$  可诱导 PSME1 和 PSME2 的表达,这一现象不仅存在于免疫细胞,也存在于非免疫细胞中<sup>[27]</sup>。本研究通过探讨 PSME1 在 11S 调节颗粒形成中的作用发现,PSME1 在 HUVEC 中过表达可上调 PSME2 的表达水平,提示 PSME1 和 PSME2 之间可能存在协同调控机制。本研究进一步证实,PSME1 过表达可抑制 PSME2 的降解速率,这一现象支持二者相互作用的假设。此外,有研究报道了 PSME2 基因敲除小鼠体内未检测到 PSME1 蛋白的表达<sup>[28]</sup>,进一步强调了 PSME1 和 PSME2 在蛋白酶体调节中的协同关系。

**3.4 PSME1 促进错误折叠蛋白的降解** 蛋白酶体介导的蛋白质降解通常依赖于底物蛋白的多聚泛素化修饰,这是降解途径中的重要限速步骤<sup>[29]</sup>。正常细胞蛋白的泛素化往往依赖于其翻译后修饰状态,以及特定 E3 泛素连接酶的识别与作用。只有在这些条件满足的前提下,泛素化过程才能顺利进行<sup>[30-31]</sup>。因此,

单纯增强蛋白酶体的蛋白水解活性不应显著影响正常蛋白质的稳定性<sup>[32]</sup>。错误折叠或损伤的蛋白通常会发生构象改变,暴露其疏水序列,从而激活泛素化修饰。GFPu 通过在 GFP 的羧基端融合结构域 CL1 构建而成,CL1 可通过其暴露的疏水序列诱导泛素化<sup>[33]</sup>。因此,GFPu 被认为是错误折叠蛋白的替代标志物,可用于评估 UPS 的蛋白水解功能<sup>[34]</sup>。本研究显示,PSME1 在 HUVEC 中过表达显著降低 GFPu 蛋白水平,且存在剂量依赖性。此外,GFPu 半衰期的缩短提示 PSME1 过表达可能通过转录后机制促进错误折叠蛋白的降解。进一步分析发现了 PSME1 过表达的细胞中蛋白酶体的 ATP 非依赖性和 ATP 依赖性水解活性均显著升高。这些结果表明,PSME1 上调可增强 HUVEC 内错误折叠蛋白的降解能力,同时不影响正常蛋白质的稳态,这一特性有助于维护心血管系统的蛋白质稳态。

**3.5 PSME1 过表达对内皮细胞的保护作用** 蛋白酶体通过降解错误折叠、未折叠以及受损的蛋白质,在细胞内蛋白质质量控制方面发挥着不可或缺的作用<sup>[35-36]</sup>。在常见类型心脏病的动物模型中,已经观察到蛋白质错误折叠现象<sup>[37]</sup>,且在人类动脉粥样硬化中也有类似关联<sup>[12, 38]</sup>。蛋白质稳态失衡被认为是 CVD 进展的一个重要致病因素<sup>[11, 39]</sup>。蛋白酶体对氧化应激的调节在 CVD 中发挥关键作用。本研究发现,PSME1 过表达能显著降低 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的蛋白质羰基化水平,提示在氧化应激等危险因素存在的情况下,内皮细胞处于应激状态,而 PSME1 的表达减少可能导致错误折叠蛋白质的清除受阻,进而破坏内皮细胞蛋白质稳态,并最终导致内皮细胞损伤。本研究揭示了 PSME1 在调控蛋白酶体功能及维持内皮细胞蛋白质稳态中的关键作用,为探索针对内皮功能障碍的新型治疗策略提供了理论支持。

**利益冲突声明** 本研究不存在任何利益冲突

#### 参考文献

- [1] Li YN, Li SJ, Wu HJ. Ubiquitination-Proteasome system (UPS) and autophagy two main protein degradation machineries in response to cell stress[J]. Cells (Basel, Switzerland), 2022, 11(5): 851.
- [2] Rai M, Hunt LC, Demontis F. Stress responses induced by perturbation of the ubiquitin-proteasome system [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2025, 50(3): 175-178.
- [3] Yu PF, Hua ZH. The ubiquitin-26S proteasome system and autophagy relay proteome homeostasis regulation during silique development[J]. Plant Journal, 2022, 111(5): 1324-1339.
- [4] Cascio P. PA28 $\gamma$ : new insights on an ancient proteasome activator [J]. Biomolecules, 2021, 11(2): 228.
- [5] 骆诗凌,袁源,刘新光. 蛋白酶体与衰老的研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 45(2): 258-265.

- Luo SL, Yuan Y, Liu XG. Progress in proteasome and aging[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2023, 45(2): 258–265.(In Chinese)
- [ 6 ] Chen XY, Barton LF, Chi Y, et al. Ubiquitin-independent degradation of cell-cycle inhibitors by the REGgamma proteasome[J]. Molecular Cell, 2007, 26(6): 843–852.
- [ 7 ] George DE, Tepe JJ. Advances in proteasome enhancement by small molecules[J]. Biomolecules, 2021, 11(12): 1789.
- [ 8 ] Inui N, Sakai S, Kitagawa M. Molecular pathogenesis of pulmonary fibrosis, with focus on pathways related to TGF- $\beta$  and the Ubiquitin-Proteasome pathway[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(11): 6107.
- [ 9 ] Xie YF, Gao RF, Gao Y, et al. The proteasome activator REG  $\gamma$  promotes diabetic endothelial impairment by inhibiting HMG2-GLUT1 pathway [J]. Translational Research, 2022, 246: 33–48.
- [ 10 ] Faries PL, Rohan DI, Wyers MC, et al. Relationship of the 20S proteasome and the proteasome activator PA28 to atherosclerosis and intimal hyperplasia in the human vascular system [J]. Annals of Vascular Surgery, 2001, 15(6): 628–633.
- [ 11 ] Qiu M, Chen JM, Li XH, et al. Intersection of the Ubiquitin-Proteasome system with oxidative stress in cardiovascular disease[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(20): 12197.
- [ 12 ] Nie YF, Ma Z, Zhang BE, et al. The role of the immunoproteasome in cardiovascular disease [J]. Pharmacological Research, 2024, 204: 107215.
- [ 13 ] 宋幸奇,邱燕燕. 泛素-蛋白酶体系统、自噬-溶酶体系统与代谢性疾病[J]. 生命的化学,2024,44(5):780–785.  
Song XQ, Qiu YY. Ubiquitin-proteasomal system, autophagy-lysosomal system and metabolic diseases[J]. Chemistry of Life, 2024, 44(5): 780–785.(In Chinese)
- [ 14 ] 宋献美,钱丽丽,梁瑞峰. 芍药苷对过氧化氢损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用[J]. 现代预防医学,2015,42:2914–2916, 2923.  
Song XM, Qian LL, Liang RF. Protective effect of paeoniflorin on hydrogen peroxide-injured human umbilical vein endothelial cells [J]. Modern Preventive Medicine, 2015, 42: 2914–2916, 2923.(In Chinese)
- [ 15 ] Zhang JH, Tao PF, Deutch NT, et al. Proteasome-Associated syndromes: updates on genetics, clinical manifestations, pathogenesis, and treatment [J]. Journal of Clinical Immunology, 2024, 44(4): 88.
- [ 16 ] Yazgılı AS, Ebstein F, Meiners S. The proteasome activator PA200/PSME4: an emerging new player in health and disease[J]. Biomolecules, 2022, 12(8): 1150.
- [ 17 ] Sahu I, Glickman MH. Proteasome in action: substrate degradation by the 26S proteasome [J]. Biochemical Society Transactions, 2021, 49(2): 629–644.
- [ 18 ] Wang Z, Guo D, Yang B, et al. Integrated analysis of microarray data of atherosclerotic plaques: modulation of the ubiquitin-proteasome system[J]. PLOS One, 2014, 9(10): e110288.
- [ 19 ] 缪林煜,赖玲. 泛素-蛋白酶体系统在心脏中的作用[J]. 中国医学创新,2022,19(23):185–188.  
Miao LY, Lai L. Role of ubiquitin-proteasome system in heart[J]. Medical Innovation of China, 2022, 19(23): 185–188.(In Chinese)
- [ 20 ] Versari D, Herrmann J, Gössl M, et al. Dysregulation of the ubiquitin-proteasome system in human carotid atherosclerosis[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2006, 26 (9): 2132–2139.
- [ 21 ] 周孟学,王中群. 去泛素化酶在动脉粥样硬化中的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志,2022,30(2):161–166.  
Zhou MX, Wang ZQ. Research progress of deubiquitinating enzyme in atherosclerosis[J]. Chinese Journal of Arteriosclerosis, 2022, 30(2): 161–166.(In Chinese)
- [ 22 ] 杨冠华,孙瑞红. 泛素蛋白酶体通路与动脉粥样硬化斑块关系的研究[J]. 脑与神经疾病杂志,2019,27(11):720–723.  
Yang GH, Sun RH. Study on the relationship between the ubiquitin-proteasome pathway and atherosclerotic plaques [J]. Journal of Brain and Nervous Diseases, 2019, 27 (11): 720–723.(In Chinese)
- [ 23 ] Xie SY, Liu SQ, Zhang T, et al. USP28 serves as a key suppressor of mitochondrial morphofunctional defects and cardiac dysfunction in the diabetic heart[J]. Circulation, 2024, 149(9): 684–706.
- [ 24 ] Zeng LQ, Zhang XK, Huang ZH, et al. Ubiquitin proteasome system in cardiac fibrosis[J]. Journal of Advanced Research, 2024, 24: 2090.
- [ 25 ] Nahum-Ankonina O, Kurtzward-Josefson E, Ciechanover A, et al. Ubiquitin proteasome system role in Diabetes-Induced cardiomyopathy [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(20): 15376.
- [ 26 ] Lesne J, Locard-Paulet M, Parra J, et al. Conformational maps of human 20S proteasomes reveal PA28- and immuno-dependent inter-ring crosstalks[J]. Nature Communications, 2020, 11(1): 6140.
- [ 27 ] Inholz K, Anderl JL, Klawitter M, et al. Proteasome composition in immune cells implies special immune-cell-specific immunoproteasome function [J]. European Journal of Immunology, 2024, 54(4): 2350613.
- [ 28 ] Preckel T, Fung-Leung WP, Cai Z, et al. Impaired immunoproteasome assembly and immune responses in PA28-/-mice[J]. Science, 1999, 286(5447): 2162–2165.
- [ 29 ] 卢慧,李衍常,黄学石. 蛋白酶体翻译后修饰功能机制研究[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2021,37(6):710–719.  
Lu H, Li YC, Huang XS. Mechanistic studies of post-translational modifications on the proteasome [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2021, 37(6): 710–719.(In Chinese)
- [ 30 ] 李佳泽,张小荣,丁浩川,等. 泛素化在冠状动脉粥样硬化性心脏病发病机制中的作用[J]. 国际心血管病杂志,2024,51(5): 281–283, 291.  
Li JZ, Zhang XR, Ding HC, et al. Role of ubiquitination in the pathogenesis of coronary atherosclerotic heart disease [J]. International Journal of Cardiovascular Disease, 2024, 51 (5): 281–283, 291.(In Chinese)
- [ 31 ] Timms RT, Mena EL, Leng YM, et al. Defining E3 ligase-substrate relationships through multiplex CRISPR screening [J]. Nature Cell Biology, 2023, 25(10): 1535–1545.
- [ 32 ] Zhang HX, Zhou CY, Mohammad Z, et al. Structural basis of human 20S proteasome biogenesis[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 8184.
- [ 33 ] Braganca CE, Kraut DA. Mode of targeting to the proteasome determines GFP fate [J]. Journal of Biological Chemistry, 2020, 295 (47): 15892–15901.
- [ 34 ] El demerdash N, Chen MW, O'Brien CE, et al. Oleuropein activates

- Biol, 2020, 3(1): 241.
- [ 32 ] Mcgovern BB, McDonnell RK, Morris SK, et al. Novel class 1 integron harboring antibiotic resistance genes in wastewater-derived bacteria as revealed by functional metagenomics [J]. *Plasmid*, 2021, 114: 102563.
- [ 33 ] Teng L, Liao SH, Zhou X, et al. Prevalence and genomic investigation of Multidrug-Resistant salmonella isolates from companion animals in Hangzhou, China[J]. *Antibiotics-Basel*, 2022, 11(5): 625.
- [ 34 ] Zhao RN, Hao J, Yang JT, et al. The co-occurrence of antibiotic resistance genes between dogs and their owners in families[J]. *iMeta*, 2022, 1(2): e21.
- [ 35 ] Clausen PTL, Zankari E, Aarestrup FM, et al. Benchmarking of methods for identification of antimicrobial resistance genes in bacterial whole genome data [J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71(9): 2484-2488.
- [ 36 ] Cheng ST, Shi MM, Xing LJ, et al. Sulfamethoxazole affects the microbial composition and antibiotic resistance gene abundance in soil and accumulates in lettuce [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020, 27(23): 29257-29265.
- [ 37 ] Hou MH, Yang XY, Gong L, et al. Surveillance of antimicrobial resistance using isothermal amplification: a review [J]. *Chemical Communications (Cambridge, England)*, 2025, 61(9): 1748-1760.
- [ 38 ] Asante J, Osei sekyere J. Understanding antimicrobial discovery and resistance from a metagenomic and metatranscriptomic perspective: advances and applications [J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2019, 11(2): 62-86.
- [ 39 ] Paruch L. Molecular diagnostic tools applied for assessing microbial water quality [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(9): 5128.
- [ 40 ] Zhang ZH, Li X, Liu H, et al. Advancements in detection and removal of antibiotic resistance genes in sludge digestion: A state-of-art review [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344 (Pt A): 126197.
- [ 41 ] Chen CP, Li YY, Wu ZH, et al. Cat and dog feces as reservoirs of diverse novel antibiotic resistance genes[J]. *Environmental Research*, 2024, 261: 119690.
- [ 42 ] Yuan Y, Hu Y, Zhang XL, et al. Characteristics of MDR E [J]. coli Strains Isolated From Pet Dogs With Clinic Diarrhea: a Pool of Antibiotic Resistance Genes and Virulence-associated Genes. *PLoS One*, 2024, 19(2): e0298053.
- [ 43 ] Kerek A, Szabó E, Szabó Á, et al. Investigating antimicrobial resistance genes in probiotic products for companion animals [J]. *Front Vet Sci*, 2024, 11: 1464351.
- [ 44 ] Harada K, Okada E, Shimizu TK, et al. Antimicrobial resistance, virulence profiles, and phylogenetic groups of fecal Escherichia coli isolates: a comparative analysis between dogs and their owners in Japan [J]. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2012, 35(2): 139-144.
- [ 45 ] Harada K, Shimizu TK, Mukai Y, et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in klebsiella spp. isolates from companion animals in Japan: clonal dissemination of Multidrug-Resistant Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing klebsiella pneumoniae[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1021.
- [ 46 ] Bakkeren E, Diard M, Hardt WD. Evolutionary causes and Consequences of bacterial antibiotic persistence [J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2020, 18(9): 479-490.
- [ 47 ] Tóth AG, Tóth I, Rózsa B, et al. Canine saliva as a possible source of antimicrobial resistance genes[J]. *Antibiotics-Basel*, 2022, 11(11): 1490.
- [ 48 ] Westgarth C, Pinchbeck GL, Bradshaw JWS, et al. Dog-human and dog-dog interactions of 260 dog-owning households in a community in Cheshire[J]. *The Veterinary Record*, 2008, 162(14): 436-442.

收稿日期: 2024-12-18

(上接第 2841 页)

- neonatal neocortical proteasomes, but proteasome gene targeting by AAV9 is variable in a clinically relevant Piglet model of brain Hypoxia-Ischemia and hypothermia [J]. *Cells (Basel, Switzerland)*, 2021, 10(8): 2120.
- [ 35 ] Kandel R, Jung J, Neal S. Proteotoxic stress and the ubiquitin proteasome system [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2024, 156: 107-120.
- [ 36 ] Diteepeng T, Del monte F, Luciani M. The long and winding road to target protein misfolding in cardiovascular diseases [J]. *European Journal of Clinical Investigation*, 2021, 51(5): e13504.
- [ 37 ] Ren J, Bi YG, Sowers JR, et al. Endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response in cardiovascular diseases [J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2021, 18(7): 499-521.
- [ 38 ] Wang FL, Lerman A, Herrmann J. Dysfunction of the ubiquitin-proteasome system in atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *American Journal of Cardiovascular Disease*, 2015, 5(1): 83-100.
- [ 39 ] 高明阳, 吴玉湖, 杨宣叶, 等. 蛋白质动态平衡网络维稳机制的研究进展[J]. *生物工程学报*, 2024, 40(2): 434-445.
- Gao MY, Wu YH, Yang XY, et al. Advances of proteostasis network and its stability maintenance mechanism [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2024, 40(2): 434-445. (In Chinese)

收稿日期: 2025-04-02