

· 论著 ·

抑制泛素特异性蛋白酶 7 改善血管紧张素 II 诱导的心肌细胞肥大

陈梦雅 谢赛阳 邓伟

(武汉大学人民医院心血管内科 代谢与相关慢病湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探究泛素特异性蛋白酶 7(USP7)抑制剂 FT671 在血管紧张素 II(Ang II)诱导的 H9c2 细胞肥大中的作用和潜在机制。**方法** 将 H9c2 细胞随机分为四组:对照组、FT671 组、Ang II 组、FT671 + Ang II 组。利用 α -actinin 细胞免疫荧光染色检测心肌细胞表面积;Western blot 检测心房钠尿肽(ANP)、脑钠肽(BNP)、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白(Bax)、白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)以及 NADPH 氧化酶 4(Nox4)的蛋白表达水平;RT-PCR 检测 ANP、BNP、 β -肌球蛋白重链(β -MHC)、IL-6、MCP-1、TNF- α 的 mRNA 表达;TUNEL 染色检测细胞凋亡情况;细胞计数试剂 8(CCK8)实验检测各组细胞活力;活性氧(ROS)染色检测细胞内氧化损伤水平。**结果** 与对照组相比,Ang II 组 USP7 蛋白表达明显增加,而使用 FT671 后,USP7 表达明显被抑制。与 Ang II 组相比,FT671 + Ang II 组心肌细胞面积减小;ANP、BNP、Bax 的蛋白表达减少,ANP、BNP、 β -MHC、Bax、IL-6、MCP-1 以及 TNF- α 的 mRNA 表达减少;Bcl-2 的蛋白和 mRNA 表达均增加。与 Ang II 组相比,FT671 + Ang II 组 TUNEL 阳性细胞明显减少,心肌细胞活力增强,ROS 生成减少,Nox4、NLRP3 蛋白表达减少,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** FT671 通过抑制 Nox4/ROS/NLRP3 炎症通路减轻 Ang II 诱导的心肌细胞中的氧化应激和炎症反应,从而减轻心肌细胞肥大。

【关键词】 泛素特异性蛋白酶 7;血管紧张素 II;FT671;心肌肥厚;氧化应激

【DOI】10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.02.016

Inhibition of Ubiquitin-Specific Protease 7 Improves Angiotensin II-Induced Cardiomyocyte Hypertrophy

CHEN Mengya, XIE Saiyang, DENG Wei

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Metabolic and Chronic Diseases, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect and mechanism of ubiquitin-specific protease 7 (USP7) inhibitor FT671 in cardiomyocyte hypertrophy induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** H9c2 cardiomyocytes were randomly divided into four groups: control group, FT671 group, Ang II group, FT671 + Ang II group. The surface area of cardiomyocytes was detected by immunofluorescence staining of α -actinin. The protein expression of atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-2-associated X protein (Bax), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (Nox4) were detected by Western blot. The mRNA levels of ANP, BNP, β -myosin heavy chain (β -MHC), IL-6, MCP-1, TNF- α were detected by real-time PCR. TUNEL staining was used to evaluate cell apoptosis. Cell counting kit-8 (CCK8) was used to detect cell viability. The fluorescent probe 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) was used to measure intracellular reactive oxygen species (ROS) formation. **Results** There was a significant increase in USP7 protein expression in the Ang II group, which was evidently inhibited by the USP7 inhibitor FT671. Compared with Ang II group, cardiomyocyte surface area was significantly reduced in FT671 + Ang II group; the protein expression of ANP, BNP and Bax, as well as mRNA level of ANP, BNP, β -MHC, Bax, IL-6, MCP-1, TNF- α , were decreased in FT671 + Ang II group. In addition, the protein expression and mRNA level of Bcl-2 were increased in FT671 + Ang II group. Additionally, compared with Ang II group, TUNEL positive cells was significantly reduced, cell viability was improved and ROS generation was inhibited in FT671 + Ang II group. Further studies showed the protein expression of NLRP3 and Nox4 was decreased after FT671 treatment in Ang II induced cardiomyocyte hypertrophy. **Conclusion** The USP7 inhibitor FT671 attenuated oxidative stress and inflammatory response in Ang II-induced cardiomyocyte by inhibiting the Nox4/ROS/NLRP3 inflammatory pathway, thereby reducing cardiomyocyte hypertrophy.

【Keywords】 Ubiquitin-specific protease 7; Angiotensin II; FT671; Cardiac hypertrophy; Oxidative stress

基金项目:国家自然科学基金(82170245)

通信作者:邓伟, E-mail: vivideng1982@whu.edu.cn

心力衰竭是各种心脏疾病发展的终末阶段,以心肌肥厚和纤维化为特征的心肌重构已被确定为心力衰竭病程进展中的决定性因素^[1]。生理性心肌肥厚在刺激消失后可逆转,而心肌梗死、高血压等长期慢性刺激导致的病理性心肌肥厚往往会导致心肌重构,产生不良后果,如心律失常、心力衰竭等^[2]。心肌肥厚的发生发展机制比较复杂,至今尚未完全阐明。因此,探讨心肌肥厚的发生发展机制,从而寻找更有效的作用靶点,抑制甚至逆转心肌重构的发生是针对心力衰竭的重要策略。

泛素-蛋白酶体系统是细胞内蛋白质降解的主要途径,通过对底物蛋白的泛素化降解,参与包括细胞周期调节、免疫反应、细胞受体功能及肿瘤生长等在内的多种细胞活动^[3]。去泛素化酶(deubiquitinating enzyme, DUB)家族可将泛素分子从泛素化标记的蛋白质或者前体蛋白上水解下来,起到去泛素化的作用,对蛋白降解进行反向调节^[4-5]。既往研究^[6-8]显示, DUB 在心肌肥厚、心肌梗死、心房颤动等心血管疾病中起着至关重要的作用。泛素特异性蛋白酶 7 (ubiquitin-specific protease 7, USP7) 是第一个被发现的 DUB, 主要位于细胞核中, 参与细胞增殖、DNA 损伤反应、肿瘤发生、炎症和细胞凋亡等过程^[9-10], 在神经退行性疾病和癌症中被广泛研究, USP7 的抑制剂也常作为抗肿瘤药被广泛研究^[11-12], 但是在心血管疾病中研究较少。最近研究^[13]发现 USP7 在心肌细胞缺氧条件下的表达显著增加, 可能参与心肌梗死和心肌缺血再灌注损伤过程。然而, 关于 USP7 在心肌肥厚中的作用和机制知之甚少。在本研究中, 应用 USP7 特异性抑制剂 FT671 干预血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 诱导的 H9c2 心肌细胞肥大, 探讨 USP7 在心肌细胞病理性肥大中的作用和作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

试剂: H9c2 心肌细胞购自中国科学院细胞库(上海, 中国)。FT671 (HY-107985) [美国 MedChemexpress (MCE) 公司], AngII (美国 Sig-maAldrich 公司), 胎牛血清和 F12 培养液 (美国 Gibco 公司), USP7 抗体 (ABclonal, A3448), α -actinin、心房钠尿肽 (atrial natriuretic peptide, ANP)、脑钠肽 (brain natriuretic peptide, BNP)、B 细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (美国 abcam 公司), NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3,

NLRP3)、羊抗兔二抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司), NADPH 氧化酶 4 (reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, Nox4) (Proteintech)。TUNEL 染色试剂盒、细胞计数试剂 8 (CCK8) 试剂盒、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (Beyotime Biotechnology)。Trizol (Invitrogen), 反转录试剂盒 (瑞士 Roche 公司), Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (RIPA) 裂解液 (美国赛默飞世尔公司)。

仪器: 凝胶电泳系统 (北京六一仪器厂), 凝胶电泳转移系统 (BIO-RAD), 聚偏二氟乙烯膜 (美国 Milipore), 化学发光蛋白检测显影仪 (美国 Borad), 荧光显微镜 (OLYMPUS DX51), SYBRGreen I Master (瑞士 Roche 公司, 4707516001), LightCycler480 SYBRGreen 荧光定量仪 (瑞士 Roche 公司, LC480), 酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司, Synergy HT)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组

使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、95% O₂、5% CO₂ 培养箱中培养 H9c2 心肌细胞, 待细胞贴壁之后长至 90% 密度左右, 用 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 待细胞长至培养皿面积的 70% ~ 80% 时, 进行以下实验。

将 H9c2 心肌细胞随机分为 4 组 ($n = 6$): 对照组, FT671 (10 μ mol/L) 组, Ang II (1 μ mol/L) 组, FT671 (10 μ mol/L) + Ang II (1 μ mol/L) 组。待细胞长至培养皿面积的 70% ~ 80%, 换液之后根据分组加入生理盐水或 Ang II 和/或 FT671, 培养 24 h 之后收集细胞进行后续实验。

1.2.2 细胞免疫荧光检测细胞面积

采用细胞爬片, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 0.2% Triton-X-100 通透细胞, 10% 羊血清室温孵育 60 min 进行封闭。 α -actinin 一抗 (1 : 200) 4 °C 孵育过夜, 绿色荧光标记的二抗 (1 : 100) 湿盒中 37 °C 孵育 60 min。滴加封片剂封片, 放置 10 min 左右后, 在荧光显微镜下观察、拍照, 并使用 Image J 软件分析, 计算各组心肌细胞肥大面积。

1.2.3 免疫印迹法 Western blot 检测目的蛋白表达

提取各组心肌细胞蛋白, 采用 BCA 法进行定量, 制备上样蛋白, 使用 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 电泳分离蛋白, 转膜至聚偏二氟乙烯膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 孵育一抗置于 4 °C 过夜。用 Tris 缓冲液加 Tween 20 液洗膜 3 次后, 二抗室温孵育 1 h, 使用化学发光后成像系统进行图像采集, Image J 软件对蛋白表达水平进行定量, β -tubulin

作为内参蛋白。

1.2.4 RT-PCR 法检测目的基因 mRNA 表达

按照 Trizol (Invitrogen) 法提取细胞总 mRNA, 紫外分光光度计检测 RNA 含量及纯度。每个样本取

2 μ g 总 mRNA, 使用 Roche 反转录试剂盒 (20 μ L 反应体系) 反转录, 之后进行 PCR 扩增, 以 GAPDH 作为内参基因, 计算各组相较于对照组的相对表达量, 计算公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (表 1)。

表 1 引物序列 (5'-3')

鉴定引物	上游引物	下游引物
ANP	CCTGGACTGGGGAAGTCAAC	GCAGCTCCAGGAGGTATTC
BNP	CAGAAGCTGCTGGAGCTGATA	TCCGGTCTATCTTCTGCCCA
IL-6	CACTTCACAAGTCGGAGGCT	AGCACACTAGGTTTGGCCGAG
MCP-1	TAGCATCCACGTGCTGTCTC	CAGCCGACTCATTGGGATCA
TNF- α	TCGTAGCAAACCAAGCA	GAAGTGGCAAATCGGCTGAC
GAPDH	GCATCTTCTGTGCACTGCC	GATGGTGATGGGTTTCCCGT

注: IL-6, 白细胞介素-6; MCP-1, 单核细胞趋化蛋白-1; TNF- α , 肿瘤坏死因子- α 。

1.2.5 TUNEL 染色检测心肌细胞凋亡

处理后的细胞用 4% 多聚甲醛固定细胞 30 min, 0.2% Triton-X-100 通透细胞, 每组加 50 μ L TUNEL 检测液, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 60 min。滴加含有 DAPI 的封片剂封片, 放置 10 min 左右后, 在荧光显微镜下观察、拍照, 并使用 Image J 软件分析, 计算各组每个视野 TUNEL 阳性细胞占总细胞的比率即凋亡率。

1.2.6 CCK8 检测心肌细胞活性

使用 CCK8 试剂盒检测细胞活性。于 96 孔板中每孔加入 100 μ L (约 4 000 个细胞) H9c2 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h, 待细胞贴壁后根据分组进行处理, 培养 24 h 后每孔加入 10 μ L CCK8 试剂, 继续置于培养箱内孵育 2 h。用酶标仪检测, 分别于 450 nm 波长处测定光密度 (optical density, OD) 值, 计算细胞活性。实验结果以细胞存活率表示, 细胞存活率 = (实验组 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值) \times 100%。

1.2.7 ROS 染色实验检测氧化损伤

使用荧光探针 DCFH-DA 测量细胞内 ROS 的形成。用 10 μ mol/L DCFH-DA 处理细胞爬片并置于 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内孵育 20 min, 用无血清培养液洗涤 3 次。用倒置显微镜记录心肌细胞中 ROS 的荧光, 并用 Image J 软件进行分析。

1.3 统计学处理

应用 Graph Pad Prism 9.0 统计学软件对数据进行统计分析, Image J 软件分析条带灰度值。数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两组间比较采用成对 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FT671 作用验证及对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大面积的影响

Western blot 检测显示 Ang II 刺激的心肌细胞中 USP7 蛋白表达明显增加, 在应用 USP7 抑制剂 FT671 后, FT671 组和 FT671 + Ang II 组 USP7 表达明显减少 (图 1A、B)。对不同组 H9c2 细胞进行 α -actinin 免疫荧光染色后, 与对照组比, Ang II 组和 FT671 + Ang II 组心肌细胞面积增加, 而相比于 Ang II 组, 应用 FT671 后心肌细胞面积明显减少 (图 1C、D), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 FT671 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大分子标志物的影响

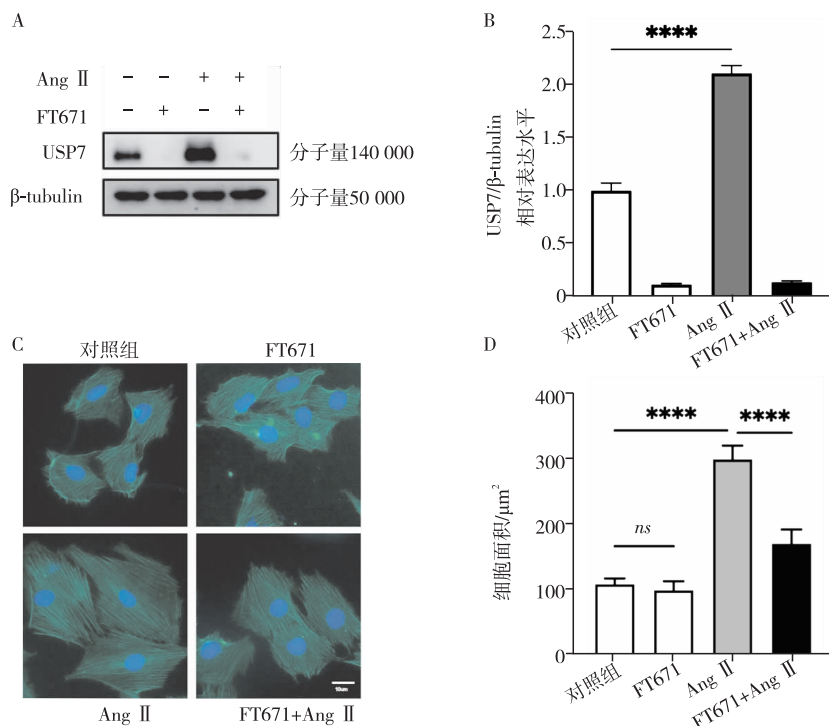
应用 Western blot 检测各组心肌细胞 ANP、BNP 的蛋白表达变化, RT-PCR 检测各组心肌细胞 ANP、BNP、 β -肌球蛋白重链 (β -myosin heavy chain, β -MHC) 的 mRNA 表达变化。结果显示, Ang II 组 H9c2 心肌细胞 ANP、BNP 蛋白 (图 2A、B、C) 以及 ANP、BNP、 β -MHC 的 mRNA (图 2D、E、F) 的表达较对照组明显增高 ($P < 0.05$), 而 FT671 能降低 Ang II 诱导的 ANP、BNP、 β -MHC 的表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 FT671 对 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡指标的影响

应用 Western blot 检测各组心肌细胞 Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达变化, 结果显示, 与对照组比, Ang II 组心肌细胞 Bax 表达增加, Bcl-2 表达降低, 而相比于 Ang II 组, FT671 + Ang II 组心肌细胞 Bax 表达下调, Bcl-2 表达上调 (图 3A、B、C), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。TUNEL 染色显示相比于 Ang II 组, FT671 组 TUNEL 阳性细胞数明显减少, 心肌细胞凋亡率下降 (图 3D、E),

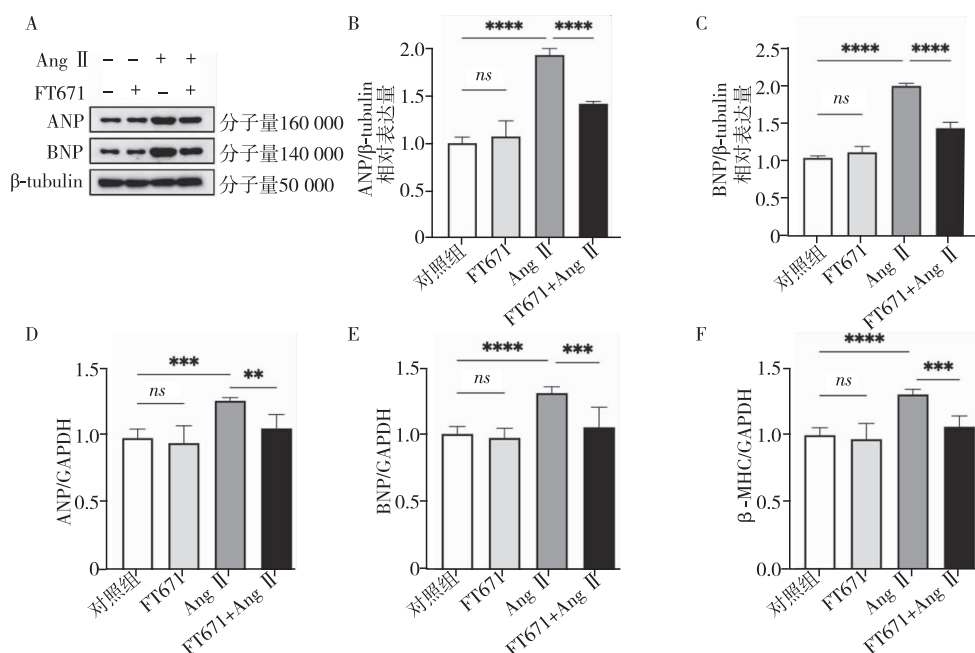
差异具有统计学意义($P < 0.05$)。应用 CCK8 法检测各组心肌细胞活性的变化,与对照组相比,FT671 对 H9c2 心肌细胞活性的影响无统计学差异($P > 0.05$);

而相比于 Ang II 组,FT671 能明显提高 Ang II 刺激后的细胞存活率(图 3F),差异具有统计学意义($P < 0.05$)。



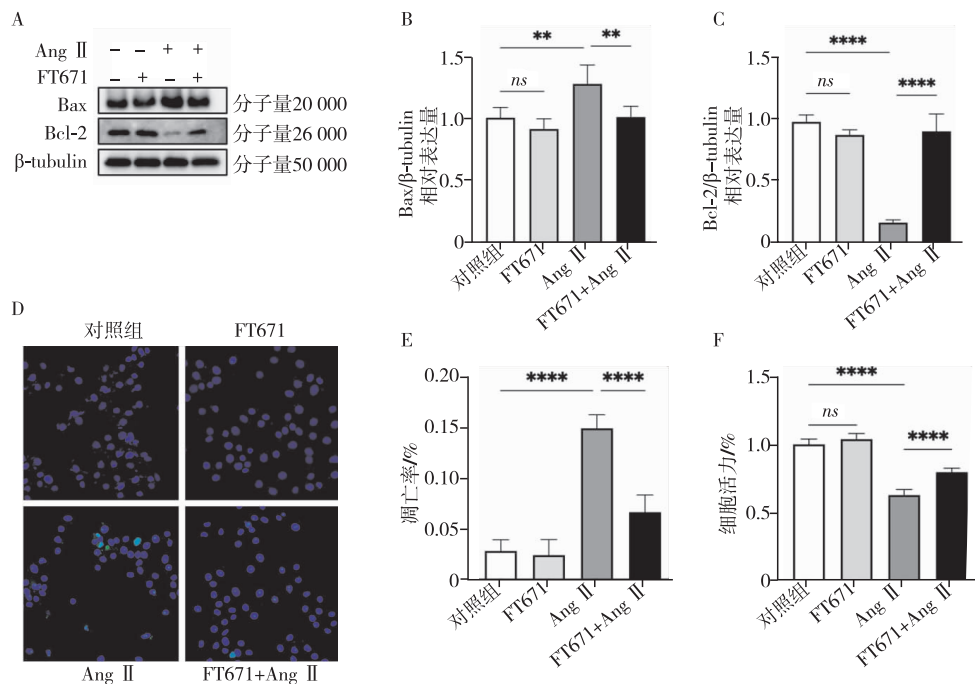
注:A、B 为 Western blot 检测 H9c2 心肌细胞内 USP7 蛋白表达的电泳图及蛋白相对定量($n=6$);C、D 为心肌细胞 α-actinin 免疫荧光图及荧光定量($n=3$),倍数 400。*ns* 表示两组差异无统计学意义;****表示 $P < 0.0001$ 。

图1 FT671 作用验证及对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大面积的影响



注:A、B、C 为 Western blot 检测 H9c2 心肌细胞内 ANP、BNP 蛋白表达以及蛋白定量($n=6$);D、E、F 为 RT-PCR 检测心肌细胞 ANP、BNP、β-MHC 的 mRNA 表达变化($n=6$)。*ns* 表示两组差异无统计学意义;****表示 $P < 0.0001$, ***表示 $P < 0.001$, **表示 $P < 0.01$ 。

图2 FT671 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大分子标志物的影响



注: A、B、C 为 Western blot 检测 H9c2 心肌细胞内 Bax、Bcl-2 蛋白表达以及蛋白定量($n=6$); D、E 为 TUNEL 染色检测 TUNEL 阳性凋亡细胞以及凋亡率($n=6$), 倍数 200; F 为 CCK8 检测心肌细胞活性($n=6$)。ns 表示两组差异无统计学意义; **** 表示 $P<0.0001$; ** 表示 $P<0.01$ 。

图 3 FT671 对 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡指标的影响

2.4 FT671 对 Ang II 诱导的心肌细胞肥大的作用机制

既往研究表明, Ang II 促进心肌细胞内 ROS 生成是其诱导心肌肥大的重要机制, 因此笔者检测了 FT671 对 Ang II 刺激的细胞内 ROS 生成的影响, 发现 Ang II 干预组 ROS 水平较对照组明显升高, FT671 干预可以明显降低 Ang II 诱导的心肌细胞内 ROS 的产生($P<0.05$) (图 4A)。另外, 笔者检测了炎症通路分子 NLRP3^[14] 和 ROS 生成相关的关键酶 Nox4^[15] 的蛋白表达水平。结果显示, 相比于 Ang II 组, FT671 可以降低心肌细胞内 NLRP3 和 Nox4 的蛋白表达水平 (图 4B、C、D)。RT-PCR 检测显示 FT671 干预可以降低 Ang II 诱导的白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症因子的表达 (图 4E、F、G)。这些实验表明 FT671 通过抑制 ROS 介导的 Nox4/NLRP3 炎症通路改善 Ang II 诱导的心肌细胞肥大。

3 讨论

在本研究中, 证明了 USP7 抑制剂 FT671 在调节 Ang II 诱导的心肌细胞肥大中起着重要作用。本研究利用 USP7 抑制剂 FT671 从形态学和分子标记物两方面进行了验证, 发现 USP7 在 Ang II 刺激后的心肌细胞中表达显著增加。FT671 抑制 USP7 显著减轻了 Ang II

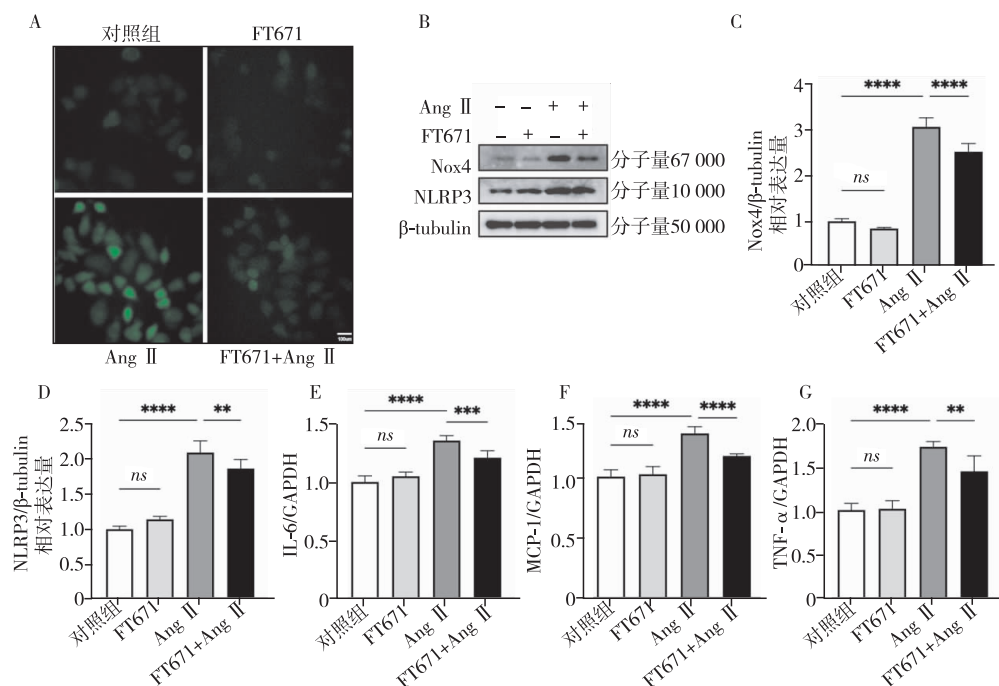
诱导的心肌细胞肥大、凋亡、炎症反应和 ROS 的产生。机制上, FT671 可能是通过抑制 Nox4 相关的氧化应激和 NLRP3 炎症小体的活化, 改善心肌细胞肥大。总的来说, 本研究发现 USP7 参与 Ang II 诱导的心肌肥大过程, 并提示抑制 USP7 可能是治疗心肌肥厚的一种潜在新靶点。

泛素化和去泛素化过程是一个动态过程, 调节特定的蛋白质-蛋白质相互作用。USP7 是一种 DUB, 通过催化泛素分子与底物之间酰胺键的水解将泛素分子从目标蛋白上水解下来, 阻止目标蛋白被降解, 从而调节细胞生理过程^[16]。已知 USP7 可以调节 MDM2/p53^[17-18]、磷酸酶和张力蛋白同源物^[19]、NLRP3^[20] 等靶蛋白的降解, 在病毒复制、细胞信号传导、DNA 损伤修复、表观遗传调控和免疫反应中发挥重要作用^[21]。近年来, USP7 在心血管领域的研究逐渐增多, 既往研究^[13] 发现, USP7 在缺血再灌注损伤小鼠模型中可促进心肌细胞炎症和凋亡。

本研究发现 Ang II 刺激的心肌细胞中 USP7 表达增加 (图 1), 表明 USP7 可能参与 Ang II 诱导的心肌细胞肥大过程。Ang II 刺激后心肌细胞表面积明显增加, 肥厚标志物 ANP、BNP、 β -MHC 表达增加, 而 FT671 可缓解上述肥厚基因的表达 (图 1、2)。这表明靶向抑制 USP7 可能有助于减轻 Ang II 诱导的心肌肥厚。之前的研究^[22-24] 已经证实, 凋亡、炎症反应和氧化应激

在心肌梗死后心肌重构中起着关键作用。因此笔者检测并发现应用 FT671 后 Ang II 刺激的心肌细胞中促凋亡因子 Bax 的表达减少,而抗凋亡因子 Bcl-2 表达明显增加。除此之外,CCK8 和 TUNEL 染色的结果也证明应用 FT671 可以改善心肌细胞的存活率,减少细胞凋亡(图 3)。这些结果提示 USP7 参与调节 Ang II 诱导的心肌细胞凋亡过程。ROS 生成过多会加剧心肌细胞内的氧化损伤,推动心肌细胞损伤和凋亡进

程^[25]。Nox4 是催化 ROS 生成的关键酶,下调 Nox4 水平可以减少 ROS 的产生,降低心肌细胞内的氧化应激水平,改善心肌肥大^[26]。本研究显示 FT671 的使用降低了 Ang II 诱导的氧化应激,这体现在其抑制 ROS 产生和 Nox4 的表达上(图 4)。更进一步研究发现,FT671 抑制 USP7 后下调了 NLRP3 水平,减少了炎症因子 IL-6、MCP-1、TNF- α 的表达(图 4),这可能与 NLRP3 炎症小体受抑制有关系。



注:A为ROS染色检测心肌细胞内ROS含量($n=6$),倍数200;B、C、D为Western blot检测心肌细胞内Nox4、NLRP3蛋白表达及蛋白定量($n=6$);E、F、G为RT-PCR检测心肌细胞IL-6、MCP-1、TNF- α 的mRNA表达变化($n=6$)。ns表示两组差异无统计学意义;****表示 $P<0.0001$;***表示 $P<0.001$;**表示 $P<0.01$ 。

图4 FT671对Ang II诱导的心肌细胞肥大的作用机制

USP7在小鼠心肌缺血再灌注损伤过程中表达增加,抑制USP7表达可抑制氧自由基的生成和心肌细胞凋亡,减轻心肌组织损伤,改善心功能^[27]。本研究证实抑制USP7可以减轻Ang II诱导的心肌细胞内的凋亡和炎症反应,降低ROS的生成。Liu等^[20]发现USP7可以靶向并去泛素化Nox4,从而导致ROS产生增加。本研究也证实了抑制USP7可以降低Ang II诱导的Nox4水平。另外,有研究^[28]证明USP7可以调节NLRP3炎症小体的泛素化状态。本研究也发现抑制USP7可以下调心肌细胞中NLRP3的水平。因此,USP7可能通过靶向Nox4和NLRP3发挥去泛素化作用,从而参与Ang II诱导的炎症反应和氧化应激过程,调节心肌肥厚和心肌重构。本研究仍存在一些局限性。目前,Ang II诱导USP7表达增加的具体机制尚不清楚,需要在未来进一步探索。

总之,本研究表明,在Ang II刺激的心肌细胞中,

USP7表达增加,并且通过靶向Nox4和NLRP3的去泛素化来调节Ang II诱导的心肌细胞内的氧化应激和炎症反应从而参与心肌肥厚的形成,而抑制USP7或可成为治疗心肌重构中心肌肥厚的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42 (36): 3599-3726.
- [2] Xie S, Chen M, Fang W, et al. Diminished arachidonate 5-lipoxygenase perturbs phase separation and transcriptional response of Runx2 to reverse pathological ventricular remodeling [J]. *EBioMedicine*, 2022, 86: 104359.
- [3] Swatek KN, Komander D. Ubiquitin modifications [J]. *Cell Res*, 2016, 26 (4): 399-422.
- [4] Zheng J, Chen C, Guo C, et al. The pleiotropic ubiquitin-specific peptidase 16 and its many substrates [J]. *Cells*, 2023, 12 (6): 886.
- [5] Clague MJ, Urbé S, Komander D. Breaking the chains: deubiquitylating enzyme

- specificity begets function[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20(6):338-352.
- [6] Hu Y, Ma Z, Chen Z, et al. USP47 promotes apoptosis in rat myocardial cells after ischemia/reperfusion injury via NF-kappaB activation[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021, 68(4):841-848.
- [7] Han X, Zhang YL, Fu TT, et al. Blockage of UCHL1 activity attenuates cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats[J]. *Hypertens Res*, 2020, 43(10):1089-1098.
- [8] Bi HL, Zhang YL, Yang J, et al. Inhibition of UCHL1 by LDN-57444 attenuates Ang II-Induced atrial fibrillation in mice[J]. *Hypertens Res*, 2020, 43(3):168-177.
- [9] Pozhidaeva A, Bezsonova I. USP7: structure, substrate specificity, and inhibition[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2019, 76:30-39.
- [10] Fountain MD, Oleson DS, Rech ME, et al. Pathogenic variants in USP7 cause a neurodevelopmental disorder with speech delays, altered behavior, and neurologic anomalies[J]. *Genet Med*, 2019, 21(8):1797-1807.
- [11] Zhang XW, Feng N, Liu YC, et al. Neuroinflammation inhibition by small-molecule targeting USP7 noncatalytic domain for neurodegenerative disease therapy[J]. *Sci Adv*, 2022, 8(32):eabo0789.
- [12] Galarreta A, Valledor P, Ubieta-Capella P, et al. USP7 limits CDK1 activity throughout the cell cycle[J]. *EMBO J*, 2021, 40(11):e99692.
- [13] Xue Q, Yang D, Zhang J, et al. USP7, negatively regulated by miR-409-5p, aggravates hypoxia-induced cardiomyocyte injury[J]. *APMIS*, 2021, 129(3):152-162.
- [14] Suetomi T, Willeford A, Brand CS, et al. Inflammation and NLRP3 inflammasome activation initiated in response to pressure overload by Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II delta signaling in cardiomyocytes are essential for adverse cardiac remodeling[J]. *Circulation*, 2018, 138(22):2530-2544.
- [15] Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1):245-313.
- [16] Nie L, Wang C, Liu X, et al. USP7 substrates identified by proteomics analysis reveal the specificity of USP7[J]. *Genes Dev*, 2022, 36(17-18):1016-1030.
- [17] Meulmeester E, Maurice MM, Boutell C, et al. Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2[J]. *Mol Cell*, 2005, 18(5):565-576.
- [18] Cummins JM, Rago C, Kohli M, et al. Tumour suppression: disruption of HAUSP gene stabilizes p53[J]. *Nature*, 2004, 428(6982):1 p following 486.
- [19] Song MS, Salmena L, Carracedo A, et al. The deubiquitylation and localization of PTEN are regulated by a HAUSP-PML network[J]. *Nature*, 2008, 455(7214):813-817.
- [20] Liu G, Liu Q, Yan B, et al. USP7 inhibition alleviates H_2O_2 -induced injury in chondrocytes via inhibiting NOX4/NLRP3 pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11:617270.
- [21] Ji L, Lu B, Zamponi R, et al. USP7 inhibits Wnt/beta-catenin signaling through promoting stabilization of Axin[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):4184.
- [22] Sanz RL, Inserra F, García Menéndez S, et al. Metabolic syndrome and cardiac remodeling due to mitochondrial oxidative stress involving gliflozins and sirtuins[J]. *Curr Hypertens Rep*, 2023, 25(6):91-106.
- [23] Daou D, Gillette TG, Hill JA. Inflammatory mechanisms in heart failure with preserved ejection fraction[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2023, 38(5):217-230.
- [24] Hu C, Zhang X, Wei W, et al. Matrine attenuates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via maintaining AMPKalpha/UCP2 pathway[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(4):690-701.
- [25] Werbner B, Tavakoli-Rouzbahani OM, Fatahian AN, et al. The dynamic interplay between cardiac mitochondrial health and myocardial structural remodeling in metabolic heart disease, aging, and heart failure[J]. *J Cardiovasc Aging*, 2023, 3(1):9.
- [26] Guo S, Chen X. The human Nox4: gene, structure, physiological function and pathological significance[J]. *J Drug Target*, 2015, 23(10):888-896.
- [27] Xu Q, Liu M, Gu J, et al. Ubiquitin-specific protease 7 regulates myocardial ischemia/reperfusion injury by stabilizing Keap1[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1):291.
- [28] Palazón-Riquelme P, Worboys JD, Green J, et al. USP7 and USP47 deubiquitinases regulate NLRP3 inflammasome activation[J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(10):e44766.

收稿日期:2023-05-04

投稿须知

1. 投稿请作者根据系统提示填写完整个人信息(基金项目及编号、单位、地址、邮编、手机号码、E-mail、研究方向等)。
2. 稿件请用 word 格式文件上传,格式参照系统首页 2022 投稿格式示例。
3. 文责自负,编辑部可对文稿作文字修改、删减或退请作者修改。投稿刊登后其版权归《心血管病学进展》编辑部。
4. 收到本刊回执 2 个月后未接到本刊录用通知,则稿件仍在审阅研究中,作者如需另投他刊,请先与本刊联系。请勿一稿多投及多稿一投。
5. 本刊已加入中国学术期刊光盘版及网络版等。凡在本刊发表的论文将自然转载其中,如作者有异议,请投稿时声明,否则本刊将视为作者同意。

本刊编辑部