

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2007147

论著·实验研究

泛素-特异性蛋白酶7在高氧暴露 早产鼠肺组织中的表达及意义

黄晓悦¹ 全裕凤¹ 严隆丽² 赵琳³

(1. 桂林医学院附属医院新生儿科, 广西 桂林 541001; 2. 广东省妇幼保健院新生儿科, 广东 广州 511400; 3. 河北省儿童医院新生儿科, 河北 石家庄 050000)

【摘要】 **目的** 探讨泛素-特异性蛋白酶7 (USP7) 及 Wnt 信号通路中关键因子在高氧暴露早产大鼠肺组织中的表达及意义。**方法** 将 180 只新生早产 Wistar 大鼠随机均分成空气对照组、空气干预组、高氧对照组及高氧干预组, 每组 45 只。干预组早产鼠每天腹腔注射 USP7 特异性抑制剂 P5091 (5 mg/kg), 高氧组建立早产大鼠高氧暴露肺损伤动物模型。分别于实验过程第 3、5、9 天时处死动物收集早产鼠肺组织标本, 通过苏木精-伊红染色病理切片观察肺组织病理变化; 采用 RT-PCR 及 Western blot 技术检测肺组织中 USP7 及 Wnt 信号通路关键因子 β -catenin、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的 mRNA 及其蛋白表达水平。**结果** 空气各组肺组织形态结构基本正常; 高氧对照组 3 d、5 d 时可见肺泡明显压缩、结构紊乱, 有明显炎症细胞、红细胞渗出及间质水肿改变; 高氧对照组 9 d 时可见肺泡结构紊乱、肺泡间隔明显增厚; 高氧干预组肺组织结构紊乱、炎症细胞浸润、红细胞渗出情况均较相应时间点的高氧对照组有所减轻; 各时间点高氧各组放射状肺泡计数 (RAC) 均明显低于相应空气各组 ($P < 0.05$), 且高氧干预组 RAC 较高氧对照组明显升高 ($P < 0.05$)。实验第 3、5、9 天时, 高氧各组 USP7、 β -catenin mRNA 及 USP7、 β -catenin、 α -SMA 蛋白表达均较相应空气各组增加 ($P < 0.05$); 高氧干预组 β -catenin mRNA 及 β -catenin、 α -SMA 蛋白表达较高氧对照组减少 ($P < 0.05$); 高氧干预组 USP7 mRNA 及蛋白表达与高氧对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 空气干预组 USP7、 β -catenin mRNA 及 USP7、 β -catenin、 α -SMA 蛋白表达与空气对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 高氧暴露可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路; USP7 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路参与高氧肺损伤; USP7 特异性抑制剂 P5091 可能通过加强 β -catenin 的泛素化来加速其降解, 减少肺上皮-间质转化, 从而对高氧肺损伤具有一定的保护作用。
【中国当代儿科杂志, 2020, 22 (12): 1331-1337】

【关键词】 高氧肺损伤; 泛素-特异性蛋白酶7; Wnt/ β -catenin 信号通路; 早产; 大鼠

Expression of ubiquitin-specific protease 7 in lung tissue of preterm rats after hyperoxia exposure

HUANG Xiao-Yue, QUAN Yu-Feng, YAN Long-Li, ZHAO Lin. Department of Neonatology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541001, China (Quan Y-F, Email: Qyfxse@163.com)

Abstract: Objective To study the expression and significance of ubiquitin-specific protease 7 (USP7) and the key factors of the Wnt signaling pathway in the lung tissue of preterm rats after hyperoxia exposure. **Methods** A total of 180 preterm neonatal Wistar rats were randomly divided into an air control group, an air intervention group, a hyperoxia control group, and a hyperoxia intervention group, with 45 rats in each group. Lung injury was induced by hyperoxia exposure in the hyperoxia groups. The preterm rats in the intervention groups were given intraperitoneal injection of the USP7 specific inhibitor P5091 (5 mg/kg) every day. The animals were sacrificed on days 3, 5, and 9 of the experiment to collect lung tissue specimens. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes of lung tissue. RT-PCR and Western blot were used to measure the mRNA and protein expression levels of USP7 and the key factors

[收稿日期] 2020-07-20; [接受日期] 2020-11-11

[基金项目] 国家自然科学基金 (81360105)。

[作者简介] 黄晓悦, 女, 硕士, 医师。现工作单位: 北海市人民医院新生儿科, 邮编: 536000。

[通信作者] 全裕凤, 女, 教授, 主任医师。Email: Qyfxse@163.com。

of the Wnt signaling pathway β -catenin and α -smooth muscle actin (α -SMA) in lung tissue. **Results** The air groups had normal morphology and structure of lung tissue; on days 3 and 5, the hyperoxia control group showed obvious alveolar compression and disordered structure, with obvious inflammatory cells, erythrocyte diapedesis, and interstitial edema. On day 9, the hyperoxia control group showed alveolar structural disorder and obvious thickening of the alveolar septa. Compared with the hyperoxia control group at the corresponding time points, the hyperoxia intervention group had significantly alleviated disordered structure, inflammatory cell infiltration, and bleeding in lung tissue. At each time point, the hyperoxia groups had a significantly lower radial alveolar count (RAC) than the corresponding air groups ($P<0.05$), and the hyperoxia intervention group had a significantly higher RAC than the hyperoxia control group ($P<0.05$). On days 3, 5, and 9 of the experiment, the hyperoxia groups had significantly higher mRNA expression of USP7 and β -catenin and protein expression of USP7, β -catenin, and α -SMA than the corresponding air groups ($P<0.05$). Compared with the hyperoxia control group, the hyperoxia intervention group had significant reductions in the mRNA expression of β -catenin and the protein expression of β -catenin and α -SMA ($P<0.05$), while there were no significant differences in the mRNA and protein expression of USP7 between the hyperoxia intervention and hyperoxia control groups ($P>0.05$). There were no significant differences in the mRNA expression of USP7 and β -catenin and the protein expression of USP7, β -catenin, and α -SMA between the air intervention and air control groups ($P>0.05$). **Conclusions** Hyperoxia exposure can activate the Wnt/ β -catenin signaling pathway, and USP7 may participate in hyperoxic lung injury through the Wnt/ β -catenin signaling pathway. The USP7 specific inhibitor P5091 may accelerate the degradation of β -catenin by enhancing its ubiquitination, reduce lung epithelial-mesenchymal transition, and thus exert a certain protective effect against hyperoxic lung injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(12): 1331-1337]

Key words: Hyperoxic lung injury; Ubiquitin-specific protease 7; Wnt/ β -catenin signaling pathway; Preterm birth; Rats

近年来研究发现 Wnt/ β -catenin 信号通路参与了肺癌^[1]、高氧肺损伤^[2]、肺纤维化^[3]的发病。通路中关键因子 β -catenin 的富集和降解直接影响着 Wnt 信号通路的活化, 而 β -catenin 蛋白被降解的关键是其泛素化 - 去泛素化过程。有文献表明, 高氧暴露早期大鼠肺组织中泛素 - 蛋白酶途径被激活, 并参与肺损伤过程^[4]; 泛素 - 特异性蛋白酶 7 (ubiquitin-specific protease 7, USP7) 通过对 β -catenin 去泛素化参与了 Wnt 信号通路, 在结肠癌中起积极作用^[5]; 有研究表明在博莱霉素诱导的小鼠纤维化肺组织中 USP7 表达增强^[6]; 本课题组前期研究已表明 β -catenin 受高氧诱导时表达增加^[2], 由此猜测 USP7 可能通过对 β -catenin 去泛素化在高氧肺损伤中起一定作用。故本文通过观察 USP7 特异性抑制剂 P5091 干预前后, 高氧暴露下的早产鼠肺组织中 USP7、 β -catenin、 α -SMA 的表达水平的变化, 了解 USP7 在高氧致早产鼠肺损伤发生发展中的作用, 可能为临床上支气管肺发育不良 (bronchopulmonary dysplasia, BPD) 的防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

总 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司), 引物 (美国 Invitrogen 公司), USP7 一抗、 β -catenin 一抗、 α -SMA 一抗 (美国 Abcam 公司), PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司), Tanon4100 型全自动数码凝胶成像分析系统 (上海天能公司), ChemiDo-cXRS 图像采集系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 动物模型的分组及制备

清洁级成年健康 Wistar 大鼠 60 只均购自桂林医学院实验动物中心, 雌鼠 45 只, 体重 220~260 g, 雄鼠 15 只, 体重 260~320 g, 按雌雄比例 3:1 夜间合笼, 次日晨取雌鼠阴道分泌物镜检, 见精子即为受孕第 1 天, 孕 21 d 大鼠剖宫产后取出的新生大鼠即为早产鼠。将生后 24 h 存活的早产鼠按随机数字表法随机分为高氧组和空气组, 每组 90 只; 各组再随机分为干预组及对照组 2 个亚组, 每组 45 只。干预组早产鼠每天腹腔注射 USP7 特异性抑制剂 P5091 (5 mg/kg), 对照组给

予同等剂量生理盐水处理。将高氧组早产鼠连同母鼠置于自制氧箱中，氧浓度维持在75%~80%，定期与空气组交换母鼠以防因氧中毒致母鼠喂养能力降低；空气组置于空气中，氧浓度为21%，余处理方法分别同对应的高氧组亚组^[7-8]。实验过程中无新生早产大鼠死亡。

1.3 标本的收集与处理

各组分别于实验第3、5、9天用10%水合氯醛(0.6 mL/100 g)腹腔注射麻醉，开胸后迅速取下肺组织，置于1.5 mL无酶冻存管，液氮速冻，-80℃冰箱保存；另一部分早产鼠经气管将4%多聚甲醛注入肺组织中并将其取下置于4%多聚甲醛固定，乙醇脱水，石蜡包埋切片，苏木精-伊红(HE)染色，光镜下观察肺组织的结构形态学变化。每个样本随机取3张切片，于100倍光镜下，计算放射状肺泡计数(radial alveolar counts, RAC)，即在呼吸性细支气管中心作一垂直线至最近胸膜或纤维隔上，计数肺泡数，每张切片行5次计数，取平均值。

1.4 RT-PCR法检测肺组织USP7、β-catenin mRNA的表达

取肺组织50 mg，迅速放入液氮冷冻的研钵中，研磨呈细粉末状后按总RNA提取试剂盒说明书提取总RNA，NanoDrop 2000超微量分光光度计检测RNA纯度及浓度，取总RNA 2 μg逆转录为cDNA，以cDNA为模板进行PCR扩增。PCR反应体系(25 μL)：cDNA 3 μL，上下游引物各1 μL，RNase-Free ddH₂O 7.5 μL，2×Taq Master Mix 12.5 μL。USP7上游引物5'-TGGGTTTGTGGTCACCTTATC-3'，下游引物5'-CGTCCCTATAACCTTGAGACTTG-3'，片段长度为122 bp；β-catenin上游引物5'-CAAGCCACAGGACTACAAGAA-3'，下游引物5'-CAATGTCCAGTCCGAGATCAG-3'，片段长度为107 bp；内参GAPDH上游引物5'-GATGGTGAAGGTCGGAGTG-3'，下游引物5'-TGTAGTGGAGGTCAATGAATGG-3'，片段长度为122 bp。PCR反应结束后，取5 μL扩增产物加至含有EB替代物DuRed核酸染料的2%琼脂糖凝胶上电泳，全自动数码凝胶成像分析仪显示并拍照，测定条带光密度值，计算USP7、β-catenin与

GAPDH光密度值比值，以此表示目的基因mRNA的相对表达水平。

1.5 Western blot法检测肺组织USP7、β-catenin、α-SMA蛋白的表达

取肺组织50 mg置于预冷的1.5 mL EP管中，剪碎，加入500 μL RIPA裂解液及50 μL PMSF，超声3~4次，冰上裂解10 min，4℃ 12 000 r/min离心30 min，取上清液即总蛋白。按BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书进行所得蛋白浓度测定，将浓度最低管设为标准，把样品调成统一浓度，将样品溶液置于沸水浴中15 min后置于冰上冷却，每孔加30 μg蛋白进行SDS-PAGE电泳，转膜，封闭，分别加入USP7一抗、β-catenin一抗、α-SMA一抗(均按1:5 000稀释)，孵育过夜，漂洗，加入对应的二抗(均按1:5 000稀释)，孵育，漂洗，曝光后用ChemiDo-cXRS图像采集系统采集图像，IMAGE J软件检测光密度比值，以GAPDH蛋白表达作为内参照，计算各目的蛋白与GAPDH蛋白光密度值比值，以此表示目的蛋白的相对表达水平。

1.6 统计学分析

采用SPSS 24.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK-*q*检验，*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变

空气各组肺泡发育良好，结构基本正常，无明显渗出及出血情况，随日龄增加，肺泡体积逐渐变小而数量增多。高氧对照组3 d、5 d可见肺泡明显压缩、结构紊乱，有明显炎症细胞、红细胞渗出及间质水肿改变；高氧对照组9 d可见肺泡结构紊乱、肺泡间隔明显增厚。高氧干预组肺组织结构紊乱、炎症细胞浸润、红细胞渗出情况较高氧对照组有所减轻，但较空气各组仍有肺泡结构紊乱、肺泡间隔增厚情况。见图1。

2.2 两组肺组织RAC变化

各时间点高氧各组RAC均明显低于对应的空气各组(*P*<0.05)，且高氧干预组RAC较高氧对照组明显升高(*P*<0.05)，见表1。

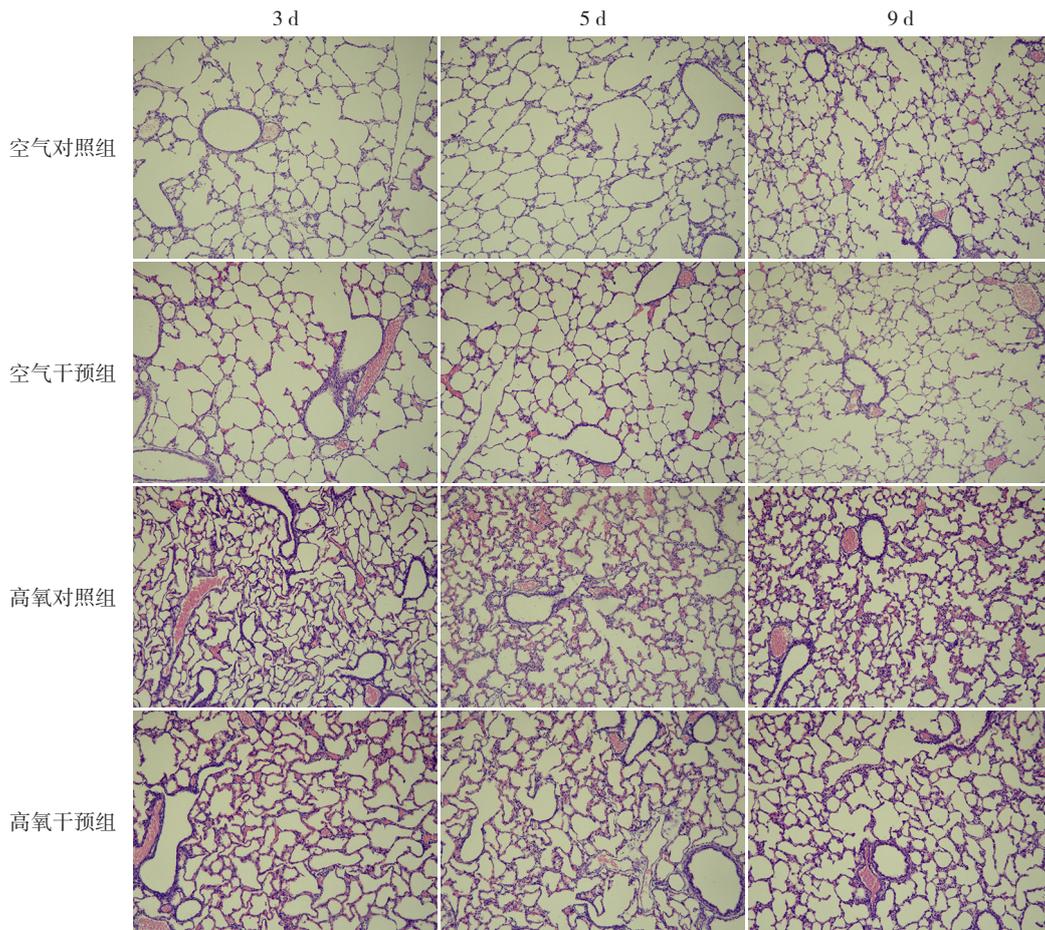


图 1 各组早产鼠肺组织在不同时间点病理学改变 (苏木精-伊红染色, $\times 100$) 空气各组肺组织形态结构基本正常; 高氧对照组 3 d、5 d 可见肺泡明显压缩、结构紊乱, 有明显炎症细胞、红细胞渗出及间质水肿改变; 高氧对照组 9 d 可见肺泡结构紊乱、肺泡间隔明显增厚。高氧干预组肺组织结构紊乱、炎症细胞浸润、红细胞渗出情况均较相应时间点的高氧对照组有所减轻。

表 1 各组不同时间点 RAC 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	RAC (个)		
		3 d	5 d	9 d
空气对照组	8	5.43 \pm 0.26	6.57 \pm 0.16	8.52 \pm 0.11
空气干预组	8	5.27 \pm 0.34	6.36 \pm 0.06	8.68 \pm 0.18
高氧对照组	8	4.05 \pm 0.27 ^a	5.11 \pm 0.21 ^a	6.19 \pm 0.16 ^a
高氧干预组	8	4.92 \pm 0.18 ^{b,c}	5.98 \pm 0.09 ^{b,c}	7.26 \pm 0.14 ^{b,c}
F 值		15.766	61.932	183.165
P 值		0.001	<0.001	<0.001

注: [RAC] 放射状肺泡计数。a 示与空气对照组比较, $P < 0.05$; b 示与空气干预组比较, $P < 0.05$; c 示与高氧对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.3 肺组织 USP7、 β -catenin mRNA 表达

实验第 3、5、9 天, 与空气对照组相比, 高氧对照组 USP7、 β -catenin mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.01$); 与空气干预组相比, 高氧干预组 USP7、 β -catenin mRNA 表达均显著升高

($P < 0.05$); 与高氧对照组相比, 高氧干预组 β -catenin mRNA 表达显著减少 ($P < 0.05$); 高氧干预组 USP7 mRNA 表达与高氧对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 空气干预组 USP7、 β -catenin mRNA 表达与空气对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2, 表 2~3。

2.4 肺组织 USP7、 β -catenin、 α -SMA 蛋白表达

实验第 3、5、9 天, 与空气对照组相比, 高氧对照组 USP7、 β -catenin、 α -SMA 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$); 与空气干预组相比, 高氧干预组 USP7、 β -catenin、 α -SMA 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$); 与高氧对照组相比, 高氧干预组 β -catenin、 α -SMA 蛋白表达均显著减少 ($P < 0.05$); 高氧干预组 USP7 蛋白表达与高氧对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 空气干预组 USP7、 β -catenin、 α -SMA 蛋白表达与空气对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3, 表 4~6。

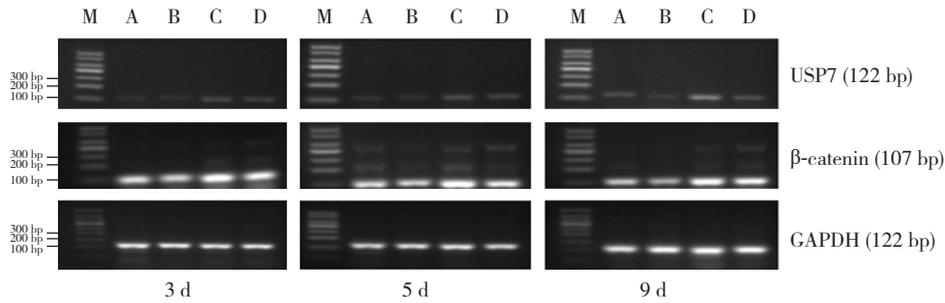


图 2 RT-PCR 法检测各组早产鼠肺组织中不同时间点 USP7、 β -catenin mRNA 电泳图 M: Marker; A: 空气对照组; B: 空气干预组; C: 高氧对照组; D: 高氧干预组。

表 2 各组早产鼠肺组织中不同时间点 USP7 mRNA 相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3 d	5 d	9 d
空气对照组	8	0.29 ± 0.13	0.55 ± 0.16	0.73 ± 0.13
空气干预组	8	0.24 ± 0.09	0.59 ± 0.15	0.64 ± 0.28
高氧对照组	8	1.03 ± 0.20 ^a	1.22 ± 0.16 ^a	1.59 ± 0.24 ^a
高氧干预组	8	0.93 ± 0.23 ^b	1.21 ± 0.16 ^b	1.31 ± 0.20 ^b
<i>F</i> 值		17.068	16.894	12.951
<i>P</i> 值		0.001	0.001	0.002

注: a 示与空气对照组比较, $P < 0.01$; b 示与空气干预组比较, $P < 0.05$ 。

表 3 各组早产鼠肺组织中不同时间点 β -catenin mRNA 相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3 d	5 d	9 d
空气对照组	8	0.43 ± 0.15	0.50 ± 0.11	0.62 ± 0.17
空气干预组	8	0.27 ± 0.12	0.30 ± 0.16	0.47 ± 0.10
高氧对照组	8	1.19 ± 0.17 ^a	1.25 ± 0.22 ^a	1.45 ± 0.22 ^a
高氧干预组	8	0.72 ± 0.23 ^{b,c}	0.77 ± 0.20 ^{b,c}	0.96 ± 0.15 ^{b,c}
<i>F</i> 值		16.872	16.214	20.263
<i>P</i> 值		0.001	0.001	<0.001

注: a 示与空气对照组比较, $P < 0.01$; b 示与空气干预组比较, $P < 0.05$; c 示与高氧对照组比较, $P < 0.05$ 。

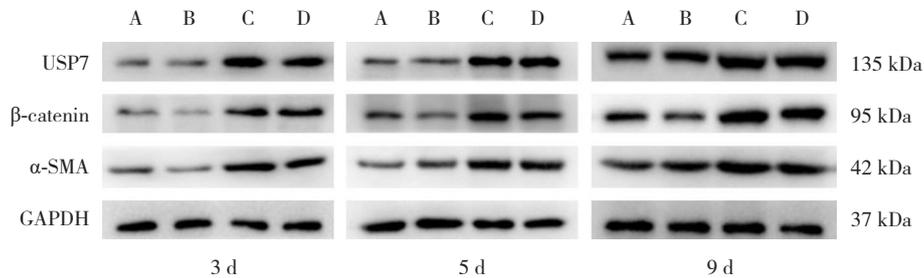


图 3 Western blot 法检测各组早产鼠肺组织中不同时间点 USP7、 β -catenin、 α -SMA 蛋白电泳图 A: 空气对照组; B: 空气干预组; C: 高氧对照组; D: 高氧干预组。

表 4 各组早产鼠肺组织中不同时间点 USP7 蛋白相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3 d	5 d	9 d
空气对照组	8	0.34 ± 0.15	0.56 ± 0.26	0.73 ± 0.27
空气干预组	8	0.43 ± 0.23	0.63 ± 0.34	0.80 ± 0.14
高氧对照组	8	1.40 ± 0.25 ^a	1.70 ± 0.27 ^a	1.65 ± 0.21 ^a
高氧干预组	8	1.25 ± 0.19 ^b	1.57 ± 0.40 ^b	1.72 ± 0.18 ^b
<i>F</i> 值		20.861	10.501	20.526
<i>P</i> 值		<0.001	0.004	<0.001

注: a 示与空气对照组比较, $P < 0.01$; b 示与空气干预组比较, $P < 0.05$ 。

表 5 各组早产鼠肺组织中不同时间点 β -catenin 蛋白相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3 d	5 d	9 d
空气对照组	8	0.41 ± 0.13	0.57 ± 0.16	0.62 ± 0.09
空气干预组	8	0.22 ± 0.08	0.36 ± 0.06	0.40 ± 0.14
高氧对照组	8	1.25 ± 0.19 ^a	1.41 ± 0.21 ^a	1.54 ± 0.23 ^a
高氧干预组	8	0.80 ± 0.19 ^{b,c}	0.93 ± 0.20 ^{b,c}	1.03 ± 0.18 ^{b,c}
<i>F</i> 值		26.432	22.522	26.939
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注: a 示与空气对照组比较, $P < 0.01$; b 示与空气干预组比较, $P < 0.01$; c 示与高氧对照组比较, $P < 0.05$ 。

表 6 各组早产鼠肺组织中不同时间点 α -SMA 蛋白的相对表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	3 d	5 d	9 d
空气对照组	8	0.58 ± 0.14	0.72 ± 0.13	0.72 ± 0.11
空气干预组	8	0.36 ± 0.13	0.51 ± 0.09	0.68 ± 0.18
高氧对照组	8	1.39 ± 0.19 ^a	1.44 ± 0.23 ^a	1.50 ± 0.16 ^a
高氧干预组	8	0.96 ± 0.17 ^{b,c}	0.97 ± 0.17 ^{b,c}	1.09 ± 0.16 ^{b,c}
F 值		24.142	18.004	18.116
P 值		<0.001	0.001	0.001

注: a 示与空气对照组比较, $P < 0.01$; b 示与空气干预组比较, $P < 0.05$; c 示与高氧对照组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

BPD 是早产儿呼吸系统常见疾病, 其本质是在遗传易感性的基础上, 在吸入高浓度氧、气压伤或容量伤、宫内感染或炎症等各种不利因素共同作用下, 对未发育成熟的肺造成损伤, 并出现损伤后肺组织异常修复及功能异常^[9-10]。近年来的研究显示 Wnt/ β -catenin 信号通路在肺发育、肺疾病的发生发展过程中起着极其重要的作用, β -catenin 的异常激活可导致肺泡型细胞异位分化, 导致气道、杯状细胞增生和肺泡空间增大^[11]。 β -catenin 作为经典 Wnt 信号通路的关键因子, 其在胞质内富集并向胞核内转移, 是 Wnt 信号通路活化的标志, 保持细胞胞浆中 β -catenin 稳定不被降解直接影响着 Wnt 信号通路的活化, 而 β -catenin 被降解的关键是其泛素化过程。去泛素化酶可通过切割多聚泛素链或者从修饰的底物蛋白中去除泛素, 逆转泛素化过程, 逆向调节了蛋白降解途径, 从而影响蛋白质的功能^[12]。

根据催化结构域的不同, 去泛素化酶主要分为 7 个亚家族, 包括泛素-特异性蛋白酶家族 (ubiquitin-specific proteases, USPs)、泛素羧基末端水解酶家族、卵巢肿瘤蛋白酶家族、MJD 结构域蛋白酶家族、MINDY 蛋白酶家族、ZUFSP 蛋白酶家族和 JAMM 蛋白酶家族^[13]; 其中, USPs 是迄今已知的最大的去泛素化酶家族。Xu 等^[14]研究证实了小鼠淋巴细胞中去泛素化酶 USP9X 过表达可致 β -catenin 表达增加。另有学者发现 USP4 可通过去泛素化作用积极调节 β -catenin 稳定性并增强转录活性, 对 Wnt/ β -catenin 信号通路起到正向调控的作用; 而敲除 USP4 则减弱了结肠癌细胞的侵

袭和迁移活性^[15]。也就是说, 去泛素化酶可以通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin 的表达变化, 在疾病的发生、发展过程中起作用。

USP7 在结直肠癌^[16]、肺癌^[17]、急性肺损伤^[18]、慢性淋巴细胞白血病^[19]等多种疾病中均有大量的研究。USP7 表达于血管上皮细胞、细支气管上皮细胞及肺泡上皮细胞中, 且其在博来霉素诱导的小鼠纤维化肺组织中表达增强^[6]。P5091 属于 USP7 噻吩类小分子抑制剂, An 等^[16]研究发现 P5091 可通过增强 β -catenin 的泛素化和亚序列降解来减弱 Wnt 信号途径传导的能力。

本实验取材的时间选择, 跨越了大鼠肺发育中的囊泡期与肺泡期, 与人类胎龄 28 周时处于囊泡期的肺组织结构相符。空气各组肺组织结构基本正常, 高氧对照组 3 d、5 d 可见肺泡明显压缩、结构紊乱, 有明显炎症细胞、红细胞渗出及间质水肿改变; 高氧对照组 9 d 可见肺泡结构紊乱、肺泡间隔明显增厚。高氧干预组肺组织结构紊乱、炎症细胞浸润、红细胞渗出情况均较相应时间点的高氧对照组有所减轻; 空气各组肺泡数目较高氧各组明显增加, RAC 显著增加, 且高氧干预组 RAC 较高氧对照组明显升高, 提示 USP7 特异性抑制剂 P5091 可能对高氧肺损伤有一定的保护作用。

本实验中, 高氧各组 USP7 的 mRNA 及蛋白的表达较对应的空气组均明显增加, 提示 USP7 可能参与了高氧肺损伤。USP7 可能作为关键的分子靶点参与了 Wnt 信号通路^[20]、NF- κ B 信号通路^[21]等多条信号转导通路途径。朱晓丹^[22]研究中发现, 去泛素化酶 A20 能通过抑制 NF- κ B 活化发挥抗炎作用。本实验高氧肺损伤早期, 肺泡腔中可见大量的以中性粒细胞为主的炎症细胞聚集, 推测早期肺组织的 USP7 升高很可能是通过对抗瀑式炎症反应而起保护作用。随着高氧暴露时间的延长, 肺损伤进一步加重, USP7 的表达也进一步增加, 表明其去泛素化作用增强, 同时伴随着下游底物分子 β -catenin 的表达增加; 在应用 USP7 特异性抑制剂 P5091 后, 虽然高氧对照组 USP7 蛋白及 mRNA 表达与高氧干预组比较差异无统计学意义 (考虑与 P5091 是通过抑制 USP7 活性而非影响其表达来发挥作用有关), 但 β -catenin 的表达明显减少, 进一步说明 P5091 通过变构作用使 USP7 作

用于泛素链的去泛素化作用减弱,使 β -catenin 的降解增强,导致胞浆中 β -catenin 的浓度降低,从而减少了 β -catenin 的核内转移,使 Wnt/ β -catenin 信号通路的活化受抑制。

α -SMA 是 Wnt/ β -catenin 信号通路下游的 1 个靶基因,表达于肌成纤维细胞中,是肺中上皮-间质转化的标志物^[23],代表了组织纤维化的程度。有研究表明,肌成纤维细胞表达强弱与肺纤维化程度呈正相关^[24]。本研究发现,高氧各组中 α -SMA 蛋白及 mRNA 表达均明显高于同时间点空气各组,提示高氧暴露肺损伤存在肺上皮-间质的转化增加,从而导致肺组织纤维化。在应用 USP7 特异性抑制剂 P5091 的高氧组中 α -SMA 蛋白及其 mRNA 表达均比高氧对照组明显降低,提示 P5091 可能通过拮抗 USP7 的去泛素化作用,减少肺上皮-间质转化来参与高氧肺损伤起保护作用。

综上所述,本实验研究结果提示了高氧暴露可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路;USP7 可能通过 Wnt/ β -catenin 信号通路来参与高氧肺损伤;USP7 特异性抑制剂 P5091 可能通过减弱 USP7 的去泛素化作用,加强 β -catenin 的泛素化而加速其降解,降低 Wnt/ β -catenin 通路的活化,减少肺上皮-间质转化,从而对高氧肺损伤产生一定的保护作用。而有关 USP7 与 Wnt/ β -catenin 信号通路在高氧肺损伤中的具体作用机制仍有待进一步研究。

【参 考 文 献】

[1] Kim JH. Di(2-ethylhexyl) phthalate promotes lung cancer cell line A549 progression via Wnt/ β -catenin signaling[J]. *J Toxicol Sci*, 2019, 44(4): 237-244.

[2] 严隆丽,全裕凤,张华,等. SOX9 及 WNT 信号通路分子在高氧暴露致早产大鼠肺损伤中的表达及意义[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(4): 552-557.

[3] Hosseinzadeh A, Javad-Moosavi SA, Reiter RJ, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) signaling pathways and protective roles of melatonin[J]. *Life Sci*, 2018, 201: 17-29.

[4] 黄宇戈,封志纯,余彦亮,等. 泛素-蛋白酶体途径在高体积分数氧肺损伤大鼠早期的激活[J]. *实用儿科临床杂志*, 2009, 24(6): 422-424.

[5] Novellasdemunt L, Foglizzo V, Cuadrado L, et al. USP7 is a tumor-specific WNT activator for APC-mutated colorectal cancer by mediating β -catenin deubiquitination[J]. *Cell Rep*, 2017, 21(3): 612-627.

[6] 彭清,高习文. 泛素特异性蛋白酶 7 在博莱霉素诱导的小鼠炎症及肺纤维化过程中的表达及作用[J]. *蚌埠医学院学报*, 2018, 43(7): 845-849.

[7] 王少华,党红星,范倩倩,等. 早产新生大鼠高氧肺损伤 Shh

信号转导途径 Smo 和 Gli1 蛋白表达和意义[J]. *中国新生儿科杂志*, 2014, 29(1): 49-53.

[8] 严隆丽,全裕凤,张华,等. 早产大鼠在高氧暴露下肺组织高迁移率族盒蛋白 4 和 β -连环素的表达及意义[J]. *中华新生儿科杂志*, 2018, 33(2): 136-141.

[9] 陈超,袁琳. 早产儿支气管肺发育不良的病因及危险因素[J]. *中国实用儿科杂志*, 2014, 29(1): 5-7.

[10] 李燕,韦秋芬,潘新年,等. 早产儿支气管肺发育不良严重程度的影响因素[J]. *中国当代儿科杂志*, 2014, 16(10): 1014-1018.

[11] Mucenski ML, Nation JM, Thitoff AR, et al. Beta-catenin regulates differentiation of respiratory epithelial cells in vivo[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 289(6): L971-L979.

[12] 梁超超,程梦华,刘石娟. 去泛素化酶活性的调控[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(1): 38-44.

[13] Geurink PP, van der Heden van Noort GJ, Mulder MPC, et al. Profiling DUBs and Ubl-specific proteases with activity-based probes[J]. *Methods Enzymol*, 2019, 618: 357-387.

[14] Xu J, Taya S, Kaibuchi K, et al. Spatially and temporally specific expression in mouse hippocampus of Usp9x, a ubiquitin-specific protease involved in synaptic development[J]. *J Neurosci Res*, 2005, 80(1): 47-55.

[15] Yun SI, Kim HH, Yoon JH, et al. Ubiquitin specific protease 4 positively regulates the WNT/ β -catenin signaling in colorectal cancer[J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(9): 1834-1851.

[16] An T, Gong Y, Li X, et al. USP7 inhibitor P5091 inhibits Wnt signaling and colorectal tumor growth[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 131: 29-39.

[17] Li J, Han Y, Zhang H, et al. The m6A demethylase FTO promotes the growth of lung cancer cells by regulating the m6A level of USP7 mRNA[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(3): 479-485.

[18] Wang J, Li HY, Su ZB. Stabilization of the histone acetyltransferase Tip60 by deubiquitinating enzyme USP7 stimulates the release of pro-inflammatory mediators in acute lung injury[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2020, 98(6): 907-921.

[19] Carrà G, Panuzzo C, Torti D, et al. Therapeutic inhibition of USP7-PTEN network in chronic lymphocytic leukemia: a strategy to overcome TP53 mutated/deleted clones[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(22): 35508-35522.

[20] Li X, Kong L, Yang Q, et al. Parthenolide inhibits ubiquitin-specific peptidase 7 (USP7), Wnt signaling, and colorectal cancer cell growth[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(11): 3576-3589.

[21] Mitxitorena I, Somma D, Mitchell JP, et al. The deubiquitinase USP7 uses a distinct ubiquitin-like domain to deubiquitinate NF- κ B subunits[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(33): 11754-11763.

[22] 朱晓丹. 锌指蛋白 A20 对急性肺损伤炎症反应的调控及机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2012.

[23] Tan ZX, Chen YH, Xu S, et al. Calcitriol inhibits bleomycin-induced early pulmonary inflammatory response and epithelial-mesenchymal transition in mice[J]. *Toxicol Lett*, 2016, 240(1): 161-171.

[24] Darby IA, Zakuan N, Billet F, et al. The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(6): 1145-1157.

(本文编辑: 万静)