

• 基础研究 •

泛素特异性肽酶 20 通过调节 TGF- β 1/SMAD 3 级联反应缓解脓毒症性急性肺损伤中的氧化应激和炎症

张燕琴 董菲艳 刘学锋

【摘要】 目的 本研究旨在探讨泛素特异性肽酶 20 (USP20) 在脓毒症性急性肺损伤 (ALI) 中的作用及具体机制。**方法** 分别用 BEAS-2B 细胞和 C57BL/6 小鼠建立体内和体外脂多糖 (LPS) 处理的 ALI 模型。RT-qPCR 检测 USP20 的表达情况,在体外实验模型中转染 USP20 腺病毒后,通过 ELISA、CCK8 和蛋白质印迹等方法观察其对 ALI 细胞模型的炎症、氧化应激、生存力等的影响。在 USP20 过表达治疗后的体内模型中,进一步观察病理变化情况。**结果** 在 ALI 小鼠模型、LPS 处理的 BEAS-2B 细胞中证实低表达 USP20;上调 USP20 可阻止炎症和氧化应激,同时增强了 LPS 处理的 BEAS-2B 细胞的生存能力;上调的 USP20 通过抑制 TGF- β 1/SMAD3 级联激活减轻 ALI 小鼠的肺损伤。**结论** USP20 通过调节 TGF- β 1/SMAD3 级联反应缓解脓毒症性 ALI 的氧化应激和炎症。

【关键词】 脓毒症性急性肺损伤; USP20; 炎症; 氧化应激

【中图分类号】 R563.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2024)08-0075-04

脓毒症是由严重感染引起的全身炎症反应综合征^[1]。急性肺损伤 (ALI) 和更严重的急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 是急性全身性炎症过程的肺部表现,由过度炎症和凋亡导致肺泡上皮细胞破坏、上皮通透性增加和水肿液流入肺泡间隙所导致^[2]。炎症反应是脓毒症性 ALI 的发病机制之一,这一过程与炎症细胞因子和趋化因子如:转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、白细胞介素 IL-1 β 、IL-6、IL-13 和肿瘤坏死因子 (TNF- α) 等的上调有关^[3-4];此外,氧化应激也是脓毒症性 ALI 的关键病理过程之一^[5]。TGF- β 1 与多种疾病中的氧化应激有关^[6],表明 TGF- β 1 在脓毒症性 ALI 中的重要性。泛素特异性肽酶 20 (USP20) 是一种去泛素化酶,它具有从特异性泛素链中去除多聚泛素链的强大能力^[7-8]。USP20 参与了广泛的生理活动,包括免疫反应、炎症和抗病毒反应^[9-10],显示了 USP20 在这些炎症相关疾病发病机制中的潜力。本研究假设 USP20 通过 TGF- β 1/SMAD3 级联反应减轻脓毒症性 ALI 中的氧化应激和炎症,旨在探讨 USP20 在脓毒症性 ALI 发病机制中以前未被重视的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 Lipofectamine 3000 (美国 Invitrogen 公司); BEAS-2B (中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,目录号:GNHu27); LPS

(美国 sigma 公司); C57BL/6 小鼠 [广州赛业百沐生物科技有限公司,生产许可证编号:SCXK (粤) 2020-0055]; USP20 腺病毒 [云舟生物科技 (广州) 股份有限公司]; 酶联免疫吸附测定试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司); 超氧化物歧化酶活性试剂盒 (南京程健生物工程研究所); BCA 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 一步法 RT-qPCR 试剂盒 (上海联迈生物工程有限公司); TGF- β 1、Smad3、p-Smad3 及 GAPDH (武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 使用过表达 USP20 腺病毒 pRP [Exp] -EGFP/Puro-EF1A > USP20 (简称 AP-USP20) 感染人正常肺上皮细胞系 BEAS-2B, 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h,将细胞暴露于 1.0 μ g/mL LPS 24 h,建立 LPS 诱导的 ALI 模型。

1.2.2 实验动物 成年健康雄性 C57BL/6 小鼠 25~30 g, 6~8 周龄,在 61% 空气湿度、21~26 °C 温度和 12 h 光照/黑暗条件下饲喂标准饲料和纯净水。腹腔注射 10 mg/kg LPS 诱导脓毒症性 ALI,正常对照组小鼠注射 0.2 mL 生理盐水。将小鼠分 4 组 (正常对照组 Con、AP-USP20 组、LPS 组和 LPS+AP-USP20 组),每组 8 只小鼠。LPS+AP-USP20 组的小鼠在 LPS 诱导前连续 3 d 静脉注射 AP-USP20 腺病毒。

作者单位: 宁德师范学院附属宁德市医院, 宁德 352000

DOI: 10.20148/j.fmj.2024.08.022

1.2.3 炎症因子检测 通过离心收集小鼠血清,并收集 BEAS-2B 细胞培养物上清液。使用酶联免疫吸附测定试剂盒检测血清和细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达量。在酶标仪上于 490 nm 的波长处测定吸光度。

1.2.4 氧化应激检测 将 BEAS-2B 细胞悬浮在 0.3 mL PBS 中,并在冰上超声破碎以提取细胞总蛋白质。用生理盐水将肺组织制备成组织匀浆,按照试剂盒说明书测定超氧化物歧化酶 (superoxide-dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 的含量。

1.2.5 CCK8 检测 BEAS-2B 细胞接种在 96 孔板中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h,用新鲜 DMEM 替换培养基,再孵育 12 h,随后加入 CCK8 (10 μL /孔),酶标仪上测量 490 nm 的波长。

1.2.6 苏木精-伊红染色法 将小鼠肺组织制成 5 nm 切片并包埋在石蜡中。石蜡切片用常规梯度酒精脱水,用二甲苯清洗,苏木精染色,用 1% 曙红溶液反染后,切片行常规脱水和渗透处理,密封,并在显微镜下观察。

1.2.7 定量实时 PCR 检测 收集小鼠的肺组织及干预的 BEAS-2B 细胞,用 Trizol 法提取总 RNA。USP20 引物序列为: F: 5'-GGCTGATGAAG-GAGAGTCTGAG-3'; R: 5'-GCCACACTCCAA-GAAGAACTGA-3'。根据一步法 RT-qPCR 试剂盒说明,按照两步法扩增程序: 42 $^{\circ}\text{C}$ 30 min、94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min、然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 进行 40 个循环。所有实验重复 3 次。

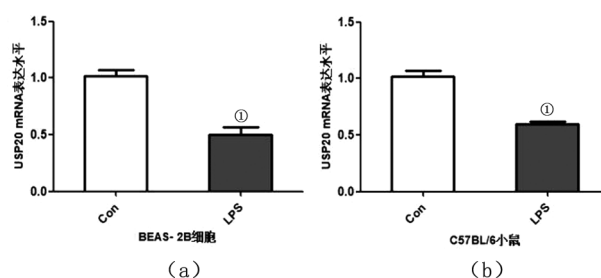
1.2.8 蛋白质印迹 提取小鼠肺组织和 BEAS-2B 细胞以获得总蛋白,并通过 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。通过 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,随后通过免疫印迹到 PVDF 膜上并用 5% BSA 封闭。TGF- β 1、Smad3、p-Smad3 和 GAPDH 等一抗的浓度为 1:1 000,向膜中加入化学发光试剂,观察条带并使用 Image J 软件进行分析。

1.2.9 统计学分析 GraphPad Prism 8 用于统计分析,数据使用平均值 \pm 标准差表示。正态分布的数据用 Student's *t* 检验进行评估;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 USP20 在体内和体外脓毒症性 ALI 模型中下调 RT-qPCR 结果证实了 LPS 处理的 BEAS-2B 细胞 (图 1a) 和 LPS 诱导的小鼠肺组织中 USP20 表达量被显著抑制 (图 1b)。证实了 USP20 在 LPS

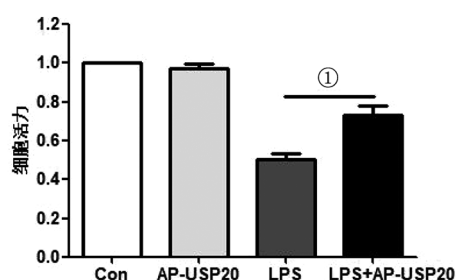
诱导的毒性 ALI 细胞和小鼠模型中表达是下调的。



注: (a) LPS 处理的 BEAS-2B 细胞; (b) LPS 处理的小鼠肺组织 ($n=8$)。与 Con 组比较, ① $P < 0.001$ 。

图 1 USP20 在细胞和 ALI 小鼠模型中表达情况

2.2 USP20 抑制 LPS 诱导的炎症和氧化应激 当分析 USP20 在脓毒症性 ALI 中的机制时,用 LPS 和 USP20 腺病毒感染 BEAS-2B 细胞 48 h。首先,利用 CCK8 分析证实,与正常对照组相比,LPS 中的细胞存活率明显降低;与 LPS 组相比,USP20 腺病毒感染的细胞存活率明显升高 (图 2)。

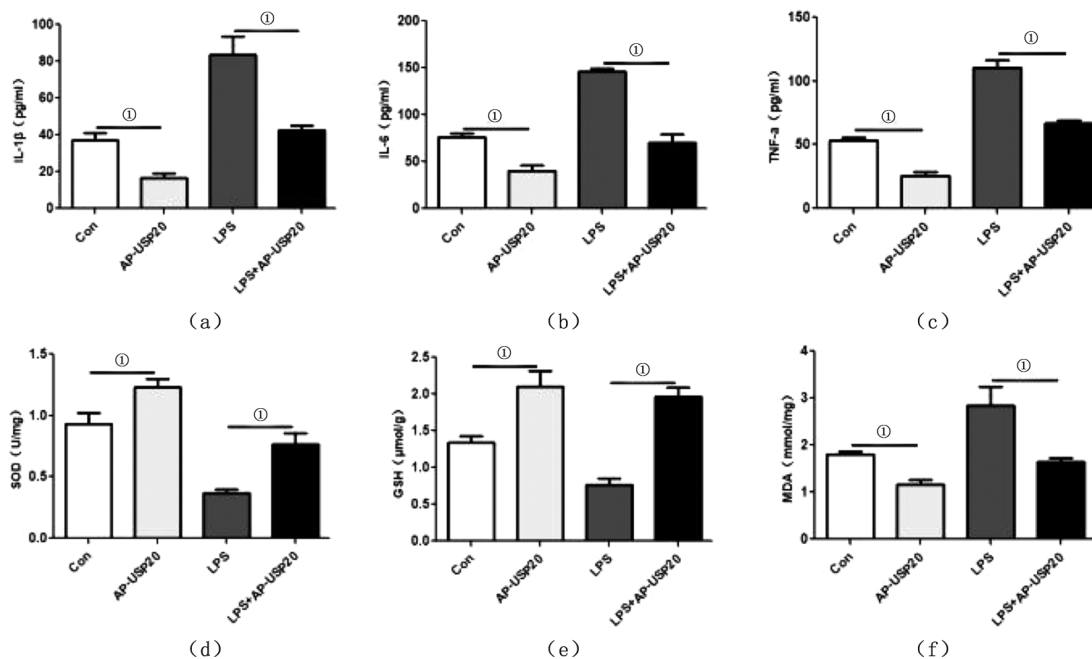


注: 与 LPS 组比较, ① $P < 0.001$ 。

图 2 过表达 USP20 对细胞活力的影响

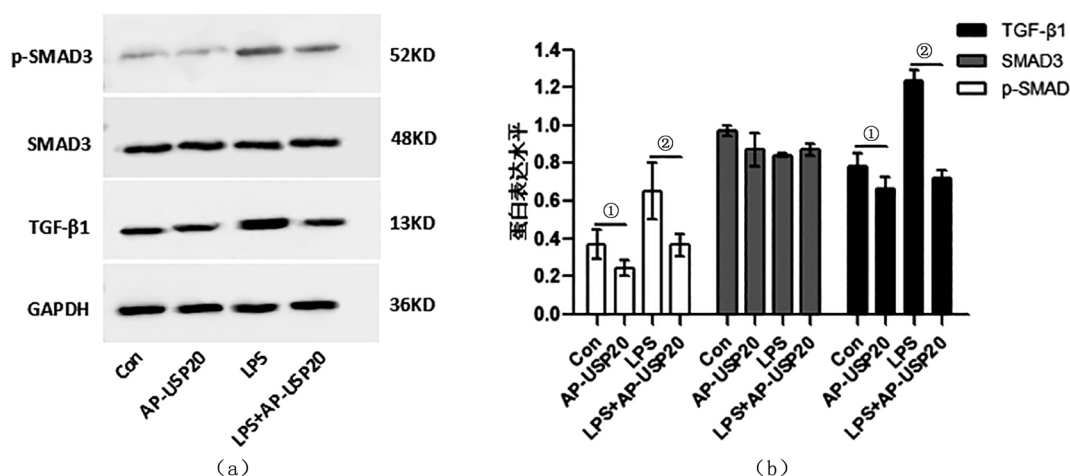
ELISA 实验证实,与 LPS 组相比,USP20 腺病毒感染 BEAS-2B 细胞后,细胞因子 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的含量明显减少 (图 3a~c)。同时发现与 LPS 组相比,过表达 USP20 可以明显提升氧化应激指标 SOD 和 GSH 的表达量,降低 MDA 的含量 (图 3d~f)。这些观察表明 USP20 在体外减轻了 LPS 诱导的炎症和氧化应激。

2.3 USP20 调节 TGF- β 1/SMAD3 级联反应 蛋白质印迹实验结果显示:经 LPS 诱导的 ALI 模型组,TGF- β 1 和磷酸化 SMAD3 的蛋白表达水平明显升高,尤其是磷酸化 SMAD3 的蛋白表达水平升高更明显;当过表达 USP20 后,明显降低了 TGF- β 1 和磷酸化 SMAD3 的蛋白表达水平,而对 SMAD3 没有影响 (图 4a~b)。这些结果说明 USP20 可能是



注：(a~c) 炎症因子浓度；(d~f) 氧化应激相关指标的含量。① $P < 0.001$ 。

图 3 过表达 USP20 缓解 LPS 诱导的炎症和氧化应激



注：① $P < 0.01$ ，② $P < 0.001$ 。

图 4 TGF-β1/SMAD3 级联相关因子蛋白表达水平

通过调节 TGF-β1/SMAD3 级联反应来控制炎症和氧化应激。

2.4 USP20 防止体内 LPS 诱导的炎症 研究结果最终证实了 USP20 在 LPS 诱导的炎症中的作用。HE 组织染色显示正常对照组的肺组织结构完整，没有肺泡隔水肿和炎症；然而，LPS 注射组肺泡结构严重损害，肺泡隔增宽，伴有肺间质渗出、出血和大量炎性细胞浸润；在 ALI 组中观察到的这些病理损伤在过表达 USP20 预处理组中得到缓解（图 5，见封四）。这些结果证实了 USP20 在体内一定程度上阻止 LPS 诱导的炎症的形成。

3 讨论

目前没有针对脓毒性 ALI 的特效药物或治疗方法。本研究主要是关于 USP20 在脓毒性 ALI 中发挥的作用和机制进行初步研究：包括研究 USP20 在小鼠体内和脓毒性 ALI 细胞模型中的表达情况，以及了解 USP20 在 LPS 诱导 ALI 细胞模型的炎症和氧化应激中发挥作用的具体机制。该研究旨在明确 USP20 可以通过调节 TGF-β1/SMAD3 级联反应来缓解 LPS 诱导的炎症和氧化应激。

脓毒症主要由细胞对感染的反应引起^[11]。在 ALI 的病因中，脓毒症导致的 ALI 发病率和死亡率

最高^[12]。脓毒症的发生与伤口上的细菌或细菌毒素 LPS 有关。LPS 诱导的体内和体外模型已被认为是脓毒症所致急性肺损伤的经典模型^[13]，其可诱发脓毒症、脓毒性休克和多器官功能障碍综合征。LPS 通过多种信号诱导机体的免疫反应转导通路，刺激免疫细胞产生大量具有产热作用的炎性细胞因子，如 TNF- α 和 IL-6，导致免疫系统过度激活^[14]。同时，脓毒症导致肺泡上皮细胞破坏、炎性渗出和呼吸窘迫。这些现象与本研究在 LPS 诱导的脓毒症性 ALI 小鼠中观察到的现象一致。同时在这项研究中，LPS 诱导的 ALI 小鼠血液中炎症和氧化应激标志物（IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、SOD 和 GSH 等）水平显著升高，这也表明本研究中使用的体内模型具有高度的代表性和模拟性。

因此，研究脓毒症 ALI 中异常表达的 USP20 的功能可能有助于研发脓毒症性 ALI 的有效治疗方法。在目前的研究中，USP20 在 LPS 处理的小鼠和 BEAS-2B 细胞模型中表达量下调，提示 USP20 可能参与了脓毒性 ALI 的发展。本研究的体外细胞实验表明，上调 USP20 可以通过抑制氧化应激和炎症损伤来减轻 LPS 诱导的细胞损伤。此外，动物实验结果与细胞观察结果一致。

本研究探索了 USP20 调节脓毒症性 ALI 的可能机制，发现在 BEAS-2B 细胞中经 LPS 处理可以激活 TGF- β 1/SMAD3 级联反应，上调 USP20 可以抑制 TGF- β 1 和 p-Smad3 蛋白的表达。尽管 TGF- β 1 介导的急性肺损伤的潜在机制尚不清楚，但 TGF- β 1 是参与多种病理生理过程的重要炎症细胞因子。相关研究表明 TGF- β 1 可能通过增加肺微血管内皮细胞和肺泡上皮细胞的通透性而增强急性肺损伤^[15]。急性肺损伤体内 TGF- β 1 的升高与疾病进展的晚期有关，并在疾病进展的早期导致肺损伤^[16]。TGF- β 1/SMAD3 级联反应参与炎症、纤维化和上皮-间质转化中的肺损伤^[17]。相关研究也证实了 TGF- β 1/SMAD3 级联失活对脓毒症性 ALI 的缓解作用^[18]。与上述研究的发现一致，本研究证实 USP20 通过 TGF- β 1/SMAD3 级联反应失活改善 LPS 诱导的氧化应激和炎症损伤。

总的来说，本研究揭示了 USP20 通过以积极的方式抑制炎症和氧化应激，从而改善 LPS 带来的脓毒炎症的损伤。但是也有一些局限性，如需要测试更大的人群以阐明血清中 USP20 的表达与脓毒性 ALI 的病理特征之间的关系；USP20 也可能通过调节其他下游靶点在脓毒症性 ALI 中发挥保护作

用，这都需要进一步的研究。

参考文献

- [1] 彭海伦, 赵月丽, 徐崇孝, 等. 成人脓毒症分型研究进展 [J]. 解放军医学杂志, 2023, 48 (9): 1107-1112.
- [2] TOMITA K, SAITO Y, SUZUKI T, et al. Vascular endothelial growth factor contributes to lung vascular hyperpermeability in sepsis-associated acute lung injury [J]. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 2020, 393 (12): 2365-2374.
- [3] JING R, XIE X, LIAO X, et al. Transforming growth factor- β 1 is associated with inflammatory resolution via regulating macrophage polarization in lung injury model mice [J]. Int Immunopharmacol, 2024, 142: 112997.
- [4] ZHANG J, GUO Y, MAK M, et al. Translational medicine for acute lung injury [J]. J Transl Med, 2024, 22 (1): 25.
- [5] 陈文胜, 刘文明. 脓毒症诱发肝损伤的发病机制研究进展 [J]. 江苏大学学报 (医学版), 2023, 33 (2): 112-117.
- [6] CHEN H Y, HO Y J, CHOU H C, et al. TGF- β 1 signaling protects retinal ganglion cells from oxidative stress via modulation of the HO-1/Nrf2 pathway [J]. Chem Biol Interact, 2020, 331 (0): 109249.
- [7] KIM J H, SEO D, KIM S J, et al. The deubiquitinating enzyme USP20 stabilizes ULK1 and promotes autophagy initiation [J]. EMBO Rep, 2018, 19 (4): e44378.
- [8] 方玲玉, 侯令密, 陈艳茹, 等. 乳腺癌组织中 USP20 与 Ezrin 表达的相关性及临床意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2023, 31 (15): 2850-2854.
- [9] ZHANG M X, CAI Z, ZHANG M, et al. USP20 promotes cellular antiviral responses via deconjugating K48-Linked Ubiquitination of MTA [J]. J Immunol, 2019, 202 (8): 2397-2406.
- [10] 钟睿梓, 张悦, 黄晓珺. 去泛素化酶 USP20 与胆固醇结石 [J]. 中国医学创新, 2024, 21 (2): 179-183.
- [11] 张碧莹, 路明, 林菲, 等. 细菌性肝脓肿并发脓毒症的临床特征 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39 (3): 307-311.
- [12] SUN B, LEI M, ZHANG J, et al. Acute lung injury caused by sepsis: how does it happen? [J]. Front Med (Lausanne), 2023, 10: 1289194.
- [13] MILARA J, PEIRÓ T, SERRANO A, et al. Epithelial to mesenchymal transition is increased in patients with COPD and induced by cigarette smoke [J]. Thorax, 2013, 68 (5): 410-420.
- [14] ZHOU M, MENG L, HE Q, et al. Valsartan attenuates LPS-induced ALI by modulating NF- κ B and MAPK pathways. [J]. Front Pharmacol, 2024, 15: 1321095.
- [15] ISSHIKI T, NAIEL S, VIERHOUT M, et al. Therapeutic strategies to target connective tissue growth factor in fibrotic lung diseases. [J]. Pharmacol Ther, 2024, 253: 108578.
- [16] ZHAO M, WANG M, CHEN X, et al. Targeting progranulin alleviated silica particles-induced pulmonary inflammation and fibrosis via decreasing IL-6 and Tgf- β 1/Smad [J]. J Hazard Mater, 2024, 465: 133199.

(下转第 87 页)

有一定的局限性有关。另外,也可能是该模式使用过程中方式方法不妥当,没有充分发挥线上线下结合的优势:带教导师在授课过程中经常发现有部分学生没有做好预习,课后也没有很好复习,可以加强线上平台的考勤、互动,观察并督促学生日常学习;临床思维训练课程不再以讲者为主体,而是选定学生分组处理病例信息,查询相关资料后共同制作 PPT,带教导师引导并完善 PPT,并以问题形式发布预习任务,课堂上分组讨论并以提出问题、回答问题和最后总结的方式带动全员积极参与,让学生的学习积极性与自主性充分调动起来。混合教学更注重临床思维能力等综合能力的培养,而综合考试的许多知识点需课后不断记忆及背诵,需个人努力加持。混合式教学更多是培养解决临床问题的能力^[11],与应试考试有相悖之处,因此不能完全使用综合考试成绩来判定该模式的应用效果。在后续进一步的研究中,可以应用更多客观指标来评定,如使用自我效能感量表、医学生自主学习能力测评量表^[12]来评价学习能力,使用改良版麻醉迷你临床演练评估量表^[13]来评价临床胜任力,或者可以借鉴客观结构化临床考核全方位地对实习生的临床能力进行评价^[14]。

综上所述,在麻醉临床实习阶段实施传统带教法+导师制+基于“超星学习通”的线上线下混合式教学能够提高教师教学质量,提升学生实习质量、学习兴趣及临床思维能力等,但在实践中需要注意调整带教的方式方法以及评价的模式,后续在该教学模式的应用上应适当改进,以期全方位提升实习生的成绩与能力。

参考文献

[1] 银世杰,武伟,覃冠斌,等.分阶段教学模式在临床麻醉实习

带教中的应用效果[J].临床医学研究与实践,2020,5(4):182-183.

[2] 石海霞,杜雪江.“互联网+”教学在麻醉实习教学的应用[J].教育教学论坛,2018,9(24):269-270.

[3] 郑晓春,郑艇,许文言,等.以“实习导师制”为核心的麻醉学实习医师入科专项培训制度的实践与评价[J].大学教育,2016,5(8):179-180.

[4] 王秀红,陈世彪,雷恩骏,等.麻醉本科生实习阶段精细化培养的的实施与评价[J].中国继续医学教育,2019,11(12):35-37.

[5] 朱倩男,吴婷婷,唐健,等.从医教协同谈提高临床实践教学效率[J].南京医科大学学报(社会科学版),2019,19(5):415-418.

[6] 唐志航.麻醉学学生临床实习中多模式融合教学法的应用效果[J].中国继续医学教育,2021,13(18):37-41.

[7] 任长和,吴刚明,李刚,等.CBL与SGD结合教学法在麻醉学临床实习教学中的应用[J].中国继续医学教育,2020,12(3):6-8.

[8] 郭乐乐,郭春燕.千聊互动式网络教学与病例模拟教学方式整合在麻醉学本科生实习教育中的探索与效果评价[J].内蒙古医科大学学报,2024,46(S1):81-84.

[9] 舒礼佩.参与式教学在麻醉学实习教学中的应用研究[J].蛇志,2020,32(2):254-255.

[10] 宋丽莉,赵松,张宏伟,等.翻转课堂对临床麻醉课程的实践教学效果[J].中国继续医学教育,2019,11(12):37-39.

[11] 卫兵,郭玉堂,谢飞,等.基于智慧课堂的计算机程序设计类课程教学模式探究[J].计算机教育,2019,17(2):91-94.

[12] 任团团,孙晓峰,王宇恒,等.整合医学模式下多模式教学在麻醉实习中的应用效果[J].中国当代医药,2022,29(3):157-160.

[13] 张生茂,赵智慧,王晶,等.以临床胜任力培养为导向的病例讨论教学在麻醉专业临床实习的应用研究[J].内蒙古医学杂志,2023,55(11):1365-1367.

[14] 吴建江,陈思宇,戴晓雯,等.客观结构化临床考核在麻醉实习教学中的问题分析及对策研究[J].中国医药导报,2022,19(4):84-87.

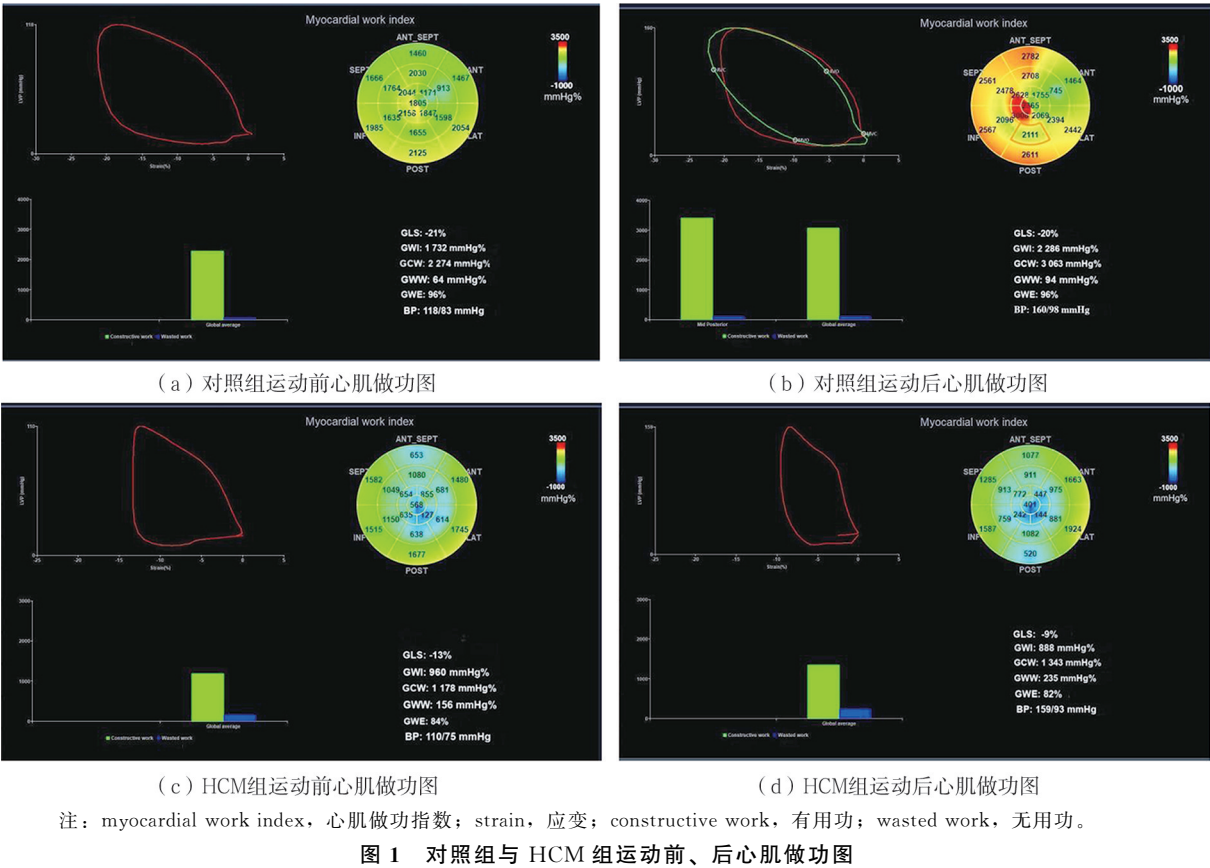
(上接第 78 页)

[17] YING H, FANG M, HANG Q Q, et al. Pirfenidone modulates macrophage polarization and ameliorates radiation-induced lung fibrosis by inhibiting the TGF- β 1/Smad3 pathway [J]. J Cell Mol Med, 2021, 25: 8662-8675.

[18] XU X M, XU X H, CAO J L, et al. MicroRNA-1258 suppresses oxidative stress and inflammation in septic acute lung injury through the Pknox1-regulated TGF- β 1/SMAD3 cascade [J]. Clinics (Sao Paulo), 2024, 79: 100354.

心肌做功联合心肺运动试验在肥厚型心肌病患者中的临床应用

(详见正文第 9 页)



泛素特异性肽酶 20 通过调节 TGF- β 1/SMAD 3 级联反应缓解脓毒症性急性肺损伤中的氧化应激和炎症

(详见正文第 75 页)

