

泛素特异性蛋白酶 4 对人增生性瘢痕成纤维细胞增殖的影响*

陈燕¹, 章杰^{2△}

(1. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院皮肤外科, 杭州 310020;

2. 南昌大学第一附属医院口腔颌面整形外科, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨泛素特异性蛋白酶 4(USP4)对增生性瘢痕(HS)成纤维细胞增殖的影响。**方法** 体外培养人 HS 成纤维细胞(HSFB),并取第 4 代细胞用于试验。利用 Vialinin A(USP4 抑制剂)干预 HS 成纤维细胞,Western blot 检测干预细胞中不同时间段(0、12、24、48 h)USP4、T β RI 及 Smad7 蛋白的表达,四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 Vialinin A 对 HS 成纤维细胞增殖的影响,分为试验组和对照组(不作干预)。**结果** Vialinin A 作用后,随着时间推移,HSFB 中的 USP4 蛋白表达逐渐减低,T β RI 的蛋白也逐渐减低,在作用 12 h 后明显降低($P < 0.05$);Smad7 的蛋白表达则逐渐升高($P < 0.05$)。Vialinin A 同一浓度作用后,随着时间推移,HSFB 增殖活性逐渐受到抑制,试验组与对照组同一时间段比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** USP4 可能通过调控 TGF- β /Smad 信号通路影响瘢痕细胞增殖,抑制其表达可使 HS 成纤维细胞增殖减慢。

[关键词] 泛素化;瘢痕,肥大性;成纤维细胞;泛素特异性蛋白酶 4;增生性瘢痕;Vialinin A;增殖

[中图分类号] R619.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)15-2021-03

The effect of USP4 on the proliferation of human hypertrophic scar fibroblasts*

Chen Yan¹, Zhang Jie^{2△}

(1. Department of Skin Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital School of Medicine, Zhejiang University,

Hangzhou, Zhejiang 310020, China; 2. Oral and Maxillofacial Plastic Surgery, the First Affiliated

Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of USP4 on the proliferation of human hypertrophic scar fibroblasts(HS-FB). **Methods** HSFB were cultured in vitro. The fourth generation of HSFB in logarithmic growth phase was selected in the experiment. HSFB were intervened by Vialinin A which was the inhibitor of USP4 for 0, 12, 24, 48 h, then collected cells and the their expression of USP4 and T β RI and Smad7 protein was detected by Western blot, MTT assay was used to detect the effect of Vialinin A on the proliferation of HS fibroblasts and the cells were divided into experimental group and control group (without intervention). **Results** After treatment with Vialinin A in HSFB, the expression of USP4 and T β RI protein in HSFB decreased gradually, especially in 12 h($P < 0.05$), and Smad7 protein expression was increased gradually($P < 0.05$). The proliferative activity of intervened HSFB reduced gradually, the difference between experimental group and control group was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** USP4 might inhibit the proliferation of scar cells and down-regulation of USP4 expression in hyperplastic scar fibroblasts, which can slow proliferative activity of intervened HSFB by regulating TGF- β /Smad signaling pathway.

[Key words] ubiquitination; cicatrix, hypertrophic; fibroblast; USP4; hypertrophic scar; Vialinin A; proliferation

增生性瘢痕(hypertrophic scar, HS)是人体对创伤过度愈合反应的结果,在临床上非常多见,常表现为瘢痕形状不规则、质地坚硬,严重影响外观,有时伴有功能障碍,部分患者还会有疼痛和瘙痒感,甚至产生瘢痕溃烂、癌变可能^[1-2]。虽然增生瘢痕的危害很大,但其病因和发病机制目前仍未完全清楚。转化生长因子 β (TGF- β)的重要生物学功能正逐渐引起人们的重视。创面愈合过程中,TGF- β /Smad 信号通路的持续激活,会导致 HS 的形成^[3]。近年来研究发现,泛素特异性蛋白酶(USP)4 可增强 TGF- β 信号通路的水平,并与 T β RI 结合,抑制其泛素化降解,进而提高胞膜上 T β RI 的表面分布水平^[4]。但其在 HS 成纤维细胞中的影响少见报道。而 Vialinin A 是一种半选择性的泛素特异性蛋白酶抑制剂,可较强烈地抑制 USP4 及 USP5^[5-6],最初是从中国云南省发现的一种可食用的蘑菇莲座革菌分离出来的小分子化合物,是一种三联苯衍生物^[6]。本试验从 HS 患者中切取 HS 组织,体外培养 HS 成纤维细胞,加入泛素特异性蛋白酶抑制剂 Vialinin A 抑制 USP4 表达,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 病理组织 取自 2014 年 4 至 7 月于本科行 HS 整形手术患者,男 10 例,女 5 例,年龄 6~16 岁。均体质健康,近期未使用任何瘢痕药物治疗;瘢痕组织处于稳定期(形成时间 6~16 个月);以四肢、颈部为主,高于周围正常皮肤,质地硬,局部无感染及溃疡,经临床和病理证实为 HS 组织并无恶变。本试验均征得患者同意并已签署知情同意书。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司),胎牛血清(美国 Hyclone 公司),Vialinin A(美国 Cayman 公司),胰蛋白酶-含 0.25% 乙二胺四乙酸(EDTA,美国 Gibco 公司),二甲基亚砜(DMSO,北京 Solarbio 公司),二氨基联苯胺(DAB)试剂盒(北京 Solarbio 公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT,美国 Gibco 公司),兔抗人 USP4 多克隆抗体(美国 Abcam 公司),兔抗人 T β RI 多克隆抗体(美国 Abcam 公司),兔抗人 Smad7 多克隆抗体(武汉 Boster 公司),兔抗人 β -actin 多克隆抗体(武汉 Boster 公司),山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)-辣根

过氧化物酶(HRP,北京 Solarbio 公司),增强型 ECL 化学发光液(北京 Solarbio 公司);CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司),超净工作台(美国 Fisher 公司),倒置显微镜及照相系统(日本 Olympus 公司),TS-10 高速离心机(湖南湘仪公司),酶联免疫检测仪(芬兰 M_μLtiskan Ascent 公司)。

1.2 方法

1.2.1 人 HSFB 体外培养

采用林尊文等^[7]的改良组织块贴壁结合胰蛋白酶消化法体外培养成纤维细胞:从整形手术中切取 HS 在无菌操作条件下,迅速带至实验室超净台中(超净台预先紫外灯照射约 1 h)放置于无菌培养皿中,彻底去除表皮和脂肪组织,残留白色质硬的瘢痕组织 PBS 漂洗 3 次;用眼科剪将组织块剪成 0.5~1.0 mm³ 大小的微粒,加入 0.25% 的胰蛋白酶约 1 mL 浸没组织块,置于 4 °C 冰箱中冷消化过夜;第 2 天 PBS 漂洗 3 次后(以去除残留胰酶),用 1 mL 注射器将组织块接种至培养瓶中,组织块间隙在 0.3~0.5 cm,将已经接种好的培养瓶竖立置于 37 °C,5% CO₂,饱和湿度的培养箱中干燥约 1 h;缓慢取出培养瓶,分别加入约 3 mL 含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液于各培养瓶中,使组织块没入培养液中,平放置于恒温箱中继续培养。每隔 3~5 d 换液 1 次。显微镜下观察,适时去除漂浮及无细胞生长组织块,待组织块周围爬出的细胞基本融合成片,密度达 80% 以上时,将瓶底细胞按 1:2 传代培养。取第 4 代细胞用于试验研究。

1.2.2 VialininA 干预 HSFB

1.2.2.1 Western blot 检测细胞内 USP4、TβRI 及 Smad7 蛋白表达

取生长状态良好的 HS 成纤维细胞消化、离心及弃去上清液,加入 2 mL 含 10% 胎牛血清的培养液混匀制成细胞悬液,取 10 μL 计数,确定细胞浓度,以每孔 2×10⁵ 密度将细胞接种到 6 孔板,继续培养 24 h 后,加入适量含 5 μmol/L Vialinin A 的培养液,分别在 0、12、24、48 h 后收集细胞总蛋白,采用二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒结合酶标仪检测对上述细胞蛋白浓度进行测定,将上述已定量的蛋白样本加入 5×十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,沸水中煮 10 min 使蛋白充分变性,取总蛋白 20 μg 上样,进行 SDS-聚丙烯酰胺(PAGE)电泳后湿法转膜,随后用 5% 脱脂奶粉封闭硝酸纤维素膜约 2 h;将封闭好硝酸纤维素膜放入适当稀释度的兔抗人抗溶液中 4 °C 过夜,USP4、TβRI、Smad7 及内参 β-actin 分开孵育;应用 TBST 洗膜后,将硝酸纤维素膜放入适当稀释度的山羊抗兔 IgG 二抗中室温下孵育 1 h。应用增强型化学发光试剂盒进行发光,采用凝胶成像系统进行图像采集和灰度分析,结果以目的蛋白灰度值与 β 肌动蛋白灰度值之比表示。

1.2.2.2 MTT 检测细胞增殖

取生长良好的已被干预的 HS 成纤维细胞与未被干预的细胞分别常规消化、离心及吸弃上清液,收集细胞及重悬细胞,以每孔 1×10⁴/mL 密度将已被 Vialinin A 干预的增生瘢痕成纤维细胞(试验组)与未干预的细胞(对照组)接种于 96 孔板,每孔为 200 μL,即 2 000 /孔,两组细胞均设 5 个复孔,并各设置 1 个调零孔(即只加 20 μL DMEM 完全培养基),以此方式再接种 2 块 96 孔板;然后置于恒温箱中培养,24 h 后从培养箱中取出 1 块板,在避光下向每孔加入 20 μL MTT 工作溶液,避光置于恒温箱中继续培养 4 h 后终止培养;加入 150 μL DMSO 于每个细胞孔中,避光置于摇床低速振荡 10 min,充分溶解结晶物;用酶联免疫检测仪测量各孔吸光度值(A 值),波长为 490 nm,记录并分析结果。48、72 h 后分别取出 1 块 96 孔板,按以上步骤测量各孔 A 值并记录。以上试验重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 进行统计学分析,计量资

料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析及 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

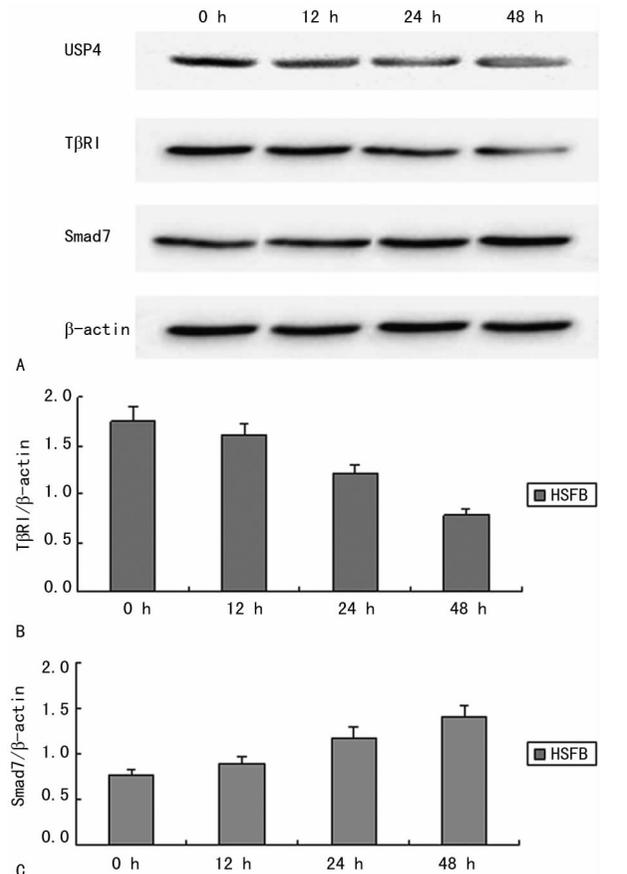
2 结果

2.1 细胞生长观察

HS 培养的原代瘢痕成纤维细胞在光镜下自第 5 天时可见单个呈梭形状细胞从组织块周围爬出,第 7 天时可见较多细胞爬出,放射状排列于组织块周围,倒置相差显微镜下观察,细胞呈长梭形,核圆,核仁清晰,细胞质均匀,胞体丰满。传代后大部分细胞生长良好,性状稳定。近 3 周时,细胞生长基本融合,可消化传代。

2.2 Vialinin A 对细胞内 USP4、TβRI 及 Smad7 蛋白表达的影响

Vialinin A 作用后,随着时间推移,HSFB 中的 USP4 蛋白表达逐渐减低;TβRI 的蛋白也逐渐减低,在作用 12 h 后明显降低,与 0 时比较差异有统计学意义($P<0.05$);Smad7 的蛋白表达则逐渐升高,与 0 时比较差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。



A: Western blot 蛋白条带; B: 不同时间段的 HSFB 中 TβRI 不同时间段的蛋白表达; C: 不同时间段的 Smad7 与 β-actin 灰度值比较。

图 1 干预 USP4 后 HSFB 中 TβRI 与 Smad7 不同时间段的表达

2.3 Vialinin A 对 HS 成纤维细胞增殖的影响

Vialinin A 作用后,试验组中 HSFB 增殖活性明显受到抑制,试验组与对照组同一时间段 A 值比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组 Vialinin A 对 HSFB 的 A 值比较 ($\bar{x}\pm s$, A 值)

时间	对照组	试验组
24 h	0.220 6±0.072 5	0.192 0±0.069 1
48 h	0.371 2±0.021 8	0.301 3±0.072 9
72 h	0.601 1±0.032 7	0.510 9±0.030 5

3 讨 论

HS 是成纤维细胞异常增殖,分泌大量胶原、基质,引起胶原等基质代谢合成与降解失衡,导致过多细胞外基质分泌和沉积的一种纤维化疾病。至今,学术界对其发病机制的研究尚未有明确的定论,临床上也尚无有效的治疗方法。现已证实多种细胞因子、信号转导通路、细胞外基质参与瘢痕形成,而 TGF- β /Smad 信号通路是已被证明与瘢痕形成密切相关的机制^[8-9]。其中,Smads 根据不同分型,对成纤维细胞胶原代谢具有双向调控作用。Smad7 主要负调控 TGF- β /Smad 信号通路,TGF- β 刺激后,Smad7 移至胞质中,与 Smad3 竞争 T β RI,进而阻止 Smad3 活化,抑制 TGF- β 信号通路转导,调控正、负性 Smads 蛋白之间的平衡^[10-11]。Smad7 还可通过 E3 泛素连接酶-Smurf (Smurf1 和 Smurf2) 诱导 Smad2 与 T β RI 的泛素化降解,下调 T β RI 在胞膜上的分布水平,进而负反馈作用于 TGF- β /Smad 信号通路^[12]。

而泛素-蛋白酶体途径是真核细胞内一个重要的蛋白质降解调节系统,是进化过程中高度保守的级联反应,紧密地调节 TGF- β 家族信号^[13]。它可通过对底物蛋白的泛素化进行蛋白酶体降解,可影响多种细胞活动,如细胞受体功能、细胞周期调节、DNA 损伤修复及肿瘤生长等^[14]。该途径也通过去泛素化酶(DUBs)逆转泛素化过程。USP4 是第 1 个在哺乳动物中被确定的去泛素化酶,由原癌基因 USP4 编码,作为 DUBs 中重要一员,USP4 最初报道可以与肿瘤抑制因子 pRb 和相关袋状蛋白 p107、p130 相互作用^[15]。它主要通过特异性靶蛋白结合使之去泛素化阻止其降解或改变性状,在多种信号通路中发挥重要调节作用,比如 Wnt/ β -catenin 信号通路、固有免疫应答通路及 p53 信号通路,尤其在 TGF- β /Smad 信号通路^[16]。其在 TGF- β /Smad 信号通路的潜在机制是 T β RI 通过 Smad7/Smurf2 复合物进行泛素化降解,而 USP4 可与 T β RI 直接结合,使之去泛素化,介导泛素化与去泛素化平衡,维持 T β RI 在质膜上的水平,调控 TGF- β /Smad 信号通路的水平。一系列体内外试验也表明在哺乳动物细胞和斑马鱼胚胎中,USP4 在调节 TGF- β /Smad 信号通路方面发挥关键作用。在对恶性乳腺癌细胞分析显示,体外试验表明 USP4 可调节 TGF- β 诱导的上皮间质转化、迁移,体内试验表明 USP4 可激活 TGF- β /Smad 信号通路,促进癌细胞侵袭、转移^[17]。这项研究还表明 USP4 可被蛋白激酶 B(AKT)磷酸化,磷酸化后使细胞核中的 USP4 重新定位于胞质和胞膜,与 T β RI 结合,进而去泛素化,增强 TGF- β 诱导的致瘤反应。如果 USP4 缺失,则由 AKT 诱导的癌细胞迁移也会受到抑制。由此可见,USP4 通过选择性介导 TGF- β /Smad 信号通路中关键组件的去泛素化,参与调控了 TGF- β /Smad 信号通路的水平。一旦其功能紊乱,就会使 TGF- β /Smad 信号通路转导异常,进而引起一系列病生改变,导致多种疾病的发生与发展。

最新研究表明,USP4 可去泛素化促进 Th17 细胞功能并且可提高风湿性心脏病患者的 CD4⁺ T 细胞水平,进一步利用 Vialinin A 抑制 USP4 活性,将可抑制 Th17 细胞分化,这意味着 USP4 有望成为 Th17 介导的自身免疫疾病的治疗靶点^[18]。Wang 等^[19]研究发现 USP4 可通过去泛素化正向调节维甲酸诱导基因 I(RIG-I)介导的抗病毒效应,稳定 RIG-I 的表达水平。Hou 等^[20]发现在头颈部鳞状细胞癌中 USP4 蛋白表达水平增加,并直接与受体相互作用蛋白 1(RIP1)相互作用,使之去泛素化,负调控 RIP1 介导的 NF- κ B 活性,促进 TNF- α 诱导的凋亡。因此这相关研究发现 USP4 是属于抑癌蛋白。然而 Zhang 等^[21]的研究发现 USP4 可直接与 T β RI 结合,使之去泛

素化,最终促进 TGF- β 诱导的乳腺癌的发展。由此可见,抑制 USP4 可负调控 TGF- β 信号通路,抑制肿瘤的生长,属于癌蛋白。从以上研究不难看出关于 USP4 在哺乳动物细胞中功能尚无确切定论。

本试验以 HS 成纤维细胞为载体,利用 Vialinin A(USP4 抑制剂)干预 HS 成纤维细胞,分别在不同时间段收集细胞总蛋白行 Western blot 检测及 MTT 检测细胞增殖情况。Western blot 检测结果显示:USP4 在 Vialinin A 作用 12 h 后,表达逐渐减低,说明 Vialinin A 抑制 USP4 有效;T β RI 的蛋白表达也在作用 12 h 后明显降低,而 Smad7 蛋白表达则逐渐升高。并且本课题组前期发现 USP4 与 T β RI 蛋白在 HS 成纤维细胞中高表达,而 Smad7 蛋白在 HS 成纤维细胞中低表达。综合表明 USP4 可能通过调控 TGF- β /Smad 信号通路影响瘢痕细胞增殖。其次,MTT 结果显示:加入泛素特异性蛋白酶抑制剂 Vialinin A 后,HSFB 的增殖活性逐渐减低,尤其在 72 h 明显。以上结果可能暗示着 USP4 与 T β RI 相互作用,通过抑制 Smad7 介导的信号通路阻止 T β RI 的泛素化降解,从而维持 T β RI 的高水平和 Smad7 的低水平,抑制 USP4 表达,导致 T β RI 的低表达及 Smad7 的高表达,从而负调控 TGF- β 介导的信号通路,抑制 HS 成纤维增殖,但其具体的分子机制还需深入研究。

参考文献

- [1] Wolfram D, Tzankov A, Pulzl P, et al. Hypertrophic scars and keloids: a review of their pathophysiology, risk factors, and therapeutic management [J]. *Dermatol Surg*, 2009, 35(2): 171-81.
- [2] Aarabi S, Longaker MT, Gurtner GC. Hypertrophic scar formation following burns and trauma: new approaches to treatment [J]. *PLoS Med*, 2007, 4(9): e234.
- [3] Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF-beta family in wound healing, burns and scarring: a review [J]. *Int J Burns Trauma*, 2012(2): 18-28.
- [4] Zhang L, Zhou F, Drabsch Y, et al. USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF-beta type I receptor [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(7): 717-726.
- [5] Okada K, Ye YQ, Taniguchi K, et al. VialininA is a ubiquitin-specific peptidase inhibitor [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(15): 4328-4331.
- [6] Yoshioka Y, Ye YQ, Okada K, et al. Ubiquitin-specific peptidase 5, a target molecule of vialinin A, is a key molecule of TNF- α production in RBL-2H3 cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e80931.
- [7] 林尊文, 徐少宏, 游敏, 等. 人增生性瘢痕成纤维细胞的改良培养和鉴定 [J]. *实用医学杂志*, 2011, 27(24): 4367-4369.
- [8] Santibañez JF, Quintanilla M, Bernabeu C. TGF- β /TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions [J]. *Clin Sci(Lond)*, 2011, 121(6): 233-251.
- [9] Poniatowski XA, Wojdasiewicz P, Gasik R, et al. Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications [J]. *Mediators Inflamm*, 2015: 137823.

到达炎症部位,发挥作用^[9]。而 ICAM-1 属于免疫球蛋白超家族成员之一,参与调解炎症反应,细胞和组织之间分化和发育、免疫反应应答及淋巴细胞归巢和再循环等一些重要的生理功能^[10],也是大部分血清型鼻病毒、呼吸道合胞病毒等多种病毒的受体,受到相关病毒感染时,其 ICAM-1 表达上调^[11-13]。

本试验研究结果提示:无论是高滴度或是低滴度噬菌体 D29 对气道上皮细胞分泌的 IL-6、IL-8 及气道上皮细胞的生长活性和 ICAM mRNA 的分泌均无明显影响,表明噬菌体 D29 本身不会刺激气道上皮细胞发生炎症反应,初步表明噬菌体 D29 对气道上皮细胞具有较好的安全性,但本试验仅限于体外试验,对体内试验是否安全需要进一步动物试验证明。

综上所述,噬菌体 D29 作用于人气道上皮细胞一段时间过后,对其生长及功能均无明显影响,表面噬菌体 D29 对气道上皮细胞有较好的安全性,为今后噬菌体生物制剂通过呼吸道治疗肺结核感染提供安全性依据。

参考文献

- [1] Rastogi V, Pragma, Verma N, et al. An overview on bacteriophages: a natural nanostructured antibacterial agent [J]. *Curr Drug Deliv*, 2016. DOI:10.2174/1567201813666160406115744. [Epub ahead of print].
- [2] Latz S, Wahida A, Arif A, et al. Preliminary survey of local bacteriophages with lytic activity against multi-drug resistant bacteria [J]. *J Basic Microbiol*, 2016, 56 (10): 1117-1123.
- [3] Peng L, Chen BW, Luo YA, et al. Effect of mycobacteriophage to intracellular mycobacterium smegmatis and mycobacterium tuberculosis in vitro [J]. *Respirology*, 2005, 10 Suppl: S177.
- [4] 梁梅,郭述良,张红梅,等.噬菌体 D29 不同途径给入在小鼠体内的代谢分布 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2012(5): 272-276.
- [5] 邹亭亭,刘平,罗永艾,等.分枝杆菌噬菌体 D29 的生物学特性研究及其抗耐药结核潜力的探讨 [J]. *世界科技研究与发展*, 2012, 34(2): 314-317.
- [6] 杨文慧.分枝杆菌噬菌体 D29 应用于耐药结核病治疗的探索性研究 [D]. 天津:中国人民解放军军事医学科学院, 2009.
- [7] Lloyd CM, Saglani S. Asthma and allergy: the emerging epithelium [J]. *Nat Med*, 2010, 16(3): 273-274.
- [8] Liu YJ. Thymic stromal lymphopoietin, master switch for allergic inflammation [J]. *J Exp Med*, 2006, 203(2): 269-273.
- [9] 曹雪涛. *医学免疫学* [M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社, 2013: 52-55.
- [10] 唐可京,李幼基,谢汕茂. ICAM-1 与 VCAM-1 的结构表达与调控 [J]. *医学分子生物学杂志*, 2002, 24(3): 173-177.
- [11] Bochkov YA, Gern JE. Rhinoviruses and their receptors: implications for allergic disease [J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2016, 16(4): 30.
- [12] Alves MP, Schögl A, Ebener S, et al. Comparison of innate immune responses towards rhinovirus infection of primary nasal and bronchial epithelial cells [J]. *Respirology*, 2016, 21(2): 304-312.
- [13] Liu X, Qin X, Xiang Y, et al. Progressive changes in inflammatory and matrix adherence of bronchial epithelial cells with persistent respiratory syncytial virus (RSV) infection (progressive changes in RSV infection) [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 18024-18040.

(收稿日期:2016-11-21 修回日期:2017-01-09)

(上接第 2023 页)

- [10] Itoh S, ten Dijke P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2007, 19(2): 176-184.
- [11] Yan X, Chen YG. Smad7: not only a regulator, but also a cross-talk mediator of TGF-beta signalling [J]. *Biochem J*, 2011, 434(1): 1-10.
- [12] Dabiri G, Campaner A, Morgan JR, et al. A TGF-beta1-dependent autocrine loop regulates the structure of focal adhesions in hypertrophic scar fibroblasts [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(5): 963-970.
- [13] Aggarwal K, Massagué J. Ubiquitin removal in the TGF-beta pathway [J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(7): 656-657.
- [14] 李衍常,高媛,徐忠伟,等.蛋白质组学在去泛素化酶研究中的应用 [J]. *生物工程学报*, 2014, 30(9): 1341-1350.
- [15] DeSalle LM, Latres E, Lin D, et al. The de-ubiquitinating enzyme Unp interacts with the retinoblastoma protein [J]. *Oncogene*, 2001, 20(39): 5538-5542.
- [16] Zhang J, Zhang X, Xie F, et al. The regulation of TGF-beta/Smad signaling by protein deubiquitination [J]. *Protein Cell*, 2014, 5(7): 503-517.
- [17] Zhang L, Huang H, Zhou F, et al. RNF12 controls embryonic stem cell fate and morphogenesis in zebrafish embryos by targeting Smad7 for degradation [J]. *Mol Cell*, 2012, 46(5): 650-661.
- [18] Hou X, Wang L, Zhang L, et al. Ubiquitin-specific protease 4 promotes TNF-alpha-induced apoptosis by deubiquitination of RIP1 in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(4): 311-316.
- [19] Wang L, Zhao W, Zhang M, et al. USP4 positively regulates RIG-I-mediated antiviral response through deubiquitination and stabilization of RIG-I [J]. *J Virol*, 2013, 87(8): 4507-4515.
- [20] Hou X, Wang L, Zhang L, et al. Ubiquitin-specific protease 4 promotes TNF-alpha-induced apoptosis by deubiquitination of RIP1 in head and neck squamous cell carcinoma [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(4): 311-316.
- [21] Zhang X, Berger FG, Yang J, et al. USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1 [J]. *Embo J*, 2011, 30(11): 2177-2189.

(收稿日期:2016-11-22 修回日期:2017-02-10)