

干扰素调节因子 4 在风湿性心脏病中去泛素化作用的研究

胡程舟¹, 张卓¹, 陈文龙¹, 周胤泽¹, 段伟豪¹, 李开朗¹, 郭志祥²

作者单位:¹安徽医科大学第二临床医学院, 安徽 合肥 230022;

²安徽医科大学第一附属医院心脏外科, 安徽 合肥 230022

通信作者:郭志祥,男,副主任医师,研究方向为移植免疫, E-mail: aydgzx100@163.com

基金项目:安徽省省级 2016 大学生创新创业计划(201610366095)

摘要:目的 探究风湿性心脏病病人干扰素调节因子 4(IRF4)去泛素化与去泛素化酶 USP4 互相作用的分子机制,为风湿性心脏病提供新的治疗策略。方法 来自安徽医科大学第一附属医院 2015 年 7 月至 2016 年 1 月 20 例风湿性心脏病病人,均行体外循环下瓣膜置换手术,均顺利出院。10 例健康对照来自于健康志愿者。分别抽取以上参与实验人员 5 mL 的外周血,经过细胞培养与转染;通过免疫共沉淀实验观察 IRF4 的 DNA 结合结构域以及和配体结合结构域是否可以和 USP4 互相结合;通过 NI-NTA 镍螯合树脂纯化实验观察 IRF4 蛋白针对 48 位和 63 位赖氨酸相关的去泛素化是否可以被 USP4 介导;应用荧光素酶检测技术观察白细胞介素(IL)-4 是否可以在 IRF4、活化 T 细胞核因子(NFATC2)和 USP4 共同促进下表达;利用基因沉默方法在人源 Th2 细胞中下调 USP4。结果 下调 USP4 后 Th2 细胞相关细胞因子的转录水平也明显减少;利用流式细胞术检测经 USP4 抑制剂处理后的 Th2 细胞表达的 IRF4 和 IL-4 均减少;以流式细胞技术测得风湿性心脏病中 IL-4 表达增高,IRF4 表达也增高。结论 风湿性心脏病病人血中 IRF4 的蛋白稳定表达可以通过 USP4 去泛素化的作用而实现;IL-4 在 IRF4 表达增加协同 NFATC2 的情况下可增加表达。

关键词:风湿性心脏病; Th2 细胞; 干扰素调节因子 4; 泛素化; 泛素特异性蛋白 4

The function of deubiquitin modification of IRF4 in rheumatic heart disease

HU Chengzhou¹, ZHANG Zhuo¹, CHEN Wenlong¹, ZHOU Yinze¹, DUAN Weihao¹, LI Kailang¹, GUO Zhixiang²

Author Affiliations: ¹Second Clinical Medical College of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China;

²Department of Cardiovascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei, Anhui 230022, China

Abstract: **Objective** To explore the molecular mechanism of the interaction between deubiquitinating enzyme USP4 and deubiquitination of interferon regulatory factor 4 (IRF4) in rheumatic heart disease patients, and to provide new tactics for treatment of rheumatic heart disease (RHD). **Methods** Twenty RHD patients were included in the study, who underwent valve replacement under cardiopulmonary bypass and were discharged smoothly from July 2015 to January 2016 in The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University. Ten healthy controls were from healthy volunteers. The peripheral blood of 5 mL of the above participants was collected, cultured and transfected. The experiment of coimmunoprecipitation was carried out to observe if USP4 could be combined with IRF4 DNA binding domain and ligand binding domain (LBD). The experiment of NI-NTA Nickel chelating resin purification was made to observe if USP4 could mediate deubiquitination of IRF4 protein related to 48 lysine and 63 lysine. And luciferase detection technology was used to observe if the expression of interleukin-4 (IL-4) could be promoted by IRF4, nuclear factor of activated T cell (NFATC2) and USP4. Gene silencing method was used to down-regulate USP4 in human Th2 cells. **Results** Down regulation of USP4 showed that the related cytokines transcriptional level of Th2 cells was significantly reduced. Flow cytometry showed that the levels of IRF4 and IL-4 expressed with Th2 cells handled by USP4 inhibitor both reduced, and the expressions of IRF4 and IL-4 both increased in rheumatic heart disease patients. **Conclusions** Through deubiquitination, USP4 can stabilize the expression of IRF4 protein in rheumatic heart disease patients. The increase of IRF4 can raise the expression of IL-4 in coordination with NFATC2.

Key words: Rheumatic heart disease; Th2 Cells; Interferon regulatory factor-4; Ubiquitination; Ubiquitin specific protein 4

风湿性心脏病是甲组乙型溶血性链球菌感染人体后引起的变态反应性疾病,属于自身免疫性疾病,病人血常规检查白细胞介素(IL)-4的水平会有

一定程度上升。IL-4 细胞因子主要由 Th2 细胞分泌, Th2 辅助细胞的主要转录因子有 GATA3、干扰素调节因子 4 (IRF4) 等。有研究表明 IRF4 能促进

IL-4的表达。

细胞内的各种转录因子调控不同的基因的表达,这些转录因子同时也受到机体各种调节机制的调节,其中翻译后修饰是一类十分重要的机制,泛素化与去泛素化修饰是翻译后修饰里比较重要的一种。Chen等^[1]发现泛素化酶 Stub 通过促进泛素蛋白赖氨酸残基 K48 的多泛素化诱导转录因子 FoxP3 的降解,从而负性调控调节性 T 细胞的抑制活性。USP4,是一种去泛素化酶,在肿瘤细胞的分裂增殖的过程起着重要的作用。Zhao等^[2]研究表明 USP4 所参与的调节机制是一种经典的 Wnt 信号传导通路,USP4 是一种新的负性调节因子。其抑癌机制为阻止 Wnt 信号通路的信号转导从而起到抑癌的效果。Xiao等^[3]发现 USP4 可以使肿瘤坏死因子受体相关因子 TRAF2 和 TRAF6 去泛素化,进而阻碍肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和 IL-1 β 诱导核因子- κ B (NF- κ B) 的表达。Wang等^[4]研究发现 USP4 能够通过对天然免疫相关蛋白 RIG-1 的去泛素化调节病毒诱导的 I 型干扰素信号。综上,USP4 对细胞的凋亡、增殖、周期进程和维持细胞的稳态发挥重要作用,因而我们认为免疫细胞中转录因子 IRF4 泛素化和去泛素化调节同样重要,本研究通过探究 IRF4 的去泛素化修饰在 Th2 细胞功能表达中的作用来进一步阐释风湿性心脏病的发生机制,从而为风湿性心脏病的治疗方案选择提供新的思路。

1 资料与方法

1.1 标本选取 20 例风湿性心脏病病人来源于 2015 年 7 月至 2016 年 1 月的安徽医科大学第一附属医院住院病人,均行体外循环下瓣膜置换手术,均顺利出院。10 例健康对照来自于健康志愿者。分别抽取以上参与实验人员 5 mL 的外周血,用 EDTA(乙二胺四乙酸二钾)抗凝管进行抗凝。病人平均年龄为 50 岁,病人或其近亲属知情同意。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 质粒、抗体 本课题所用质粒均由中国科学院上海巴斯的研究所惠赠。抗 Flag 抗体,抗 USP4 抗体(Sigma,美国);抗 Ha 抗体,抗 Ubiquitin 抗体(Santa Cruz,美国);抗 β -actin 抗体(三箭生物,天津);PerCP/Cy5.5 anti-human CD45RA, FITC anti-human CD4, PE anti-human CD25, PerCP/Cy5.5 anti-human IL-4 购自美国 BioLegend 公司。Pb anti-human/mouse IRF4 购自美国 eBioscience 公司。

1.3 细胞培养与转染 人胚肾细胞系(HEK-293T)(含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基);人源性原代幼稚 CD4⁺ T 细胞和 Th2 细胞从健康人外周血

获得,培养环境为含 10% 人 AB 血清,1% 非必需氨基酸,1% 谷氨酰胺和 1% 丙酮酸钠,1% 青霉素和链霉素的 X-VIVO15 免疫细胞培养基中,以上细胞均在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。课题所需聚乙烯亚胺(PEI)用在 HEK-293T 细胞系中转染。

1.4 实时荧光定量 PCR 体外诱导分化 Th2 细胞,基因沉默后筛选 1 周,抽提出 RNA 并检测浓度。用 1 μ g RNA 反转出 cDNA 用于实时荧光定量 PCR。所用引物如下:USP4,上游引物:5'-TCAGCCGCTATGTGAAACAG-3',下游引物:5'-GTGGTCTCACTGGGGTCATT-3'。肌动蛋白(ACTIN),上游引物:5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3',下游引物:5'-CAGGGCAGTGATCTCCTTCT-3'。IL-4:上游引物:5'-GCCACCATGAGAAGGACACT-3',下游引物:5'-ACTCTGGTTGGCTTCCTTCA-3'。IL-5:上游引物:5'-GGCACTGCTTTCTACTCATCGA-3',下游引物:5'-AGTTGGTGATTTTTATGTACAGGAACA-3'。IL-10:上游引物:5'-TGCAAAACCAAACCACAAGA-3',下游引物:5'-TCTCGGAGATCTCGAAGCAT-3'。IL-13:上游引物:5'-CTATGCATCCGCTCCTCAAT-3',下游引物:5'-GGTGATGTTGACCAGCTCCT-3'。IRF4:上游引物:5'-AGAACGAGGAGAAGAGCATC-3',下游引物:5'-CCTTTAAACAGTGCCCAAG-3'。

1.5 免疫印迹和免疫共沉淀实验 在转染之后得到的细胞用含有 20 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钾,1% (v/v) NP-40、10% Glycerol、0.25% Na-deoxycholate 的细胞裂解液进行处理,裂解液同时加入 1 mmol/L PMSF(苯甲基磺酰氟),1 mmol/L NaF,1% protease inhibitor cocktail(西格玛)。在 4 °C 细胞裂解 15 min 后,离心(12 000 r/min, 4 °C),取上清液。在获得的上清液中加入相对应的抗体在 4 °C 孵育 2 h,之后再加入 Protein A 或 G beads 孵育 2 h。之后用之前的细胞裂解液清洗样品,离心(1 000 r/min, 4 °C),一共清洗 4 遍,后进行免疫印迹实验。

1.6 His 蛋白质体外结合实验 将 Flag-IRF4、Ha-USP4、His-ubiquitin 质粒转染进 HEK-293T 细胞系中,在收细胞前 3 h 每个样品加入终浓度为 20 nmol/L 的 MG132。收样时,首先用 1 $\times$ PBS 洗一遍,再用 buffer 1 室温下裂解 30 min。之后样品再与预洗涤 NI-NTA(氨基三乙酸镍)Beads 室温下孵育 3 h。3 h 后样品用 buffer 1 洗 2 遍,buffer 2 洗两遍,Buffer3 洗 1 遍。之后样品加 2 $\times$ loading 处理,煮沸 10 min,进行免疫印迹检测。

1.7 shRNA 慢病毒的包装和转导 载体质粒

pLKO.1-shCK, shUSP4-1 和 del8.9, VSV-G 质粒共转入 HEK-293T 细胞中, 其中 pLKO.1 载体购自美国 addgene 公司。shRNA 引物来自以前的研究^[5]。

48 h 后收集病毒。将正在激活状态下的 Th2 细胞用病毒进行感染并在同一时间加入聚凝胺 (8 $\mu\text{g/mL}$), 第 2 天换新鲜培养液。并在第 3~4 天加入嘌呤霉素筛选细胞。在第 7~9 天收细胞进行相关实验检测。

1.8 流式细胞分析 人外周血经过密度梯度离心法获得外周血单核细胞, 使用丙二醇甲醚醋酸酯 (25 ng/mL) 和离子霉素 (1 $\mu\text{g/mL}$) 对外周血单核细胞进行 4 h 处理, 之后染色, 再使用流式细胞仪进行分析处理。用于分选的外周血单核细胞则经染色后, 分选初始 T 细胞, 再分化成 Th2 细胞, 再进行相关检测。

1.9 统计学方法 用 Graphpad Prism 软件行统计学分析, 两组计量资料比较采用两独立样本 *t* 检验, 检验水准为 0.05。用 Image J 软件进行免疫印迹实验图像分析条带。

2 结果

2.1 Th2 细胞中的 IRF4 与 USP4 相互作用 我们利用 USP4 筛选在 T 细胞中能与其相互作用的转录因子。我们在 HEK-293T 细胞中过表达带 Ha 标签的 USP4 和带 Myc 标签的转录因子, 如 GATA3, STAT6 (信号传导及转录激活因子 6), IRF4, PU.1, 用 anti-Ha 做免疫共沉淀实验, 再用免疫印迹实验方法检测。对比只转染了空对照质粒的细胞, 在共转染的转录因子和 USP4 的 Th2 细胞中检测到被 USP4 拉下来的 IRF4 的强信号。提示 USP4 可能与 IRF4 相互作用。接着用带有 Ha 标签的 USP4 和带有 Flag 标签的 IRF4 及分别使用抗 Ha 和抗 Flag 进行免疫共沉淀实验。最后, 进行免疫印迹实验。与用空对照质粒转染的细胞比较可见 IRF4 和 USP4 共转染的细胞中检测到 USP4 或 IRF4 下拉的强 IRF4 或 USP4 的强信号 (见图 1A)。证明了 IRF4 和 USP4 之间的相互作用。体外诱导 Th2 细胞, 利用 Normal IgG 和 anti-USP4 分别对 Th2 细胞的裂解液进行免疫共沉淀实验, 我们检测到了 anti-USP4 沉淀下来了 IRF4, 证明了 Th2 细胞中 USP4 和 IRF4 相互作用 (见图 1B)。

2.2 USP4 稳定 IRF4 蛋白的稳定性受到去泛素化酶影响。为验证 USP4 对 IRF4 的作用, 在 HEK-293T 细胞中表达 Flag-IRF4 和 Ha-USP4, 同时 USP4 逐步增加转染剂量。实验结果可见 USP4 对 IRF4 呈剂量依赖性 (见图 2)。

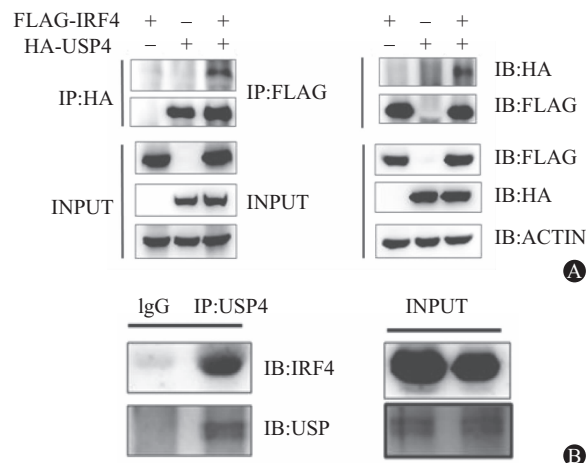


图 1 Th2 细胞中的 IRF4 与 USP4 相互作用: A 为 Flag-IRF4 和 Ha-USP4 共转入六孔板的 HEK-293T 细胞中, 在 48 h 后收集细胞, 细胞裂解后分别加入抗 Ha 或抗 Flag 单克隆抗体沉淀各 1 μg , 再经抗 Ha 或 Flag 的单克隆抗体行免疫印迹分析; B 为体外诱导 Th2 细胞, 扩增至 1 千万, 分成两份, 裂解, 加入 1 μg 标准 IgG 和 anti-USP4 沉淀, 再经免疫印迹分析 anti-IRF4 抗体

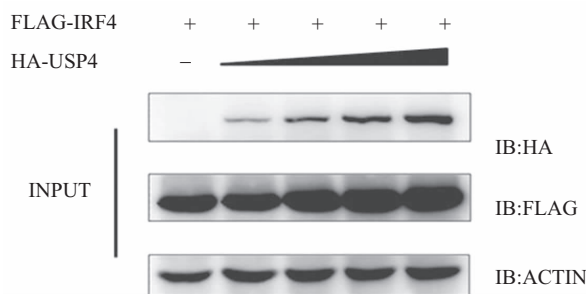


图 2 USP4 稳定 IRF4: 相同剂量的 Flag-IRF4 依次与增加剂量的 Ha-USP4 共转入 HEK-293T 细胞; 48 h 后收集细胞, 待细胞裂解测定 USP4 和 IRF4 表达水平

2.3 USP4 去泛素化 IRF4 为验证 USP4 对 IRF4 的去泛素化功能, 用 HEK-293T 细胞以 cDNA 为模板获得泛素的编码序列, 并将其克隆到 pIPHis 载体上。在 HEK-293T 细胞中瞬时表达 Flag-IRF4, Ha-USP4, Ha-USP4C311A 以及 His-Ubiquitin 再用 Ni-NTA (氨基三乙酸镍) 纯化沉淀和免疫印迹的方法检测 (见图 3A)。结果发现 USP4 可以去泛素化 IRF4, 而它的酶活突变体作用却不明显。为了探究 ROR γ t 主要受泛素上哪个位点的多泛素调节, 我们构建了泛素突变体 pIPHis-K48only 和 K63only (只有 48 位点或 63 位点为赖氨酸残基), 我们在 HEK-293T 细胞中瞬时表达 Flag-IRF4, Ha-USP4 和 His-Ubiquitin 或其突变体 (K48, K63only), 通过 Ni-NTA 纯化沉淀, 结果显示 USP4 同时介导 IRF4 K48 和 K63 位点的去泛素化。以上实验结果表明去泛素化酶 USP4 可以介导 IRF4 蛋白泛素 K48、K63 位的去泛素化 (见图 3B)。

2.4 USP4,IRF4,NFATC2(活化T细胞核因子)

共同作用 IL-4 的转录活性 在 Th2 细胞中 IRF4 是一种关键的转录因子。IRF4 的表达能被 USP4 稳定,IRF4 与 USP4 共同作用可促进 IL-4 的活化,但效用不显著(见图 4A)。但在转 IRF4, NFATC2, USP4 后,可发现 IL-4 的转录活性增加明显(见图 4B, 4C)。利用 USP4 的抑制剂 vialinin A 处理分化的 Th2 细胞,测得 IL-4,IRF4 的表达下降(见图 4D)。

2.5 Th2 细胞中,下调 USP4 影响 Th2 相关细胞因子的表达 Th2 细胞中 IRF4 作为主要的转录因子,由此可推断出 Th2 细胞的功能可能受去泛素化酶 USP4 的影响。为了验证我们的推论,我们首先把 USP4 特异性短发夹 RNA (shUSP4-1,2) 克隆到慢病毒载体 pLKO.1 上,随后我们在 HEK 293T 细胞中包装出包含该段序列的病毒颗粒,再用病毒颗粒感染体外诱导分化形成的 Th2 细胞。感染成功后的 Th2 细胞有嘌呤霉素抗性,再用嘌呤霉素对细胞进行

选择从而获得较纯的被病毒感染的 Th2 细胞。结果显示在 Th2 细胞中下调 USP4(见图 5A)后,Th2 细胞内 IRF4 蛋白水平降低,与 Th2 相关的细胞因子 IL-4, IL-10,IL-13 的转录水平也显著降低(见图 5B)。

2.6 IL-4、IRF4 的表达水平在风湿性心脏病病人中升高 风湿性心脏病是一种十分复杂的自身免疫性疾病。急性期是 Th1 细胞起主要作用。在后期,IL-2、IL-17 的作用更强。为探讨风湿性心脏病进行的病理机制,在获得健康人和符合风湿性心脏病诊断要求的病人的外周血单核细胞后用密度梯度离心法离心分离外周血单核细胞和用流式细胞技术检测可见 IRF4,IL-4 的水平均升高(见图 6A,6B)。

3 讨论

风湿性心脏病是一种自身免疫性炎症反应性疾病。急性风湿热期(ARF) Th1 分泌的 γ -干扰素 (IFN- γ) 升高明显,而在风湿性心脏病时,IL-4 上升。IL-4 是一种抗炎症反应细胞因子,在风湿性心

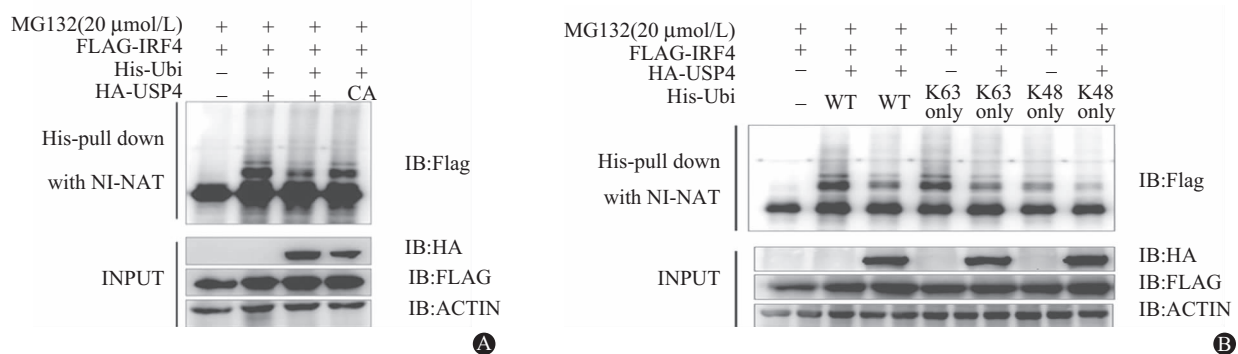


图3 USP4 去泛素化 IRF4: A 为在 HEK-293T 细胞内转染 Flag-IRF4, Ha-USP4, Ha-USP4C311A, His-Ubiquitin, 48 h 后收获细胞,在此前 MG132 (20 μ mol/L) 处理 3 h, Ni-NTA 镍螯合树脂纯化沉淀物,再免疫印迹分析经处理抗 Flag 和抗 Ha 的单克隆抗体。细胞裂解液 IRF4, USP4, ACTIN 表达水平也经免疫印迹分析。B 为 HEK-293T 细胞内共转 Flag-IRF4, Ha-USP4, His-Ubiquitin 突变体 K63only, K48only, 48 h 后收集细胞,收细胞前 MG132 (20 μ mol/L) 处理 3 h,用 Ni-NTA 镍螯合树脂纯化沉淀,再经抗 Ha,抗 Flag 的单克隆抗体进行免疫印迹分析

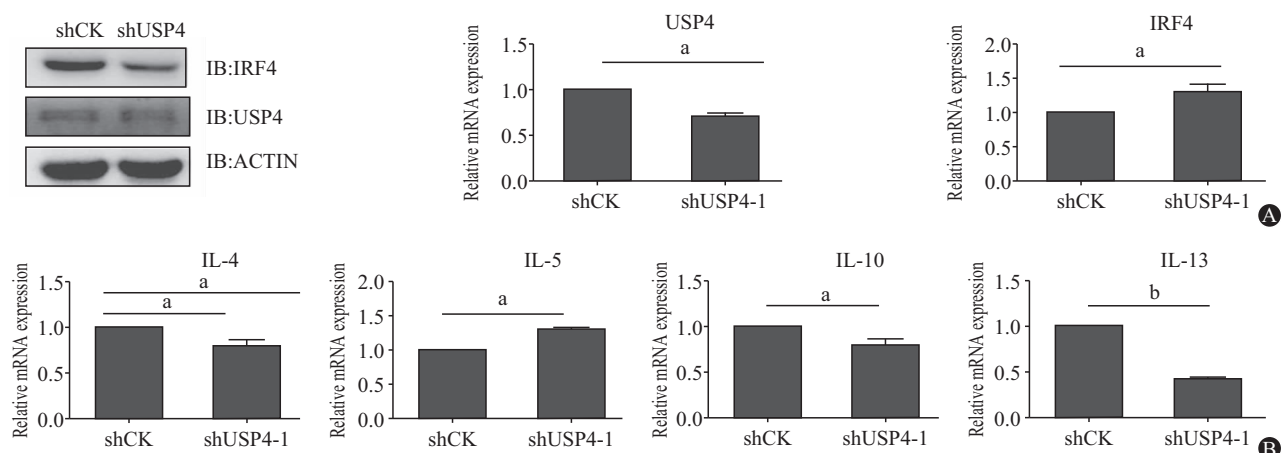


图5 Th2 细胞中,下调 USP4 影响 Th2 相关细胞因子的表达: A 为 DR8.9, shRNA, VSVG 三质粒系统包装慢病毒, 36~48 h 后收集病毒,感染体外诱导分化好的 Th2 细胞,因构建 shRNA 携带嘌呤霉素抗性,所以在应用嘌呤霉素筛选一周后,直接裂解,用抗 IRF4 抗体进行免疫印迹,检测相关指标; B 为用嘌呤霉素筛选 1 周后的 Th2 细胞抽提 RNA 并反转 cDNA,使用实时定量 PCR 的方法检测相关基因 (USP4, IRF4, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) 的表达水平。^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$

脏病转入慢性期时起到一定作用。IL-4 在免疫性炎症反应中的作用已有研究,如在多发性硬化病中^[5]。张锐和葛建军^[6]研究表明 IL-6 水平高低与冠心病诊断有一定相关性。另外, Kikly K 等也在病变的瓣膜及心肌组织中检测到 IL-17 的表达^[7]。沈奎亚等^[8]指出 IL-17 与 TNF- α 共同作用可促进 p38 蛋白激酶(p38 MAPK)的磷酸化过程而具有明显致炎作用。

T 细胞受到外来抗原物质刺激后活化进而释放 IL-4、IL-5、IL-13 等细胞因子,其中 IL-4 较为重要。而后 GATA3 在 IL-4 的启动子附近聚集,进而促进 IL-4 表达^[9]。通过利用 USP4 的小分子抑制剂 Vialinin A 处理体外诱导分化的 Th2 细胞时随着抑制剂剂量增加,IRF4、IL-4 都会降低。这说明 USP4 能影响 IL-4 表达。Rengarajan 等^[10]发现 IRF4 与 DNA 结合不牢固,NFATC2 和 IRF4 在结合后使 NFATC2 介导的 IL-4 的表达增加。活化后钙离子调控蛋白 NFATC2 可作为转录因子进入细胞核,参与调节细胞的多种功能^[11]。我们研究发现 USP4 可以稳定 IRF4 的同时促进 IL-4 的表达。USP4、NFATC2、IRF4 共同作用可以显著增加 IL-4 的表达。这可能是因为 IRF4 本身结合基因的能力较小,NFATC2 和 USP4 共同作用于 IRF4,使其形成一个稳定的复合体,从而促进 IL-4 的转录。IRF4 存在于多种免疫细胞中,如 Th2、Treg、Th17 细胞^[12]。

泛素化分为单泛素化、多重单泛素和多泛素化。多泛素化是将多个泛素单体通过异肽键进行连接,在靶蛋白赖氨酸上形成多泛素链,经研究证实不同位点的多泛素化发挥着不同的生理功能^[13]。K48 位点的多泛素化参与蛋白降解而 K63 位点的多泛素化参与 DNA 损伤修复、酶激活等。去泛素化在炎症反应中的研究目前越来越多。USP22 去泛素化 NFATC2,增加其稳定性并促进 IL-2 的表达^[10]而 USP17 去泛素化 ROR γ t 增强 IL-17 的表达^[14]。去泛素化酶 USP21 也通过泛素化调控 Th2 细胞转录因子 GATA3 的稳定性^[15]。我们的研究发现去泛素化酶 USP4 可以介导 IRF4 蛋白泛素 K48、K63 位的去泛素化。这也是 USP4 影响 IRF4 稳定性的重要因素。此外,我们发现利用基因沉默下调 USP4 的表达,IRF4 蛋白水平会下调,但转录水平会有所上升。这可能与 USP4 表达后,其对 IRF4 存在的泛素化和去泛素化修饰有关。

另外,我们的研究发现去泛素化酶 USP4 在风湿性心脏病病人外周血 CD4⁺T 细胞中表达升高,且风湿性心脏病病人的外周血的 CD4⁺T 细胞中

IRF4、IL-4 的表达也增多,我们考虑筛选 USP4 的小分子抑制剂作进一步研究,从而为治疗风湿性心脏病提供了新的治疗方向。

(本文图 4,6 见插图 4-1)

参考文献

- [1] CHEN Z, BARBI J, BU S, et al. The ubiquitin ligase Stub1 negatively modulates regulatory T cell suppressive activity by promoting degradation of the transcription factor Foxp3[J]. *Immunity*, 2013, 39(2):272-285.
- [2] ZHAO B, SCHLESIGER C, MASUCCI MG, et al. The ubiquitin specific protease 4 (USP4) is a new player in the Wnt signalling pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(8B):1886-1895.
- [3] XIAO N, LI H, LUO J, et al. Ubiquitin-specific protease 4 (USP4) targets TRAF2 and TRAF6 for deubiquitination and inhibits TNF α -induced cancer cell migration[J]. *Biochem J*, 2012, 441(3):979-986.
- [4] 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.
- [5] ZHANG L, ZHOU F, DRABSCH Y, et al. USP4 is regulated by AKT phosphorylation and directly deubiquitylates TGF- β type I receptor[J]. *Nat Cell Biol*, 2012, 14(7):717-726.
- [6] 张锐, 葛建军. 四种炎症因子与冠心病的关系研究[J]. *安徽医药*, 2014, 18(4):695-697.
- [7] KIKLY K, LIU L, NA S, et al. The IL-23/Th(17) axis: therapeutic targets for autoimmune inflammation[J]. *Curr Opin Immunol*, 2006, 18(6):670-675.
- [8] 沈奎亚, 刘梅, 吴新安. IL-17 与 TNF- α 对 HaCaT 细胞 IL-17R、p-p38 MAPK 和炎症因子表达的影响[J]. *安徽医药*, 2016, 20(7):1292-1295.
- [9] FRIC J, ZELANTE T, WONG A, et al. NFAT control of innate immunity[J]. *Blood*, 2012, 120(7):1380-1389.
- [10] RENGARAJAN J, MOWEN KA, MCBRIDE KD, et al. Interferon regulatory factor 4 (IRF4) interacts with NFATc2 to modulate interleukin 4 gene expression[J]. *J Exp Med*, 2002, 195(8):1003-1012.
- [11] GAO Y, LIN F, XU P, et al. USP22 is a positive regulator of NFATc2 on promoting IL2 expression[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(6):878-883.
- [12] Staudt V, Bothur E, Klein M, et al. Interferon-regulatory factor 4 is essential for the developmental program of T helper 9 cells[J]. *Immunity*, 2010, 33(2):192-202.
- [13] 姚玉才, 刘志福, 赵玉杰, 等. 风湿性心脏病二尖瓣狭窄患者外周血淋巴细胞 TGF- β 1 mRNA 的表达[J]. *滨州医学院学报*, 2003, 26(5):328-330.
- [14] HAN L, YANG J, WANG X, et al. The E3 deubiquitinase USP17 is a positive regulator of retinoic acid-related orphan nuclear receptor γ t (ROR γ t) in Th17 cells[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(37):25546-25555.
- [15] ZHANG J, CHEN C, HOU X, et al. Identification of the E3 deubiquitinase ubiquitin-specific peptidase 21 (USP21) as a positive regulator of the transcription factor GATA3[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(13):9373-9382.

(收稿日期:2017-12-29,修回日期:2019-01-26)