DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250630.004
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20250630.1806.008

泛素特异性蛋白酶18调控TAK1-NF-κB轴对动脉粥样硬化形成的影响

李 松,黎文艺,夏 冰,王 杰,戴佳琳✉
(贵州医科大学法医学院病理学教研室,贵州 贵阳 550004)

[摘要] **目的**:探讨泛素特异性蛋白酶18(ubiquitin-specific proteases 18,USP18)通过调控TAK1-NF-κB轴影响动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)形成及潜在分子机制。**方法**:收集尸检确诊为冠心病的人体冠状动脉左前降支样本,根据管腔狭窄程度分为:轻度狭窄(狭窄率<50%)、中度狭窄(狭窄率50%~70%)和重度狭窄(狭窄率>70%)3组,每组各10例。免疫组化和Western blot检测冠状动脉中USP18、转化生长因子β激活激酶-1(transforming growth factor-β activated kinase-1,TAK1)、磷酸化TAK1(phosphorylated TAK1,p-TAK1)、白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)和肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)的表达水平。选用ApoE$^{-/-}$小鼠,通过高脂饮食喂养16周诱导AS模型。将小鼠随机分为3组(n=5):高脂饮食对照(HFD)组、腺病毒对照(Ad-NC)组和*USP18*基因敲除(Ad-*USP18*)组。分离主动脉,通过以下染色定量分析:使用H&E染色、马松三色染色和油红O染色评估斑块面积与血管结构、胶原纤维含量和脂质沉积。此外,通过Western blot量化主动脉组织中USP18、TAK1、p-TAK1、IκBα、p65、p-p65、IL-1β和TNF-α的表达水平。**结果**:免疫组化和Western blot结果表明,随着冠状动脉狭窄程度的增加,USP18蛋白在人冠状动脉中的表达水平明显下降(P<0.05)。相反,在不同组别的人冠状动脉中,TAK1蛋白表达水平差异无统计学意义(P>0.05),然而,p-TAK1蛋白表达水平随着冠状动脉狭窄程度的增加而明显升高(P<0.05)。此外,中度和重度狭窄患者冠状动脉中IL-1β和TNF-α蛋白表达水平明显升高(P<0.05)。在动物实验中:与HFD组和Ad-NC组相比,Ad-*USP18*组小鼠的主动脉斑块负荷、脂质沉积明显增加,胶原纤维含量明显降低(P<0.05)。Western blot结果显示,*USP18*敲低导致p-TAK1、p-p65、IL-1β和TNF-α蛋白表达水平明显升高(P<0.05),同时主动脉中IκBα的表达水平明显降低(P<0.05)。**结论**:USP18可能通过与TAK1相互作用并随后导致TAK1去泛素化,抑制NF-κB信号通路、减少泡沫细胞的形成和炎症因子的释放,从而减缓AS的发生和进展。

[关键词] 动脉粥样硬化;泛素特异性蛋白酶18(USP18);转化生长因子β激活激酶-1(TAK1);核因子-κB(NF-κB)
[中图分类号] R543.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)20-1521-11

Effects of ubiquitin-specific protease 18 regulating TAK1-NF-κB axis on atherosclerosis development

LI Song, LI Wenyi, XIA Bing, WANG Jie, DAI Jialin✉
(*Department of Pathology, School of Forensic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang* 550004, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the National Natural Science Foundation of China* (82460335); *Guizhou Provincial Basic Research Program* (*Natural Science*) [*Guizhou Science Cooperation Foundation-zk*(2025)522]
[*Author*]: *LI Song, E-mail*: 1257883764@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *DAI Jialin, Master's Supervisor, Associate Professor, Chief Forensic Medical Examiner, E-mail*: *daijll*@126.*com*.
Received: 2025-03-14 *Revised*: 2025-06-20 *JHMU*, 2026;32(20):1521-1531

[基金项目] 国家自然科学基金(82460335);贵州省基础研究项目(自然科学)[黔科合基础-zk(2025)面上522]
[作者简介] 李松,Email:1257883764@qq.com。
[通讯作者] 戴佳琳,硕士研究生导师,副教授,主任法医师,Email: daijll@126.com。
[收稿日期] 2025-03-14 [修回日期] 2025-06-20 网络出版时间:2025-07-01 09:27:25

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] **Objective**: To investigate the effects of ubiquitin-specific protease 18 (USP18) on atherosclerosis development through regulating the TAK1-NF-κB signaling pathway, and to elucidate its underlying molecular mechanisms. **Methods**: Human left anterior descending coronary artery samples, diagnosed with coronary heart disease *via* autopsy, were collected and categorized into three groups based on the degree of lumen stenosis: mild stenosis (stenosis rate<50%), moderate stenosis (stenosis rate 50%~70%), and severe stenosis (stenosis rate>70%), with 10 cases in each category. Immunohistochemistry and Western blot analyses were employed to assess the expression levels of USP18, transforming growth factor-β activated kinase-1 (TAK1), phosphorylated TAK1 (p-TAK1), interleukin-1β (IL-1β), and tumor necrosis factor-α (TNF-α) in the coronary arteries. To induce an atherosclerosis model, $ApoE^{-/-}$ mice were administered a high-fat diet for 16 weeks. These mice were then randomly assigned into three groups (n=5 per group): the high-fat diet control (HFD) group, the adenovirus control (Ad-NC) group, and the *USP18* gene knockout (Ad-*USP18*) group. The aorta was subsequently isolated and subjected to quantitative analysis using various staining techniques, including H&E staining, Masson's trichrome staining, and oil red O staining. These methods were employed to assess plaque area and vascular structure, collagen fiber content, and lipid deposition, respectively. Additionally, the expression levels of USP18, TAK1, p-TAK1, IκBα, p65, p-p65, IL-1β, and TNF-α in aortic tissue were quantified by Western blot. **Results**: The findings from immunohistochemistry and Western blot analyses indicated that the expression level of the USP18 protein in human coronary arteries exhibited a significant decrease as the degree of coronary stenosis increased (P<0.05). On the contrary, no significant differences were observed in the expression levels of TAK1 protein across the various groups of human coronary arteries (P>0.05). However, the expression level of p-TAK1 protein demonstrated a significant increase correlating with the progression of coronary stenosis (P<0.05). Furthermore, the expression levels of IL-1β and TNF-α were significantly increased in the coronary arteries of patients with moderate and severe stenosis (P<0.05). In the animal experiment, the Ad-*USP18* mice exhibited a significant increase in aortic plaque load and lipid deposition, as well as a significant decrease in collagen fiber content compared to both the HFD group and the Ad-NC group (P<0.05). Western blot analysis revealed that knockdown of *USP18* led to significantly elevated expression levels of p-TAK1, p-p65, IL-1β, and TNF-α (P<0.05), while the expression level of IκBα in the aorta was significant reduced (P<0.05). **Conclusion**: By interacting with TAK1 and subsequent then leading to the ubiquitination of TAK1, USP18 may inhibit the NF-κB signaling pathway and reduce the formation of foam cells, and the release of inflammatory factors, thereby decelerating the occurrence and progression of atherosclerosis.

[Key words] Atherosclerosis; Ubiquitin-specific proteases 18; Transforming growth factor β-activated kinase 1; NF-κB

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)是一种涉及免疫和代谢过程的慢性炎症性疾病,是心血管系统疾病的主要原因之一[1,2]。动脉壁中脂质的积聚和炎性细胞的浸润导致AS斑块的形成,继而可能引发急性心血管和脑血管事件,包括心肌梗死、缺血性卒中和心脏猝死[3]。AS的早期标志是泡沫细胞的形成[4]。巨噬细胞在AS的发病机制中具有关键作用,通过形成泡沫细胞和介导炎症反应,巨噬细胞释放促炎细胞因子,如白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)和肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α),上述细胞因子促进了泡沫细胞的形成[5]。

泛素-蛋白酶体系统广泛存在于人体中,蛋白质泛素化过程由三种酶促进:泛素激活酶、泛素结合酶、泛素蛋白连接酶。泛素蛋白连接酶负责底物特异性,其主要功能是在大多数真核细胞中调节蛋白质降解。蛋白质泛素化的调节涉及两个相反的酶系统:泛素结合酶和连接酶帮助靶蛋白质的泛素化,而去泛素化酶参与从这些蛋白质中去除泛素[6,7]。泛素化是一种翻译后修饰过程,在多种生理过程中发挥关键作用,包括细胞凋亡、自噬和免疫反应。泛素特异性蛋白酶18(ubiquitin-specific proteases 18,USP18)与肝脂肪变性和先天性免疫调节等生理过程有关[8-10]。有研究表明,与正常人冠脉组织相比,人冠状AS斑块中USP18的表达水平升高。然而,随着冠状动脉斑块面积的增加,USP18的表达水平下降。此外,冠状动脉中USP18的表达与斑块面积呈负相关。USP18通过其对ABCG1的去泛素化作用增强ABCG1蛋白的表达,从而在控制AS的进展中发挥关键作用[11,12]。

转化生长因子β激活激酶-1(transforming growth factor-β activated kinase-1,TAK1)是由IL-1和TGF-β受体、Toll样受体、CD40和B细胞受体激活的一种关键的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,对细胞的存活、分化、凋亡和炎症反应至关重要[13]。An等[8]的研究发现USP18与TAK1结合并去泛素化,进而抑制TAK1的活性并随后抑制下游c-Jun N端激酶和转录因子核因子-κB(nuclear factor-κB,NF-κB)信号传导途径,以防止肝脏脂肪变性、胰岛素抵抗和炎症反应。有研究发现黄芪甲苷Ⅳ通过

抑制血管内皮细胞中TAK1的磷酸化,从而抑制内皮细胞活化以及随后的巨噬细胞黏附和迁移,表现出抗AS的作用[14]。

因此,本课题组推测USP18可能通过影响TAK1活化来减轻炎症反应,从而影响AS的发展,但其机制有待进一步明确。本研究主要探讨USP18通过调控TAK1-NF-κB轴在AS发生、发展中的作用及其潜在机制,旨在为AS的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验样本及材料

1.1.1 人体冠状动脉样本 获取2023年1月~2024年12月在贵州医科大学法医司法鉴定中心尸检的死者冠状动脉(n=30)。本研究已经获得贵州医科大学伦理委员会的批准[批件号:2025论审第(22)号]。

1.1.2 实验动物 15只8周龄的雄性ApoE$^{-/-}$小鼠,购自北京斯贝福生物科技有限公司[SCXK(京)2019-0010]。实验设施合格证编号:SYXK(贵)2023-0002。本研究获得了贵州医科大学动物伦理委员会的批准(批准号:2502296),并遵守适用的动物伦理法规。

1.1.3 主要试剂 USP18腺病毒(上海吉凯生物);油红O(ORO)染色试剂盒(北京Solarbio);免疫组化(IHC)试剂盒;苏木精-伊红(H&E)染色试剂盒(北京中杉金桥);马松三色(Masson)试剂盒(北京Solarbio);USP18抗体(1∶1 000,美国Cell Signaling Technology);TAK1抗体(1∶1 000,武汉Proteintech);p-TAK1抗体(1∶1 000,上海Abways);IκBα抗体(1∶1 000,上海Abmart);p65抗体(1∶1 000,成都正能生物);p-p65抗体(1∶1 000,上海Abmart),IL-1β抗体(1∶1 000,成都正能生物);TNF-α抗体(1∶1 000,成都正能生物)。

1.1.4 主要仪器 光学显微镜(日本Olympus);全自动冷冻切片机(德国Leica);化学发光成像系统、PAC300型垂直电泳仪、湿式转印槽(美国Bio-Rad)。

1.2 实验方法

1.2.1 人体冠状动脉处理与分组 剥离冠状动脉管壁外的脂肪组织并用4%多聚甲醛固定,以制备石蜡包埋切片。根据动脉管腔狭窄程度[15]分为轻度狭窄组(<50%,n=10),中度狭窄组(50%~70%,n=10)和重度狭窄组(>70%,n=10)。纳入标准:(1)尸体在室温下保存不超过24 h或冷冻不超过3 d,随后在室温下解冻24 h;(2)冠状动脉内膜中存在AS斑块;(3)经组织病理学诊断为冠心病。排除标准:(1)有自溶或分解的证据;(2)病理检查显示其他与心脏疾病相关的死亡原因,如高血压心脏病或肥厚型心肌病;(3)涉及中毒或感染的病例。

1.2.2 AS模型构建与腺病毒干扰分组 15只小鼠被随机分为3组:高脂饮食(HFD)组、腺病毒对照(Ad-NC)组和*USP18*基因敲低(Ad-*USP18*)组,每组包含5只小鼠。Ad-NC组的小鼠每周通过尾静脉注射对照腺病毒,滴度为2×10^{10} PFU/mL;同样,Ad-*USP18*组的小鼠每周通过尾静脉注射Adenovirus-USP18-RNAi,滴度为2×10^{10} PFU/mL;造模共计16周,从而建立了一个在ApoE$^{-/-}$小鼠中敲低*USP18*的模型。相比之下,HFD组的小鼠未接受任何治疗。所有小鼠被允许无限制地摄入高脂饮食。于16周后麻醉和处死小鼠并收集主动脉组织。部分主动脉组织保存于−80 ℃用于未来的实验分析,而其他主动脉则用4%多聚甲醛固定,以制备石蜡包埋切片。

1.2.3 IHC检测人冠状动脉中USP18、TAK1、p-TAK1、IL-1β、TNF-α的表达和H&E染色检测人冠状动脉的狭窄程度 取“1.2.1”项中部分人冠脉组织进行IHC染色和H&E染色。

1.2.3.1 IHC染色 切片二甲苯和梯度乙醇脱蜡,内源性过氧化物酶封闭,EDTA抗原修复,山羊血清封闭,一抗4 ℃孵育过夜及二抗常温孵育1 h,DAB显色液显色,苏木素复染与盐酸酒精分化反蓝,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,拍照。

1.2.3.2 H&E染色 切片二甲苯和梯度无水乙醇脱蜡水化,苏木精染色,盐酸酒精分化反蓝,伊红染色,脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.4 Western blot检测人冠状动脉中USP18、TAK1、p-TAK1、IL-1β、TNF-α的表达和小鼠主动脉中USP18、TAK1、p-TAK1、IκBα、p65、p-p65、IL-1β、TNF-α的表达 取“1.2.1”项部分人冠状动脉和“1.2.2”项前一部分小鼠主动脉进行Western blot分析,组织蛋白提取后进行SDS-PAGE电泳及随后的膜转移。膜迅速密封,并在4 ℃下与一抗孵育过夜。在室温下与二抗孵育1 h。使用ECL试剂显影条带,其灰度值通过ImageJ软件分析。

1.2.5 ORO染色检测小鼠主动脉脂质沉积 取“1.2.2”项前一部分小鼠主动脉进行ORO染色:制作冰冻切片,异丙醇分化处理,ORO染液染色,苏木

素复染细胞核，封片，拍照，ImageJ软件分析脂质沉积情况。

1.2.6　Masson染色检测小鼠主动脉胶原纤维含量　取“1.2.2”项后一部分小鼠主动脉进行Masson染色：制作石蜡切片，脱蜡水化，媒染液浸染，天青石蓝染色，苏木素复染，进行分化，丽春红品红染色，磷钼酸溶液处理，苯胺蓝溶液染色，弱酸溶液处理，脱水，二甲苯透明，中性树胶封片，ImageJ软件分析测量胶原纤维含量。

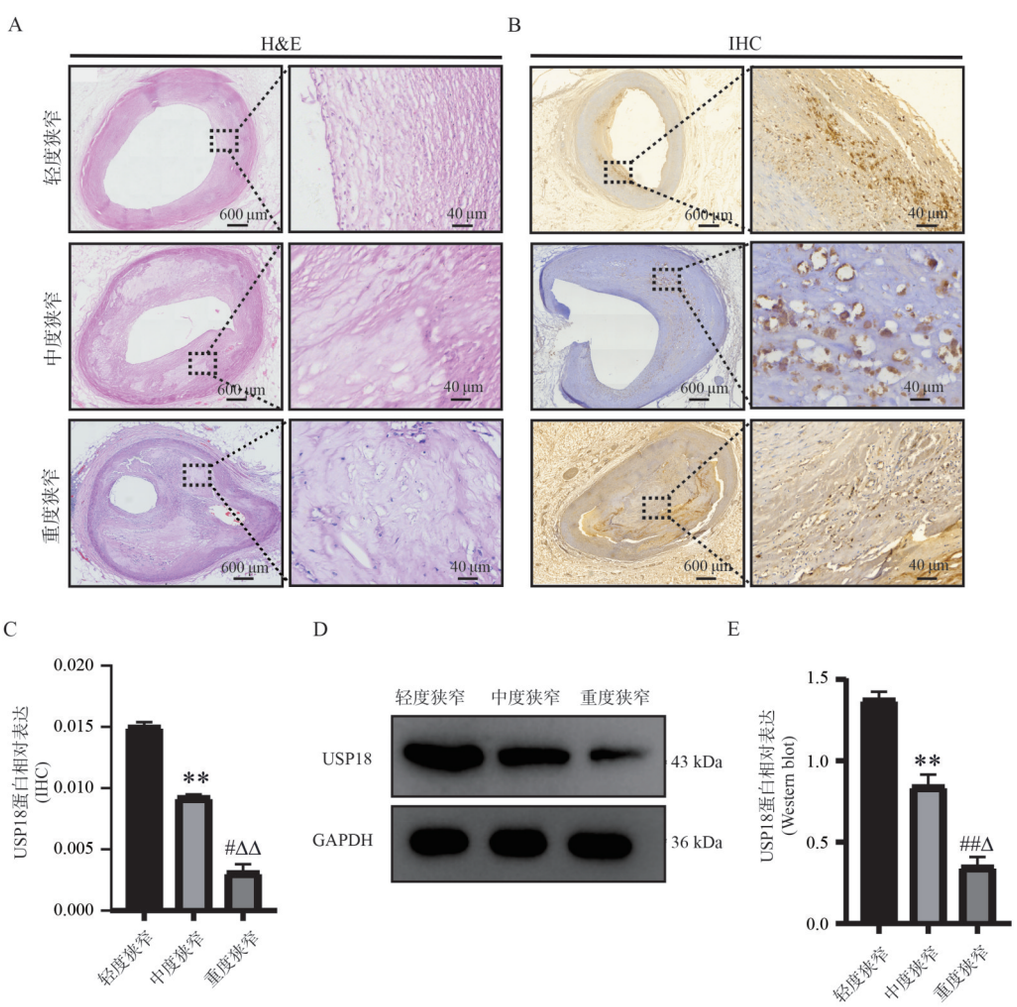
1.3　统计学处理

使用GraphPad Prism9.5.1进行统计学分析。计量数据以$\bar{x}\pm s$表示。2组之间的比较采用t检验，而3组之间的比较则采用单因素方差分析。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　USP18在人冠状动脉中的表达

H&E染色结果显示，轻度狭窄组冠状动脉的内膜层光滑，内膜轻度狭窄，管腔通畅；在中度狭窄组，冠状动脉的内膜层表现出纤维增厚，在纤维帽下可观察到坏死核心；与轻度狭窄组和中度狭窄组相比，重度狭窄组斑块面积明显增加，血管管腔高度狭窄，存在斑块破裂，见图1A。IHC染色结果显示，USP18的阳性表达主要存在于泡沫细胞胞质中，在轻度狭窄组冠状动脉中表达水平明显高于中度狭窄组和重度狭窄组（$P<0.05$）；且与中度狭窄组相比，重度狭窄组人体冠脉中USP18的蛋白表达水平明显降低（$P<0.01$），见图1B、C。Western blot结果与IHC染色一致（$P<0.05$），见1D、E。



A：3组人冠状动脉H&E染色；B、C：3组人冠脉中USP18蛋白IHC染色及统计结果；D、E：3组人冠脉中USP18蛋白Western blot条带图及统计结果；中度狭窄与轻度狭窄组比较，$^{**}P<0.01$，重度狭窄与轻度狭窄组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；重度狭窄与中度狭窄组比较，$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$

图1　USP18蛋白在3组人冠状动脉中的表达水平

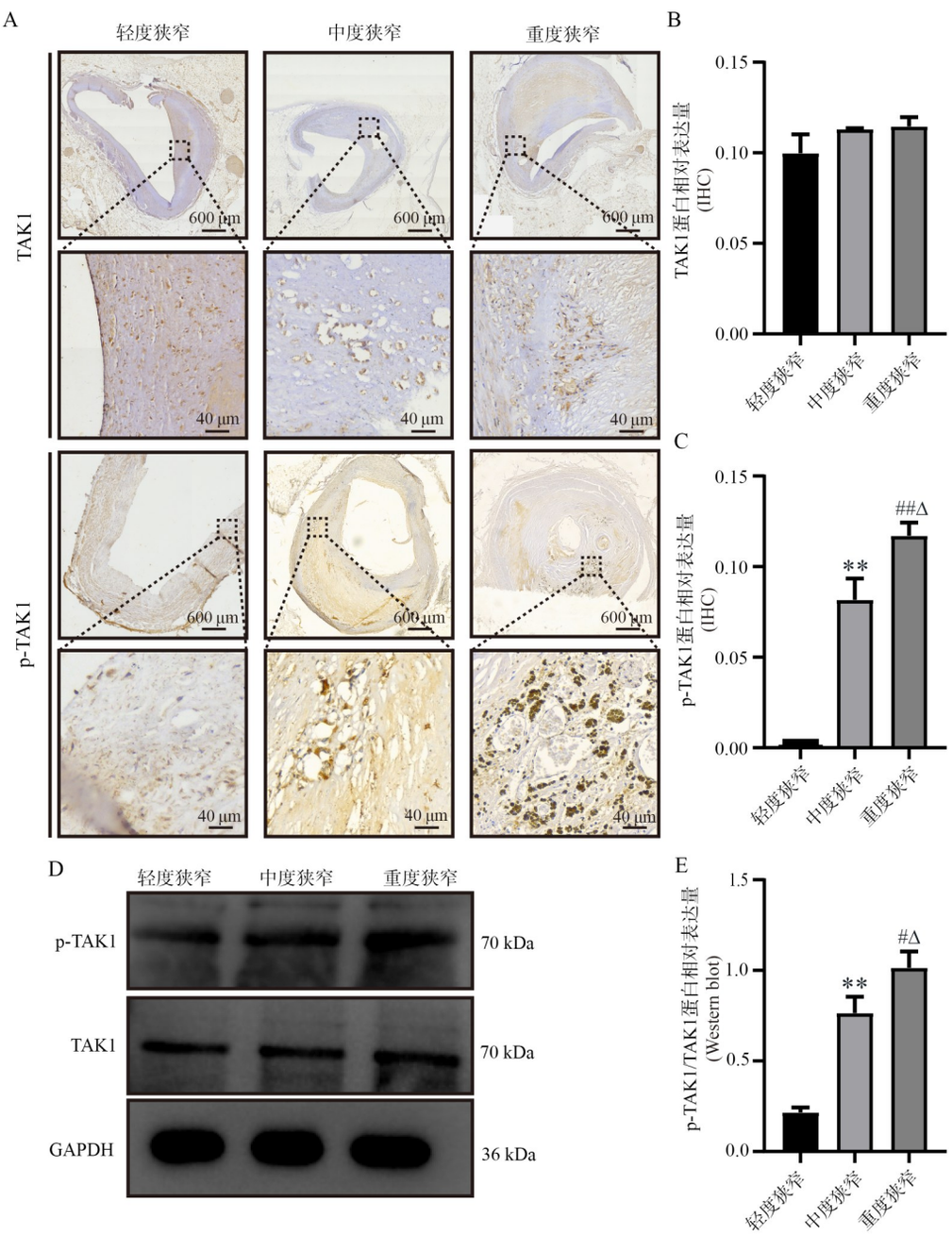
Fig 1　Expression levels of USP18 protein in human coronary artery across three groups

2.2 TAK1在人冠状动脉中的表达

IHC染色结果显示，TAK1的阳性表达主要存在于泡沫细胞胞质中。与轻度狭窄组相比，中度和重度狭窄组人冠状动脉中的TAK1蛋白表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$），p-TAK1蛋白的表达水平明显升高（$P<0.01$）；且与中度狭窄组相比，重度狭窄组的TAK1蛋白的阳性表达水平差异无统计学意义（$P>0.05$），p-TAK1蛋白的阳性表达明显升高（$P<0.05$），见图2A～C。Western blot结果与IHC染色一致（$P<0.05$），见图2D、E。

2.3 IL-1β和TNF-α蛋白在人冠状动脉中的表达水平

IHC染色结果显示，与轻度狭窄组相比，中度狭窄组和重度狭窄组人冠状动脉中IL-1β和TNF-α蛋白的表达水平明显升高（$P<0.05$）；与中度狭窄组相比，重度狭窄组人体冠状动脉中IL-1β和TNF-α



A～C：3组人冠状动脉中TAK1和p-TAK1蛋白IHC染色及统计结果；D、E：3组人冠状动脉中TAK1和p-TAK1蛋白Western blot条带图及统计结果；中度狭窄与轻度狭窄组比较，$^{**}P<0.01$，重度狭窄与轻度狭窄组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；重度狭窄与中度狭窄组比较，$^{\Delta}P<0.05$

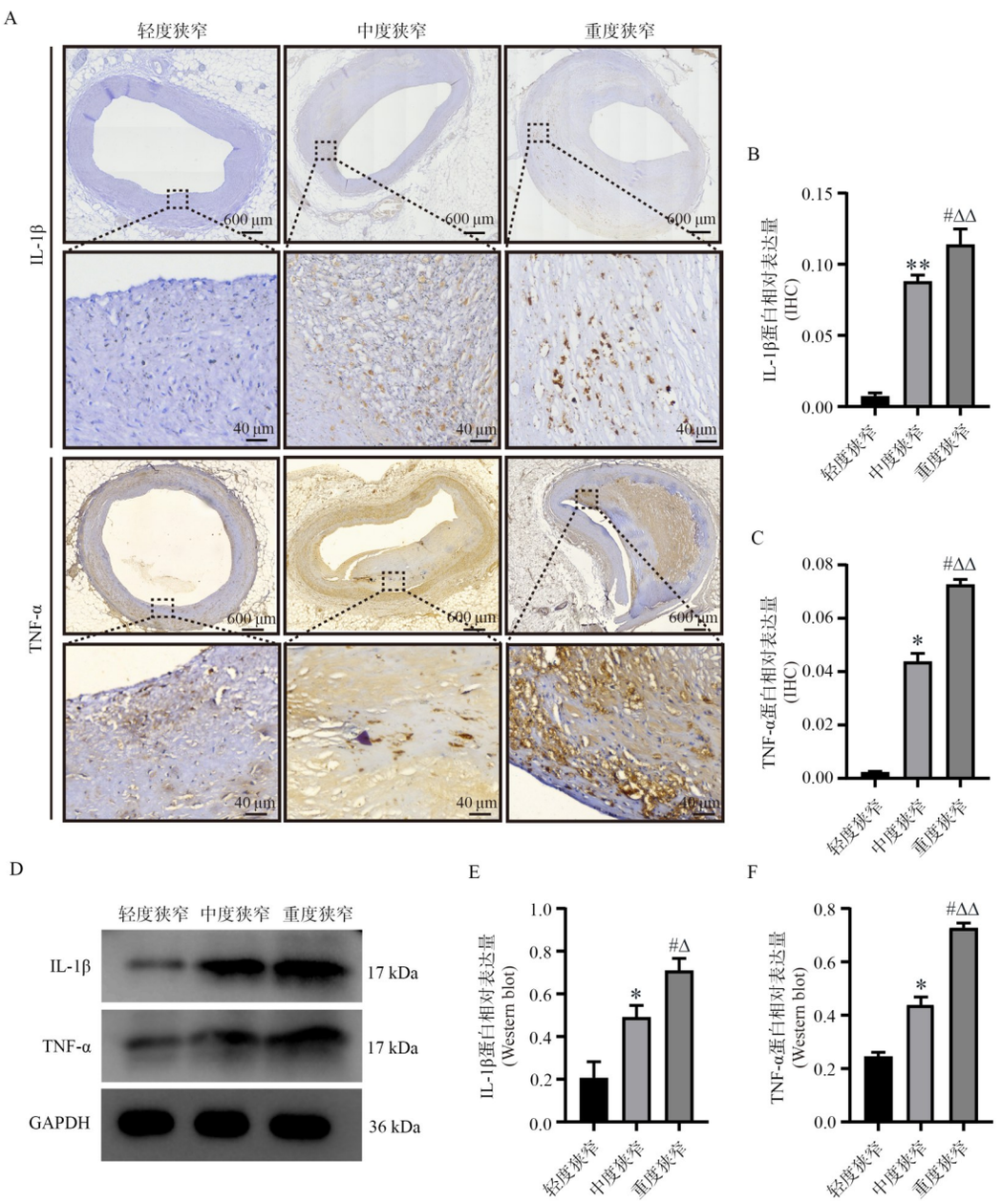
图2 TAK1蛋白在在3组人冠状动脉中的表达水平

Fig 2 Expression levels of TAK1 protein in human coronary artery across three groups

蛋白的表达水平明显升高($P<0.01$)，见图3A～C。Western blot与IHC染色一致($P<0.05$)，见图3D～F。

2.4　敲低*USP18*对小鼠AS形成和TAK1磷酸化的影响

Ad-*USP18*组ApoE$^{-/-}$小鼠的AS病变较HFD组和Ad-NC组增加，提示动物AS模型构建成功，见图4A。H&E和Masson染色结果显示，Ad-*USP18*组ApoE$^{-/-}$小鼠的AS病变较HFD组和Ad-NC组面积明显增加($P<0.05$)，见图4B～E。此外，ORO染色的结果也显示，Ad-*USP18*组ApoE$^{-/-}$小鼠的主动脉中的粥样硬化斑块中的脂质积聚较HFD组和Ad-NC组明显增加($P<0.01$)，见图4F、G。Western blot结果表明，与HFD组和Ad-NC组相比，Ad-*USP18*组主动脉中TAK1的磷酸化水平明显升高($P<0.05$)，*USP18*成功被敲低($P<0.05$)，提示动物AS模型构建成功，见图4H～J。



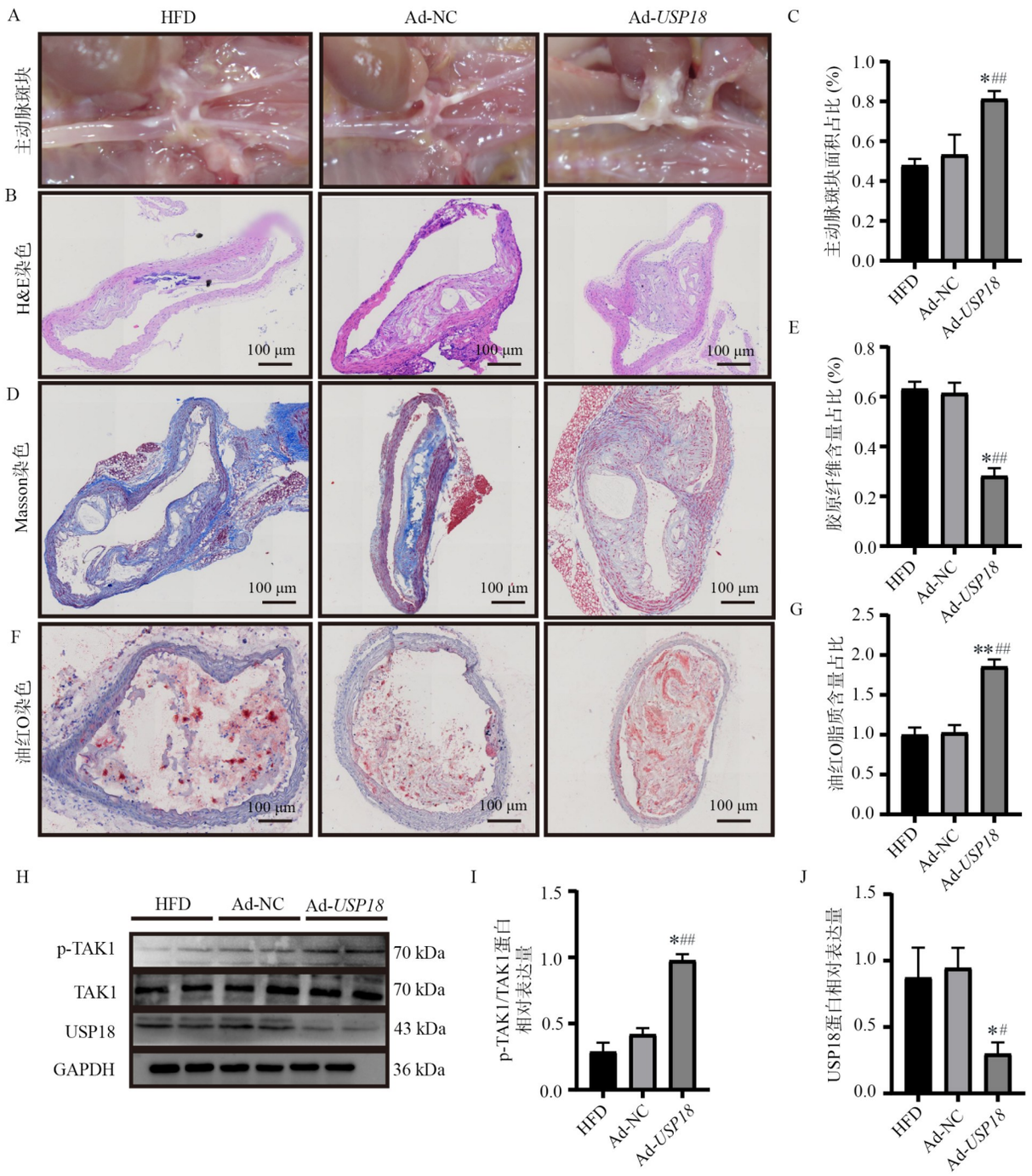
A～C：3组人冠状动脉中IL-1β和TNF-α蛋白IHC染色及统计结果；D～F：人冠状动脉中IL-1β和TNF-α蛋白Western blot条带图及统计结果；中度狭窄与轻度狭窄组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，重度狭窄与轻度狭窄组比较，$^{\#}P<0.05$；重度狭窄与中度狭窄组比较，$^{\Delta}P<0.05$，$^{\Delta\Delta}P<0.01$

图3　IL-1β和TNF-α蛋白在3组人冠状动脉中的表达水平

Fig 3　Expression levels of IL-1β and TNF-α protein in human coronary arteries across three groups

2.5 敲低*USP18*对小鼠主动脉中的炎症反应的影响

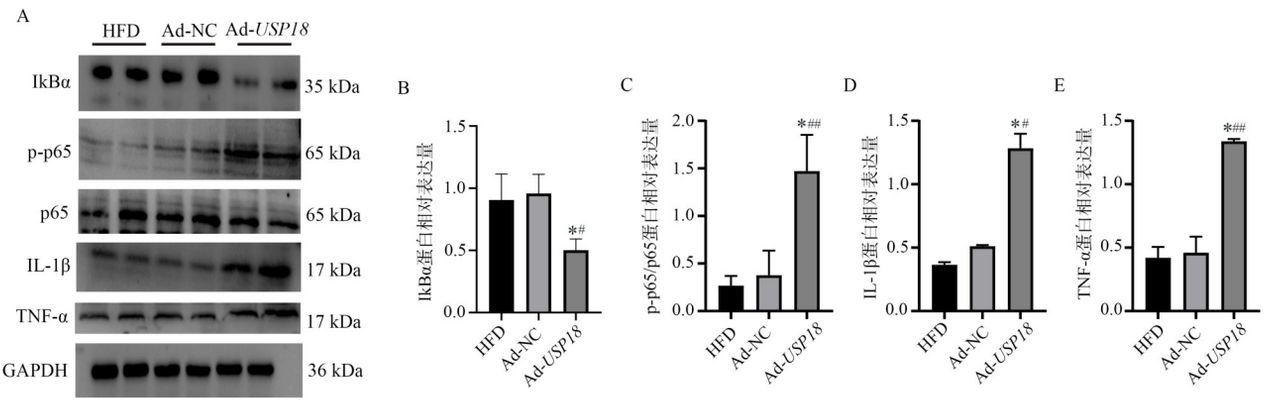
Western blot结果表明，与HFD组和Ad-NC组小鼠相比，Ad-*USP18*组小鼠的主动脉中IκBα的蛋白表达水平明显降低（$P<0.05$）；同时，还检测到Ad-*USP18*组小鼠的主动脉中NF-κB的蛋白磷酸化水平较HFD组和Ad-NC组明显升高（$P<0.05$）；此外与HFD组和Ad-NC组小鼠相比，Ad-*USP18*组小鼠的主动脉中IL-1β和TNF-α蛋白表达水平明显升高（$P<0.05$），见5A～E。



A：3组小鼠主动脉弓部位白色斑块的代表性图像；B、C：3组小鼠主动脉斑块H&E染色及主动脉斑块面积占比统计结果；D、E：3组小鼠主动脉斑块Masson染色及主动脉胶原纤维含量占比统计结果；F、G：3组小鼠主动脉斑块的ORO染色及脂质含量染色面积统计结果；H～J：3组小鼠的主动脉中TAK1、p-TAK1和USP18蛋白Western blot条带图和统计结果；与HFD组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，与Ad-NC组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

图4 敲低*USP18*对3组小鼠主动脉动脉粥样硬化的影响

Fig 4 Effects of knocking-down *USP18* on atherosclerosis in mice aorta across three groups



A～E：3组小鼠主动脉中IκBα、p-p65、p65、IL-1β、TNF-α蛋白Western blot条带图和相对表达量统计结果；与HFD组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与Ad-NC组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

图5 敲低*USP18*对3组小鼠主动脉中炎症反应的影响

Fig 5 Effects of knocking-down *USP18* on inflammatory response in mice aorta across three groups

3 讨论

AS是一种累及免疫与代谢通路的慢性炎症性疾病，也是心血管疾病最主要的病因[1,2,16,17]。通过形成泡沫细胞和介导炎症反应[5,18]，巨噬细胞在AS的发病机制中起着关键作用，其通过释放诸如IL-1β、IL-6和TNF-α等炎症因子，加剧了炎症反应并影响脂质代谢，从而促进AS的发展[19]。本研究探讨了USP18在AS中的作用，特别是在调节巨噬细胞炎症反应中的作用。

泛素化与各种细胞活动密切相关，包括细胞周期控制、免疫功能、炎症反应和程序性细胞死亡[20]。去泛素化酶可以通过从靶蛋白上分离泛素链并逆转泛素化修饰来维持靶蛋白表达的稳定性。其中，泛素特异性蛋白酶是去泛素化酶家族中研究最广泛的成员之一，该家族包含超过60种不同的成员[21]。大量的研究已经探讨了其在各种细胞过程中的作用，包括免疫反应调节、细胞增殖和细胞周期调控[22]。USP18是一种泛素特异性蛋白酶，参与多种生物学过程活动，包括肝细胞脂肪变性、先天性免疫调节以及心血管疾病[8,23,24]。研究显示，相较于正常冠状动脉组织，AS斑块内USP18表达上调；但随着冠脉斑块面积增大，USP18表达水平逐步降低，且USP18在冠状动脉组织中的表达量与斑块面积呈负相关。在机制上，USP18可通过对ABCG1实施去泛素化修饰，上调ABCG1蛋白表达，进而在抑制AS进展过程中发挥重要作用[11,12]。本研究通过IHC和Western blot发现，人冠状动脉轻度狭窄组中USP18的蛋白表达水平明显高于中度狭窄组和重度狭窄组，这一结果与前期研究结果一致。此外，在*USP18*敲除的ApoE$^{-/-}$小鼠中观察到AS斑块负荷和脂质沉积增加。这与近期关于去泛素化酶参与AS进程的研究趋势相呼应[25]。有研究[26]指出USP家族的其他成员可通过调节巨噬细胞功能影响AS发展。这提示USP18可能与AS炎症反应和泡沫细胞的形成密切相关。

TAK1，一种最初被归类于MAPK激酶家族的丝裂原/苏氨酸激酶，在响应TGF-β和BMP-4时作为信号转导的中介发挥作用[27]。大量研究表明，TAK1可被多种刺激激活，随后磷酸化一系列靶蛋白，从而在不同的应激条件和细胞类型中启动多样化的信号通路和细胞反应[28]。Jiang[29]等的研究表明，USP22通过其去泛素化活性增强HIF-1α的稳定性，进一步激活TAK1-(JNK1/2)/P38信号通路导致心脏肥大。An等[8]的研究发现USP18与TAK1结合并去泛素化从而抑制TAK1的激活，以防止肝脏脂肪变性、胰岛素抵抗和炎症反应。本研究的结果显示，随着人冠状动脉斑块狭窄程度的增加，TAK1蛋白的磷酸化水平也相应升高。同时，在*USP18*敲除的ApoE$^{-/-}$小鼠中观察到AS斑块中的TAK1蛋白的磷酸化水平更为明显，这表明了USP18对TAK1的去泛素化作用，可能成为调控AS炎症级联反应的关键节点，进而发挥抗AS的作用。与Jiang[29]等发现的USP22激活TAK1/JNK1/2/p38通路导致心脏肥大不同，本研究中USP18表现出抑制TAK1激活的特性，这不仅丰富了对USP家族功能多样性的认识，也提示了在不同病理环境下相同分子可能存在相反的的调控作用。本研究揭示USP18与TAK1的关联，为理解AS的分子机制提供了独特线索。

Ying等[23]阐明了USP18和参与心脏重塑的几个已知信号通路具有相关性,例如TAK1,是炎症中的关键调节分子和AP-1相关和NF-κB信号转导通路的上游因子,并且TAK1介导的信号转导通路激活已被证明受泛素化调节,NF-κB激活需要TAK1的Lys63(k63)连接的多泛素化,USP18通过抑制TAK1的k63连接去泛素化,负向调节Toll样受体诱导的NF-κB激活。NF-κB在调节免疫和炎症反应、细胞增殖、自噬、组织重塑和代谢过程中起关键作用[30]。Liu等[31]的研究发现NF-κB信号通路在AS中具有双重作用,适度激活有助于清除损伤细胞,过度激活则加剧炎症反应。有研究表明TAK1的自动磷酸化需要其泛素化,而TAK1的k63连接的多泛素化是其自身磷酸化所必需的,这使其完全激活[32],从而促进IκB激酶磷酸化,使得IκBα蛋白被IκB激酶迅速磷酸化[33],磷酸化的IκBα随后通过26S蛋白酶体降解[34],而IκBα与NF-κB信号通路的激活密切相关[35]。Hu等[36]的研究表明,USP18与TAK1结合并使TAK1去泛素化,通过调控TAK1/NF-κB信号通路从而抑制巨噬细胞分泌炎症因子,缓解局部炎症反应。Hua等[14]的研究发现黄芪甲苷Ⅳ通过抑制TAK1-MAPK通路的激活,从而抑制血管内皮细胞的促炎性激活,进而发挥抗AS的作用[14]。本研究结果显示,人冠状AS斑块中IL-1β和TNF-α蛋白的表达水平随着斑块狭窄程度的增加而升高。*USP18*敲除导致IkBα蛋白表达降低、NF-kB磷酸化水平升高,进而引发炎症因子IL-1β和TNF-α的大量释放,这进一步证实了USP18通过抑制TAK1/NF-kB轴,对AS炎症反应起到关键调控作用,从而加重小鼠AS斑块负荷和炎症反应以及脂质沉积增加。这提示USP18可能通过与TAK1相互结合并使TAK1去泛素化,从而抑制TAK1的磷酸化,进而抑制下游的NF-κB信号通路,抑制AS的发生、发展和巨噬细胞炎症反应。这可能是USP18参与AS病变发生与发展的机制之一。这与Hua等[14]报道的黄芪甲苷Ⅳ通过抑制TAK1-MAPK通路抗AS的机制更聚焦于泛素化修饰与信号通路的激活直接关联,为抗炎和AS的治疗提供一个潜在的治疗靶点,为靶向药物研发提供更精确的理论依据。

本研究发现USP18可能通过抑制TAK1/NF-κB信号通路的激活参与AS的形成,但仍存在以下局限性:首先,本研究仅从一个研究中心选择样本,这可能会在人冠状动脉样本的选择中引入偏倚。为了提高研究结果的普遍性,在未来的研究中可以扩大样本量。其次,本研究仅考察了*USP18*敲低对炎症反应、泡沫细胞形成和AS的影响,未评估*USP18*过表达的影响。另外,本研究仅通过USP18-TAK1-NF-κB轴研究AS形成的机制,是否存在其他炎症调控通路有待进一步研究。

总体而言,本次研究揭示了USP18和TAK1在AS中的关键作用,USP18通过与TAK1相互结合并使得TAK1去泛素化,从而抑制TAK1的磷酸化,进而抑制NF-κB信号通路的激活,最终抑制炎症反应。这种相互作用可能减少泡沫细胞的形成和炎症因子释放,从而发挥抗AS的作用。本研究不仅探讨了对AS发病机制的认知,也为开发靶向USP18的抗AS治疗策略提供了理论基础。

作者贡献度说明:

李松:实验和指标检测、撰写文稿;黎文艺:样本收集;夏冰:基金资助、实验方法指导;王杰:实验设计、实验方法指导;戴佳琳:基金资助、实验设计指导、最后校审。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

致谢:

感谢戴佳琳在课题实验设计上给予指导和提供资金资助;感谢夏冰提供资金资助和实验方法给予指导;感谢王杰在实验设计和实验方法上给予指导;感谢黎文艺在实验样本收集上提供帮助。

参考文献

1 Woollard KJ, Geissmann F. Monocytes in atherosclerosis: Subsets and functions[J]. Nat Rev Cardiol, 2010, 7(2): 77-86.

2 Berg M, Polyzos KA, Agardh H, et al. 3-Hydroxyanthralinic acid metabolism controls the hepatic SREBP/lipoprotein axis, inhibits inflammasome activation in macrophages, and decreases atherosclerosis in Ldlr-/- mice[J]. Cardiovasc Res, 2020, 116(12): 1948-1957.

3 Lv J, Kong Q, Ma X. Current advances in circulating inflammatory biomarkers in atherosclerosis and related cardio-cerebrovascular diseases[J]. Chronic Dis Transl Med, 2017, 3(4): 207-212.

4 Zhang J, Nie S, Zu Y, et al. Anti-atherogenic effects of CD36-targeted epigallocatechin gallate-loaded nanoparticles[J]. J Control Release, 2019, 303: 263-273.

5 Cassim Bawa FN, Gopoju R, Xu Y, et al. Retinoic acid receptor alpha (RARα) in macrophages protects from diet-induced atherosclerosis in mice[J]. Cells, 2022, 11(20): 3186.

6 Yao T, Song L, Jin J, et al. Distinct modes of regulation of the Uch37 deubiquitinating enzyme in the proteasome and in the Ino80 chromatin-remodeling complex [J]. Mol Cell, 2008, 31(6): 909-917.

7 Mund T, Pelham HR. Control of the activity of WW-HECT domain E3 ubiquitin ligases by NDFIP proteins[J]. EMBO Rep, 2009, 10(5): 501-507.

8 An S, Zhao LP, Shen LJ, et al. USP18 protects against hepatic steatosis and insulin resistance through its deubiquitinating activity[J]. Hepatology, 2017, 66(6): 1866-1884.

9 Wang L, Li M, Lian G, et al. USP18 antagonizes pyroptosis by facilitating selective autophagic degradation of gasdermin D[J]. Research (Wash D C), 2024, 7: 0380.

10 Lai J, Wu D, Huang C, et al. USP18 induction regulates immunometabolism to attenuate M1 signal-polarized macrophages and enhance IL-4-polarized macrophages in systemic lupus erythematosus[J]. Clin Immunol, 2024, 265: 110285.

11 安洋, 王小丽, 王杰, 等. 泛素特异性蛋白酶18促进ABCG1泛素化对动脉粥样硬化形成的影响[J]. 贵州医科大学学报, 2025, 50(2): 167-179.
An Y, Wang XL, Wang J, et al. Effect of ubiquitin-specific protease 18 promoting ubiquitination of ABCG1 on the formation of atherosclerosis[J]. J Guizhou Med Univ, 2025, 50(2): 167-179.

12 An Y, Guo C, Wang X, et al. USP18 promotes cholesterol efflux and mitigates atherosclerosis by deubiquitinating ABCG1[J]. J Cell Mol Med, 2025, 29(1): e70320.

13 Sun J, Mu Y, Jiang Y, et al. Inhibition of p70 S6 kinase activity by A77 1726 induces autophagy and enhances the degradation of superoxide dismutase 1 (SOD1) protein aggregates[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 407.

14 Hua S, Zhang H, Li J, et al. Astragaloside Ⅳ ameliorates atherosclerosis by targeting TAK1 to suppress endothelial cell proinflammatory activation[J]. Int Immunopharmacol, 2025, 146: 113842.

15 Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association[J]. Circulation, 1995, 92(5): 1355-1374.

16 Li B, Zhang Z, Fu Y. Anti-inflammatory effects of artesunate on atherosclerosis *via* miR-16-5p and TXNIP regulation of the NLRP3 inflammasome[J]. Ann Transl Med, 2021, 9(20): 1558.

17 Pi H, Wang Z, Liu M, et al. SCD1 activation impedes foam cell formation by inducing lipophagy in oxLDL-treated human vascular smooth muscle cells[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(8): 5259-5269.

18 Liao C, Xu J, Huang W, et al. Plasma proteomic changes of atherosclerosis after exercise in ApoE knockout mice [J]. Biology (Basel), 2022, 11(2): 253.

19 Ma X, Liu H, Zhu J, et al. miR-185-5p regulates inflammation and phagocytosis through CDC42/JNK pathway in macrophages[J]. Genes (Basel), 2022, 13(3): 468.

20 Zhang S, Ishida Y, Ishigami A, et al. Forensic application of epidermal ubiquitin expression to determination of wound vitality in human compressed neck skin[J]. Front Med (Lausanne), 2022, 9: 867365.

21 Zhang M, Chen D, Li H, et al. Clinical significance of USP7 and EZH2 in predicting prognosis of laryngeal squamous cell carcinoma and their possible functional mechanism[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2019, 12(6): 2184-2194.

22 Zhang Y, Zhu T, He F, et al. Identification of key genes and pathways in osteoarthritis *via* bioinformatic tools: An updated analysis[J]. Cartilage, 2021, 13(1_suppl): 1457s-1464s.

23 Ying X, Zhao Y, Yao T, et al. Novel protective role for ubiquitin-specific protease 18 in pathological cardiac remodeling[J]. Hypertension, 2016, 68(5): 1160-1170.

24 Feng Z, Pan L, Qiao C, et al. Cardamonin intervenes in myocardial hypertrophy progression by regulating Usp18 [J]. Phytomedicine, 2024, 134: 155970.

25 Pan Z, Lv J, Zhao L, et al. CircARCN1 aggravates atherosclerosis by regulating HuR-mediated *USP31* mRNA in macrophages[J]. Cardiovasc Res, 2024, 120(13): 1531-1549.

26 Tang S, Lu C, Meng Z, et al. USP22 enhances atherosclerotic plaque stability and macrophage efferocytosis by stabilizing PPARγ[J]. Commun Biol, 2025, 8(1): 678.

27 Shibuya H, Iwata H, Masuyama N, et al. Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early *Xenopus* development[J]. EMBO J, 1998, 17(4): 1019-1028.

28 Mukhopadhyay H, Lee NY. Multifaceted roles of TAK1 signaling in cancer[J]. Oncogene, 2020, 39(7): 1402-1413.

29 Jiang Y, Yang S, Guan X, et al. Loss of USP22 alleviates cardiac hypertrophy induced by pressure overload through HiF1-α-TAK1 signaling pathway[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2023, 1869(8): 166813.

30 Medzhitov R, Horng T. Transcriptional control of the inflammatory response[J]. Nat Rev Immunol, 2009, 9(10): 692-703.

31 Liu D, Zhong Z, Karin M. NF-κB: A double-edged sword controlling inflammation [J]. Biomedicines, 2022, 10(6): 1250.

32 Ajibade AA, Wang HY, Wang RF. Cell type-specific function of TAK1 in innate immune signaling [J]. Trends Immunol, 2013, 34(7): 307-316.

33 Chen ZJ. Ubiquitination in signaling to and activation of IKK[J]. Immunol Rev, 2012, 246(1): 95-106.

34 Yamamoto Y, Gaynor RB. IkappaB kinases: Key regulators of the NF-kappaB pathway[J]. Trends Biochem Sci, 2004, 29(2): 72-79.

35 Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways[J]. Nat Immunol, 2011, 12(8): 695-708.

36 Hu B, Ge C, Zhu C. Ubiquitin-specific peptidase 18 negatively regulates and inhibits lipopolysaccharide-induced sepsis by targeting transforming growth factor-β-activated kinase 1 activity[J]. Int Immunol, 2021, 33(9): 461-468.

[本文编辑] 陈思润