DOI:10.16016/j.2097-0927.202112025

组织蛋白酶 K 在酒精性心肌病小鼠心功能不全中的作用及其损伤机制研究

唐一锋[1],刘志江[2],许官学[2],赵然尊[2],陈文明[2],石 蓓[2] 553001 贵州 六盘水,六盘水市人民医院心血管内科[1];563000 贵州 遵义,遵义医科大学附属医院心血管内科[2]

[摘要] **目的** 探讨组织蛋白酶 K(cathepsin K,CatK)在酒精性心肌病(alcoholic cardiomyopathy,ACM)小鼠心功能不全中的作用及其损伤机制。**方法** 48 只 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠按随机数字表法分为对照组(n=12,等热量麦芽糖糊精对照液体饲料喂养)和模型组(n=36,4%乙醇 Lieber-DeCarli 液体饲料喂养)。8 周后,以超声心动图心脏收缩功能下降的模型组小鼠为 ACM,按随机数字表法分为:ACM 组、sh-NC 组、sh-CatK 组,每组 12 只。分别向 sh-NC 组和 sh-CatK 组小鼠鼠尾静脉注射 1×10^9 vg(100 μL)Scramble-shRNA 和 CatK-shRNA 的重组腺病毒。在第 12 周末,采用 M 型超声心动图测量心功能。免疫组织化学检测 CatK 和 Nox4 蛋白表达。体外实验以 H9c2 心肌细胞为研究对象,评价 CatK-shRNA 介导的 CatK 沉默对乙醇诱导的心肌细胞损伤的影响。采用蛋白质印迹法分析 AMPK/Nox4 信号通路蛋白表达;采用流式细胞仪分析 H9c2 细胞凋亡情况。应用荧光染料二氢乙胺测定小鼠心肌组织和体外培养的 H9c2 细胞的活性氧水平。**结果** ACM 组心肌细胞表面积,心肌纤维化面积,心肌组织中 CatK、Nox4 蛋白表达和超氧化物的产生均较对照组显著增加(P<0.05)。与 ACM 组相比,sh-CatK 组心肌细胞表面积,心肌纤维化面积,心肌组织中 CatK、Nox4 蛋白表达和超氧化物的产生均显著降低(P<0.05)。体外结果显示,随着暴露于乙醇中的时间不断延长,H9c2 细胞中 CatK 蛋白表达不断增加(P<0.05)。CatK 抑制处理显著降低了 H9c2 细胞凋亡和氧化应激水平(P<0.05),并上调了 AMPK 磷酸化(P<0.05),进而导致 Nox4 蛋白、纤维细胞胶原 COL-1 和 TGF-β 表达降低(P<0.05)。**结论** CatK 参与 ACM 小鼠心功能不全的病理过程,其机制与促进 AMPK/Nox4 信号通路介导的氧化应激有关。

[关键词] 组织蛋白酶 K;小鼠;酒精性心肌病;心功能;AMPK/Nox4 信号

[中图法分类号] R345;R363.21;R542.2 [文献标志码] A

The role of cathepsin K in cardiac dysfunction in mice with alcoholic cardiomyopathy and its damage mechanism

TANG Yifeng[1], LIU Zhijiang[2], XU Guanxue[2], ZHAO Ranzun[2], CHEN Wenming[2], SHI Bei[2] [1]Department of Cardiovascular Diseases, Liupanshui People's Hospital, Liupanshui, Guizhou Province, 553001; [2]Department of Cardiovascular Diseases, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the role of cathepsin K (CatK) in cardiac dysfunction in alcoholic cardiomyopathy (ACM) mice and its damage mechanism. **Methods** Forty-eight C57BL/6J male mice (8 weeks old) were randomly divided into control group (n=12, fed with isocaloric maltodextrin control liquid diet) and model group (n=36, fed with 4% ethanol Lieber-DeCarli liquid diet). After 8 weeks, the

[基金项目] 贵州省卫生健康科研基金项目(20190124)

[通信作者] 石 蓓,E-mail:wzjlfl2604@163.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

mice in the model group identified with decreased cardiac systolic function by echocardiography were regarded as ACM mice, and they were randomly divided into ACM group, sh-NC group, and sh-CatK group, with 12 mice in each group. The mice in the sh-NC group and the sh-CatK group were injected with 1×10^9 vg (100 μL) of recombinant adenoviruses containing scramble-shRNA or CatK-shRNA *via* tail vein, respectively. At the end of the 12th week, cardiac function was measured by M-mode echocardiography. The expression of CatK and Nox4 was detected by immunohistochemical assay. In *in vitro* study, H9c2 cardiomyocytes were used to evaluate the effect of CatK silencing on alcohol-induced cardiomyocyte injury. Western blotting was used to analyze the protein expression of AMPK/Nox4 signaling pathway. Flow cytometry was employed to analyze the apoptosis of H9c2 cells. The levels of reactive oxygen species in mouse myocardium and H9c2 cells cultured were measured using fluorescent dye dihydroethidium. **Results** The surface area of myocardial cells, area of myocardial fibrosis, protein levels of CatK and Nox4 and production of superoxide were significantly increased in the ACM group compared with the control group ($P<0.05$), and those indicators in the sh-CatK group were significantly decreased than the ACM group ($P<0.05$). Sh-CatK transfection significantly reversed the above changes in ACM mice ($P<0.05$). *In vitro* results showed that the expression of CatK protein in H9c2 cells was increased with the prolonged exposure to ethanol ($P<0.05$). CatK inhibition significantly reduced the apoptostic rate and oxidative stress levels ($P<0.05$), and up-regulated AMPK phosphorylation in H9c2 cells ($P<0.05$), resulting in decreased expression of Nox4 protein, collagen COL-1 and TGF-β ($P<0.05$). **Conclusion** CatK is involved in the pathological process of cardiac dysfunction in the ACM mice, and its mechanism might be related to the promotion of oxidative stress mediated by the AMPK/Nox4 signaling pathway.

[**Key words**] cathepsin K; mice; alcoholic cardiomyopathy; cardiac function; AMPK/Nox4 signaling

Supported by the Project of Health Scientific Research Foundation of Guizhou Province (20190124). Corresponding author: SHI Bei, E-mail: wzjlfl2604@163.com

饮酒会导致严重的心血管并发症,尤其是酒精性心肌病(alcoholic cardiomyopathy,ACM)。ACM 主要表现为间质纤维化和心肌功能不全,最终演变为心力衰竭[1]。虽然 ACM 的确切机制尚不清楚,但目前认为氧化应激在 ACM 的发生发展中起着重要作用。大量研究指出,饮酒引起的氧化应激增加了心肌纤维化,加重了心功能损害[2]。在心肌纤维化期间,心肌胶原含量增加。研究发现,在病理条件下,心肌胶原在正常水平以上增加 2~3 倍会导致左室僵硬和功能障碍增加[3]。组织蛋白酶 K(cathepsin K,CatK)是最有效的哺乳动物胶原酶之一[4],最近的证据表明,CatK 参与介导细胞蛋白质周转、胶原降解和细胞外基质重塑[5]。此外,CatK 在肥厚和衰竭心脏中的表达增加,而敲除 CatK 可以减轻肥胖和压力超负荷相关的心功能不全[6]。然而,CatK 在 ACM 中的明确作用或潜在机制仍不清楚。因此,本研究探讨 CatK 抑制对 ACM 引起的心脏结构和功能改变的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 ACM 模型的建立

48 只 8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[合格证编号:SCXK(京)2016-0006],置于温控室内、12 h/12 h 的光/暗循环环境下饲养。将小鼠按随机数字表法分为对照组($n=12$,等热量麦芽糖糊精对照液体饲料喂养,南通特洛菲饲料科技有限公司)和模型组($n=36$,4% 乙醇 Lieber-DeCarli 液体饲料喂养,南通特洛菲饲料科技有限公司)[7]。8 周后,用 VEVO3100 超声系统(日本 Fujifilm-visualonics 公司)检测小鼠的心功能。以超声心动图心脏收缩功能下降的模型组小鼠为 ACM,将 ACM 小鼠分为:ACM 组、sh-NC 组、sh-CatK 组,每组 12 只。分别向 sh-NC 组和 sh-CatK 组小鼠鼠尾静脉注射 1×10^9 vg(100 μL,生理盐水溶解)Scramble-shRNA 和 CatK-shRNA 的重组腺病毒。表达 CatK-shRNA 的重组腺病毒载体以及 Scramble-shRNA 阴性对照由上海吉玛制药技术有限公司设计并合成。重组腺病毒注

射后4周处死小鼠,收集被处死小鼠的左心室心肌作进一步实验。

1.2 超声心动图

在第8周末和第12周末,小鼠用1.5%异氟醚麻醉后进行经胸超声心动图检查。采用M型超声心动图测量以下心脏参数:射血分数、短缩分数、收缩期左室后壁厚度(systole left ventricle posterior wall thickness,LVPWs)、舒张期左室后壁厚度(diastole left ventricle posterior wall thickness,LVPWd)。

1.3 组织病理学和免疫组织化学

左心室心肌用4%多聚甲醛固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋。制备4.5 μm厚的组织切片。苏木精-伊红(HE)染色和Masson三色染色评价心肌细胞横截面积和心肌间质纤维化。将连续切片脱石蜡和再水化,然后与抗CatK(1∶250,英国Abcam公司)和Nox4(1∶200,上海Abways公司)一起孵育过夜。然后在室温下用二级抗体(美国Santa Cruz公司)染色1 h。使用CX31显微镜(日本Olympus公司)进行检查。

1.4 细胞培养

H9c2小鼠心肌细胞系从上海生物化学与细胞生物学研究所获得,接种在含有4.5 mmol/L D-葡萄糖、10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素的高糖DMEM培养基(美国Gibco公司)中生长。为了评价乙醇对H9c2细胞中CatK蛋白表达的影响,将H9c2细胞暴露于不同时间(0、4、8、16、24和48 h)的乙醇中。为了评价CatK-shRNA介导的CatK沉默对酒精诱导的心肌细胞损伤的影响,将细胞接种于6孔板上,转染Scramble-shRNA或CatK-shRNA,将H9c2分为4组:对照组(不含乙醇),乙醇组(含乙醇,200 mmol/L[8]),乙醇+Scramble-shRNA(sh-NC,10 nmol/L)组和乙醇+CatK-shRNA(sh-CatK,10 nmol/L)组。24 h后收集细胞和培养基进行进一步实验。

1.5 蛋白质印迹分析

将上述处理的H9c2细胞在含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂(美国Merck Corporation公司)的细胞裂解缓冲液(美国Cell signaling technology公司)中裂解,并通过BCA Bradford蛋白分析试剂盒(上海Beyotime公司)测定蛋白含量,然后将蛋白质与负载缓冲液混合并煮沸10 min。用SDS-PAGE凝胶分离等量提取物(50 μg)并转移到硝化纤维素膜(美国Bio-rad公司)。用5%的脱脂奶粉封闭细胞膜2 h,然后在4 ℃下与抗CatK(1∶1 000,英国Abcam公司)、Ⅰ型胶原(COL-1,1∶1 000,武汉Boster公司)、转化生长因子-β(TGF-β,1∶1 000,武汉Boster公司)、AMPK(1∶1 000,上海Abways公司)、p-AMPK(1∶1 000,上海Abways公司)、Nox4(1∶1 000,上海Abways公司)和β-actin(1∶3 000,上海Abways公司)孵育过夜。第2天,用适当的辣根过氧化物酶结合二级抗体(1∶10 000,上海Abways公司)在室温下孵育1 h。通过Tanon 5200化学发光成像系统(上海天能科技有限公司)观察免疫复合物。

1.6 流式细胞仪分析

应用Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)进行流式细胞术检测H9c2细胞凋亡。取处理后细胞,用Annexin V和PI双重染色。然后用流式细胞仪(美国BD公司)对细胞进行分析。

1.7 MDA、SOD活性测定

用荧光染料二氢乙胺(dihydroethidium,DHE)测定小鼠心肌组织和体外培养的H9c2细胞的活性氧(ROS)生成。将新鲜冷冻心肌切片和H9c2细胞在37 ℃下用DHE(10 μm)孵育30 min。在CX31显微镜下观察组织切片和细胞的荧光图像(激发520 nm和发射590 nm)。使用试剂盒(中国南京建城生物工程研究所)测定小鼠心肌组织中MDA水平和SOD活性。

1.8 统计学分析

使用SPSS 21.0进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用非配对 t 检验对两组数据进行分析。采用单因素方差分析(ANOVA)和Bonferroni事后检验来确定多组间的统计差异。$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

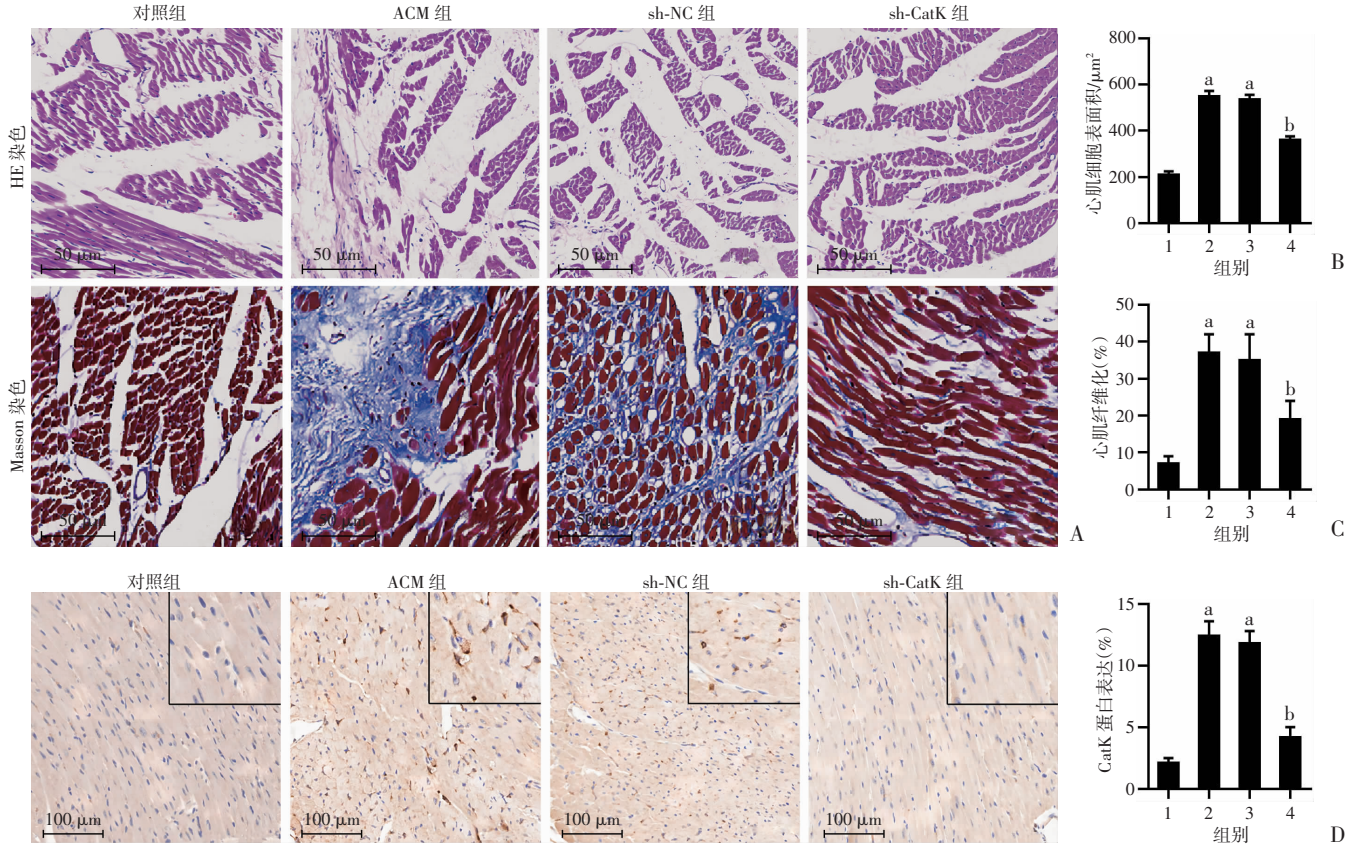
2.1 CatK在ACM小鼠心功能不全中的作用

乙醇喂养12周后,小鼠表现出明显的ACM症状,包括射血分数和缩短分数降低,并伴有左室后壁舒张内径的增加(表1)。HE染色和Masson染色显示,ACM组心肌细胞表面积和心肌纤维化面积较对照组均显著增加($P<0.05$),表明乙醇诱导心肌细胞肥大(图1A~C)。通过免疫组化检测CatK在各组中的表达情况。与对照组相比,ACM组心肌组织中CatK蛋白显著增加($P<0.05$),而sh-CatK治疗显著抑制了ACM小鼠心肌组织中CatK蛋白表达($P<0.05$,图1D),并且显著降低了ACM小鼠心肌细胞表面积和心肌纤维化面积($P<0.05$)。表明sh-CatK治疗显著减轻了乙醇诱导的心功能不全,但对血液乙醇水平没有影响,提示sh-CatK对ACM小鼠心脏保护作用并非归因于血清乙醇的清除(表1)。

表 1　造模成功后各组小鼠经胸超声心动指标对比($n=8,\bar{x}\pm s$)

指标	对照组	ACM 组	sh-NC 组	sh-CatK 组
心脏质量/体质量/mg·g^{-1}	5.16±0.34	6.24±0.07^{a}	6.35±0.01^{a}	5.40±0.16^{b}
心率/次·min^{-1}	456±4	438±3	431±2	450±6
射血分数(%)	65.00±3.17	40.39±1.86^{a}	40.04±2.51^{a}	67.75±2.72^{b}
缩短分数(%)	35.15±2.90	18.64±1.34^{a}	18.85±1.32^{a}	37.07±2.07^{b}
左室质量/mg	59.90±2.82	88.76±2.94^{a}	87.80±3.57^{a}	69.95±2.76^{b}
LVPWs/mm	1.15±0.02	1.02±0.07	1.00±0.06	1.17±0.08
LVPWd/mm	0.65±0.02	0.78±0.02^{a}	0.78±0.03^{a}	0.66±0.03^{b}
血液酒精/mg·dL^{-1}	–	3.30±0.17	3.36±0.18	3.27±0.15

a: $P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 ACM 组比较



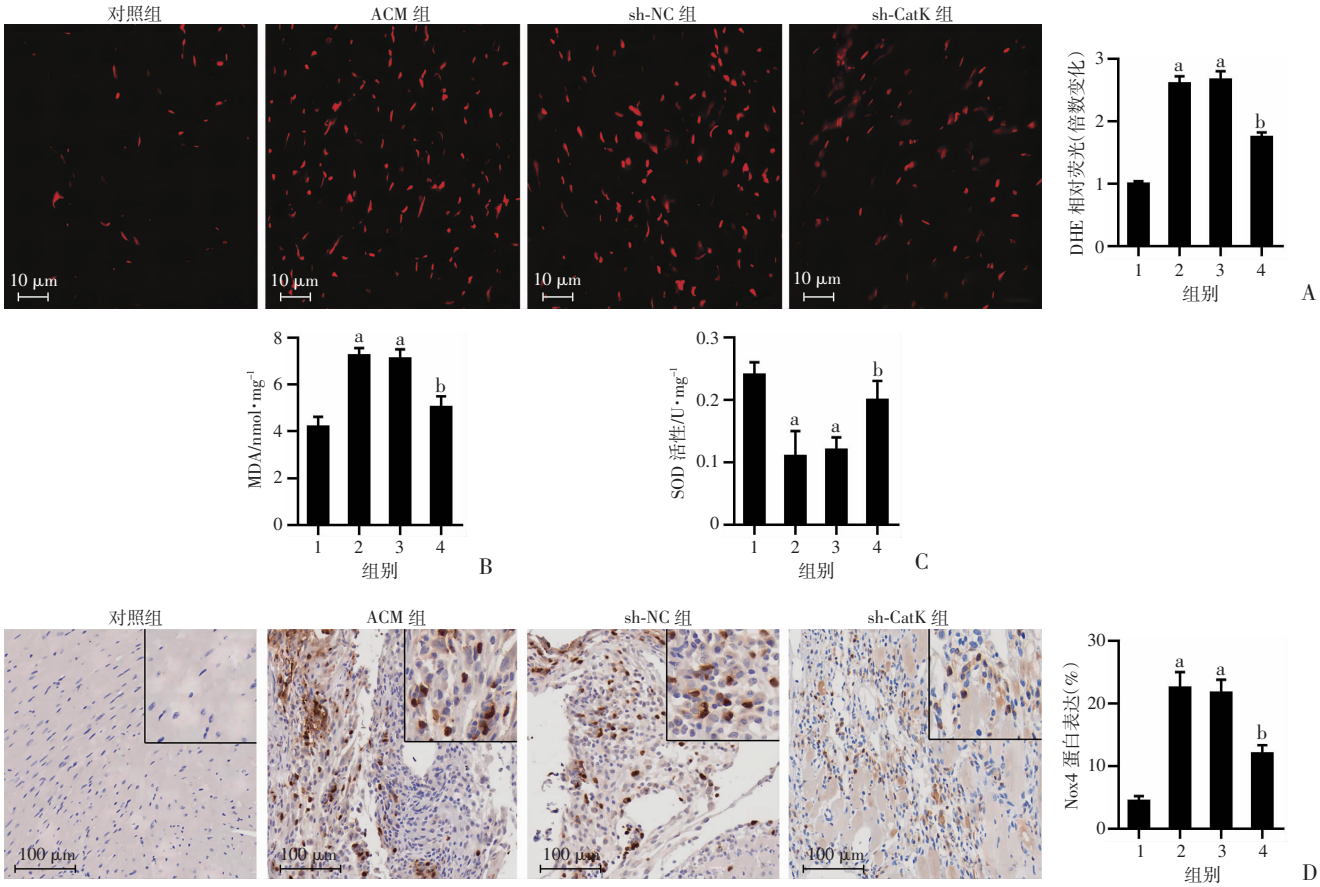
1:对照组;2:ACM 组;3:sh-NC 组;4:sh-CatK 组; a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与 ACM 组比较

A: 各组小鼠心脏组织的 HE 和 Masson 染色;B: 心肌细胞表面积的定量分析;C: 心肌纤维化面积的定量分析;D: 免疫组化分析各组心肌组织中 CatK 蛋白表达及定量分析

图 1　CatK 在 ACM 小鼠心功能不全中的作用($n=6$)

2.2　抑制 CatK 改善 ACM 小鼠氧化应激

通过 DHE 染色法测定小鼠心脏组织氧化应激水平。与对照组相比,ACM 组小鼠心肌组织中超氧化物的产生、脂质过氧化标志物 MDA 水平以及 Nox4 蛋白表达明显增加($P<0.05$),而抗氧化酶 SOD 活性明显降低($P<0.05$)。CatK 抑制减少了 ACM 小鼠心肌组织中超氧化物的产生、MDA 水平和 Nox4 蛋白表达($P<0.05$),同时增加了 SOD 活性($P<0.05$)。见图 2。



1:对照组;2:ACM 组;3:sh-NC 组;4:sh-CatK 组; a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与 ACM 组比较
A: 各组小鼠心脏组织的 DHE 荧光染色;B、C: 各组小鼠心脏组织的 MDA 和 SOD 表达水平;D: 免疫组化分析各组心肌组织中 Nox4 蛋白表达及定量分析

图 2 CatK 抑制改善 ACM 小鼠氧化应激水平($n=6$)

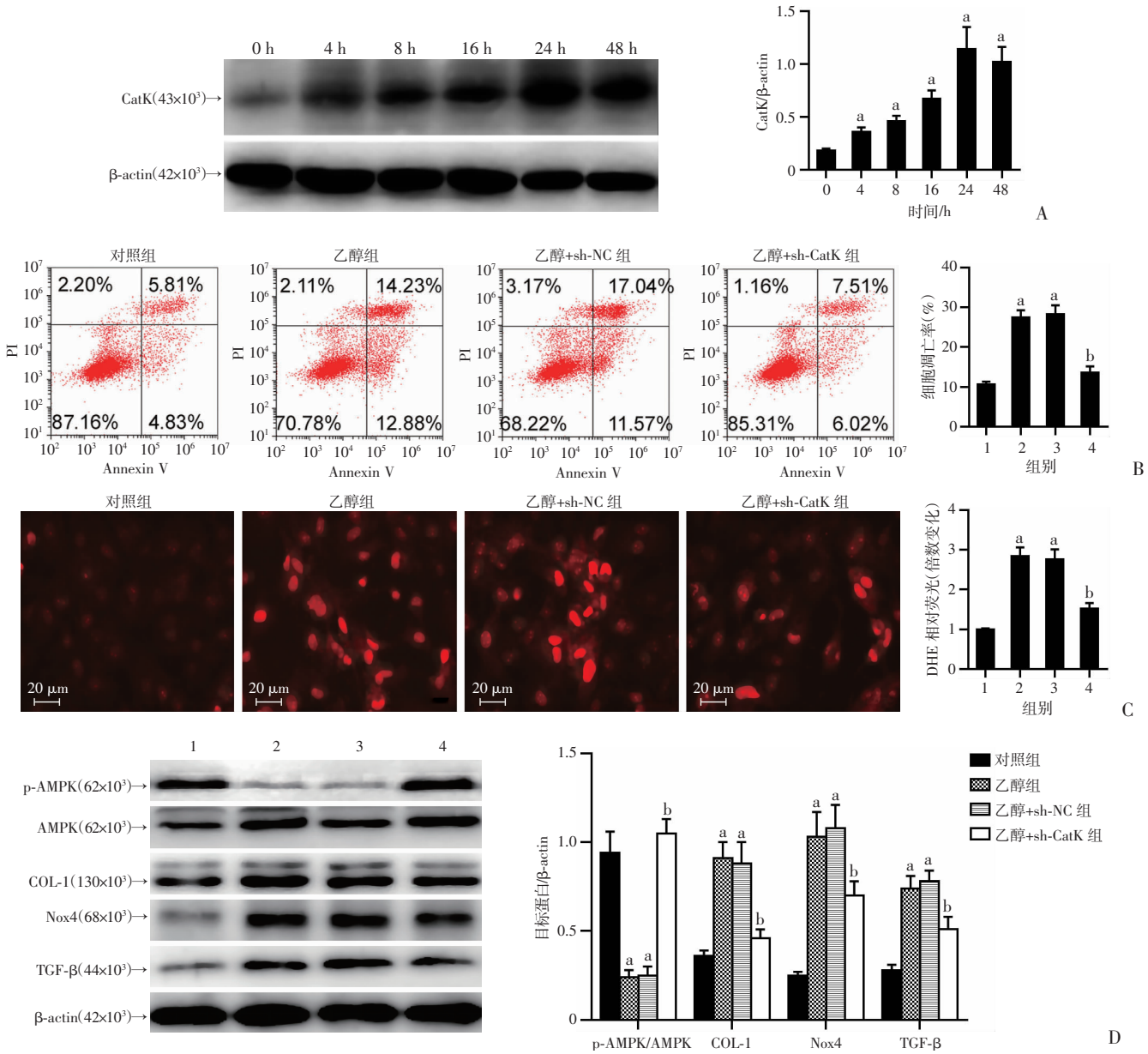
2.3 抑制 CatK 减轻乙醇诱导的心肌细胞凋亡及氧化应激

随着暴露于乙醇中的时间不断延长,H9c2 细胞中 CatK 蛋白表达不断增加,并在 24 h 达到峰值($P<0.05$,图 3A)。在乙醇存在下,H9c2 细胞凋亡率和氧化应激水平明显增加($P<0.05$),而 CatK 抑制处理显著降低了 H9c2 细胞凋亡和氧化应激水平($P<0.05$,图 3B、C)。研究进一步检测 AMPK/Nox4 信号通路是否参与 CatK 对心肌细胞的作用。如图 3D 所示,H9c2 细胞暴露于乙醇后 AMPK 磷酸化表达减弱,Nox4 蛋白、纤维细胞胶原 COL-1 和 TGF-β 表达增强,而 CatK 抑制处理逆转了这些变化($P<0.05$)。

3 讨论

ACM 是一种在长期饮酒人群中常见的心血管并发症,最终导致心力衰竭[9]。ACM 与心脏的结构和功能改变有关,导致舒张和收缩功能障碍以及氧化损伤。因此,亟需确定 ACM 相关心功能不全的靶点。在目前的研究中,体内实验显示,ACM 小鼠中 CatK 的过度表达引起细胞外基质的沉积和心功能的恶化。同样,体外实验结果表明,乙醇刺激了 H9c2 心肌细胞中 CatK 上调,并诱导细胞凋亡、氧化应激水平增加以及促纤维化因子的产生。此外,shRNA 介导的 CatK 沉默可抑制乙醇的这些不良作用。这些数据表明 CatK 可以作为减轻 ACM 相关心脏功能障碍的治疗靶点。

先前研究证实,在人类动脉粥样硬化病变中,CatK 的表达增加[10],与大多数其他胱氨酰组织蛋白酶不同,CatK 具有强大的胶原蛋白溶解和弹性蛋白溶解活性[11]。在主动脉中,弹性蛋白溶解和胶原溶解削弱了动脉壁,有利于血管扩张,增加了血液中的白细胞浸润,最终导致破裂[10]。CatK 敲除减少了动脉弹性蛋白溶解和胶原溶解,如在 $CatK^{-/-}$ 小鼠出现了较小的动脉粥样硬化和动脉瘤病变[12]。此外,有研究证明,CatK 基因敲除可以防止高脂饮食和腹主动脉收缩引



A:蛋白质印迹分析不同乙醇暴露对 H9c2 细胞中 CatK 蛋白表达影响及定量分析;a:$P<0.05$,与 0 h 比较;B:流式细胞分析各组细胞凋亡及定量分析;C:各组细胞的 DHE 荧光染色;D:蛋白质印迹分析各组细胞的 AMPK/Nox4 信号通路表达及定量分析;1:对照组;2:乙醇组;3:乙醇+sh-NC 组;4:乙醇+sh-CatK 组; a:$P<0.05$,与对照组比较; b:$P<0.05$,与乙醇组比较

图 3 CatK 抑制减轻乙醇诱导的心肌细胞凋亡及氧化应激($n=3$)

起的心肌肥大和功能障碍[5],与先前观察结果一致。在本研究中,饮酒导致小鼠心室扩大[13],而 CatK 基因抑制可减轻 ACM 相关的左室质量、LVPWd 增加以及射血分数、缩短分数降低。心肌纤维化是导致心功能不全的主要诱因之一,无论病因如何,心脏纤维化都会增加终末期心力衰竭患者心脏病发病率和病死率的风险[14]。本研究结果表明,饮酒诱导小鼠心肌纤维化面积增加,CatK 抑制降低 ACM 小鼠心肌纤维化面积,并减轻乙醇诱导的 H9c2 心肌细胞胶原和 TGF-β 的生成。这些数据表明,CatK 活性降低可能对 ACM 引起的心脏改变有保护作用。

本研究数据表明,CatK 在心肌损伤中起着一定作用,因为 CatK 抑制的 ACM 小鼠体内心肌氧化应激水平明显下降,氧化应激参与了 ACM 的病理过程。作为氧化应激 NADPH 氧化酶(Nox)的一个常见来源,Nox4 在心脏中大量表达,其介导了心肌成纤维细胞向肌成

纤维细胞的分化[15-16]。酒精摄入引起的乙醛累积可上调 Nox4 及其亚单位的蛋白表达,从而增加心肌细胞线粒体衍生的 ROS[17]。本研究结果表明,CatK 抑制减少了 ACM 小鼠心肌组织中超氧化物的产生和 MDA 水平,同时增加了 SOD 活性,这些作用可能与 Nox4 蛋白表达下调有关。氮氧化物衍生的活性氧参与多种心血管疾病。据报道,Nox4-ROS 途径会加重衰竭心脏的促纤维化反应、重塑过程和心功能恶化[18]。PAN 等[19]发现 Nox4 的敲除减弱了由 AngⅡ刺激的心肌成纤维细胞中 ROS 的产生和心肌纤维化反应。最近的研究发现,AMPK 作为一种抗氧化剂,其通过抑制 Nox4 信号表达减少主动脉内皮细胞中活性氧的产生,在血管平滑肌细胞重构中发挥作用[20]。本研究中,CatK 抑制促进了 H9c2 细胞中 AMPK 磷酸化,进而减弱了 Nox4 蛋白、纤维细胞胶原 COL-1 和 TGF-β 表达。因此,CatK 可能通过 AMPK/Nox4 信号通路参与 ACM 引起的心功能不全。

综上所述,饮酒导致心肌重塑,最终出现心功能不全。CatK 通过促进 AMPK/Nox4 信号通路介导的氧化应激参与 ACM 小鼠心功能不全的病理过程,CatK 可能作为减轻 ACM 相关心脏功能障碍的治疗靶点。

参考文献:

[1] WANG S Y, REN J. Role of autophagy and regulatory mechanisms in alcoholic cardiomyopathy [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2018, 1864(6 Pt A): 2003-2009. DOI:10.1016/j.bbadis.2018.03.016.

[2] WARE J S, AMOR-SALAMANCA A, TAYAL U, *et al*. Genetic etiology for alcohol-induced cardiac toxicity[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(20): 2293-2302. DOI:10.1016/j.jacc.2018.03.462.

[3] TALMAN V, RUSKOAHO H. Cardiac fibrosis in myocardial infarction-from repair and remodeling to regeneration[J]. Cell Tissue Res, 2016, 365(3): 563-581. DOI:10.1007/s00441-016-2431-9.

[4] HEO S C, KIM Y N, CHOI Y, *et al*. Elevated expression of cathepsin K in periodontal ligament fibroblast by inflammatory cytokines accelerates osteoclastogenesis *via* paracrine mechanism in periodontal disease[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(2): 695. DOI:10.3390/ijms22020695.

[5] FANG W Q, HE A N, XIANG M X, *et al*. Cathepsin K-deficiency impairs mouse cardiac function after myocardial infarction[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 127: 44-56. DOI:10.1016/j.yjmcc.2018.11.010.

[6] GUO R, HUA Y N, ROGERS O, *et al*. Cathepsin K knockout protects against cardiac dysfunction in diabetic mice [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8703. DOI:10.1038/s41598-017-09037-z.

[7] 廉虹, 刘立会, 聂宇. 液质饲料喂养制备酒精性心肌病小鼠模型[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(5): 40-46. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.05.007.
LIAN H, LIU L H, NIE Y. Establishment of a mouse model of alcoholic cardiomyopathy with liquid feed[J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(5): 40-46. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.05.007.

[8] GAO W Q, PAN B, LIU L J, *et al*. Alcohol exposure increases the expression of cardiac transcription factors through ERK1/2-mediated histone3 hyperacetylation in H9c2 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 466(4): 670-675. DOI:10.1016/j.bbrc.2015.09.090.

[9] 卢薇, 王宁夫. 酒精性心肌损伤的临床分类及其临床特点分析[J]. 中华医学杂志, 2019, 99(41): 3237-3242. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.41.008.
LU W, WANG N F. Clinical classification and characteristics of alcoholic myocardial injury[J]. Natl Med J China, 2019, 99(41): 3237-3242. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2019.41.008.

[10] LIU C L, GUO J L, ZHANG X, *et al*. Cysteine protease cathepsins in cardiovascular disease: from basic research to clinical trials[J]. Nat Rev Cardiol, 2018, 15(6): 351-370. DOI:10.1038/s41569-018-0002-3.

[11] MCGLINCHEY R P, LACY S M, WALKER R L 3rd, *et al*. Cathepsin K is a potent disaggregase of α-synuclein fibrils [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 529(4): 1106-1111. DOI:10.1016/j.bbrc.2020.06.155.

[12] SUN J S, SUKHOVA G K, ZHANG J, *et al*. Cathepsin K deficiency reduces elastase perfusion-induced abdominal aortic aneurysms in mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012, 32(1): 15-23. DOI:10.1161/ATVBAHA.111.235002.

[13] 路倩, 赵唯安, 刘玲娟, 等. 父代饮酒致子代小鼠心脏发育异常的组蛋白乙酰化修饰机制[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(6): 975-980. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.06.003.
LU Q, ZHAO W A, LIU L J, *et al*. Mechanisms of histone acetylation modification in paternal alcohol consumption-induced heart development abnormalities of offspring[J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(6): 975-980. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.06.003.

[14] 尹玉洁, 张倩, 旷湘楠, 等. 内皮间质转分化在心肌纤维化中的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2019, 35(1): 12-16. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2019.01.004.
YIN Y J, ZHANG Q, KUANG X N, *et al*. Research progress of endothelial mesenchymal transition in myocardial

fibrosis[J]. Chin Pharmacol Bull, 2019, 35(1): 12-16. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2019.01.004.

[15] 员小利, 井海云, 王丹. 丹参酮ⅡA通过抑制NADPH氧化酶保护心衰大鼠心肌纤维化的机制[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(4): 600-604. DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.020.
YUAN X L, JING H Y, WANG D. Tanshinone ⅡA protects myocardial fibrosis in rats with heart failure by inhibiting NADPH oxidase[J]. Acta Univ Med Anhui, 2019, 54(4): 600-604. DOI:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.04.020.

[16] KAMIHARA T, BANDO Y K, MUROHARA T. Cardiac aging is regulated by autophagic disorder mediated by chronic inflammation *via* the Rubicon/Nox4 pathway[J]. Eur Heart J, 2020, 41(Supplement_2): ehaa946.0842. DOI:10.1093/ehjci/ehaa946.0842.

[17] TAO Y L, ZHOU H, HUANG L L, *et al*. Schisandrin B protects against acute ethanol-induced cardiac injury by downregulating autophagy *via* the Nox4/ROS pathway[J]. Pharmacology, 2021, 106(3/4): 177-188. DOI:10.1159/000510863.

[18] SONG H, REN J. Protocatechuic acid attenuates angiotensin II-induced cardiac fibrosis in cardiac fibroblasts through inhibiting the Nox4/ROS/p38 signaling pathway[J]. Phytother Res, 2019, 33(9): 2440-2447. DOI:10.1002/ptr.6435.

[19] PAN L L, LIU X H, SHEN Y Q, *et al*. Inhibition of NADPH oxidase 4-related signaling by sodium hydrosulfide attenuates myocardial fibrotic response[J]. Int J Cardiol, 2013, 168(4): 3770-3778. DOI:10.1016/j.ijcard.2013.06.007.

[20] MROUEH F M, NOURELDEIN M, ZEIDAN Y H, *et al*. Unmasking the interplay between mTOR and Nox4: novel insights into the mechanism connecting diabetes and cancer[J]. FASEB J, 2019, 33(12): 14051-14066. DOI:10.1096/fj.201900396RR.

(**收稿**:2021-12-03;**修回**:2022-02-28)

(编辑 张艺霖)