

# USP22/KDM3A 通路对七氟烷后处理缺血缺氧心肌细胞模型再灌注损伤保护机制的实验研究

雷 汝, 曹 勇, 朱 明 (眉山心脑血管病医院麻醉科, 四川眉山 620010)

**摘要:** 目的 探讨泛素特异性蛋白酶 22 (USP22) / 赖氨酸特异性去甲基化酶 3A (KDM3A) 通路在七氟烷后处理 (SPC) 改善缺血缺氧心肌细胞再灌注损伤中的作用。方法 将 H9c2 大鼠心肌细胞分为对照组、缺氧/复氧 (H/R) 组、H/R+七氟烷 (Sevo) 组、H/R+Sevo+si-NC 组、H/R+Sevo+si-USP22 组和 H/R+Sevo+si-KDM3A 组。采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 USP22 和 KDM3A 的 mRNA 和蛋白表达; 细胞计数试剂盒检测细胞活性; 流式细胞术检测细胞凋亡率; ELISA 检测肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I (cTn I) 含量和乳酸脱氢酶 (LDH) 水平; 免疫共沉淀实验检测 USP22 和 KDM3A 蛋白互作以及 KDM3A 泛素化。结果 与对照组相比, H/R 组细胞 USP22 mRNA 和蛋白表达降低 ( $t=49.574, 14.852$ ), 细胞活性降低 ( $t=46.597$ ), 细胞凋亡率, CK-MB, cTn I 和 LDH 水平升高 ( $t=17.722, 21.346, 22.863, 9.722$ ), KDM3A 蛋白表达降低 ( $t=15.879$ ), 泛素化水平升高, 差异具有统计学意义 (均  $P<0.01$ ); 与 H/R 组比较, H/R+Sevo 组 H9c2 细胞 USP22 的 mRNA 和蛋白表达升高 ( $t=24.648, 17.644$ ), 细胞活性升高 ( $t=44.703$ ), 凋亡率, CK-MB, cTn I 和 LDH 水平降低 ( $t=13.736, 18.018, 17.012, 13.856$ ), KDM3A 蛋白表达升高 ( $t=12.970$ ), 泛素化水平降低, 差异具有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。与 H/R+Sevo+si-NC 组相比, H/R+Sevo+si-USP22 组细胞活力降低 ( $t=20.785$ ), 凋亡率、CK-MB, cTn I 和 LDH 水平升高 ( $t=6.821, 6.862, 6.442, 3.781$ ), KDM3A 蛋白表达降低 ( $t=4.648$ ), 泛素化水平升高, 差异具有统计学意义 (均  $P<0.05$ ); USP22 在 KDM3A 的启动子中富集, 二者之间存在直接调控关系。与 H/R+Sevo+si-NC 组相比, H/R+Sevo+si-KDM3A 组细胞活性降低 ( $t=16.501$ ), 细胞凋亡率以及 CK-MB, cTn I 和 LDH 水平升高 ( $t=8.954, 10.533, 6.801, 8.004$ ), 差异具有统计学意义 (均  $P<0.01$ )。结论 SPC 可减轻 H/R 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤, 其机制可能与上调 USP22 稳定 KDM3A 蛋白水平有关。

**关键词:** 七氟烷后处理; 泛素特异性蛋白酶 22; 赖氨酸特异性去甲基化酶 3A; 心肌缺血再灌注损伤

**中图分类号:** R-332 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2025) 03-031-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2025.03.006

## Experimental Study on the Protective Mechanism of USP22/KDM3A Pathway Against Ischemia-reperfusion Injury in Sevoflurane Postconditioning Ischemic Hypoxic Cardiomyocyte Model

LEI Ru, CAO Yong, ZHU Ming (*Department of Anesthesiology, Meishan Cardiovascular and Cerebrovascular Disease Hospital, Sichuan Meishan 620010, China*)

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of the ubiquitin specific protease 22 (USP22)/lysine specific demethylase 3A (KDM3A) pathway in improving ischemia-reperfusion injury of hypoxic cardiomyocytes in sevoflurane postconditioning (SPC). **Methods** H9c2 rat cardiomyocytes were divided into control group, hypoxia/reoxygenation (H/R) group, H/R+sevoflurane (Sevo) group, H/R+Sevo+si-NC group, H/R+Sevo+si-USP22 group and H/R+Sevo+si-KDM3A group. Real time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the mRNA and protein expression of USP22 and KDM3A, cell activity was detected by cell counting kit-8, apoptosis rate was detected by flow cytometry, and ELISA was used to detect the levels of creatine kinase MB (CK-MB) and cardiac troponin I (cTn I), while the assay kit was used to detect the levels of lactate dehydrogenase (LDH). Immunoprecipitation assay was used to detect the interaction between USP22 and KDM3A proteins, as well as KDM3A ubiquitination. **Results** Compared with the control group, the mRNA and protein expression of USP22 in H/R group cells decreased ( $t=49.574, 14.852$ ), cell activity decreased ( $t=46.597$ ), cell apoptosis rate, CK-MB, cTn I and LDH levels increased ( $t=17.722, 21.346, 22.863, 9.722$ ), KDM3A protein expression decreased ( $t=15.879$ ), and ubiquitination level increased, the differences were statistically significant (all  $P<0.01$ ). Compared with the H/R group, the mRNA and protein expression of USP22 in H9c2 cells in the H/R+Sevo group increased ( $t=24.648, 17.644$ ), cell activity increased ( $t=44.703$ ), apoptosis rate, CK-MB, cTn I and LDH levels decreased ( $t=13.736, 18.018, 17.012, 13.856$ ), KDM3A

**基金项目:** 四川省卫生健康科研课题普及项目 (19PJ214)。

**作者简介:** 雷汝 (1983-), 男, 本科, 主治医师, 研究方向: 麻醉学, E-mail: leiru1983@163.com。

protein expression increased ( $t=12.970$ ), ubiquitination level decreased, and the differences were statistically significant (all  $P<0.01$ ). Compared with the H/R+Sevo+si-NC group, the cell viability of the H/R+Sevo+si-USP22 group was decreased ( $t=20.785$ ), the apoptosis rate, CK-MB, cTn I and LDH levels were increased ( $t=6.821, 6.862, 6.442, 3.781$ ), the KDM3A protein expression was decreased ( $t=4.648$ ), and the ubiquitination level was increased, and the differences were statistically significant (all  $P<0.05$ ). USP22 was enriched in the promoter of KDM3A, and there was a direct regulatory relationship between USP22 and KDM3A. Compared with the H/R+Sevo+si-NC group, the cell viability was decreased ( $t=16.501$ ), the apoptosis rate and the levels of CK-MB, cTn I and LDH were increased in the H/R+Sevo+si-KDM3A group ( $t=8.954, 10.533, 6.801, 8.004$ ), and the differences were statistically significant (all  $P<0.01$ ). **Conclusion** SPC attenuates H/R-induced H9c2 cardiomyocyte injury, and the mechanism may be related to the up-regulation of USP22 stabilizing KDM3A protein levels.

**Keywords:** sevoflurane postconditioning; ubiquitin specific protease 22; lysine specific demethylase 3A; myocardial ischemia-reperfusion injury

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI) 可导致比心肌缺血更严重的功能障碍<sup>[1]</sup>, 制定有效治疗策略以改善 MIRI 已成为亟待解决的问题。七氟烷因其起效快、诱导平稳等优点, 在临床心血管手术中广泛应用<sup>[2]</sup>。既往研究证实, 七氟烷后处理 (sevoflurane postconditioning, SPC) 具有显著心肌保护作用<sup>[3]</sup>, 但其具体机制尚不清楚。目前, 认为泛素-蛋白酶体系统失调在 MIRI 中具有重要作用, 与患者心功能障碍、梗死面积扩大甚至总体存活率降低有关<sup>[1]</sup>。泛素特异性蛋白酶 22 (ubiquitin-specific protease 22, USP22) 是去泛素化酶家族成员之一, 可通过催化组蛋白去泛素化调控细胞周期进程, 在 MIRI 后表达降低<sup>[4]</sup>。赖氨酸去甲基酶 3A (lysine-specific demethylase 3A, KDM3A) 作为 USP22 下游的一种组蛋白去甲基化酶, 与 MIRI 过程中细胞自我更新、炎症和基因表达密切相关, 其缺失促进心肌损伤<sup>[5]</sup>。故此, 本研究旨在探讨 SPC 是否通过调控 USP22/KDM3A 通路来发挥其对 MIRI 的保护作用。

## 1 材料与方法

1.1 细胞来源 从中国典型培养物保藏中心购买 1 株大鼠心肌细胞 H9c2 作为研究对象。

1.2 仪器与试剂 2g/dl 七氟烷 (sevofluran, Sevo, 上海恒瑞医药有限公司); 细胞计数 (CCK-8) 试剂盒 (北京索莱宝生物科技有限公司); 乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 肌酸激酶 -MB (CK-MB) 和心肌肌钙蛋白 I (cTnI) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (美国 Immuno-way 公司); 抗 USP22, KDM3A 和泛素蛋白 (ubiquitin protein, Ub) 抗体 (美国 Abcam 公司); 膜联蛋白 v-异硫氰酸荧光素 (annexin v-fluorescein isothiocyanate, Annexin vFITC) 染色试剂盒 (美国赛默飞公司); 阴性对照小干扰 RNA (negative control small interfering RNA, si-NC), si-USP22 和 si-KDM3A 以及 USP22, KDM3A 和磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 引物均由生工生物工程 (上海)

股份有限公司设计并合成。Spectra-Maxi3x 型多功能酶标仪 (美国 MD 公司); Chemi Doc XRS 化学发光凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); NIB 910 光学显微镜 (深圳博士达器械设备有限公司)。

### 1.3 方法

1.3.1 细胞培养: H9c2 细胞用含有 10g/dl 胎牛血清 (FBS) 和 1g/dl 青链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养液培养, 置于 5% (v/v) CO<sub>2</sub>, 37℃ 完全饱和湿度细胞培养箱中并传代, 待细胞长至对数生长期后, 进行后续实验。

1.3.2 细胞模型构建及分组处理: 将 H9c2 细胞以  $1 \times 10^5$  个/孔的密度铺入 6 孔板中, 分为对照组、缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 组、H/R+Sevo 组、H/R+Sevo+si-NC 组、H/R+Sevo+si-USP22 组和 H/R+Sevo+si-KDM3A 组。除对照组外, 其余组均根据文献 [3] 方法建立 H/R (缺氧 3h, 复氧 6h) 细胞模型。在复氧开始时, 将接受 SPC 的细胞置于 37℃ 密闭容器中, 2g/dl Sevo 处理 15min。利用 Lipofectamine 2000 试剂将 H/R+Sevo+si-NC 组, H/R+Sevo+si-USP22 组和 H/R+Sevo+si-KDM3A 组细胞分别在 H/R 前 6h 转染 si-NC, si-USP22 或 si-KDM3A。

1.3.3 qRT-PCR 分析: 使用 Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 利用反转录试剂盒逆转录为 cDNA。以此为模板配置 PCR 反应体系, 进行 RT-PCR 扩增, 条件为 95℃ 10min, 95℃ 30s, 60℃ 30s, 72℃ 20s, 40 个循环。以 GAPDH 作为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相对表达量。引物序列如下, USP22: F: 5'-ATG-GTGGCCAGGCCCGAG-3', R: 5'-CTACTCATAT-TCCAGGAA-3'; KAM3A: F: 5'-GTGGAAACCAT-GGTGCTC-3', R: 5'-AGAGAGGAGTTAAGATTT-3'; GAPDH: F: 5'-ATAGACAAGATGGTGAAG-3', R: 5'-CAGGGTTTCTTACTCCTT-3'。

1.3.4 Western blot 分析: 用放射免疫沉淀法裂解缓冲液提取各组细胞总蛋白并检测浓度。取适量蛋白进行 12g/dl 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶

(SDS-PAGE)电泳分离,湿转到聚偏二氟乙烯膜上,室温下用5ml/dl脱脂牛奶封闭1h,用USP22, KDM3A和GAPDH(稀释比为1:500)一抗4℃孵育过夜。次日,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(1:10000)室温孵育1h。以GAPDH作为内参,通过化学发光试剂盒对条带进行可视化,并通过化学发光成像系统进行拍照,Image Lab软件量化条带灰度值。

1.3.5 CCK-8检测细胞活性:将各组细胞以 $2.5 \times 10^4$ 个/孔的密度均匀接种于96孔板,分别在相应转染72h后,按照CCK-8试剂盒说明书各孔加入 $10 \mu\text{l}$  CCK-8溶液,培养2h。采用酶标仪测定450nm波长下的吸光度(A)值。

1.3.6 流式细胞术检测细胞凋亡:重悬各组细胞( $1 \times 10^5$ 个/ml),在 $100 \mu\text{l}$ 细胞悬液中加入 $5 \mu\text{l}$  Annexin V-FITC和 $5 \mu\text{l}$ 碘化丙啶,室温避光孵育15min,通过流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.7 ELISA检测CK-MB, cTn I和LDH水平:采用相应ELISA检测试剂盒,按照说明书操作步骤方法,检测各组细胞CK-MB, cTn I和LDH含量。

1.3.8 免疫共沉淀实验检测USP22和KDM3A蛋白互作:细胞裂解后,取1/10的细胞裂解缓冲液作为Input,剩余部分与抗KDM3A(1:30)和蛋白A/G-Sepharose抗体在4℃孵育过夜。沉淀蛋白用裂解

液洗涤5次后,与抗USP22(1:2000)抗体孵育,进行Western blot。

1.3.9 泛素化水平检测:将转染细胞用含0.1g/dl十二烷基硫酸钠的蛋白裂解缓冲液稀释至终浓度为0.2g/dl,然后进行与免疫沉淀检测相同的操作,进行泛素化检测。使用抗Ub抗体(1:1000)进行Western blot分析。

1.4 统计学分析 采用SPSS 22.0统计学软件进行统计分析,所有计量资料均以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本t检验,多组间比较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 SPC对H/R损伤后H9c2细胞中USP22 mRNA和蛋白、KDM3A mRNA和蛋白、细胞活力、细胞凋亡及心肌损伤标志物的影响 见表1。与对照组相比,H/R组细胞USP22的mRNA和蛋白、KDM3A蛋白、细胞活力A值降低,细胞凋亡率、CK-MB, cTn I, LDH水平升高。差异具有统计学意义(均 $P < 0.001$ );与H/R组比较,H/R+Sevo组细胞USP22 mRNA和蛋白表达、细胞活力A值升高,细胞凋亡率、CK-MB, cTn I, LDH水平均降低,差异具有统计学意义(均 $P < 0.001$ )。而三组细胞间KDM3A mRNA水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表1 SPC对H/R损伤后H9c2细胞中USP22 mRNA和蛋白、KDM3A mRNA和蛋白、细胞活力、细胞凋亡及心肌损伤标志物水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组	H/R组	H/R+Sevo组	对照组 vs H/R组		H/R组 vs H/R+Sevo组	
				t	P	t	P
USP22 mRNA	1.03 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.01	0.84 $\pm$ 0.03	49.574	< 0.001	24.648	< 0.001
USP22 蛋白	0.78 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.03	0.69 $\pm$ 0.02	14.852	< 0.001	17.644	< 0.001
KDM3A mRNA	0.92 $\pm$ 0.04	0.93 $\pm$ 0.04	0.97 $\pm$ 0.05	0.306	> 0.05	1.082	> 0.05
KDM3A 蛋白	0.73 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.02	0.59 $\pm$ 0.03	15.879	< 0.001	12.970	< 0.001
细胞活力(A值)	1.38 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.02	1.14 $\pm$ 0.02	46.597	< 0.001	44.703	< 0.001
细胞凋亡(%)	8.63 $\pm$ 0.87	26.02 $\pm$ 1.46	11.85 $\pm$ 1.03	17.722	< 0.001	13.736	< 0.001
CK-MB(U/L)	24.77 $\pm$ 2.31	107.93 $\pm$ 6.34	36.92 $\pm$ 2.53	21.346	< 0.001	18.018	< 0.001
cTn I(mg/ml)	0.87 $\pm$ 0.04	12.63 $\pm$ 0.89	3.67 $\pm$ 0.68	22.863	< 0.001	17.012	< 0.001
LDH(U/L)	0.28 $\pm$ 0.03	0.92 $\pm$ 0.11	0.41 $\pm$ 0.03	9.722	< 0.001	13.856	< 0.001

2.2 干扰USP22对SPC后细胞活力、凋亡、心肌损伤和KDM3A表达的影响 见表2。细胞实验结果显示,与H/R+Sevo+si-NC组相比,H/R+Sevo+si-USP22组细胞活力A值、KDM3A蛋白表达降低,细胞凋亡率、CK-MB, cTn I和LDH水平升高,差异具有统计学意义(均 $P < 0.01$ )。但两组间KDM3A mRNA水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2.3 USP22靶向调控KDM3A 见图1。免疫共沉

淀实验发现,USP22在KDM3A的启动子中富集,二者之间存在直接调控关系。

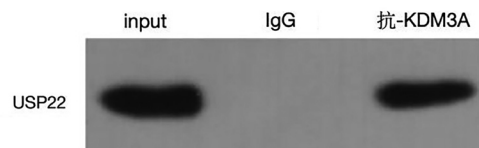


图1 免疫沉淀实验检测USP22对KDM3A的靶向调控作用

表2 干扰 USP22 对 SPC 后细胞活力、凋亡、心肌损伤和 KDM3A 表达的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

项目	H/R+Sevo+si-NC 组	H/R+Sevo+si-USP22 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
细胞活力 <i>A</i> 值	1.12 ± 0.04	0.52 ± 0.03	20.785	<0.001
细胞凋亡率 (%)	10.01 ± 1.05	15.33 ± 0.85	6.821	<0.001
CK-MB(U/L)	37.64 ± 3.32	62.82 ± 5.42	6.862	<0.001
cTn I(ng/ml)	3.13 ± 0.42	6.79 ± 0.89	6.442	<0.001
LDH(U/L)	0.38 ± 0.02	0.56 ± 0.08	3.781	0.019
KDM3A 蛋白	0.53 ± 0.04	0.41 ± 0.02	4.648	0.010
KDM3A mRNA	0.96 ± 0.03	0.94 ± 0.02	0.961	0.391

2.4 USP22 对 SPC 后 KDM3A 泛素化的调控作用 见图 2。与对照组相比, H/R 组细胞 KDM3A 泛素化水平升高; 与 H/R 组比较, H/R+Sevo 组和 H/R+Sevo+si-NC 组 H9c2 细胞 KDM3A 泛素化水平降低; 与 H/R+Sevo+si-NC 组相比, H/R+Sevo+si-USP22 组 KDM3A 泛素化水平升高。

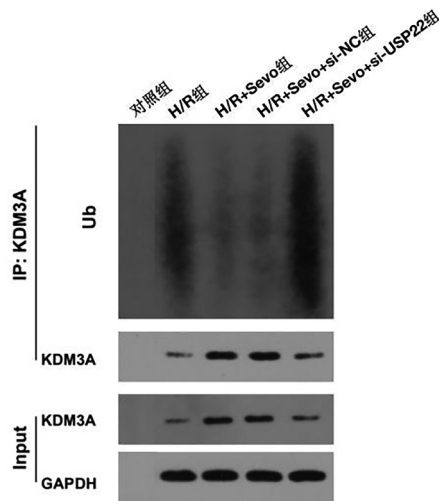


图2 各组 H9c2 细胞 KDM3A 泛素化检测

2.5 敲除 KDM3A 对 H9c2 细胞增殖、凋亡和心肌损伤标志物水平的影响 见表 3。与 H/R+Sevo+si-NC 组相比, H/R+Sevo+si-KDM3A 组 H9c2 细胞增殖活力 *A* 值降低, 细胞凋亡率及 CK-MB, cTn I 和 LDH 水平升高, 差异具有统计学意义 (均  $P < 0.001$ )。

表3 敲除 KDM3A 对 H9c2 细胞增殖、凋亡和心肌损伤标志物水平的影响 ( $n=3, \bar{x} \pm s$ )

项目	H/R+Sevo+si-NC 组	H/R+Sevo+si-KDM3A 组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
细胞活力 <i>A</i> 值	1.26 ± 0.04	0.65 ± 0.05	16.501	<0.001
细胞凋亡率 (%)	11.19 ± 1.05	18.83 ± 1.04	8.954	<0.001
CK-MB(U/L)	37.93 ± 2.63	74.62 ± 5.43	10.533	<0.001
cTn I(ng/ml)	2.87 ± 0.74	7.85 ± 1.03	6.801	<0.001
LDH(U/L)	0.37 ± 0.03	0.68 ± 0.06	8.004	<0.001

### 3 讨论

心肌梗死是由于心脏供血不足而引起的严重临

床综合征, 可导致血氧供失衡和心功能紊乱。目前临床主要通过经皮冠状动脉介入术进行再灌注治疗, 但 MIRI 可诱发严重的心血管并发症和不良临床后果<sup>[6]</sup>。急需探索有效的干预措施减轻 MIRI 损伤。近期有研究发现, 利用临床常用的吸入麻醉剂对 MIRI 小鼠进行干预, 可减轻心功能和心肌细胞损伤, 甚至限制梗死面积<sup>[7]</sup>。但其机制目前尚不清楚。

Sevo 是临床手术最常用的吸入性麻醉剂, 其药理学特性强调了在冠状动脉疾病治疗方面的潜在临床应用潜力<sup>[8]</sup>。已有多项研究探讨了 SPC 在 MIRI 损伤中的可能保护作用, DENG 等<sup>[9]</sup>发现, SPC 可通过激活腺苷酸活化蛋白激酶/自噬激活激酶 1 通路触发自噬流, 抑制细胞焦亡, 从而减轻 H/R 对心肌细胞的损伤。王晓蕾等<sup>[10]</sup>研究发现, SPC 可改善 MIRI 大鼠心肌的血流供应, 降低 cTn I, LDH 和 CK-MB 水平, 对 MIRI 心肌有一定的保护作用。白雪等<sup>[11]</sup>研究显示, SPC 可以通过激活低氧诱导因子  $\alpha$ -2/ 双调蛋白通路实现对 MIRI 模型大鼠心肌的保护作用。与这些研究结果类似, 本研究体外结果同样发现, SPC 处理后, H9c2 细胞 H/R 模型表现出细胞活力增强, 凋亡率降低, CK-MB 和 cTn I 水平降低以及 LDH 释放减少。所有上述发现和证据一致提示, SPC 对 MIRI 具有保护作用。

USP22 作为去泛素化系统的重要成员, 通过去泛素化调节多种蛋白的降解, 参与蛋白稳定性调节, 在多种生理病理过程中发挥重要作用, 特别是肿瘤的发生发展<sup>[12]</sup>。尽管有大量研究报道了 USP22 在癌症中的作用, 但对其在心脏中的作用却知之甚少。近期的研究发现, USP22 在压力超负荷诱导的心衰大鼠模型中表达下调, 过表达心脏 USP22 可改善模型大鼠的心室功能和心脏重塑<sup>[13]</sup>。XU 等<sup>[14]</sup>发现, USP22 通过上调细胞周期蛋白 D1 和  $\beta$ -连环蛋白 ( $\beta$ -catenin) 表达, 在体外抑制血管紧张素 II 诱导的心脏成纤维细胞活化。GAO 等<sup>[15]</sup>研究显示, N-myc 原癌基因蛋白激活 USP22 转录, 介导连接桥粒斑珠蛋白的泛素化和蛋白稳定, 从而使蛋白激酶 B/ $\beta$ -catenin 轴失活, 减轻心脏肥厚性心力衰竭。本研究同样发现, USP22 在 H/R 后的心肌细胞中表达降低, 而在 SPC 治疗后上调。先前的证据表明, Sevo 和泛素特异性蛋白酶之间的相互作用可影响认知功能<sup>[16]</sup>, 但上述相互作用对 MIRI 严重程度的调节作用仍是未知数。为了阐明 SPC 是否通过上调 USP22 的表达来缓解 MIRI, 本研究在经 SPC 干预的 H/R 处理的 H9c2 细胞中沉默 USP22, 发现 H9c2 细胞活力受到抑制, 凋亡率增加, CK-MB, cTn I 和血清 LDH 水平升高。这些研究和结果提示了心肌损伤后 USP22 表达降低不利于 MIRI 后心脏

功能和结构恢复。泛素-蛋白酶体被认为是 MIRI 的主要参与者,而泛素-蛋白酶体水平不足与心肌功能障碍、梗死面积扩大甚至心脏病患者总体存活率降低有关<sup>[17]</sup>。此外, USP22 曾被证明可在多种细胞通路中调节细胞凋亡,从而影响基因表达和蛋白质转导<sup>[18]</sup>。更重要的是, MA 等<sup>[6]</sup>指出 USP22 有助于限制心肌梗死面积,减轻病理损伤,抑制 CK-MB 和 LDH 的释放,改善心功能<sup>[4]</sup>,这与本研究的研究结果一致。这些发现和数据提示, USP22 敲除可以逆转 SPC 对心肌细胞 H/R 损伤的保护作用。

KDM3A 是一种组蛋白去甲基化酶,研究发现其能够消除泛素化以稳定蛋白质水平,而其自身的泛素化会刺激 KDM3A 的降解并淬灭 KDM3A 的活性<sup>[19]</sup>。作为一种组蛋白去甲基化酶, KDM3A 可主动参与心血管肥厚和纤维化的关键过程。此外, KDM3A 基因敲除曾被证明会破坏细胞分化,同时对细胞凋亡产生促进作用<sup>[20]</sup>。此外,之前的研究已经证实, KDM3A 过度消耗会增强炎症反应,破坏心肌结构,延缓心肌梗死后心脏修复<sup>[21]</sup>。因此,本团队推测 USP22 和 KDM3A 之间可能存在一定的相互影响。免疫共沉淀和泛素化试验验证了我们的假设, USP22 在 KDM3A 的启动子中富集,二者之间存在直接调控关系。为了探究 KDM3A 是否与 MIRI 中 SPC 的保护机制有关,本研究在 H/R 处理的 H9c2 细胞中敲除 KDM3A,结果发现沉默 KDM3A 表达后 H9c2 细胞的活力被抑制,凋亡率增加, CK-MB 和 cTn I 水平升高, LDH 释放得到改善。总之,这些证据表明, USP22 诱导的 KDM3A 泛素化可逆转 SPC 对 H/R 处理的 H9c2 细胞的保护作用。

综上所述, SPC 可能通过上调 USP22 稳定 KDM3A 蛋白水平对心肌细胞 H/R 损伤产生保护作用。然而本研究尚存在一定不足,例如未进行在体动物实验,而且对 KDM3A 的下游靶蛋白有待于进一步探索。

#### 参考文献:

- [1] LIU Yang, LI Lei, WANG Zhen, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury; molecular mechanisms and prevention [J]. *Microvascular Research*, 2023, 149: 104565.
- [2] 蔡文灿,刘熙君,刘彦明,等.血清 PLGF 和 sFLT-1 水平联合检测对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者 PCI 术后 MACE 复发的诊断价值研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2021,36(2):66-69.
- [3] ZHANG Jing, YU Peng, HUA Fuzhou, et al. Sevoflurane postconditioning reduces myocardial ischemia reperfusion injury-induced necroptosis by up-regulation of OGT-mediated O-GlcNAcylated RIPK3 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(24): 25452-25468.
- [4] GUERRERO-ORRIACH J L, CARMONA-LUQUE M D, RAIGÓN-PONFERRADA A. Beneficial effects of halogenated anesthetics in cardiomyocytes: the role of mitochondria [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(10): 1819.
- [5] GUO Xin, ZHANG Bofang, ZHANG Jing, et al. The histone demethylase KDM3A protects the myocardium from ischemia/reperfusion injury via promotion of ETS1 expression [J]. *Communications Biology*, 2022, 5(1): 270.
- [6] MA Shuxian, SUN Linyan, WU Wenhao, et al. USP22 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via the SIRT1-p53/SLC7A11-dependent inhibition of ferroptosis-induced cardiomyocyte death [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 551318.
- [7] 万子琳,王小燕.七氟烷预处理及后处理对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制的研究进展 [J]. *云南医药*, 2021,42(6):581-584.
- [8] WANG Zilin, WANG Xiaoyan. Research progress of protective effect and its mechanism of sevoflurane pretreatment and posttreatment for myocardial ischemiareperfusion injury[J]. *Medicine and Pharmacy of Yunnan*, 2021, 42(6): 581-584.
- [9] 彭海.新型吸入麻醉剂七氟烷的研究进展 [J]. *临床医学*, 2022,42(9):123-125.
- [10] PENG Hai. Research progress of sevoflurane, a new inhalation anesthetic[J]. *Clinical Medicine*, 2022, 42(9): 123-125.
- [11] DENG Lin, JIANG Lihua, WEI Na, et al. Anesthetic sevoflurane simultaneously regulates autophagic flux and pyroptotic cell death-associated cellular inflammation in the hypoxic/re-oxygenated cardiomyocytes: identification of sevoflurane as putative drug for the treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, 936: 175363.
- [12] 白雪,宋思宜,郭海燕,等.七氟烷对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠心肌的保护作用及其机制 [J]. *精准医学杂志*, 2021,36(3):203-206, 211.
- [13] BAI Xue, SONG Siyi, GUO Haiyan, et al. Protective effect of sevoflurane on myocardium in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury and its mechanism[J]. *Journal of Precision Medicine*, 2021, 36(3): 203-206, 211.
- [14] KITAMURA H, HASHIMOTO M. USP2-related cellular signaling and consequent pathophysiological outcomes[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(3): 1209.
- [15] XING Junhui, LI Pengcheng, HONG Jin, et al. Overexpression of ubiquitin-specific protease 2 (USP2) in the heart suppressed pressure overload-induced cardiac remodeling [J]. *Mediators Inflammation*, 2020, 2020: 4121750.
- [16] XU Qiong, LIU Mingke, ZHANG Fangcheng, et al. Ubiquitin-specific protease 2 regulates Ang II-induced cardiac fibroblasts activation by up-regulating cyclin D1 and stabilizing  $\beta$ -catenin in vitro[J]. *Journal of cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(2): 1001-1011.
- [17] GAO Wennian, GUO Na, YAN Hongjiang, et al. Mycn ameliorates cardiac hypertrophy-induced heart failure in

- mice by mediating the USP2/JUP/Akt/ $\beta$ -catenin cascade [J]. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2024, 24(1): 82.
- [16] SONG Shan, WANG Yang, WANG Haiyan, et al. Role of sevoflurane in myocardial ischemia-reperfusion injury via the ubiquitin-specific protease 22/lysine-specific demethylase 3A axis[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5): 13366-13383.
- [17] ZHAN Xiaona, YANG Yi, LI Qing, et al. The role of deubiquitinases in cardiac disease[J]. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 2024, 25(26): e3.
- [18] ROEDIG J, KOWALD L, JURETSCHKE T, et al. USP22 controls necroptosis by regulating receptor-interacting protein kinase 3 ubiquitination[J]. *EMBO Reports*, 2021, 22(2): e50163.
- [19] CHANG Liang, WANG Qi, JU Jiannan, et al. Magnoflorine ameliorates inflammation and fibrosis in rats with diabetic nephropathy by mediating the stability of lysine-specific demethylase 3A [J]. *Frontiers in Physiology*, 2020, 11: 580406.
- [20] 张天瑞, 高文怡, 姚娟. KDM3A 沉默对人乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 凋亡和侵袭能力的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2021, 41(1): 33-37.
- ZHANG Tianrui, GAO Wenyi, YAO Juan. Effects of KDM3A silencing on the apoptosis and invasion of human breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2021, 41(1): 33-37.
- [21] ZHANG Bofang, LIU Gen, HUANG Bing, et al. KDM3A attenuates myocardial ischemic and reperfusion injury by ameliorating cardiac microvascular endothelial cell pyroptosis[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 4622520.
- 收稿日期: 2024-04-27  
修回日期: 2024-07-15

(上接第 23 页)

综上所述, 在 CCI-ION 诱导的小鼠 TN 模型中, Gm14461 通过招募 CSTF2 上调 CGRP, P2X3 受体和 P2X7 受体表达, 促进炎症反应, 从而降低 TN 小鼠的 MWT 值, 促进疼痛传递。

参考文献:

- [1] ASHINA S, ROBERTSON C E, SRIKIATKHACHORN A, et al. Trigeminal neuralgia[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2024, 10(1): 39.
- [2] PERGOLIZZI J V J, LEQUANG J A, EL-TALLAWY S N, et al. An update on pharmacotherapy for trigeminal neuralgia[J]. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 2024, 24(8): 773-786.
- [3] LI Da, YUAN Chang, ZHAO Bingxiao, et al. lncRNA Kcnq1ot1 relieves neuropathic pain through downregulation of Myd88[J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 119: 110218.
- [4] LIU Yajing, LIU Fei, LI Yike, et al. lncRNA Anxa10-203 enhances Mc1r mRNA stability to promote neuropathic pain by recruiting DHX30 in the trigeminal ganglion [J]. *the Journal of Headache and Pain*, 2024, 25(1): 28.
- [5] 许牧. lncRNA Gm14461 在三叉神经痛中的作用及其机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- XU Mu. The role and mechanism of lncRNA Gm14461 in trigeminal neuralgia [D]. Nanchang: Nanchang University, 2021.
- [6] CAI Jun, YAN Yi, ZHANG Daying, et al. Silencing of lncRNA Gm14461 alleviates pain in trigeminal neuralgia through inhibiting astrocyte activation[J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(12): 2663-2671.
- [7] LI Lu, LI Tian, QU Xinyu, et al. Stress/cell death pathways, neuroinflammation, and neuropathic pain[J]. *Immunological Reviews*, 2024, 321(1): 33-51.
- [8] MOISSET X. Are CGRP and PACAP involved in the pathophysiology of peripheral neuropathic pain[J]. *Revue Neurologique (Paris)*, 2023, 179(3): 123-124.
- [9] XU Mu, YAN Yi, ZHU Mengye, et al. Effects of long non-coding RNA Gm14461 on pain transmission in trigeminal neuralgia[J]. *Journal of Inflammation (London)*, 2020, 17: 1.
- [10] 张如月, 武彩花, 李嫚, 等. 长链非编码 RNA 调控神经病理性疼痛的研究进展 [J]. *中国疼痛医学杂志*, 2021, 27(7): 490-496.
- ZHANG Ruyue, WU Caihua, LI Man, et al. Research progress of long non-coding RNA regulating neuropathic pain[J]. *Chinese Journal of Pain Medicine*, 2021, 27(7): 490-496.
- [11] WU Shaogen, MARIE LUTZ B, MIAO Xuerong, et al. Dorsal root ganglion transcriptome analysis following peripheral nerve injury in mice [J]. *Molecular Pain*, 2016, 12: 1744806916629048.
- [12] WANG Tianyi, LIU Liu, SONG Dongzhe, et al. Emerging roles of lncRNAs in the pathogenesis, diagnosis, and treatment of trigeminal neuralgia[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2022, 50(2): 1013-1023.
- [13] MA Xiaohan, ZHU Taomin, KE Jin. Progress in animal models of trigeminal neuralgia[J]. *Archives of Oral Biology*, 2023, 154: 105765.
- [14] ISLAM J, KC E, KIM S, et al. Optogenetic inhibition of glutamatergic neurons in the dysgranular posterior insular cortex modulates trigeminal neuropathic pain in CCI-ION rat[J]. *Neuromolecular Medicine*, 2023, 25(4): 516-532.
- [15] GUO Rong, FANG Yuxin, ZHANG Yuyao, et al. SHED-derived exosomes attenuate trigeminal neuralgia after CCI of the infraorbital nerve in mice via the miR-24-3p/IL-1R1/p-p38 MAPK pathway[J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2023, 21(1): 458.
- [16] KUMARI S, DHAPOLA R, SHARMA P, et al. The impact of cytokines in neuroinflammation-mediated stroke [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2024, 78: 105-119.
- [17] DEMARTINI C, GRECO R, ZANABONI A M, et al. URB937 prevents the development of mechanical allodynia in male rats with trigeminal neuralgia[J]. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 2023, 16(11): 1626.
- [18] DONG B, XU R, LIM M. The pathophysiology of trigeminal neuralgia: a molecular review[J]. *Journal of Neurosurgery*, 2023, 139(5): 1471-1479.
- [19] GINIATULLIN R, NISTRI A. Role of ATP in migraine mechanisms: focus on P2X3 receptors[J]. *the Journal of Headache and Pain*, 2023, 24(1): 1.
- [20] 贾清越, 陶怡, 闵晓曼, 等. 中医药调控 P2X 受体治疗神经病理性疼痛的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2024, 21(32): 59-64.
- JIA Qingyue, TAO Yi, MIN Xiaoman, et al. Research progress on the regulation of P2X receptors by traditional Chinese medicine in the treatment of neuropathic pain[J]. *China Medical Herald*, 2024, 21(32): 59-64.
- [21] RYAN K, CRIGHTON A. Trigeminal neuralgia and trigeminal neuropathic pain[J]. *British Dental Journal*, 2024, 236(4): 323-328.
- 收稿日期: 2024-12-26  
修回日期: 2025-03-13