

Y 编码样睾丸特异性蛋白 5 在心肌缺血再灌注损伤中的保护作用

范怡伦 吴佳伟 丁丹 黄一航 薛松 黄日太

【摘要】 目的:观察过表达 Y 编码样睾丸特异性蛋白 5 (TSPYL5) 对缺氧/复氧损伤后 H9c2 细胞的影响。**方法:**检测 TSPYL5 在小鼠心肌缺血再灌注及心肌细胞缺氧/复氧损伤后的表达水平。根据表达结果上调 TSPYL5, 以缺氧/复氧后普通 H9c2 细胞为对照组, 相同模型中过表达 TSPYL5 的 H9c2 细胞为实验组, 比较 2 组间凋亡水平的差异。**结果:**TSPYL5 在体内、体外实验中表达水平均显著下降 ($P<0.001$)。与对照组相比, 缺氧/复氧模型中过表达组 p53 的蛋白表达水平显著下调 (25.52 ± 0.19 对 47.39 ± 0.40 , $P<0.05$), caspase-3 显著下调 (60.57 ± 0.26 对 108.24 ± 0.56 , $P<0.05$), Bcl-2 显著上调 (45.65 ± 0.22 对 28.92 ± 0.01 , $P<0.05$), Tunel 染色凋亡阳性率显著下调 ($P<0.01$)。**结论:**TSPYL5 在心肌缺血再灌注及细胞缺氧/复氧后表达下降;过表达 TSPYL5 可以减轻细胞在缺氧/复氧后的凋亡水平, 从而起保护作用。

【关键词】 Y 编码样睾丸特异性蛋白 5; 心肌缺血再灌注损伤; 缺氧/复氧损伤; 凋亡; p53
doi: 10.3969/j.issn.1673-6583.2022.05.012

The protective role of TSPYL5 in myocardial ischemia/reperfusion injury FAN Yilun, WU Jiawei, DING Dan, HUANG Yihang, XUE Song, HUANG Ritai Department of Cardiovascular Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200127, China.

【Abstract】 Objective: To explore the effect of TSPYL5 overexpression on H9c2 cells after hypoxia/reoxygenation. **Methods:** We assessed the expression level of TSPYL5 after myocardial ischemia/reperfusion in mice and post hypoxia/reoxygenation in H9c2 cells, respectively. Levels of apoptosis were compared between H9c2 cells with overexpression of TSPYL5 and those without overexpression of TSPYL5 after hypoxia/reoxygenation. **Results:** The expression level of TSPYL5 was significantly decreased in both in vivo and in vitro experiments ($P<0.001$). In the hypoxia/reoxygenation model, overexpression of TSPYL5 was associated with lower protein levels of p53 (25.52 ± 0.19 vs. 47.39 ± 0.40 , $P<0.05$) and caspase-3 (60.57 ± 0.26 vs. 108.24 ± 0.56 , $P<0.05$), while Bcl-2 level was elevated (45.65 ± 0.22 vs. 28.92 ± 0.01 , $P<0.05$). Meanwhile, the apoptosis level with positive Tunel staining was significantly reduced ($P<0.01$). **Conclusion:** This study suggests that overexpression of TSPYL5 may diminish apoptosis after ischemia/reperfusion and hypoxia/reoxygenation, highlighting a myocardial protective effect.

【Key words】 TSPYL5; Myocardial ischemia reperfusion injury; Hypoxia/reoxygenation injury; Cell apoptosis; p53

心肌缺血再灌注损伤的发生涉及多种机制, 如氧自由基的产生、钙离子超载、炎症反应等^[1-4]。

如何减轻缺血再灌注引起的心肌损伤, 仍是心血管临床医生面临的难题。

基金项目: 上海交大医学院附属仁济医院临床科研创新培育基金计划 (PYMDT-008)
作者单位: 200127 上海交通大学医学院附属仁济医院心血管外科
通信作者: 黄日太, E-mail: huangritai@renji.com

Y 编码样睾丸特异性蛋白 5 基因 (TSPYL5) 位于染色体 8q22 位点, 是 1 种与乳腺癌预后不良有关的独立标记物^[5-6]。有研究显示 TSPYL5 可

以刺激多种细胞增殖^[7],参与细胞生长调节关键物 p53 的负向调控^[6],如通过抑制 p53 促进内皮细胞的增殖和功能^[8]。本研究探究在心肌缺血再灌注损伤中, TSPYL5 能否通过抑制 p53 信号通路,减少心肌细胞凋亡,从而起到保护心肌的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用主要试剂与仪器有 H9c2 心肌细胞株(上海中国科学院细胞库);抗 TSPYL5、GAPDH、p53、Bcl-2、caspase-3 抗体(ABclonal);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(碧云天);聚合酶链反应(PCR)扩增试剂盒(TaKaRa);Lipofectamine 3000 转染试剂(Invitrogen);BCA 试剂盒(碧云天)等。

1.2 H9c2 心肌细胞培养与分组

将 H9c2 心肌细胞培养于 DMEM 培养基中。将细胞随机分组:对照组按照常规方式培养细胞;缺氧复氧组将常规培养基换为无血清培养基,置于含 1%O₂、95%N₂ 的缺氧培养箱中培养 12 h,再将细胞放回 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养 6 h。

1.3 TSPYL5 过表达体系的构建

将 H9c2 细胞接种在 6 孔板中培养 24 h。将 2.1 μg TSPYL5 过表达质粒与 5 μL 的 P3000 溶于 100 μL 无血清无抗生素的培养基中混匀;再将 5 μL Lipofectamine 3000 溶于 100 μL 无血清无抗生素的培养基中混匀,静置 15 min;将上述两者轻柔混匀后,加入换有新鲜正常培养基的培养孔。继续培养 48 h 后,过表达体系构建完成。

1.4 小鼠心脏缺血再灌注模型的构建

给予 6~8 周雄性 C57BL/6 小鼠腹腔注射 1.2% 异氟烷进行麻醉,气管插管后于小鼠胸骨左侧 3、4 肋间剪开皮肤,打开胸腔,用手术缝线对侧牵拉肋骨使心脏暴露。剪开心包,找出左心耳下缘的红色血管即左前降支,打 1 活结进行结扎,暂时关闭胸腔。30 min 及 2 h 后再次开胸,打开活结,看到心壁苍白区域再次变红,即为再灌注成功。

1.5 TUNEL 染色检测细胞凋亡

将细胞种入底部放有玻片的 12 孔板,经缺氧

复氧处理后使用多聚甲醛固定 30 min,使用 PBS 洗涤后根据凋亡试剂盒说明书进行操作。直接置于光学显微镜下观察。

1.6 Western blot 检测蛋白水平

细胞蛋白经 RIPA 裂解提取后,使用 BCA 定量法测定蛋白浓度。使用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离出分子量大小不同的蛋白,将其转移至 PVDF 膜上,使用快速封闭液将膜封闭后,一抗孵育过夜。TBST 洗膜后常温避光孵育二抗 2 h,洗膜后使用 Odyssey Clx 扫膜。

1.7 统计学分析

使用 Graphpad Prism 9 软件进行统计学分析与作图,实验数据采用均数 ± 标准差表示,其中非配对 *t* 检验用于进行 2 组样本间的比较。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺血再灌注后小鼠心肌 TSPYL5 表达下调

为探究动物模型中 TSPYL5 的表达水平是否与缺血再灌注损伤有关,实验设立了对照组、缺血 0.5 h 组、再灌注 0.5 h 组与再灌注 2 h 组,进行蛋白表达水平检测。与对照组相比,缺血再灌注 0.5 h 和 2 h 后小鼠心肌组织 TSPYL5 的蛋白表达水平明显下降。再灌注 2 h 的小鼠 TSPYL5 的蛋白表达水平下降最显著(*P* 均 < 0.05)。见表 1。

表1 小鼠心肌细胞缺血再灌注后的蛋白表达水平

组别	TSPYL 5
对照组	100.0 ± 2.01
缺血0.5 h组	64.89 ± 1.62
再灌注0.5 h组	43.79 ± 0.93 ⁽¹⁾
再灌注2 h组	29.32 ± 0.32 ⁽²⁾

注:与对照组相比, ⁽¹⁾*P* < 0.05, ⁽²⁾*P* < 0.001

2.2 缺氧/复氧后 H9c2 细胞凋亡显著增加

与对照组相比,缺氧/复氧后细胞 TSPYL5 的表达水平显著下降,与此同时, p53、caspase-3 的蛋白表达水平显著上调,促凋亡蛋白 Bcl-2 的表达显著下调(*P* 均 < 0.05),提示细胞在缺氧/复氧后发生凋亡,见表 2。

表2 H9C2细胞中TSPYL 5与凋亡通路蛋白表达水平

组别	TSPYL 5	p53	Bcl-2	caspase-3
对照组	70.60 ± 0.28	8.27 ± 0.27	83.54 ± 1.96	4.27 ± 0.32
缺氧/复氧组	43.15 ± 0.47 ⁽¹⁾	73.20 ± 0.84 ⁽¹⁾	39.59 ± 0.67 ⁽¹⁾	59.13 ± 0.42 ⁽¹⁾

注:与对照组相比, ⁽¹⁾*P* < 0.01

2.3 TSPYL5 过表达逆转了缺氧/复氧后的细胞凋亡

在 H9c2 细胞中建立 TSPYL5 过表达体系, p53 与 caspase-3 的蛋白表达水平显著下调, Bcl-2 的蛋白表达水平显著上调 (P 均 <0.05), 提示在过表达 TSPYL5 后细胞凋亡被明显抑制。见图 1、表 3。



图1 TSPYL5过表达的构建

表3 过表达TSPYL5后凋亡通路蛋白表达水平

组别	p53	Bcl-2	caspase-3
缺氧/复氧组	47.39±0.40	28.92±0.01	108.24±0.56
缺氧/复氧+TSPYL5组	25.52±0.19 ⁽¹⁾	45.65±0.22 ⁽¹⁾	60.57±0.26 ⁽¹⁾

注: 与缺氧/复氧组相比, ⁽¹⁾ $P<0.05$

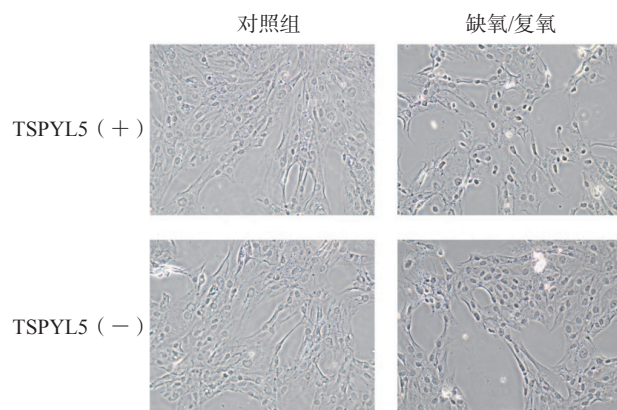


图2 缺氧/复氧后Tunel染色结果 (×25)

下调最显著。在后续的体外实验中, 这样的差异也同样被验证。这说明 TSPYL 5 的表达水平与心肌缺血再灌注存在一定的联系。

p53 是肿瘤抑制蛋白, 在细胞面临缺氧/缺血压力时, 它是细胞周期与凋亡的关键调节物^[9-10]。本研究检测到 p53 凋亡信号通路蛋白即 Bcl-2、caspase-3、p53 表达水平的变化, 证实了 H9c2 细胞在缺氧/复氧模型中发生了显著凋亡。

已有研究表明, 抑制 p53 介导的凋亡信号通路可以显著地减少缺血再灌注导致的心肌损伤^[11-12]。而且 TSPYL5 已被证明可以通过与 USP7 相互作用抑制 p53, 从而消除 p53 介导的凋亡效应^[6], 比

在转入质粒后, 与对照组相比, TSPYL5 的高表达显著抑制了缺氧/复氧后细胞的凋亡水平, 见图 2。

3 讨论

TSPYL5 在细胞中广泛表达, 既往研究表明其可以促进多种肿瘤细胞的增殖^[7], 也可以通过与泛素特异性蛋白酶 7 (USP7) 结合的方式对 p53 通路产生抑制作用^[6], 通过这种作用可以促进内皮细胞的增殖和功能^[8]。然而, TSPYL5 蛋白能否通过抑制 p53 通路在心肌缺血再灌注损伤中产生保护作用, 还尚未有报道。

首先, 本研究发现在小鼠缺血再灌注模型中 TSPYL 5 的表达水平平均有下调, 其中再灌注 2 h 组

如促进内皮细胞的增殖^[8]等。本研究已经验证 TSPYL5 在缺氧/复氧后表达水平会发生下调, 由此进一步探究在水平心肌细胞缺氧/复氧模型中, 高表达 TSPYL5 是否能够通过抑制 p53 信号通路对细胞产生保护作用。TSPYL5 过表达细胞体系被成功构建之后, 结合蛋白表达水平与 Tunel 染色结果提示, 过表达 TSPYL5 通过抑制 p53 信号通路逆转了心肌细胞缺氧/复氧后的凋亡水平。

以上研究结果表明, TSPYL 5 在心肌缺血再灌注后表达下调, 通过抑制 p53 信号通路的方式, 发挥心肌细胞保护作用。本研究仅在体外验证了 TSPYL5 对心肌细胞的保护作用, 尚未进行体内实验。TSPYL5 能否在小鼠缺血再灌注模型中实现对心肌的保护作用, 以及在未来如何将 TSPYL5 作为潜在靶点, 从而减轻心肌缺血再灌注损伤, 需要后续深入研究。

参 考 文 献

- [1] Hausenloy DJ, Yellon DM. Targeting myocardial reperfusion injury—the search continues[J]. N Engl J Med, 2015, 373(11):1073-1075.
- [2] Ibáñez B, Heusch G, Qvize M, et al. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65(14):1454-1471.
- [3] Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, et al. The protective role of curcumin in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. J Cell

- Physiol, 2018, 234(1):214-222.
- [4] Fan Q, Tao R, Zhang H, et al. Dectin-1 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating macrophage polarization and neutrophil infiltration[J]. Circulation, 2019, 139(5):663-678.
- [5] Hu G, Chong RA, Yang Q, et al. MTDH activation by 8q22 genomic gain promotes chemoresistance and metastasis of poor-prognosis breast cancer[J]. Cancer Cell, 2009, 15(1):9-20.
- [6] Epping MT, Meijer LA, Krijgsman O, et al. TSPYL5 suppresses p53 levels and function by physical interaction with USP7[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(1):102-108.
- [7] Kim EJ, Lee SY, Kim TR, et al. TSPYL5 is involved in cell growth and the resistance to radiation in A549 cells via the regulation of p21(WAF1/Cip1) and PTEN/AKT pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 392(3):448-453.
- [8] Na HJ, Yeum CE, Kim HS, et al. TSPYL5-mediated inhibition of p53 promotes human endothelial cell function[J]. Angiogenesis, 2019, 22(2):281-293.
- [9] Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1787(5):414-420.
- [10] Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(4):275-283.
- [11] Ma S, Sun L, Wu W, et al. USP22 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury via the SIRT1-p53/SLC7A11-dependent inhibition of ferroptosis-induced cardiomyocyte death[J]. Front Physiol, 2020, 11:551318.
- [12] Zhang H, Wang J, Du A, et al. MiR-483-3p inhibition ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury by targeting the MDM4/p53 pathway[J]. Mol Immunol, 2020, 125:9-14.
- (收稿:2021-07-10 修回:2022-08-08)
(本文编辑:丁媛媛)

