

陈果,刘命珩,王瀚,等. RNF130 通过促进 PARP1 的泛素化改善小鼠心肌缺血-再灌注损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(7): 1-10.

Chen G, Liu MH, Wang J, et al. Ring finger protein 130 improves myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting poly-ADP ribose polymerase 1 ubiquitination [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(7): 1-10.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.07.001

RNF130 通过促进 PARP1 的泛素化改善小鼠 心肌缺血-再灌注损伤

陈 果¹, 刘命珩^{1,2}, 王 瀚¹, 苏家宝^{1,2}, 韦 敏¹, 孙海建¹, 朱雪雪¹, 陆清波^{2*}

(1. 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学附属医院, 江苏 无锡 214000)

【摘要】 目的 探讨环指蛋白 130 (ring finger protein 130, RNF130) 对心肌缺血-再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI) 的影响及可能的机制。**方法** 将 C57BL/6J 雄性小鼠分为 4 组 ($n=6$): 假手术 (Sham) 组、模型 (MI/RI) 组、心肌缺血-再灌注+空载体质粒 (MI/RI+Vector) 组、心肌缺血-再灌注+RNF130 过表达 (MI/RI+RNF130OE) 组。心肌缺血-再灌注 24 h 后, 通过心脏超声检测小鼠心功能, 采用 IHC、DHE 和 TUNEL 染色观察各组心肌组织的病理变化、氧化损伤和细胞凋亡, Western blot、免疫荧光和免疫组化检测蛋白表达情况。蛋白质组学分析 RNF130 调控的下游蛋白, 通过免疫沉淀 (IP) 实验检测蛋白互作。**结果** 与给予 Vector 空载体质粒的模型组小鼠相比, 小鼠心肌细胞 RNF130 过表达后, 心脏功能显著改善, 表现为左室射血分数 (EF) 和左室短轴缩短率 (FS) 的数值增加, 同时心肌梗死区域显著缩小, NOX-2 与 BAX 蛋白的表达水平也观察到明显的下降 ($P<0.05$)。DHE 和 TUNEL 染色表明, RNF130 过表达后, 相比于 MI/RI+Vector 组的小鼠, 其心肌细胞氧化损伤和细胞凋亡率明显降低 ($P<0.05$)。蛋白质组学分析与 IP 实验发现蛋白 PARP1 与 RNF130 有明显的蛋白互作。同时发现其与 RNF130 蛋白的表达变化相反。**结论** RNF130 可能通过调控 PARP1 泛素化途径减轻 MI/RI 损伤, 为靶向干预提供了新方向。

【关键词】 心肌缺血-再灌注; 泛素化; 泛素特异性蛋白酶; PARP1

【中图分类号】 R542.2; R-33; R364.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 07-0001-10

Ring finger protein 130 improves myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting poly-ADP ribose polymerase 1 ubiquitination

CHEN Guo¹, LIU Mingheng^{1,2}, WANG Jing¹, SU Jiabao^{1,2}, WEI Min¹, SUN Haijian¹, ZHU Xuexue¹, LU Qingbo^{2*}

(1. Wuxi Medical College, Jiangnan University, Wuxi 214122, China.

2. Affiliated Hospital of Jiangnan University, Wuxi 214000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of ring finger protein 130 (RNF130) on myocardial ischemia-reperfusion injury (MI/RI) and its potential mechanism. **Methods** Male C57BL/6J mice were divided into four groups ($n=6$): Sham, MI/RI, MI/RI+Vector, and MI/RI+RNF130 overexpression (MI/RI+RNF130OE). Cardiac function was evaluated by echocardiography 24 hours after ischemia-reperfusion. Pathological changes,

【基金项目】 国家自然科学基金 (82300414)。

【作者简介】 陈果 (2001—), 女, 硕士, 研究方向: 心血管疾病的病理基础研究。E-mail: 6232814001@stu.jiangnan.edu.cn

【通信作者】 陆清波 (1993—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 心血管发病机制及药物干预研究。E-mail: bonnielqb@yeah.net

oxidative damage, and apoptosis in myocardial tissues were observed via IHC, DHE, and TUNEL staining. Protein expression was detected using Western blot, immunofluorescence, and immunohistochemistry. Proteomic analysis was performed to identify downstream proteins regulated by RNF130, and protein-protein interactions were validated by immunoprecipitation (IP) assay. **Results** Compared with the MI/RI + Vector group, RNF130 overexpression significantly improved cardiac function, as indicated by increased left ventricular ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS), reduced myocardial infarction area, and decreased expression of NOX-2 and BAX proteins ($P < 0.05$). DHE and TUNEL staining showed that RNF130 overexpression alleviated myocardial oxidative damage and apoptosis ($P < 0.05$). Proteomic analysis and IP assays revealed a significant interaction between RNF130 and PARP1, with PARP1 expression inversely correlated with RNF130. **Conclusions** RNF130 may mitigate MI/RI injury by regulating the PARP1 ubiquitination pathway, providing a new target for therapeutic intervention.

【Keywords】 myocardial ischemia-reperfusion; ubiquitination; ubiquitin-specific protease; PARP1

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

缺血性心脏病 (ischemic heart disease, IHD) 是全球范围内致死率最高的心血管疾病之一,其最严重的临床表现为急性心肌梗死。该疾病对患者健康构成重大威胁,因其病情进展迅速且预后较差,已成为临床诊疗中亟需关注的核心问题^[1-2]。再灌注治疗是针对心肌梗死最为有效的医疗手段^[3],它能够在有限的时间内重新建立对缺血心肌的血液供应,然而,这种治疗也可能引发一系列问题,包括细胞代谢的紊乱、组织结构的破坏,以及可能的永久性损伤,即心肌缺血-再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI)^[4-6]。研究显示,泛素蛋白酶系统 (ubiquitinating-proteasome system, UPS) 为体内主要蛋白质降解途径之一,具有高效性和选择性^[7]。泛素与底物的结合由 3 种酶介导:活化酶 (E1)、结合酶 (E2) 和连接酶 (E3)^[8,9]。其参与细胞的多种病理生理活动中,行使调控降解功能的核心成员——E3 泛素连接酶扮演着至关重要的角色。近年来,越来越多的泛素化调控蛋白在 MI/RI 中出现失调而显著增加心血管疾病死亡风险^[10]。E3 连接酶在确定底物特异性方面起着决定性作用,其中 RNF 家族,以其 N 端的 RING 结构域为特征,是 E3 泛素连接酶家族中最大的一类^[11-13]。作为 RNF 家族一员的环指蛋白 130 (ring finger protein 130, RNF130) 与多种疾病的发生、发展密切相关,有研究表明 RNF130 通过促进 c-myc 泛素化和降解来改善肺纤维化^[14]。经后期实验证明 E3 家族成员之一 RNF130,在小鼠缺血-再灌注损伤后的心肌细胞中表达较低,但对于发生 MI/RI 的心肌细胞是否同样有保护作用,尚

未查到相关报道。本研究主要探讨 RNF130 对于 MI/RI 的保护作用及其具体调节机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 6~8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,体质量 20~30 g,24 只,购自集萃药康 (苏州) 生物技术有限公司 [SCXK (苏) 2023-0009],于江南大学医学院实验动物中心 [SYXK (苏) 2021-0056] 预适应喂养 7 d。所有实验操作符合动物福利、动物实验伦理要求及 3R 原则,并通过江南大学实验动物伦理委员会审查批准后施行 (JN. No20240115c0600730 [038])。

1.2 主要试剂与仪器

Evans blue (314-13-6)、TTC 染液 (G3005)、DHE 试剂盒 (S0064)、HE 试剂盒 (G1120)、TUNEL 试剂盒 (T2190) 均购自北京 Solarbio 公司;RNF130 过表达质粒、阴性对照 AAV9 病毒载体 (10 PFU/mL) 购自苏州吉玛基因股份有限公司;细胞裂解液 (P0013) 购自碧云天生物技术有限公司;RNF130 抗体 (DF4654) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司;BCA 蛋白检测试剂盒 (23227) 购自 Thermo Scientific;荧光二抗 (A11012 和 A11029) 购自 Thermofisher 公司;链霉亲和 (CW2069S) 购自康为世纪;BAX (50599-2-Ig)、NOX2 (19013-1-AP)、PARP1 (13371-1-AP)、ubiquitin (10201-2-AP)、 β -tubulin (80713-1-RR)、山羊抗兔抗体 (SA00001-2)、山羊抗鼠抗体 (SA00001-1)、 α -actinin (66895-1-Ig) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司。超声探头 vevo3100LT

购自富士胶片中国投资有限公司;酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司;蔡司倒置荧光显微镜购自德国卡尔蔡司公司;全自动化学发光/荧光图像分析系统购自天能公司;尼康正置荧光显微镜购自日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组

将小鼠按随机数字表分为 4 组:假手术(Sham)组($n=6$)、模型(MI/RI)组($n=6$)、心肌缺血-再灌注+空载体质粒(MI/RI+Vector)组($n=6$)、心肌缺血-再灌注+RNF130 过表达(MI/RI+RNF130OE)组($n=6$)。

1.3.2 小鼠心肌缺血-再灌注损伤模型的制备和 RNF130 心脏特异性过表达

使用异氟烷 2% 浓度气体麻醉小鼠后,使用脱毛膏脱去胸前毛发,观察小鼠心脏起伏位置,在左胸处合适位置切开一个小皮肤切口(约 1.2 cm),分离胸大肌和胸小肌后,露出第四肋间隙。用持针器在第四肋间隙开一个小孔,打开胸膜和心包。在持针器轻微撑开肋间隙的情况下,心脏顺利地由孔中轻轻“弹出”。使用 6-0 丝线定位冠状动脉左前降支(LCA)并在距离其上端约 2 mm 的位置进针并打活结结扎。当左室前壁变苍白时,认为结扎成功。结扎后,即刻将心脏送回胸腔内,将活结相对较长的一端留在体外。食指轻压抽气以防气胸发生,并使用荷包缝合法关闭肌肉和皮肤。让小鼠呼吸室内空气,并在恢复期间进行监测。30 min 后缓慢抽出结扎线,表明再灌注开始,再灌注 24 h^[15]。假手术组打开胸腔后随即关闭缝合,不建立心脏 MI/RI 模型。对于 MI/RI+RNF130OE 组和 MI/RI+Vector 组,小鼠两周龄时尾静脉注射 100 μ L 携带 cTnT 启动子的 RNF130 过表达质粒或阴性对照 AAV9 病毒载体(10 PFU/mL),6 周后行心脏超声或生化分析。

1.3.3 心脏超声评估小鼠心功能

麻醉并固定小鼠于操作台上,在小鼠前胸涂上耦合剂,将超声探头(vevo3100LT)平行于小鼠心脏长轴,M 型超声测量心脏收缩末期和舒张末期左室内径,并使用 Vevo LAB 软件计算出左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)。

1.3.4 心肌梗死面积测定

在再灌注 24 h 后,对小鼠实施 2% 异氟醚麻醉。随后重新结扎左前降支冠状动脉,并注入 1% 伊文蓝染料至右心房。迅速取出心脏,用生理盐水冲洗后,将其置于-80 $^{\circ}$ C 环境中冷冻 30 min。冷冻完成后,将心脏切成 4 片短轴切片,并在 37 $^{\circ}$ C 下用 1% 的 TTC 溶液孵育 15 min。之后,将切片压平并用 4% 的多聚甲醛进行固定处理。未被伊文蓝和 TTC 染色的区域显示为心肌梗死区域;仅被 TTC 染色的红色区域代表心肌缺血区域;同时被两种染料染色的蓝色区域则为非缺血区域。危险区域(AAR)包括缺血区和梗死区,而非危险区域则由酞菁蓝染色表示。最后,使用 Image J(15.4)软件对染色区域进行图像量化,以梗死区域占 AAR 的百分比表示。

1.3.5 观察心肌组织损伤

将石蜡包埋后的心肌组织进行切片(4 μ m),通过 HE、TUNEL 和 DHE 染色于显微镜下观察心肌细胞病理损伤、细胞凋亡和氧化损伤结果。

1.3.6 Western blot 检测心肌组织蛋白表达

将蛋白酶和磷酸酶抑制剂及 IP 细胞裂解液从心肌组织左心室中提取总蛋白,再使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,加入 Loading Buffer 后 95 $^{\circ}$ C 加热 5 min,使蛋白变性。经电泳分离、转膜和封闭后,加入抗体 RNF130(1:1000)、BAX(1:2000)、NOX2(1:2000)、PARP1(1:1000)、ubiquitin(1:1000)和 β -tubulin(1:10 000),在 4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜,次日洗膜后,使用山羊抗兔抗体(1:3000)或山羊抗鼠抗体(1:3000)室温摇床孵育 2 h,再次洗膜后,用 ECL 化学发光试剂显影蛋白质电泳条带,拍照并用 Image J(15.4)软件进行条带灰度值分析,并以 β -tubulin 作为内参,将目的条带灰度值与内参比较,计算目的蛋白相对表达水平。

1.3.7 免疫组织化学染色和免疫荧光染色

检测心肌组织 RNF130 蛋白表达将石蜡包埋后的心肌组织进行切片(4 μ m),经脱蜡复水和抗原修复后,使用 4% 过氧化氢去除内源性过氧化氢酶,0.2% 曲拉通破膜后,使用 5% BSA 封闭 30 min。免疫组化组加入 RNF130 抗体(1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后,滴加生物素标记羊抗兔/鼠二抗工作液以及 HRP 标记的链霉亲和素,DAB 显色

后染核封片。免疫荧光组在封闭后加入 RNF130 和 α -actinin (1 : 200) 抗体 4 °C 孵育过夜后,滴加荧光二抗 (1 : 500), 37 °C 避光孵育 1 h 后,用含 DAPI 封片剂封片。最后使用显微镜观察并分析 RNF130 蛋白表达情况。

1.3.8 蛋白质组学

取新鲜 MI/RI+Vector 和 MI/RI+RNF130OE 组小鼠心脏各 3 只, PBS 洗净后立即放入液氮速冻 1 min, 然后放入干冰保存, 送上海鹿明生物科技有限公司做蛋白质组学分析。即将心脏组织破碎裂解后得到蛋白溶液, 再加入丙酮得到蛋白沉淀, 经过蛋白重溶、还原、烷基化和蛋白酶解后浓缩样本, 复溶上机。使用质谱仪采集各项数据, 检索数据库并最后进行定性分析。

1.3.9 免疫沉淀实验检测蛋白互作

收集心肌组织, 加入适量 IP 裂解液, 冰上裂解 30 min, 12 000 r/min 离心 15 min 后收集上清。每个样本取 100 ~ 200 μ g 转移至新的 EP 管做 Input, 每个管子加 1 μ g 抗体, 4 °C 摇晃 1 h, 每个管子再加入 20 μ L 的 Protein A/G 珠子, 4 °C 摇晃过夜。随后 2500 r/min 于 4 °C 离心 5 min, 小心吸出并弃上清, 底部为免疫沉淀复合物, 最后加入 40 μ L 的 1×Loading Buffer, 煮沸 10 min, 加入 20 μ L 的样品到 SDS-PAGE, 进行 Western blot 分析。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析, 实验结果以平均数 $\pm$ 标准误差 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$) 呈现, 两组间采用无配对方差分析, 对于多重比较采用 One-way ANOVA, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNF130 在 MI/RI 小鼠的心脏中表达降低

通过对小鼠进行 30 min 缺血和 24 h 再灌注建立了 MI/RI 模型, 发现与 Sham 组相比, 超声心动图显示 MI/RI 小鼠的 LVEF 和 LVFS 显著下降 ($P < 0.05$, 图 1A)。然而, 免疫荧光染色进一步揭示了 RNF130 在心肌细胞中的定位特征: 在 Sham 组中, RNF130 与 α -actinin (心肌细胞标记物) 共定位明显, 而在 MI/RI 组中, 其荧光强度显著减弱 ($P < 0.05$, 图 1B)。Western blot 结果显示, MI/RI 小鼠心脏中 RNF130 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$, 图 1C)。

2.2 RNF130 过表达改善 MI/RI 小鼠心功能

与给予 Vector 空载体质粒的模型组小鼠相比, 小鼠心肌细胞 RNF130 过表达后, 心脏功能显著改善, 表现为 LVEF 和 LVFS 的数值显著增加 ($P < 0.05$, 图 2A), 同时心肌梗死区域显著缩小 ($P < 0.05$, 图 2C)。此外, NOX-2 与 BAX 蛋白的表达水平也观察到显著下降 ($P < 0.05$, 图 2B)。

2.3 RNF130 过表达减轻 MI/RI 小鼠心肌损伤

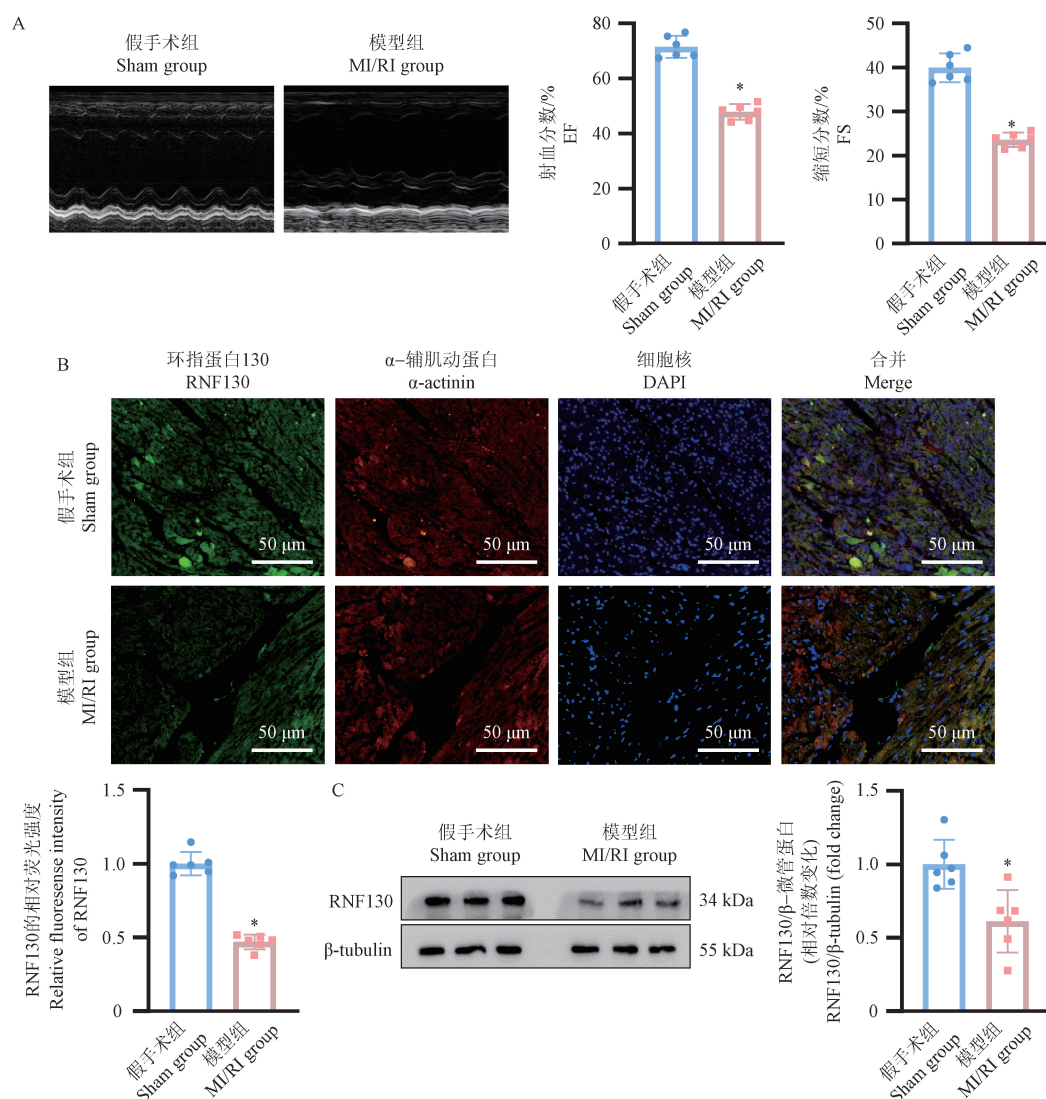
免疫组化染色显示 MI/RI+RNF130OE 组 caspase-3 较 MI/RI+Vector 组表达有所降低 (图 3A)。DHE 和 TUNEL 染色表明, RNF130 过表达后, 相比于 MI/RI+Vector 组, 其心肌细胞氧化损伤和细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.05$, 图 3B、3C)。

2.4 RNF130 通过结合 PARP1 并促进其泛素化, 进而减少 PARP1 蛋白表达

蛋白质组学分析结果显示, 与 MI/RI+RNF130OE 组相比, MI/RI 组小鼠心肌细胞有 75 个蛋白显著升高, 49 个蛋白显著下降, 本研究在蛋白表达升高较为显著的前 5 个蛋白 (CASP3、PARP1、CASP7、XRCC1、PARG) 中选择了升高最显著的 PARP1 进行了 IP 实验, 发现蛋白 PARP1 与 RNF130 有明显的蛋白互作。通过 Western blot 实验, 发现与 RNF130 蛋白的表达变化相反, MI/RI 组小鼠相比于 Sham 组, 其 RNF130 蛋白表达明显升高, 将 RNF130 过表达后, PARP1 蛋白表达进一步降低, 且 PARP1 的泛素化水平显著增强 ($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

随着经济的增长和社会生活方式的转变, 特别是由于人口老龄化和城市化的快速推进, 不健康生活习惯在居民中变得越来越普遍。这导致 IHD 的发病率和死亡率居高不下, 对中国的医疗保健系统构成了严峻挑战。在 IHD 的进展和治疗中, MI/RI 对患者的长期健康结果有着重大的负面影响^[16-18]。MI/RI 在临床上常伴随心脏手术、急性心肌梗死后的再灌注治疗等情况, 表现为严重的氧化应激和细胞凋亡, 严重影响患者预后^[19]。本研究首次探讨了 RNF130 在 MI/RI 中的作用及机制, 揭示了其通过泛素化降解 PARP1, 抑制 DNA 损伤和细胞凋亡, 保护心脏功能的潜力。



注:A:小鼠 MI/RI 损伤后 24 h 的代表性 M 型超声心动图像以及小鼠 MI/RI 后 LVEF 和 LVFS 的定量分析;B:免疫荧光观察 RNF130 在小鼠心肌细胞中的蛋白表达;C:Western blot 检测 RNF130 在小鼠心肌细胞中的蛋白表达。与假手术组相比, * $P<0.05$ 。

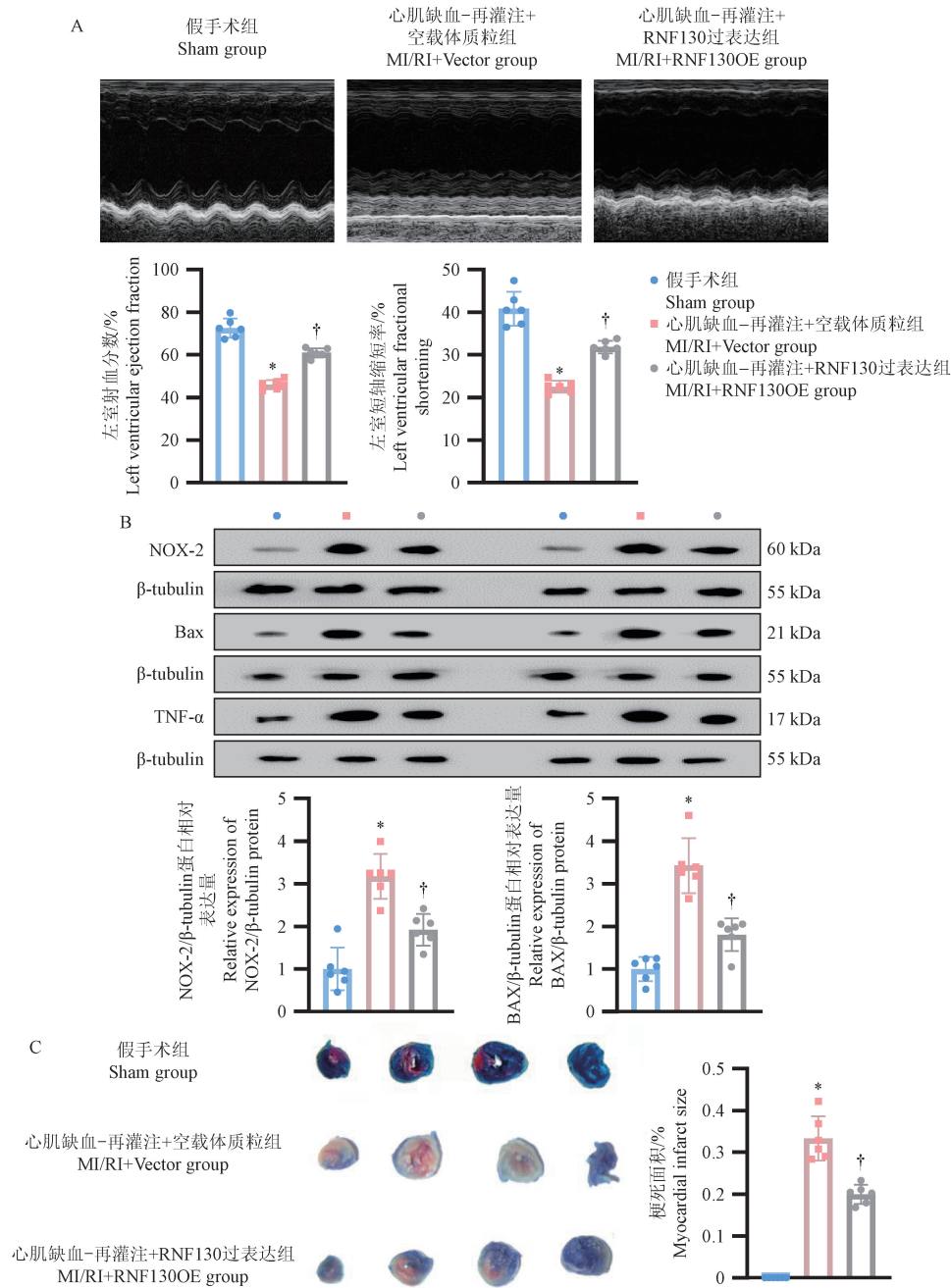
图 1 RNF130 在 MI/RI 小鼠的心脏中表达降低

Note. A, Representative M-mode echocardiographic images of mice 24 hours after MI/RI injury and quantitative analysis of LVEF and LVFS following MI/RI in mice. B, Immunofluorescence observation of RNF130 protein expression in mouse cardiomyocytes. C, Western blot analysis was performed to determine the protein expression of RNF130 in mice cardiomyocytes. Compared with Sham group, * $P<0.05$.

Figure 1 RNF130 expression was decreased in the heart of MI/RI mice

RNF130 又称 GOLIATH,是果蝇蛋白酶相关 (PA)结构域的 E3 连接酶 Goliath (dGoliath) 的哺乳动物同源物^[20]。E3 连接酶是细胞泛素系统的一部分,它不仅控制 26S 蛋白酶体对蛋白质的选择性降解,还可以修饰蛋白质并调节其细胞定位。E3 连接酶催化泛素转移至靶蛋白,从而赋予这些过程特异性和调节性。在心脏缺血再灌注损伤过程中,氧化应激和 DNA 损伤是导致心肌细胞死亡的主要机制。RNF130 作为 RING E3 连接酶的一员,已被证明可调节人类疾病中的免疫

力、细胞凋亡和癌症进展^[21]。近期有研究证实 RNF130 通过介导 c-myc 泛素化抑制有氧糖酵解抗肺纤维化^[11],但在心肌缺血再灌注研究中并未见相关报道。ADP-核糖基化是一种关键的细胞反应,主要由 PARP 家族中的聚 ADP 核糖聚合酶-1 (PARP1) 催化,这一过程对于 DNA 损伤修复至关重要。PARP1 作为该家族中含量最丰富的成员之一,它参与了基因稳定性的维护以及 DNA 修复机制。近年来,PARP1 抑制剂已被证实其治疗可显著减弱心力衰竭动物模型中左心室收缩



注:A:心脏超声检测小鼠心脏 EF 和 FS 值;B:Western blot 检测 NOX-2 和 BAX 在小鼠心肌细胞中的蛋白表达;C:伊文蓝和 TTC 染色观察小鼠心肌梗死面积。与假手术组相比, * $P<0.05$;与心肌缺血-再灌注+空载体质粒组相比, † $P<0.05$ 。

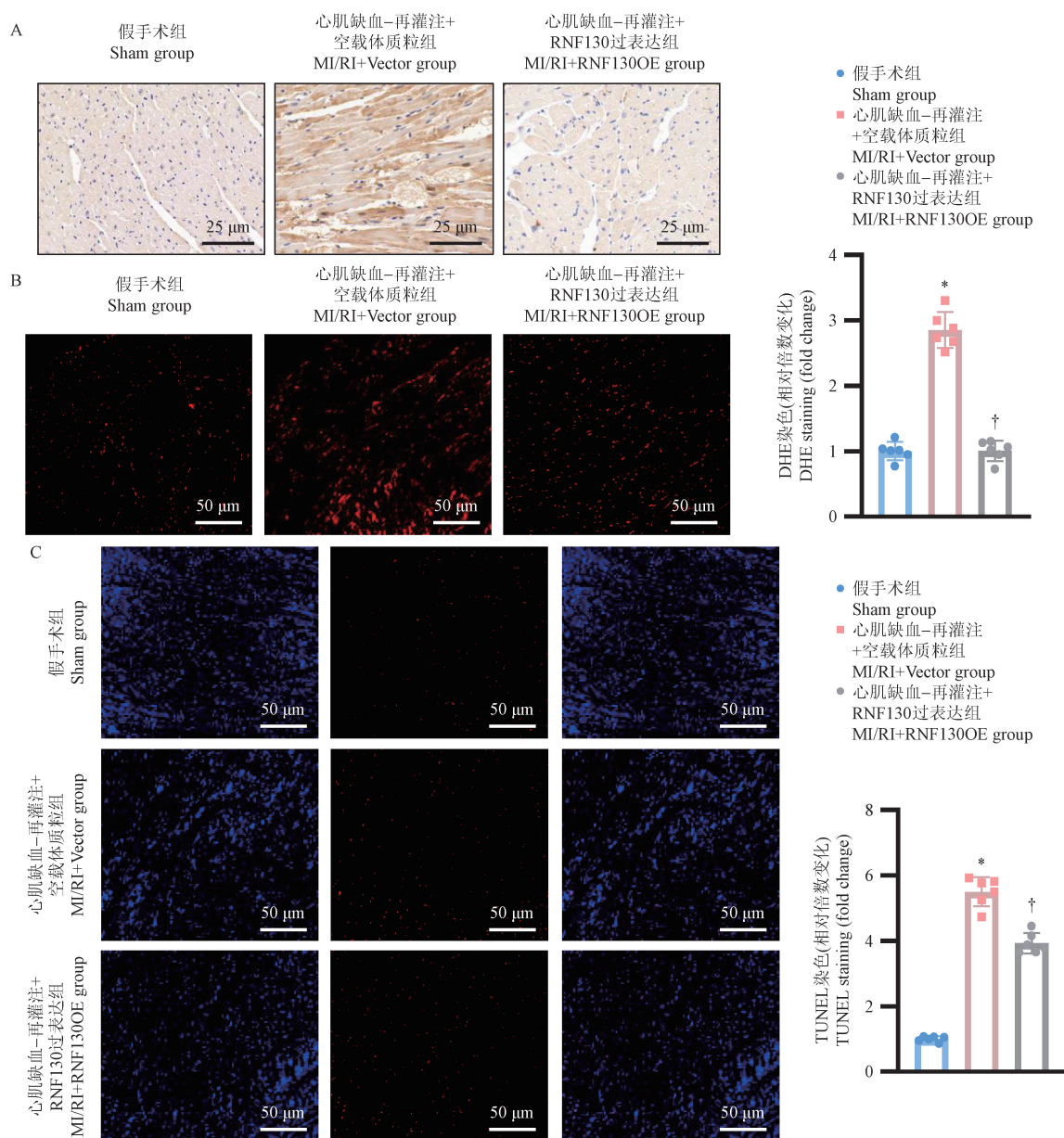
图 2 RNF130 过表达改善 MI/RI 小鼠心功能

Note. A, Cardiac ultrasound examination of mouse heart EF and FS values. B, Western blot analysis was performed to detect the protein expression of NADPH oxidase 2 (NOX-2) and Bcl2-associated X protein (BAX) in mice cardiomyocytes. C, Myocardial infarct size was evaluated by Evans blue and triphenyltetrazolium chloride (TTC) double staining. Compared with Sham group, * $P<0.05$. Compared with MI/RI+Vector group, † $P<0.05$.

Figure 2 RNF130 overexpression improves cardiac function in MI/RI mice

压、心室收缩力和舒张力,并通过限制或阻止促炎性细胞因子来改善疾病^[22]。本研究表明, RNF130 过表达能够通过促进 PARP1 的泛素化

降解,减轻心肌细胞的 DNA 损伤和凋亡,进而改善心功能,降低心肌梗死面积。这一发现不仅为理解心肌缺血再灌注损伤提供了新的分子机制,



注:A:免疫组化观察 caspase-3 在心脏组织表达;B:DHE 染色观察心肌细胞氧化损伤;C:TUNEL 染色观察心肌细胞凋亡。与假手术组相比, * $P<0.05$;与心肌梗死-再灌注+空载体质粒组相比, † $P<0.05$ 。

图 3 RNF130 过表达减轻 MI/RI 小鼠心肌损伤

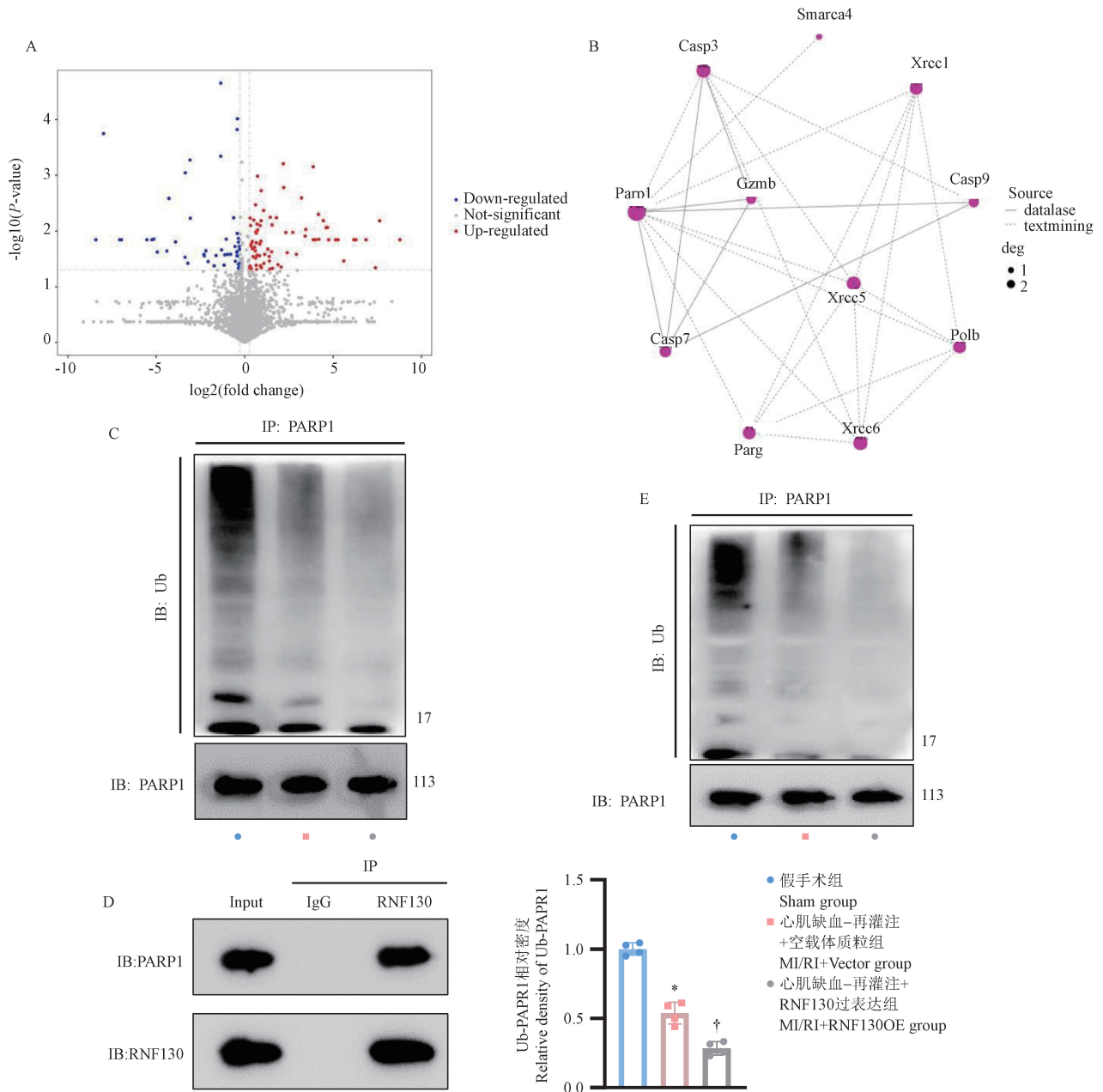
Note. A, Immunohistochemistry was performed to assess the expression of caspase-3 in cardiac tissues. B, DHE staining was utilized to evaluate oxidative damage in cardiomyocytes. C, TUNEL staining was conducted to quantify cardiomyocyte apoptosis. Compared with Sham group, * $P<0.05$. Compared with MI/RI+Vector group, † $P<0.05$.

Figure 3 RNF130 overexpression facilitates myocardial injury in MI/RI mice

也为临床治疗提供了潜在的靶点。

高水平的活性氧 (ROS) 不仅直接损伤细胞结构,还会通过激活多种细胞应答机制,如线粒体功能障碍、内皮细胞功能障碍以及心肌细胞死亡,进而加重病理过程。本研究发现,RNF130 过表达能够有效抑制氧化应激反应,降低 NOX-2、BAX 等凋亡相关蛋白的表达,并减小心肌梗死面

积。这些结果提示,RNF130 不仅通过其对 PARP1 的调控作用减轻 DNA 损伤,还通过抑制 ROS 产生,进一步保护心脏免受 MI/RI 引发的损害。泛素化是最重要的蛋白质翻译后修饰之一,涉及底物活性、细胞定位、蛋白质稳定性以及与其他蛋白质相互作用的调节^[23-25]。已有研究表明 ATG9A 泛素化在氧化应激诱导的自噬、内吞运



注:A:火山图显示 MI/RI+Vector 和 MI/RI+RNF130OE 两组间蛋白表达差异;B:蛋白质互作图显示两组间表达上调最显著蛋白的互作关系;C:免疫沉淀实验验证小鼠心肌细胞中 RNF130 与 PARP1 的蛋白互作;D:IP 检测 PARP1 在小鼠心肌细胞中的蛋白表达;E:采用免疫沉淀法检测小鼠心肌细胞 PARP1 蛋白的泛素化,并用 Image J (15.4) 软件进行定量分析。与假手术组相比, * $P < 0.05$;与心肌缺血-再灌注+空载体质粒组相比, $^{\dagger}P < 0.05$ 。

图 4 RNF130 通过结合 PARP1 并促进其泛素化,进而减少 PARP1 蛋白表达

Note. A, Volcano plot illustrates differentially expressed proteins between the MI/RI+Vector and MI/RI+RNF130OE groups. B, Protein-protein interaction network analysis demonstrates functional relationships among the most significantly upregulated proteins between the two groups. C, Co-immunoprecipitation assays validated the physical interaction between RNF130 and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) in mouse cardiomyocytes. D, Immunoprecipitation combined with immunoblotting confirmed the protein expression of PARP1 in mice cardiomyocytes. E, Ubiquitination assays via immunoprecipitation were performed to detect ubiquitinated PARP1 in mice cardiomyocytes, followed by quantitative analysis using Image J (15.4) software. Compared with Sham group, * $P < 0.05$. Compared with MI/RI+Vector group, $^{\dagger}P < 0.05$.

Figure 4 RNF130 reduces PARP1 protein expression by binding to PARP1 and promoting its ubiquitination

输和先天免疫中的关键作用^[26]。泛素化也被证实

可缺少的作用^[27,28]。

本研究首次探讨 RNF130 是否对小鼠心肌缺

实在心血管疾病多种病理生理进程中发挥着不

血再灌注损伤发挥改善作用,并探究其下游机制。本实验首先通过在小鼠体内构建 MI/RI 模型,经研究发现,在 MI/RI 组心肌细胞 RNF130 的蛋白表达下降,这提示 RNF130 在心肌缺血-再灌注损伤中发挥着重要作用。接着我们构建了腺相关病毒 RNF130-AAV9,将 RNF130 在小鼠心肌细胞特异性过表达后,我们发现 MI/RI + RNF130OE 组小鼠心功能明显改善,心肌细胞病理损伤减轻,同时逆转了 MI/RI 引起的 LVEF 和 LVFS 降低、减少心肌细胞凋亡、抑制氧化应激反应、降低凋亡标志物 NOX-2、BAX 蛋白的表达,降低心肌梗死面积。本研究证实 RNF130 过表达的确能够对心肌缺血再灌注损伤起到治疗作用。

RNF130 作为一种 E3 连接酶,介导底物的泛素化和降解,减少其蛋白表达。因此,本研究采用 MI/RI+Vector 和 MI/RI+RNF130OE 两组小鼠心肌细胞进行蛋白质组学研究,筛选出 49 个表达下调蛋白,并从下调最显著的一系列蛋白中发现 PARP1 与 RNF130 产生明显的蛋白互作,进一步实验证明其与 RNF130 的表达有反向升降,且 PARP1 泛素化在 RNF130 过表达后显著增加。ZHANG 等^[29]研究结果显示在心肌中特异性敲除 WWP2 会降低 PARP1 泛素化水平并增加异丙肾上腺素(ISO)诱导的 PARP1 和 PARylation 的作用,进而加重 ISO 诱导的心肌肥大、心力衰竭和心肌纤维化。XU 等^[30]证明 PARP1 在 MIRI 诱导的体外心肌自噬过程中被激活,此外,PARP1 抑制剂通过抑制自噬保护心肌细胞免受 MIRI。其中,PARP1 已被证实作为人类恶性肿瘤治疗靶点的临床潜力^[31-33]。通过 IP 实验我们推测 RNF130 通过使 PARP1 的泛素化增强,起到稳定和减少 PARP1 蛋白的效果,改善了心肌缺血再灌注损伤。

尽管本研究揭示了 RNF130 通过泛素化 PARP1 缓解心肌缺血再灌注损伤的潜在机制,但仍有一些局限性需要进一步探讨。首先,尽管结果表明 RNF130 过表达能够改善心功能,但尚未明确其作用的分子机制是否仅限于 PARP1 的泛素化降解。未来的研究可通过筛选更多的 RNF130 下游靶标,进一步探讨其在心脏保护中的全面作用。此外,虽然 PARP1 抑制剂已在其他研究中证明其能有效减轻心肌缺血再灌注损伤,但其临床应用仍面临挑战,例如潜在的副作用和

治疗窗口的问题。因此,RNF130 及其调控机制可能为未来开发心肌保护性药物提供新的策略。

综上,RNF130 通过促进 PARP1 的泛素化降解,抑制 PARP1 介导的心肌细胞 DNA 损伤和细胞凋亡,减轻氧化应激损伤,从而发挥对小鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。本研究为临床治疗心肌缺血再灌注损伤提供了新的分子靶点,并为 RNF130 在心血管疾病中的应用开辟了新的方向。

参考文献:

- [1] DONG W, GUAN F F, ZHANG X, et al. Dhcr24 activates the PI3K/Akt/HKII pathway and protects against dilated cardiomyopathy in mice [J]. *Anim Model Exp Med*, 2018, 1(1): 40-52.
- [2] BAI G, YANG J, LIAO W, et al. miR-106a targets ATG7 to inhibit autophagy and angiogenesis after myocardial infarction [J]. *Anim Model Exp Med*, 2024, 7(4): 408-418.
- [3] 陈亚萍, 张彬, 刘桂艳, 等. 杨梅苷对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(5): 31-39.
CHEN Y P, ZHANG B, LIU G Y, et al. Protective effects of myricitrin on ischemic/reperfusion injury in isolated rat hearts [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(5): 31-39.
- [4] 李世龙, 王贺, 曹英杰. NF- κ B 信号通路介导巨噬细胞参与心肌缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2024, 34(4): 139-146.
LI S L, WANG H, CAO Y J. Research progress on the involvement of macrophages in myocardial ischemia reperfusion injury mediated by NF- κ B signaling pathway [J]. *Chin J Comp Med*, 2024, 34(4): 139-146.
- [5] 蒋先训, 张凯, 张鹰. circTLK1 通过 miR-26a-5p/YES1 轴减轻小鼠心肌缺血/再灌注损伤 [J]. *中国比较医学杂志*, 2023, 33(8): 86-94.
JIANG X X, ZHANG K, ZHANG Y. circTLK1 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in mice via the miR-26a-5p/YES1 axis [J]. *Chin J Comp Med*, 2023, 33(8): 86-94.
- [6] XIANG Q, YI X, ZHU X H, et al. Regulated cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35(3): 219-234.
- [7] GU X, NARDONE C, KAMITAKI N, et al. The midnolin-proteasome pathway catches proteins for ubiquitination-independent degradation [J]. *Science*, 2023, 381(6660): eadh5021.
- [8] HAN S, WANG R, ZHANG Y, et al. The role of

- ubiquitination and deubiquitination in tumor invasion and metastasis [J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(6): 2292–2303.
- [9] WANG X, ZHANG X, SONG C P, et al. PUB25 and PUB26 dynamically modulate ICE1 stability *via* differential ubiquitination during cold stress in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2023, 35(9): 3585–3603.
- [10] WANG Y, XU Y, GUO W, et al. Ablation of Shank3 alleviates cardiac dysfunction in aging mice by promoting CaMKII activation and Parkin-mediated mitophagy [J]. *Redox Biol*, 2022, 58: 102537.
- [11] CAI C, TANG Y D, ZHAI J, et al. The RING finger protein family in health and disease [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 300.
- [12] TRACZ M, BIALEK W. Beyond K48 and K63: non-canonical protein ubiquitination [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2021, 26(1): 1.
- [13] WAN D, DU T, HONG W, et al. Neurological complications and infection mechanism of SARS-COV-2 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 406.
- [14] ZHANG J, CHEN W, DU J, et al. RNF130 protects against pulmonary fibrosis through suppressing aerobic glycolysis by mediating c-myc ubiquitination [J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 117: 109985.
- [15] HAN D, WANG F, JIANG Q, et al. Enhancing cardioprotection through neutrophil-mediated delivery of 18 β -glycyrrhetic acid in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2024, 11(42): e2406124.
- [16] ALGOET M, JANSSENS S, HIMMELREICH U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2023, 33(6): 357–366.
- [17] YANG K, GAO R, CHEN H, et al. Myocardial reperfusion injury exacerbation due to ALDH2 deficiency is mediated by neutrophil extracellular traps and prevented by leukotriene C4 inhibition [J]. *Eur Heart J*, 2024, 45(18): 1662–1680.
- [18] QUADER M, CHOLYWAY R, WICKRAMARATNE N, et al. Refining murine heterotopic heart transplantation: a model to study ischemia and reperfusion injury in donation after circulatory death hearts [J]. *Anim Model Exp Med*, 2021, 4(3): 283–296.
- [19] CHEN N, GUO L, WANG L, et al. Sleep fragmentation exacerbates myocardial ischemia-reperfusion injury by promoting copper overload in cardiomyocytes [J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 3834.
- [20] CLIFFORD B L, JARRETT K E, CHENG J, et al. RNF130 regulates LDLR availability and plasma LDL cholesterol levels [J]. *Circ Res*, 2023, 132(7): 849–863.
- [21] ROBERT J, PANTELOGLOU G, VON ECKARDSTEIN A. RNF130 adds further complexity to the regulation of LDL receptor activity [J]. *Circ Res*, 2023, 132(7): 864–866.
- [22] LI P, WANG Y, LIU X, et al. Loss of PARP-1 attenuates diabetic arteriosclerotic calcification *via* Stat1/Runx2 axis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1): 22.
- [23] CAI W, LIU L, SHI X, et al. Alox15/15-HpETE aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury by promoting cardiomyocyte ferroptosis [J]. *Circulation*, 2023, 147(19): 1444–1460.
- [24] WANG J, DU H, XIE W, et al. CAR-macrophage therapy alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Circ Res*, 2024, 135(12): 1161–1174.
- [25] LIU S, BI Y, HAN T, et al. The E3 ubiquitin ligase MARCH2 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through inhibiting pyroptosis *via* negative regulation of PGAM5/MAVS/NLRP3 axis [J]. *Cell Discov*, 2024, 10(1): 24.
- [26] WANG Y T, CHEN G C. Regulation of oxidative stress-induced autophagy by ATG9A ubiquitination [J]. *Autophagy*, 2022, 18(8): 2008–2010.
- [27] FANG Z, HAN J, LIN L, et al. Deubiquitinase OTUD6a drives cardiac inflammation and hypertrophy by deubiquitination of STING [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(4): 167061.
- [28] HU Y, BAI X, ZHANG C, et al. Ubiquitination-activating enzymes UBE1 and UBA6 regulate ubiquitination and expression of cardiac sodium channel Nav1.5 [J]. *Biochem J*, 2020, 477(9): 1683–1700.
- [29] ZHANG N, ZHANG Y, QIAN H, et al. Selective targeting of ubiquitination and degradation of PARP1 by E3 ubiquitin ligase WWP2 regulates isoproterenol-induced cardiac remodeling [J]. *Cell Death Differ*, 2020, 27(9): 2605–2619.
- [30] XU Y, WANG B, LIU X, et al. Sp1 targeted PARP1 inhibition protects cardiomyocytes from myocardial ischemia-reperfusion injury *via* downregulation of autophagy [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 621906.
- [31] ALEMASOVA E E, LAVRIK O I. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(8): 3811–3827.
- [32] ZONG W, GONG Y, SUN W, et al. PARP1: liaison of chromatin remodeling and transcription [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(17): 4162.
- [33] KOŁACZ K, ROBASZKIEWICZ A. PARP1 at the crossroad of cellular senescence and nucleolar processes [J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 94: 102206.