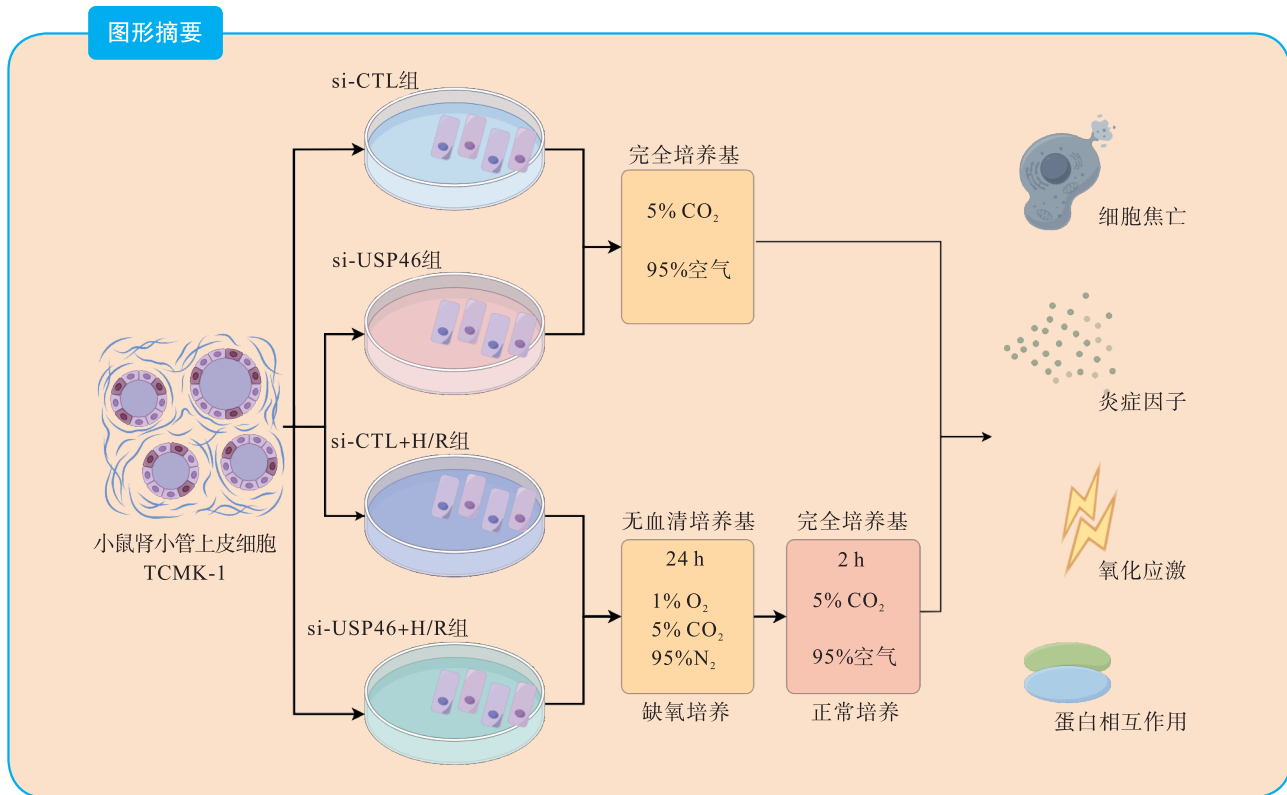


· 论著 ·

下调 USP46 通过抑制 NLRP3 去泛素化减轻细胞焦亡改善肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤

顾世琦 倪海强 彭宣 曹孝天 宫念樵



【摘要】 目的 探讨泛素特异性蛋白酶 46 (USP46) 在缺氧/复氧 (H/R) 诱导的肾小管上皮细胞焦亡中的作用和机制。**方法** 将肾小管上皮细胞分为阴性对照沉默组 (si-CTL 组)、沉默 USP46 组 (si-USP46 组)、阴性对照沉默+H/R 处理组 (si-CTL+H/R 组) 和沉默 USP46+H/R 处理组 (si-USP46+H/R 组)。流式细胞术检测各组细胞凋亡情况, 实时定量聚合酶链反应检测各组 USP46、NOD 样受体蛋白 3 (NLRP3)、消皮素 D (GSDMD)、白细胞介素 (IL)-18、IL-1 β 信使 RNA (mRNA) 表达, 蛋白质印迹法检测各组 USP46、NLRP3、GSDMD、裂解半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (C-Caspase)-1 蛋白表达。检测各组细胞上清中炎症因子和乳酸脱氢酶 (LDH) 表

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2025072

基金项目: 国家自然科学基金 (82170772、82370759)

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院器官移植研究所 器官移植教育部重点实验室 国家卫生健康委员会器官移植重点实验室 中国医学科学院器官移植重点实验室

作者简介: 顾世琦 (ORCID 0009-0002-2137-9710), 硕士研究生, 研究方向为肾移植、缺血-再灌注损伤, Email: gsqgsq1717@163.com

通信作者: 宫念樵 (ORCID 0000-0001-7634-1440), 教授, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为器官移植、移植免疫、干细胞治疗, Email: nqgong@tjh.tjmu.edu.cn

达情况,检测各组细胞活性氧簇(ROS)和丙二醛(MDA)水平。采用免疫共沉淀验证 USP46 和 NLRP3 的蛋白结合情况。**结果** 与 si-CTL 组比较, si-CTL+H/R 组细胞凋亡水平升高, USP46、NLRP3、GSDMD-N、C-Caspase-1 蛋白表达水平升高, USP46、NLRP3、GSDMD、IL-18、IL-1 β mRNA 表达水平升高, IL-18、IL-1 β 、TNF- α 、LDH 水平升高, ROS、MDA 增多(均为 $P < 0.05$); 与 si-CTL+H/R 组相比, si-USP46+H/R 组细胞凋亡水平降低, USP46、NLRP3、GSDMD-N、C-Caspase-1 蛋白表达水平降低, USP46、GSDMD、IL-18 mRNA 表达水平降低, IL-18、IL-1 β 、TNF- α 、LDH 水平降低, ROS、MDA 水平降低(均为 $P < 0.05$)。免疫共沉淀结果显示 USP46 能够和 NLRP3 结合。**结论** 下调 USP46 能够减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞焦亡,其机制可能是通过抑制 USP46 依赖性的 NLRP3 蛋白去泛素化水平,促进 NLRP3 泛素化降解。

【关键词】 肾移植; 缺血-再灌注损伤; 细胞焦亡; 泛素化特异性蛋白酶 46; NOD 样受体蛋白 3; 炎症小体; 去泛素化; 氧化应激

【中图分类号】 R617, R692 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2025) 03-0010-09

Downregulation of USP46 alleviates hypoxia/reoxygenation-induced pyroptosis in renal tubular epithelial cells by inhibiting NLRP3 deubiquitination Gu Shiqi, Ni Haiqiang, Peng Xuan, Cao Xiaotian, Gong Nianqiao. Institute of Organ Transplantation, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Key Laboratory of Organ Transplantation of Ministry of Education, Key Laboratory of Organ Transplantation of National Health Commission of China, Key Laboratory of Organ Transplantation of Chinese Academy of Medical Sciences, Wuhan 430030, China
Corresponding author: Gong Nianqiao, Email: nqgong@tjh.tjmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the role and mechanism of ubiquitin-specific protease 46 (USP46) in hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced pyroptosis of renal tubular epithelial cells. **Methods** Renal tubular epithelial cells were divided into negative control siRNA group (si-CTL group), USP46 knockdown group (si-USP46 group), negative control siRNA + H/R treatment group (si-CTL+H/R group), and USP46 knockdown + H/R treatment group (si-USP46+H/R group). Flow cytometry was used to detect cell apoptosis in each group. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was employed to measure the messenger RNA (mRNA) expression of USP46, NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), gasdermin D (GSDMD), interleukin (IL)-18, and IL-1 β . Western blotting was used to detect the protein expression of USP46, NLRP3, GSDMD, and cleaved cysteinyl aspartate specific proteinase (C-Caspase)-1. The levels of inflammatory factors and lactate dehydrogenase (LDH) in the cell supernatants were detected, and the levels of reactive oxygen species (ROS) and malondialdehyde (MDA) in the cells were detected. Co-immunoprecipitation was used to verify the interaction between USP46 and NLRP3. **Results** Compared with the si-CTL group, the si-CTL+H/R group exhibited increased cell apoptosis, elevated protein expression of USP46, NLRP3, GSDMD-N and C-Caspase-1, increased mRNA expression of USP46, NLRP3, GSDMD, IL-18 and IL-1 β , higher levels of IL-18, IL-1 β , TNF- α and LDH, and increased ROS and MDA levels (all $P < 0.05$). Compared with the si-CTL+H/R group, the si-USP46+H/R group showed decreased cell apoptosis, reduced protein expression of USP46, NLRP3, GSDMD-N and C-Caspase-1, decreased mRNA expression of USP46, GSDMD and IL-18, lower levels of IL-18, IL-1 β , TNF- α and LDH, and decreased ROS and MDA levels (all $P < 0.05$). Co-immunoprecipitation results indicated that USP46 could bind to NLRP3. **Conclusions** Downregulation of USP46 alleviates H/R-induced pyroptosis in renal tubular epithelial cells, possibly by inhibiting USP46-dependent NLRP3 deubiquitination and promoting NLRP3 ubiquitination and degradation.

【Key words】 Kidney transplantation; Ischemia-reperfusion injury; Pyroptosis; Ubiquitin-specific protease 46; NOD-like receptor protein 3; Inflammasome; Deubiquitination; Oxidative stress

肾脏缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是肾移植过程中面临的严重并发症之一^[1],其机制涵盖细胞死亡、氧化应激、内质网应激等多个方面^[2]。其中,细胞焦亡作为 IRI 过程中的重要细胞

死亡方式,也是潜在的治疗靶点之一^[3-5]。细胞焦亡的经典通路是通过核苷酸结合 NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein-3, NLRP3) 炎症小体的组装,募集半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cysteinyl

aspartate specific proteinase, Caspase)-1 形成有酶活性的裂解 Caspase-1 (C-Caspase-1), 引起下游相关炎症因子白细胞介素 (interleukin, IL)-18 和 IL-1 β 的成熟及释放, 同时诱导消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 形成有活性的 N 端剪切体, 在细胞膜上打孔, 引起细胞焦亡^[6]。NLRP3 依赖性细胞焦亡是 IRI 过程中的主要细胞焦亡途径, 干预 NLRP3 对于改善细胞焦亡并减轻其相关下游炎症反应具有重要意义^[7-9]。

泛素化特异性蛋白酶 (ubiquitin specific proteinase, USP) 是细胞生命活动不可或缺的酶之一, 它们能够影响蛋白质泛素化从而促进或抑制蛋白降解, 在多种信号通路传导、自身免疫性疾病、肿瘤等生理病理过程中发挥着重要作用^[10-13]。然而, USP 家族在 IRI 中的作用暂无深入研究, 其中, USP46 作为 USP 家族中的重要成员, 其是否在肾脏 IRI 中发挥作用尚不清楚。因此, 本研究通过建立体外缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型, 探究调控 USP46 对小鼠肾小管上皮细胞 NLRP3 炎症小体和细胞焦亡的影响及可能的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

小鼠肾小管上皮细胞 (TCMK-1) 采购自武汉普诺赛生命科技有限公司。DMEM/F-12 细胞培养基来源于武汉赛维尔生物科技有限公司, 胎牛血清购自长沙赛尔博克斯生物科技有限公司。细胞凋亡及活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒购自杭州联科生物技术有限公司。IP 裂解液、lipo293 转染试剂、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒以及 BCA 蛋白定量试剂盒均采购自上海碧云天生物技术有限公司。RNA 抽提试剂盒购自上海飞捷有限公司, protein A/G 磁珠由苏州海狸生物提供。NLRP3 抗体购自武汉博士德生物公司, USP46 抗体、 β -actin 抗体、Flag 标签抗体、HA 标签抗体以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗购自武汉爱博泰克生物科技有限公司, GSDMD-N、C-Caspase-1 抗体采购自英国 Abcam 公司。IL-18、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA) 试剂盒购自深圳市达科为生物技术股份有限公司。乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒购

自上海科艾博生物公司。逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒来源于南京诺唯赞生物科技股份有限公司。聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物由武汉奥科鼎盛公司合成, USP46 小干扰 RNA 由武汉金开瑞公司合成, HA-USP46 和 Flag-NLRP3 的过表达质粒由上海和元生物公司构建合成。所有动物实验均经同济医院实验动物福利与伦理委员会批准 (批号: TJH-202207003), 并遵守中华人民共和国科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》。

1.2 实验分组与处理

1.2.1 实验分组 将 TCMK-1 细胞培养在添加了 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 完全培养基内, 放置在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。当细胞生长至融合率达到 80%~90% 时, 开展传代操作。实验共设置 4 个组别: 转染小干扰 RNA 阴性对照组 (si-CTL 组); 转染靶向 USP46 小干扰 RNA 组 (si-USP46 组); 转染小干扰 RNA 阴性对照后进行 H/R 处理组 (si-CTL+H/R 组); 转染靶向 USP46 小干扰 RNA 后进行 H/R 处理组 (si-USP46+H/R 组)。将 TCMK-1 细胞传代, 待细胞达到 70% 融合度后分别设置 NC 组和 H/R 组, 不进行任何处理或进行 H/R 处理后收集细胞。

1.2.2 H/R 模型建立 当细胞培养至融合率达到 60%~70% 时, 将培养基更换为无血清培养基, 随后放置于三气缺氧箱中继续培养 24 h, 以模拟缺氧环境 (箱内气体成分为 1% O₂、5% CO₂、94% N₂), 而常氧细胞则在标准培养条件下持续培养。待缺氧结束后, 将缺氧细胞与常氧细胞的培养基均更换为新鲜培养基, 并在常规细胞培养箱中再培养 2 h, 进行各项检测分析。

1.2.3 siRNA 转染 在细胞融合率达到 70%~80% 时进行 USP46 小干扰 RNA 及阴性对照小干扰 RNA 转染, 以 6 孔板每孔 200 pmol 小干扰 RNA 转染量转染细胞, 48 h 后即可检测转染效率和基因调控效果。小鼠 USP46 干扰序列为 5'-GCAUUAACAUCACCAUCGUAAATT-3'。

1.3 研究内容与方法

1.3.1 实时定量聚合酶链反应 使用 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA, 通过逆转录试剂盒逆转录为互补 DNA (complementary DNA, cDNA)。使用 SYBR Green 预混料配置成相应体系进行扩增, 检测各组 USP46、NLRP3、GSDMD、IL-18、IL-1 β 信使

RNA (messenger RNA, mRNA) 表达水平。引物序列见表 1。

1.3.2 蛋白质印迹法 提取各组细胞总蛋白, 利用 BCA 蛋白测定试剂盒进行定量。电泳分离后采用湿转的方法进行转膜。转膜完成后, 于室温下用含 5% 脱脂奶粉的封闭液封闭 60 min。封闭结束且经过洗涤后, 将膜与对应一抗在 4 °C 摇床上孵育过夜。次日洗涤后加入二抗室温孵育 60 min, 之后依次进行清洗、显影以及图片曝光采集, 检测 USP46、NLRP3、GSDMD、C-Caspase-1 蛋白的表达情况。

1.3.3 细胞凋亡检测 对细胞进行消化并收集, 离心后弃去上清液, 再用磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 洗涤细胞 3 次。之后, 依据说明书加入异硫氰酸荧光素-Annexin V 和碘化丙啶溶液, 在避光环境下孵育 10 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡水平。

1.3.4 ROS 检测 使用 ROS 荧光探针试剂盒检测 ROS。消化收集细胞后离心弃上清, 用 PBS 洗涤 3 次, 将 ROS 荧光探针加入细胞中, 放置于 37 °C 细胞培养箱孵育 30 min, 在流式细胞仪器上机检测。

1.3.5 LDH 检测 收集各组细胞上清, 13 000×g, 4 °C 离心 10 min 后使用 LDH 检测试剂盒检测细胞上清, 根据标准曲线计算细胞上清 LDH 含量。

1.3.6 细胞因子检测 收集各组细胞上清, 13 000×g, 4 °C 离心 10 min 后使用 ELISA 试剂盒, 按照说明书检测细胞上清 IL-18、IL-1β、TNF-α 含量。

1.3.7 MDA 检测 细胞培养造模结束后, 收集各组细胞, 用 MDA 检测试剂盒按照说明书检测 MDA 含量。

1.3.8 免疫共沉淀实验 使用 DMEM 完全培养基将工具细胞 293T 培养达到融合率 50%~60% 左右, 使用 lipo293 转染试剂分别转入 Flag-NLRP3、HA-USP46 以及 Flag-NLRP3+HA-USP46 的质粒, 48 h 后通过荧

光显微镜检测转染效率, 确认转染效率在 50% 以上后, 弃掉培养基并用预冷 PBS 润洗, 在冰上使用 IP 裂解液裂解细胞 15 min, 收集细胞裂解液于 EP 管中, 冷库旋转摇床充分裂解 30 min 后 13 000×g 4 °C 离心 15 min, 收集上清, 留取 Input 组, 使用磁珠和标签抗体过夜冷库孵育后离心留下磁珠, 进行蛋白质印迹检测。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism8 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料采用均数±标准差表示, 采用独立样本 *t* 检验或单因素方差分析进行比较分析。对于多个分组的数据, 使用 student's *t* 检验进行两组间差异比较和分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H/R 处理肾小管上皮细胞后, USP46 表达升高

与 NC 组相比, H/R 组 USP46 mRNA 和蛋白相对表达量均升高 (均为 *P*<0.001, 图 1A~C)。与 si-CTL 组相比, si-USP46 组 USP46 mRNA 和蛋白相对表达量均降低 (均为 *P*<0.001, 图 1D~F)。

2.2 下调 USP46 减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞焦亡

流式细胞术结果显示, 与 si-CTL 组比较, si-CTL+H/R 组细胞凋亡水平较高; 与 si-CTL+H/R 组比较, si-USP46+H/R 组细胞凋亡水平降低, 差异均有统计学意义 (均为 *P*<0.05, 图 2A)。

蛋白质印迹法结果显示, 与 si-CTL 组相比, si-CTL+H/R 组 USP46、NLRP3、GSDMD-N、C-Caspase-1 蛋白表达量升高; 与 si-CTL+H/R 组比较, si-USP46+H/R 组 USP46、NLRP3、GSDMD-N、C-Caspase-1 蛋白表达量降低 (均为 *P*<0.05, 图 2B)。

RT-qPCR 结果显示, 与 si-CTL 组比较, si-CTL+

表 1 引物序列

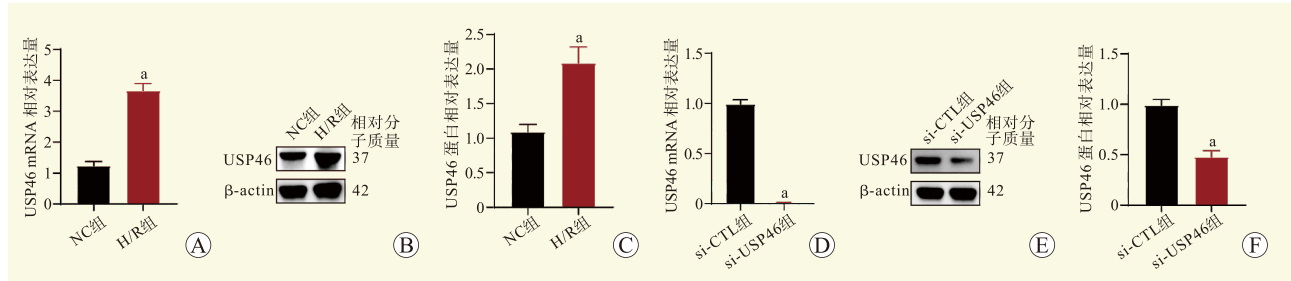
Table 1 Primer sequences

基因名称	正义链	反义链
USP46	5'-CAACACATTCTCCCGGAACG-3'	5'-TGACTGTCCGAAACATCGCC-3'
NLRP3	5'-TTCGGAGATTGTGGTTGGG-3'	5'-GTCACCGAGGGCGTTGTC-3'
GSDMD	5'-GCCCTCAAGCTCATGGTTCT-3'	5'-AGTCAATAACCAGCTGGGCC-3'
IL-18	5'-GACTCTTGCCTCAACTTCAAGG-3'	5'-CAGGCTGTCTTTTGCAACGA-3'
IL-1β	5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3'	5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3'
β-actin	5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'	5'-TACCACCATGTACCCAGGCA-3'

H/R 组 USP46、NLRP3、GSDMD、IL-18、IL-1 β mRNA 相对表达量升高；与 si-CTL+H/R 组比较，si-USP46+H/R 组 USP46、GSDMD、IL-18 mRNA 相对表达量减少（均为 $P < 0.05$ ，图 2C）。

2.3 下调 USP46 减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞炎症反应

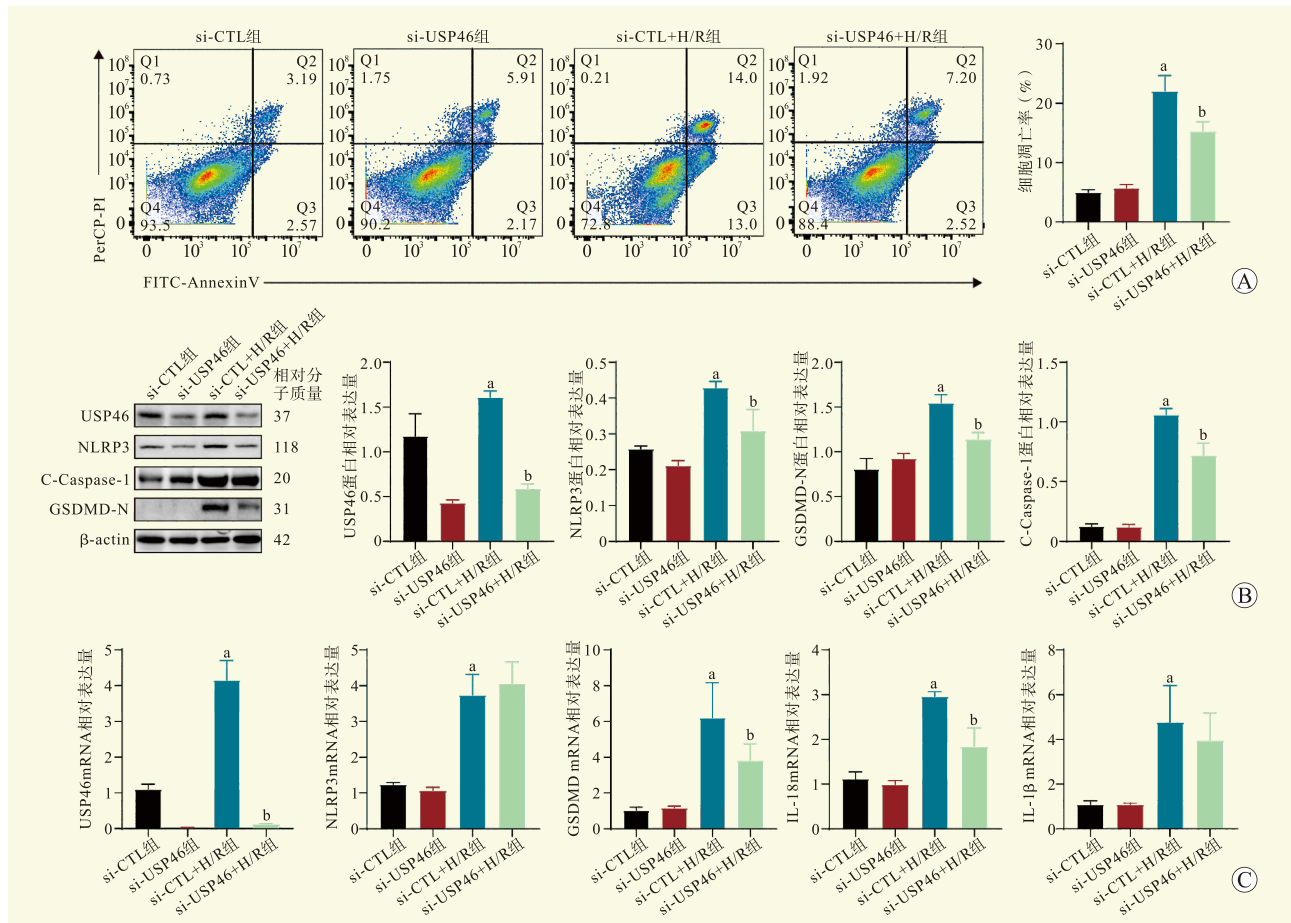
ELISA 结果显示，与 si-CTL 组相比，si-CTL+H/R 组 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 、LDH 水平升高；与 si-



注：A 图为 NC 组和 NC+H/R 组 USP46 mRNA 相对表达量；B 图为 NC 组和 NC+H/R 组蛋白质印迹法结果；C 图为 NC 组和 NC+H/R 组 USP46 蛋白相对表达量；D 图为 si-CTL 组和 si-USP46 组 USP46 mRNA 相对表达量；E 图为 si-CTL 组和 si-USP46 组蛋白质印迹法结果；F 图为各组 USP46 蛋白相对表达量。与 NC 组相比，^a $P < 0.001$ ；与 si-CTL 组相比，^a $P < 0.001$ 。

图 1 H/R 对肾小管上皮细胞 USP46 表达的影响

Figure 1 The effect of H/R on USP46 expression in renal tubular epithelial cells



注：A 图为流式细胞术检测各组细胞凋亡；B 图为蛋白质印迹法检测各组 USP46 及细胞焦亡相关蛋白表达；C 图为 RT-qPCR 法检测各组 USP46 及细胞焦亡相关基因表达。与 si-CTL 组相比，^a $P < 0.05$ ；与 si-CTL+H/R 组相比，^b $P < 0.05$ 。

图 2 下调 USP46 减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞细胞焦亡

Figure 2 Downregulation of USP46 alleviates H/R induced pyroptosis in renal tubular epithelial cells

CTL+H/R 组相比, si-USP46+H/R 组 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 、LDH 水平下降, 差异均有统计学意义 (均为 $P < 0.05$, 图 3)。

2.4 下调 USP46 减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞氧化应激

流式细胞术结果显示, 与 si-CTL 组比较, si-CTL+H/R 组 ROS 水平升高; 与 si-CTL+H/R 组比较, si-USP46+H/R 组 ROS 水平均降低 (均为 $P < 0.001$, 图 4A)。

MDA 检测结果显示, 与 si-CTL 组比较, si-CTL+H/R 组的 MDA 水平升高; 与 si-CTL+H/R 组比较, si-USP46+H/R 组 MDA 水平降低 (均为 $P < 0.001$, 图 4B)。

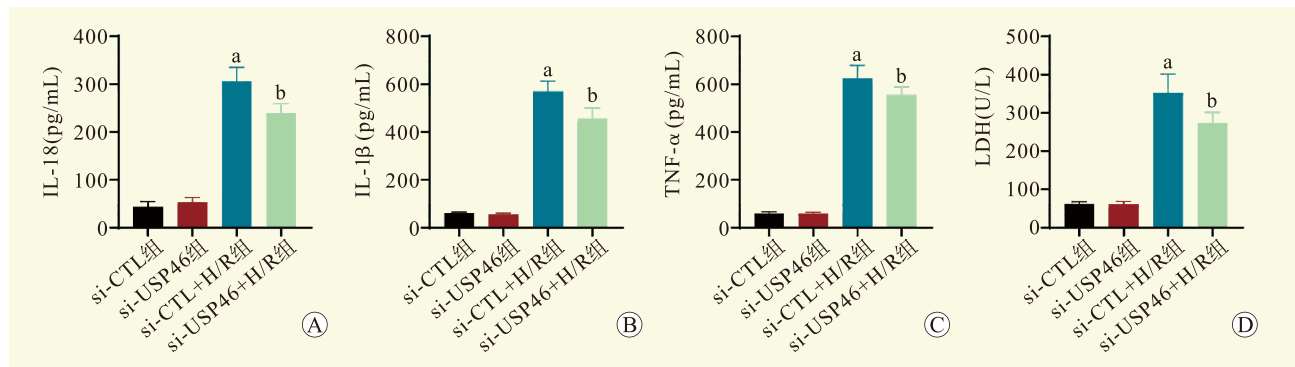
2.5 USP46 和 NLRP3 蛋白质相互作用

3 组转染 Flag-NLRP3、HA-USP46 和 Flag-NLRP3+HA-USP46 质粒的工具细胞均成功过表达

Flag-NLRP3、HA-USP46 和 Flag-NLRP3+HA-USP46 蛋白。共转染 Flag-NLRP3+HA-USP46 的细胞裂解液中, 使用 Flag 为 IP 抗体和磁珠结合后再次进行蛋白质印迹实验, 使用 HA 标签抗体为一抗, 证明 Flag-NLRP3 能够和 HA-USP46 结合 (图 5A); 在共转染 Flag-NLRP3+HA-USP46 的细胞裂解液中, 使用 HA 为 IP 抗体和磁珠结合后再次进行蛋白质印迹实验, 使用 HA 标签抗体为一抗, 证明 HA-USP46 能够 and Flag-NLRP3 结合 (图 5B)。

3 讨论

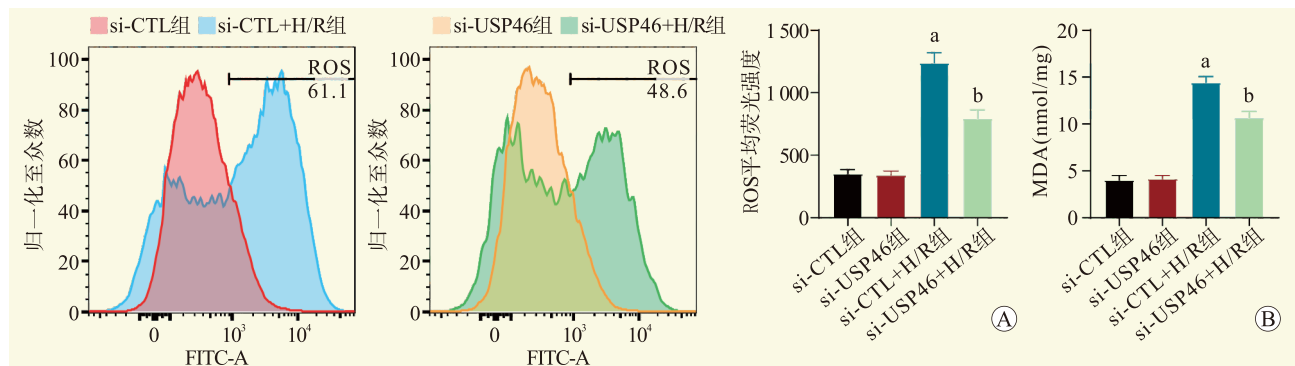
肾移植是治疗终末期肾病的有效手段, 而肾移植过程中难以避免的 IRI 可导致多种方式的细胞死亡, 最终引起移植肾功能延迟恢复和预后不良^[14-15], 如何减轻 IRI 成为临床医师面临的一大难题。本研究通过构建肾小管上皮细胞 H/R 模型, 模拟肾脏 IRI 的病理



注: 图 A 为各组细胞上清中 IL-18 含量; B 图为各组细胞上清中 IL-1 β 含量; C 图为各组细胞上清中 TNF- α 含量; 图 D 为各组细胞上清中 LDH 含量。与 si-CTL 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 si-CTL+H/R 组相比, ^b $P < 0.05$ 。

图 3 下调 USP46 减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞炎症反应

Figure 3 Downregulation of USP46 alleviates H/R induced inflammation in renal tubular epithelial cells



注: A 图为流式细胞术检测各组 ROS 平均表达量; B 图为各组 MDA 检测结果。与 si-CTL 组相比, ^a $P < 0.001$; 与 si-CTL+H/R 组相比, ^b $P < 0.001$ 。

图 4 下调 USP46 减轻 H/R 诱导的肾小管上皮细胞氧化应激

Figure 4 Downregulating USP46 alleviates H/R induced oxidative stress in renal tubular epithelial cells

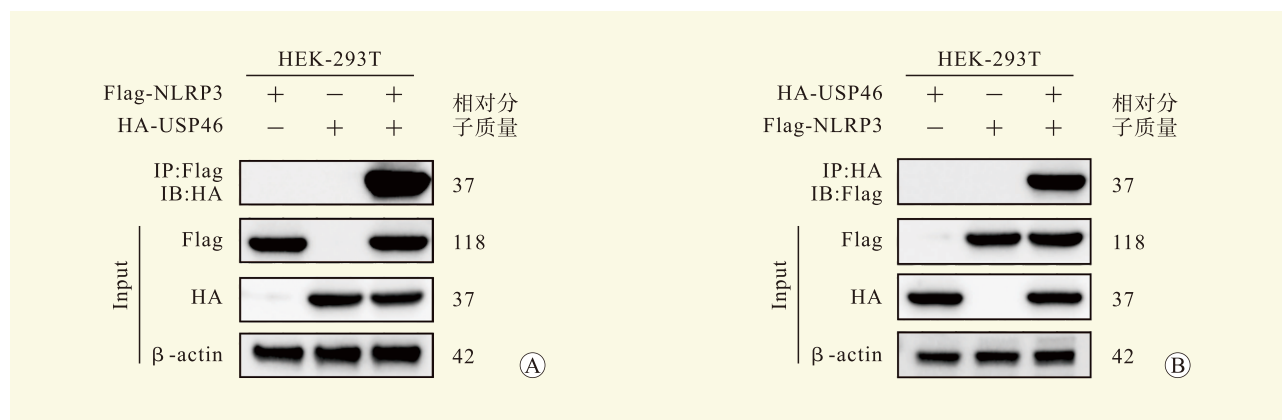


图 5 USP46 和 NLRP3 蛋白质相互作用

Figure 5 The interaction between USP46 and NLRP3 proteins

生理过程，发现 H/R 能够引起细胞焦亡，尤其是 NLRP3 介导的经典细胞焦亡途径，且 USP46 在蛋白和转录水平均升高，下调 USP46 则可能通过抑制 NLRP3 去泛素化减轻肾小管上皮细胞焦亡。

细胞焦亡是 IRI 中一种重要的细胞死亡方式，大量研究也针对细胞焦亡的经典通路——NLRP3 炎症小体依赖性的细胞焦亡，将 NLRP3 作为靶点改善 IRI 和急性肾损伤^[16-17]。研究发现，在造影剂诱导的急性肾损伤中，抑制 NLRP3 活性起到了明显的保护效应^[18]。针对 NLRP3 的新药研发也取得了一定进展^[19-20]。本团队前期研究也证实通过调控上游转录因子 X 盒结合蛋白 1 (X-box binding protein 1, XBP1) 可以调控 NLRP3 表达改善 IRI，这也是具有潜力的治疗方式之一^[21]。本研究通过沉默 USP46 来减少 NLRP3 表达，不仅减少细胞焦亡，也降低了氧化应激水平和炎症因子表达，这也证明针对 NLRP3 靶点治疗肾脏 IRI 的潜在价值。

本研究通过建立 24 h 缺氧 2 h 复氧模型，确认了 TCMK 细胞造模形成细胞焦亡的可能条件。既往研究以及综合本课题组前期研究表明^[22-23]，缺氧 24 h 后 TCMK 细胞会发生较严重的细胞死亡，而 12 h 及以下的缺氧后细胞死亡较少，且 36 h 以上的缺氧细胞融合度超过 90%，细胞状态受到影响，因此选取 24 h 作为缺氧造模时间以促进细胞焦亡；对于复氧时间我们在预实验中发现，使用完全培养基复氧 2 h 以上后，TCMK 细胞活力恢复，出现了一定程度的细胞死亡减少，因此我们选取 2 h 作为我们造模的终点。

NLRP3 存在多个结构域^[24-26]。本研究中，在工具细胞里外源性转入过表达 USP46 和 NLRP3 的质粒，

通过免疫共沉淀证明了 USP46 和 NLRP3 可能存在蛋白质直接结合，由此说明 USP46 可能对于 NLRP3 存在去泛素化效应。但对于 USP46 在 NLRP3 蛋白质上具体的结合位点并未进行深入讨论。同时有文献表明，USP46 作为一种去泛素化酶并不单独发挥作用，而是和伴侣蛋白 UAF1 等一起组成去泛素化酶复合物产生作用，我们猜想 USP46/UAF1 去泛素化复合物可能一起与 NLRP3 蛋白作用从而发挥去泛素化效应^[27]，但仍需进行深入实验验证。此外，本研究未深入探讨 USP46 针对 NLRP3 泛素化水平的具体影响，我们发现下调 USP46 对于 NLRP3 的转录水平并没有明显的影响，需进一步排除 USP46 是否能够通过泛素化以外的途径影响 NLRP3 蛋白水平。

USP46 作为一种去泛素化酶广泛参与细胞病理生理活动之中，近年来，USP46 在抑郁症、肿瘤等病理过程和多种信号通路中的作用逐渐被揭示^[28-34]。既往研究者发现，USP 家族中的许多分子如 USP1、USP12 等可以通过去泛素化的方式直接减少 NLRP3 泛素化降解^[35-36]；也有学者发现 USP5、USP22 可能通过间接途径，以去泛素化调控自噬蛋白的方式影响 NLRP3 的翻译后修饰^[37-38]；还有研究团队发现 USP46 可能参与心脏 IRI 的过程^[32]。本研究提示下调 USP46 对 IRI 可能具有改善作用，而 USP46 能否通过其他途径改善肾脏 IRI 和减轻细胞焦亡仍需继续探索。

综上所述，IRI 可促进 USP46 和 NLRP3 的高表达，引起细胞焦亡。下调 USP46 表达可能通过减少 NLRP3 去泛素化，从而增加 NLRP3 泛素化降解，减轻细胞焦亡和氧化应激。这一研究结果可能为临床工

作中治疗 IRI 和保护肾功能提供新的理论基础和研究方向, 未来有望针对 USP46 开发更多新药和寻找具有临床潜力的治疗方法。但肾小管上皮细胞 H/R 模型无法完全模拟体内肾脏 IRI 的病理过程, 后续仍然需要补充动物体内实验以验证下调 USP46 对 IRI 肾脏的保护效应。

参考文献:

- [1] THUILLIER R. Molecular frontiers in transplantation-induced ischemia-reperfusion injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3450. DOI: 10.3390/ijms24043450.
- [2] YUAN J, OFENGEIM D. A guide to cell death pathways[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2024, 25(5): 379-395. DOI: 10.1038/s41580-023-00689-6.
- [3] SANZ A B, SANCHEZ-NIÑO M D, RAMOS A M, et al. Regulated cell death pathways in kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(5): 281-299. DOI: 10.1038/s41581-023-00694-0.
- [4] LI N, WANG Y, WANG X, et al. Pathway network of pyroptosis and its potential inhibitors in acute kidney injury[J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175: 106033. DOI: 10.1016/j.phrs.2021.106033.
- [5] BERTHELOOT D, LATZ E, FRANKLIN B S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1106-1121. DOI: 10.1038/s41423-020-00630-3.
- [6] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 128. DOI: 10.1038/s41392-021-00507-5.
- [7] MRIDHA A R, WREE A, ROBERTSON A A B, et al. NLRP3 inflammasome blockade reduces liver inflammation and fibrosis in experimental NASH in mice[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(5): 1037-1046. DOI: 10.1016/j.jhep.2017.01.022.
- [8] LI X, YUAN F, XIONG Y, et al. FAM3A plays a key role in protecting against tubular cell pyroptosis and acute kidney injury[J]. *Redox Biol*, 2024, 74: 103225. DOI: 10.1016/j.redox.2024.103225.
- [9] LI Y, HUANG H, LIU B, et al. Inflammasomes as therapeutic targets in human diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 247. DOI: 10.1038/s41392-021-00650-z.
- [10] MENNERICH D, KUBAICHUK K, KIETZMANN T. DUBs, hypoxia, and cancer[J]. *Trends Cancer*, 2019, 5(10): 632-653. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.08.005.
- [11] 杨静, 张丽璇, 张晨钰, 等. 部分泛素特异性蛋白酶生物学功能的研究进展[J]. *中国医学创新*, 2024, 21(1): 149-154. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2024.01.036.
YANG J, ZHANG L X, ZHANG C Y, et al. Research progress in biological functions of partial ubiquitin-specific proteases[J]. *Med Innov China*, 2024, 21(1): 149-154. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4985.2024.01.036.
- [12] DAGAR G, KUMAR R, YADAV K K, et al. Ubiquitination and deubiquitination: implications on cancer therapy[J]. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, 2023, 1866(4): 194979. DOI: 10.1016/j.bbagr.2023.194979.
- [13] GAO H, YIN J, JI C, et al. Targeting ubiquitin specific proteases (USPs) in cancer immunotherapy: from basic research to preclinical application[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2023, 42(1): 225. DOI: 10.1186/s13046-023-02805-y.
- [14] PEFANIS A, IERINO F L, MURPHY J M, et al. Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2019, 96(2): 291-301. DOI: 10.1016/j.kint.2019.02.009.
- [15] ZHAO H, ALAM A, SOO A P, et al. Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond[J]. *EBioMedicine*, 2018, 28: 31-42. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.01.025.
- [16] 房尚萍, 孙任珂, 苏慧, 等. 绿原酸减轻脓毒症诱导的小鼠急性肾损伤: 基于抑制 Caspase-1 经典细胞焦亡信号通路[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(2): 317-323. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2024.02.14.
FANG S P, SUN R K, SU H, et al. Chlorogenic acid alleviates acute kidney injury in septic mice by inhibiting NLRP3 inflammasomes and the Caspase-1 canonical pyroptosis pathway[J]. *J South Med Univ*, 2024, 44(2): 317-323. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2024.02.14.
- [17] YE Z, ZHANG J, XU Z, et al. Pioglitazone ameliorates ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury via oxidative stress attenuation and NLRP3 inflammasome[J]. *Hum Cell*, 2024, 37(4): 959-971. DOI: 10.1007/s13577-024-01059-w.
- [18] LIN Q, LI S, JIANG N, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1A and BNIP3-mediated mitophagy[J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 2975-2990. DOI: 10.1080/15548627.2020.1848971.
- [19] TAPIA-ABELLÁN A, ANGOSTO-BAZARRA D, MARTÍNEZ-BANACLOCHA H, et al. MCC950 closes the active conformation of NLRP3 to an inactive state[J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15(6): 560-564. DOI: 10.1038/s41589-019-0278-6.
- [20] 李陈广, 麦凤怡, 梁靖蓉, 等. NLRP3 炎症小体抑制剂的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(10): 1801-1808. DOI: 10.12360/CPB202306061.
LI C G, MAI F Y, LIANG J R, et al. Research progress of NLRP3 inflammasome inhibitors[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2024, 40(10): 1801-1808. DOI: 10.12360/CPB202306061.
- [21] NI H, OU Z, WANG Y, et al. XBP1 modulates endoplasmic reticulum and mitochondria crosstalk via regulating NLRP3 in renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 69. DOI: 10.1038/s41420-023-01360-x.
- [22] ZHU K, SUN S, LI Z, et al. METTL3 promotes renal ischemia-reperfusion injury by modulating miR-374b-5p/SRSF7 axis[J]. *FASEB J*, 2025, 39(3): e70320. DOI: 10.1096/fj.202402443R.
- [23] ZHANG J, ZHANG J, NI H, et al. Downregulation of XBP1 protects kidney against ischemia-reperfusion injury via suppressing HRD1-mediated NRF2 ubiquitylation[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 44. DOI: 10.1038/s41420-021-00425-z.
- [24] MA Q. Pharmacological inhibition of the NLRP3 inflammasome: structure, molecular activation, and

- inhibitor-NLRP3 interaction[J]. *Pharmacol Rev*, 2023, 75(3): 487-520. DOI: 10.1124/pharmrev.122.000629.
- [25] FU J, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316. DOI: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207.
- [26] PAIK S, KIM J K, SILWAL P, et al. An update on the regulatory mechanisms of NLRP3 inflammasome activation[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1141-1160. DOI: 10.1038/s41423-021-00670-3.
- [27] XU H, CHEN J, CHEN P, et al. Costunolide covalently targets NACHT domain of NLRP3 to inhibit inflammasome activation and alleviate NLRP3-driven inflammatory diseases[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, 13(2): 678-693. DOI: 10.1016/j.apsb.2022.09.014.
- [28] KIRAN S, DAR A, SINGH S K, et al. The deubiquitinase USP46 is essential for proliferation and tumor growth of HPV-transformed cancers[J]. *Mol Cell*, 2018, 72(5): 823-835. DOI:10.1016/j.molcel.2018.09.019.
- [29] NG V H, SPENCER Z, NEITZEL L R, et al. The USP46 complex deubiquitylates LRP6 to promote Wnt/ β -catenin signaling[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6173. DOI: 10.1038/s41467-023-41836-z.
- [30] SPENCER Z T, NG V H, BENCHABANE H, et al. The USP46 deubiquitylase complex increases Wntless/Wnt signaling strength by stabilizing Arrow/LRP6[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 6174. DOI: 10.1038/s41467-023-41843-0.
- [31] SHU J, YANG C, MIAO Y, et al. USP46 promotes the interferon antiviral signaling in black carp by deubiquitinating TBK1[J]. *Dev Comp Immunol*, 2024, 156: 105170. DOI: 10.1016/j.dci.2024.105170.
- [32] YE X, HANG Y, LU Y, et al. CircRNA circ-NNT mediates myocardial ischemia/reperfusion injury through activating pyroptosis by sponging miR-33a-5p and regulating USP46 expression[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 370. DOI: 10.1038/s41420-021-00706-7.
- [33] YU K, WANG G M, GUO S S, et al. The USP12/46 deubiquitinases protect integrins from ESCRT-mediated lysosomal degradation[J]. *EMBO Rep*, 2024, 25(12): 5687-5718. DOI: 10.1038/s44319-024-00300-9.
- [34] GAO S, WANG Y, XU Y, et al. USP46 enhances tamoxifen resistance in breast cancer cells by stabilizing PTBP1 to facilitate glycolysis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2024, 1870(3): 167011. DOI: 10.1016/j.bbadis.2023.167011.
- [35] SONG H, ZHAO C, YU Z, et al. UAF1 deubiquitinase complexes facilitate NLRP3 inflammasome activation by promoting NLRP3 expression[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 6042. DOI: 10.1038/s41467-020-19939-8.
- [36] ZHU Y, ZHANG M, WANG J, et al. Knockdown of UAF1 alleviates sevoflurane-induced cognitive impairment and neurotoxicity in rats by inhibiting pro-inflammatory signaling and oxidative stress[J]. *J ToxicolSci*, 2022, 47(9): 349-357. DOI: 10.2131/jts.47.349.
- [37] CAI B, ZHAO J, ZHANG Y, et al. USP5 attenuates NLRP3 inflammasome activation by promoting autophagic degradation of NLRP3[J]. *Autophagy*, 2022, 18(5): 990-1004. DOI: 10.1080/15548627.2021.1965426.
- [38] DI Q, ZHAO X, TANG H, et al. USP22 suppresses the NLRP3 inflammasome by degrading NLRP3 via ATG5-dependent autophagy[J]. *Autophagy*, 2023, 19(3): 873-885. DOI: 10.1080/15548627.2022.2107314.

(收稿日期: 2025-01-25)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)