

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.18.005

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200814.1232.004.html\(2020-08-14\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200814.1232.004.html(2020-08-14))

JMJD3 对小鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响研究^{*}

周 强^{1,2}, 邓明华¹, 吴涯昆³, 龚建平^{1△}

(1. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科 400010; 2. 重庆市高新区人民医院
普外科 400039; 3. 四川省遂宁市中心医院肝胆外科 629380)

[摘要] **目的** 探讨含十字形结构域蛋白 3(JMJD3)在小鼠肝脏缺血再灌注损伤(IRI)时的作用,并探究抑制 JMJD3 能否减轻小鼠肝脏 IRI。**方法** 建立小鼠 IRI 模型,Western blot、免疫组织化学检测 JMJD3 的表达及定位;建立 AML-12 肝细胞的缺氧复氧损伤模型,Western blot 检测 JMJD3 的蛋白水平变化情况;用 ShRNA 沉默 AML-12 肝细胞中的 JMJD3,CCK-8 检测沉默 JMJD3 对 AML-12 细胞活力的影响,同时抑制 C-jun 氨基末端激酶(JNK)的活性进一步探究 JNK-p53 信号通路是否调控 JMJD3;在小鼠 IRI 模型中验证 GSK-J4 预处理抑制 JMJD3 对肝脏 IRI 的作用。**结果** 小鼠肝脏 IRI 能导致 JMJD3 的表达增加,且 JMJD3 主要表达于肝细胞中,缺氧复氧损伤也能导致 AML-12 蛋白水平增加。沉默 JMJD3 能减轻缺氧复氧损伤导致的 AML-12 的凋亡,且 JMJD3 受 JNK-p53 信号通路调控。在小鼠 IRI 模型中,GSK-J4 预处理能明显减轻 IRI 6、24 h 后血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平,苏木素-伊红(HE)和 TUNEL 染色发现抑制 JMJD3 能缓解 IRI 6 h 病理改变和降低肝细胞凋亡。**结论** 抑制 JMJD3 能减轻小鼠肝脏 IRI,JMJD3 受 JNK-p53 信号通路调控。

[关键词] 含十字形结构域蛋白 3;肝;再灌注损伤;JNK;基因;p53

[中图法分类号] R392.4;R657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)18-2991-06

Study on the effect of JMJD3 on liver ischemia-reperfusion injury in mice^{*}

ZHOU Qiang^{1,2}, DENG Minghua¹, WU Yakun³, GONG Jianping^{1△}

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Department of General Surgery, People's Hospital of Chongqing Hi-tech District, Chongqing 400039, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Suining Central Hospital, Suining, Sichuan 629308, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the role of Jumonji domain-containing protein 3 (JMJD3) in the mouse liver ischemia reperfusion injury (IRI), and whether inhibition of JMJD3 could alleviate liver IRI. **Methods** Established the mice IRI model, Western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression and location of JMJD3. Established a hypoxia-reoxygenation injury model of AML-12 hepatocytes, Western blot was used to detect changes in the protein level of JMJD3; Silenced JMJD3 in AML-12 cell with ShRNA, CCK-8 was used to detect the effect of silencing JMJD3 on the cell viability of AML-12, while inhibiting the activity of C-jun N-terminal kinase (JNK) to further explore whether the JNK-p53 signaling pathway regulating JMJD3. Verified that GSK-J4 pretreatment inhibited the effect of JMJD3 on liver IRI in the mice IRI model. **Results** Mice liver IRI increased the expression of JMJD3, and JMJD3 was mainly expressed in liver cells. Hypoxia and reoxygenation injury could also lead to an increase in AML-12 protein levels. Silencing JMJD3 reduced the apoptosis of AML-12 caused by hypoxia and reoxygenation injury, and JMJD3 was regulated by the JNK-p53 signaling pathway. In the mice IRI model, GSK-J4 pretreatment significantly reduced the levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) after 6 and 24 hours of IRI, and hematoxylin-eosin (HE) staining and TUNEL staining found that inhibiting JMJD3 could alleviate the pathological changes of IRI 6 h and reduce hepatocyte apoptosis. **Conclusion** Inhibition of JMJD3 could alleviate mouse liver IRI, JMJD3 is regulated by JNK-p53 pathway.

^{*} 基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81600504)。 作者简介:周强(1971—),副主任医师,本科,主要从事肝脏疾病研究。
[△] 通信作者, E-mail: gongjianping11@126.com。

[Key words] Jumonji domain-containing protein 3; liver; reperfusion injury; JNK; genes, p53

肝移植是目前治疗终末期肝脏疾病最有效的方法,肝脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)能引起肝细胞功能异常和肝脏结构紊乱,并导致约 10% 的早期肝移植失败,增加急性和慢性排斥反应的发生率^[1]。IRI 的发生机制十分复杂,可能与活性氧产生、细胞凋亡、钙离子超载及大量炎性细胞浸润导致的炎性反应有关,这些机制在肝脏缺血的过程中开始出现,并在血液再灌注后进一步加重^[2]。IRI 能导致肝细胞凋亡,凋亡的肝细胞能产生高迁移率族蛋白 1(high-mobility group box 1, HMGB1)、三磷酸腺苷(ATP)、核酸等危险相关分子模式(danger-associated molecular patterns, DAMP),进而引起炎性细胞浸润,并产生大量炎性因子,而炎性因子又进一步加重肝细胞凋亡^[3]。大量研究也发现抑制肝细胞凋亡能减轻 IRI^[4-5]。含十字形结构域蛋白 3(Jumonji domain-containing protein 3, JMJD3)是一种特异性去甲基化酶,能特异性去除组蛋白 3 第 27 位赖氨酸的三甲基化(H3K27me3)状态,解除其对基因表达的抑制作用^[6]。有研究报道, JMJD3 能直接去除促凋亡蛋白含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3 和 Bax 的基因启动子区 H3K27me3,上调 Caspase-3 和 Bax 的表达,促进细胞凋亡,抑制 JMJD3 能增加细胞活性,降低细胞凋亡的发生率^[7]。而 JMJD3 在肝脏缺血再灌注过程中作用尚未报道,本研究通过建立小鼠 IRI 模型,探讨 JMJD3 在肝脏 IRI 过程中发挥的作用,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8~10 周龄 BALB/c 雄性小鼠 40 只,体重 16~22 g,购于重庆医科大学动物实验中心,饲养于重庆医科大学实验动物中心无特殊病原体(SPF)实验室,予以正常昼夜光照及饮食、饮水。实验过程中所有操作遵守重庆医科大学伦理委员会发布的伦理及管理指南。

1.1.2 试剂

JMJD3 抑制剂 GSK-J4、C-jun 氨基末端激酶(c-Jun NH2-terminal kinase, JNK)抑制剂 JNK-IN-7、二甲亚砜(DMSO)购自美国 MCE 公司; JMJD3 抗体购于美国赛默飞公司; cleaved-Caspase-3、Bcl2、Bax、GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司; p53、p-p53、JNK、p-JNK 抗体购自美国 CST 公司;膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)双染细胞凋亡检测试剂盒购自上海博谷生物科技有限公司;总蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天公司;包被 JMJD3 的 ShRNA

的慢病毒购自上海吉凯基因生物公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 IRI 模型建立及分组

术前 12 h 小鼠禁食,自由饮水。采用异氟烷吸入麻醉方式,麻醉成功后,将小鼠固定,腹部予以碘伏消毒,采取腹部正中切口打开腹腔,暴露肝脏门静脉、肝动脉,小血管夹夹闭左门静脉和中门静脉分支,90 min 后重新恢复血供,并再灌注 6、24 h 后处死小鼠,并采集肝脏及血液标本,血液予以离心收集血清, -80 °C 保存。假手术(Sham)组小鼠($n=10$)仅予以开腹和门静脉暴露。IRI 组($n=10$)小鼠予以 IRI 处理。IRI+GSK-J4 组小鼠($n=10$)在术前连续 3 d 腹腔注射 GSK-J4(3 mg/kg), GSK-J4 按说明书溶解于 DMSO 中,并于第 4 天进行 IRI 处理。IRI+DMSO 组小鼠($n=10$)在术前连续 3 d 腹腔注射 DMSO,并于第 4 天进行 IRI 处理。

1.2.2 肝功能检测

采用 Beckman CX7 全自动生化分析仪检测各组小鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平。

1.2.3 苏木素-伊红(HE)染色

肝组织在 4% 的多聚甲醛中固定,石蜡包埋后切片,厚度约 5 μ m。石蜡切片常规脱蜡水化,苏木素染色 5~15 min,自来水冲洗多余的染色液后再用蒸馏水冲洗数秒,伊红染色液染色 1~2 min 后,自来水冲洗反蓝,再进行脱水、透明、封片。光学显微镜下观察。同时,采用 Suzuki 评分评价肝脏组织损伤情况。

1.2.4 免疫组织化学染色

石蜡切片常规脱蜡至水,95 °C 柠檬酸钠中抗原修复 15 min,滴加正常山羊血清封闭 60 min。50 μ L JMJD3 抗体(1:100)孵育过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 遍后滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(1:200),室温孵育 1 h。PBS 洗 3 遍后滴加 DAB 显示液显色 30 s 至 5 min,显微镜下见明显着色后终止显示。苏木素染色 10 min 后,自来水冲洗反蓝,再进行脱水、透明、封片。光学显微镜下观察。

1.2.5 TUNEL 检测肝细胞凋亡

根据 TUNEL 检测试剂盒实验说明书进行操作。石蜡切片脱蜡至水,蛋白酶 K 37 °C 反应 30 min, PBS 洗 3 遍。用配置好的 TDT 反应液 37 °C 避光反应 60 min, PBS 洗 3 次。Streptavidin-Fluorescein 标记液 37 °C 避光反应 30 min, PBS 洗 3 次。DAP 复染 10 min 后洗去多余的 DAP 染色液,抗荧光淬灭剂封片。荧光显微镜下观察。

1.2.6 细胞培养及缺氧复氧损伤处理

将正常小鼠肝细胞 AML-12 于 6 孔板中种板,完

全贴壁后,更换不含 DMEM 的培养基,置于缺氧细胞培养箱(94% N₂,5% CO₂,1% O₂,37 ℃)中培养 3、6、12 h,更换为完全培养基置于常氧细胞培养箱(5% CO₂,37 ℃)中培养 2 h,完成复氧。

1.2.7 慢病毒转染

设立阴性对照组(缺氧复氧损伤处理)、Scramble 组(阳性对照,不含慢病毒培养基培养)和 ShJMJD3 组,其中 ShJMJD3 组 AML-12 贴壁后,更换含有慢病毒、5 μg/mL Polybrene 的完全培养基培养 24 h。再吸弃上清液,更换为完全培养基培养 48 h 后,加入嘌呤霉素筛选稳定转染细胞株。JMJD3 ShRNA 核苷酸序列,正向:5'-ATG GGA ACA GCT TGH ACA GTT GTT TCA AGA GAA CAA CTG TCC AAG CTG TTC CCT TTT TCT-3';反向:5'-TCG AGA AAA AAG GGA ACA GCT TGG ACA GTT GTT CTT GAA ACA ACT GTC CAA GCT GTT CCC A-3'。

1.2.8 流式细胞仪检测凋亡

正常小鼠肝细胞 AML-12 经过缺氧复氧损伤处理后,单独设立 JNK-IN-7 组并加入 JNK-IN-7 培养,后将所有细胞制成细胞悬液,加入 Annexin V-FITC 抗体常温下避光孵育 30 min,加入 PI 染色液,室温孵育 20 min,离心后保留细胞,加入 500 μL PBS,振荡混匀后于流式细胞计数仪上分析细胞凋亡情况。

1.2.9 Western blot 检测

采用总蛋白提取试剂盒提取细胞蛋白,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,按 30 μg 蛋白上样量于十二烷基-硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)进行电泳,并进行电转,将蛋白转到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上。5%脱脂牛奶中室温封闭 60 min。TBST 洗 3 次,每次 5 min,稀释后的一抗 4 ℃ 孵育过夜,TBST 洗 3 次,每次 5 min,稀释后的二抗常温孵育 60 min,

TBST 洗 3 次,每次 5 min。采用 ECL 发光液在凝胶成像分析仪中曝光显影,用 Image lab(5.2.1)软件分析目的蛋白和内参的灰度值。

1.2.10 细胞活性和毒性检测

根据 CCK-8 检测试剂盒实验说明书检测细胞活性,将 100 μL AML-12 种于 96 孔板中培养,加入 10 μL CCK-8 避光孵育 1~2 h 后,用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值来测定细胞活性。根据乳酸脱氢酶(LDH)细胞毒性检测试剂盒实验说明书检测坏死凋亡细胞释放到培养基中的 LDH 来测定细胞毒性,其中 LDH 水平越高则说明细胞毒性越大。

1.3 统计学处理

采用 GraphPad prism7 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,两组间比较采用非配对样本 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

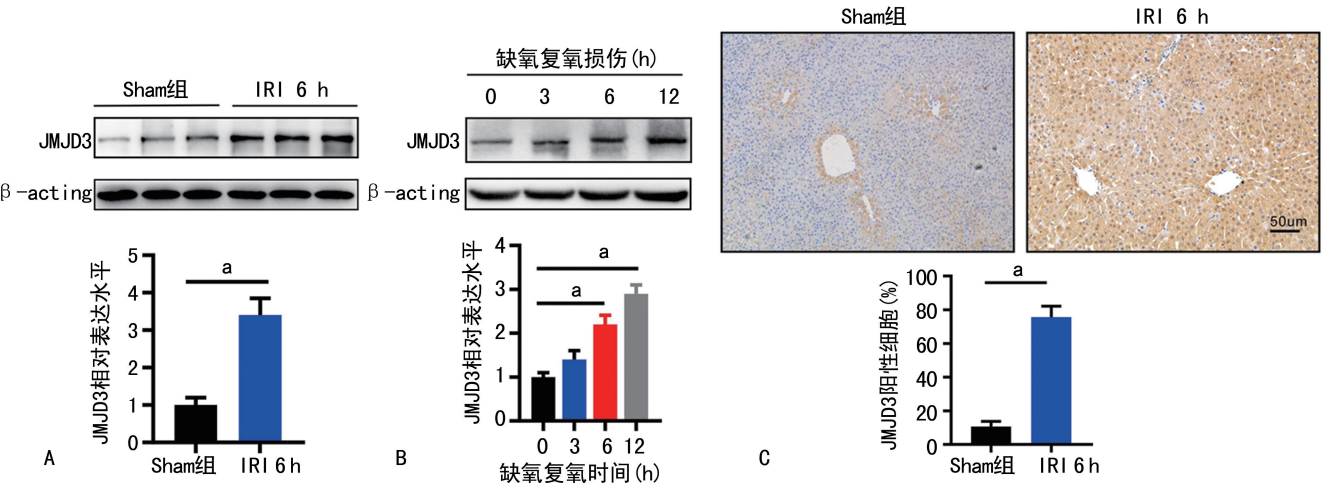
2 结 果

2.1 肝脏早期 IRI 后 JMJD3 表达情况

Western blot 结果显示,与 Sham 组比较,IRI 6 h 后,肝脏中的 JMJD3 的蛋白表达明显增加。对小鼠正常肝细胞 AML-12 在体外建立缺氧复氧损伤模型发现,随着缺氧复氧时间的增加,细胞中 JMJD3 的蛋白表达水平明显增加。免疫组织化学结果也显示,Sham 组中肝脏 JMJD3 的表达主要集中于肝小叶中央区的肝细胞中。IRI 6 h 后,肝脏中 JMJD3 的表达明显增加(*P* < 0.05),且多位于肝细胞中。见图 1。

2.2 沉默 JMJD3 对缺氧复氧损伤导致的肝细胞凋亡的影响

Western blot 结果显示,ShJMJD3 组中 JMJD3 的蛋白水平明显降低。CCK-8 实验检测细胞活力发现,在常氧培养下,Scramble 组和 ShJMJD3 组 AML-12 细胞活性无明显差异,而在缺氧复氧损伤处理后,



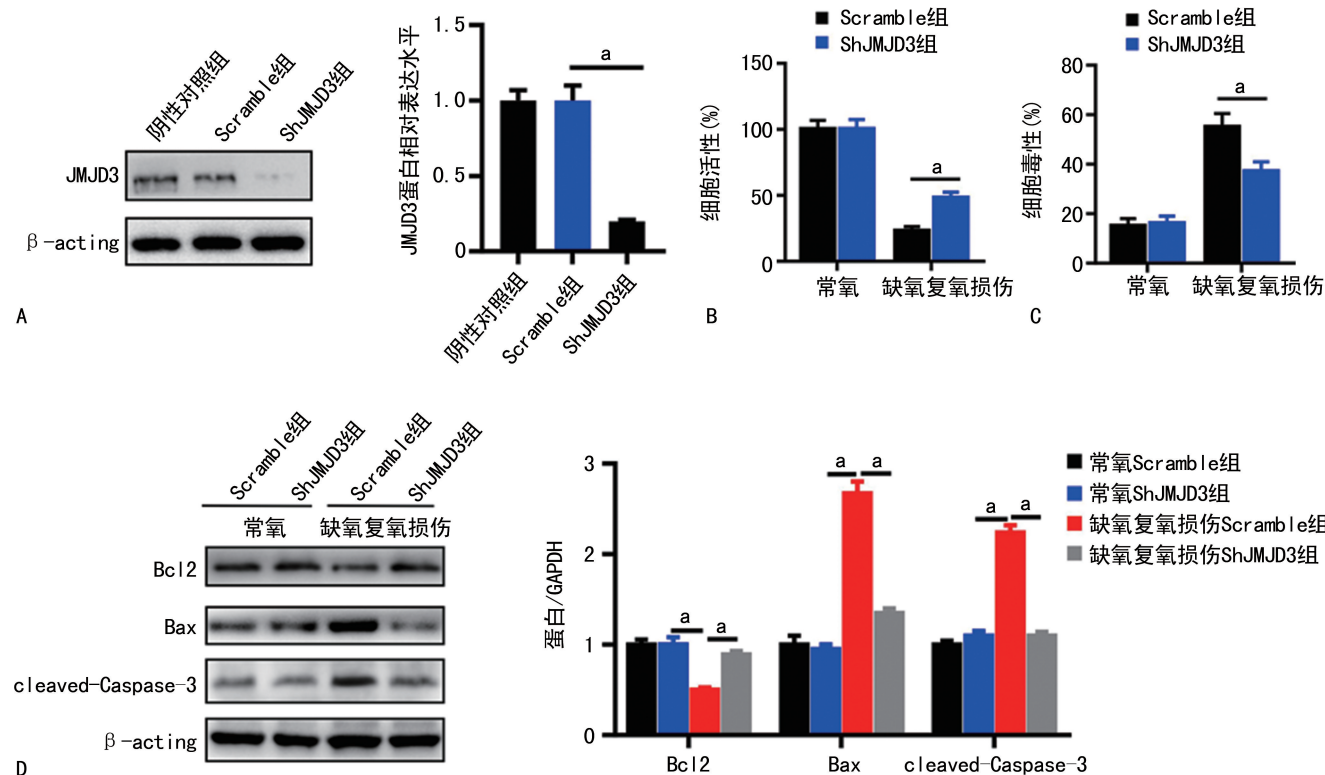
A: Western blot 检测小鼠肝脏缺血 IRI 6 h 后肝脏组织蛋白 JMJD3 的表达;B: Western blot 检测缺氧 0、3、6、12 h 后复氧 2 h 处理 AML-12,细胞中 JMJD3 的蛋白表达水平变化;C:免疫组织化学检测小鼠肝脏 IRI 6 h 后 JMJD3 的定位及表达(免疫组织化学,×200);^a:*P* < 0.05。

图 1 小鼠肝脏 IRI 后 JMJD3 的表达

AML-12 细胞活性明显降低,但与 Scramble 组比较,ShJMJD3 组细胞活性明显增加,细胞毒性明显降低($P<0.05$)。进一步采用 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达水平,在常氧培养下,Scramble 组和 ShJMJD3 组中 Bcl2、Bax 和 cleaved-Caspase-3 的表达水平无明显差异。但在缺氧复氧损伤处理后,与 ShJMJD3 组比较,Scramble 组抗凋亡蛋白 Bcl2 的表达水平下降更明显,促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved-Caspase-3 的表达水平上升更明显。见图 2。

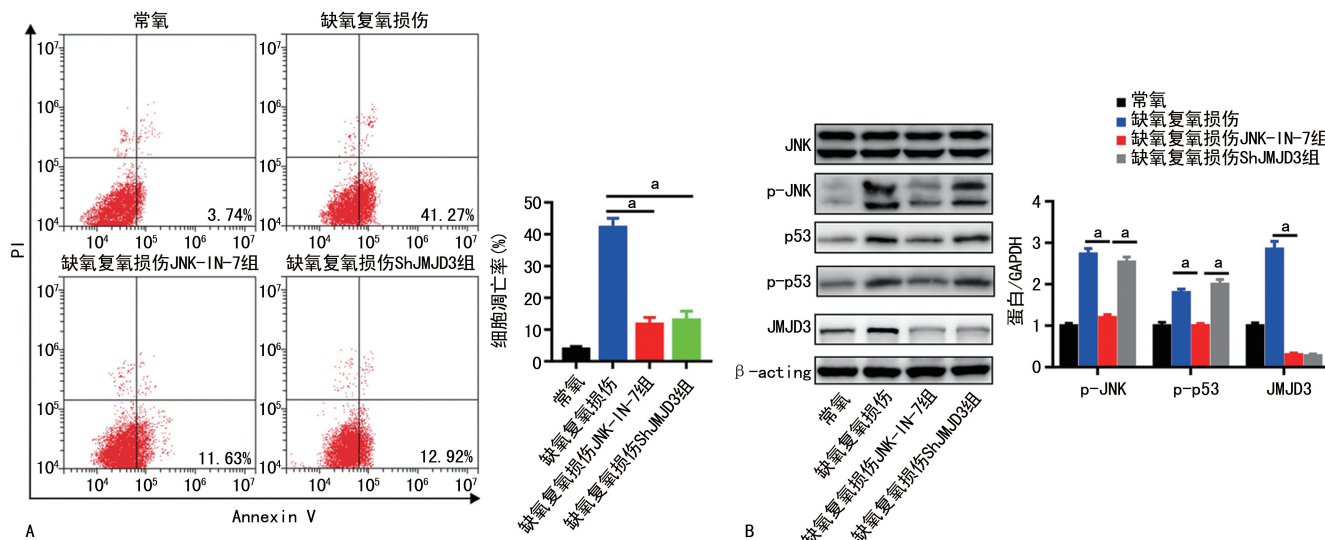
2.3 抑制 JNK 对缺氧复氧损伤导致的肝细胞凋亡的影响

用流式细胞仪检测缺氧复氧损伤引起 AML-12 的凋亡发现,与常氧培养比较,缺氧复氧损伤能明显增加 AML-12 的凋亡,而 JNK-IN-7 组和 ShJMJD3 组凋亡水平明显降低($P<0.05$)。Western blot 检测 JMJD3、JNK 和 p53 发现,JNK-IN-7 组 p-JNK、p-p53 和 JMJD3 的蛋白水平明显降低,但 ShJMJD3 组 p-JNK 和 p-p53 的蛋白水平无明显变化。见图 3。



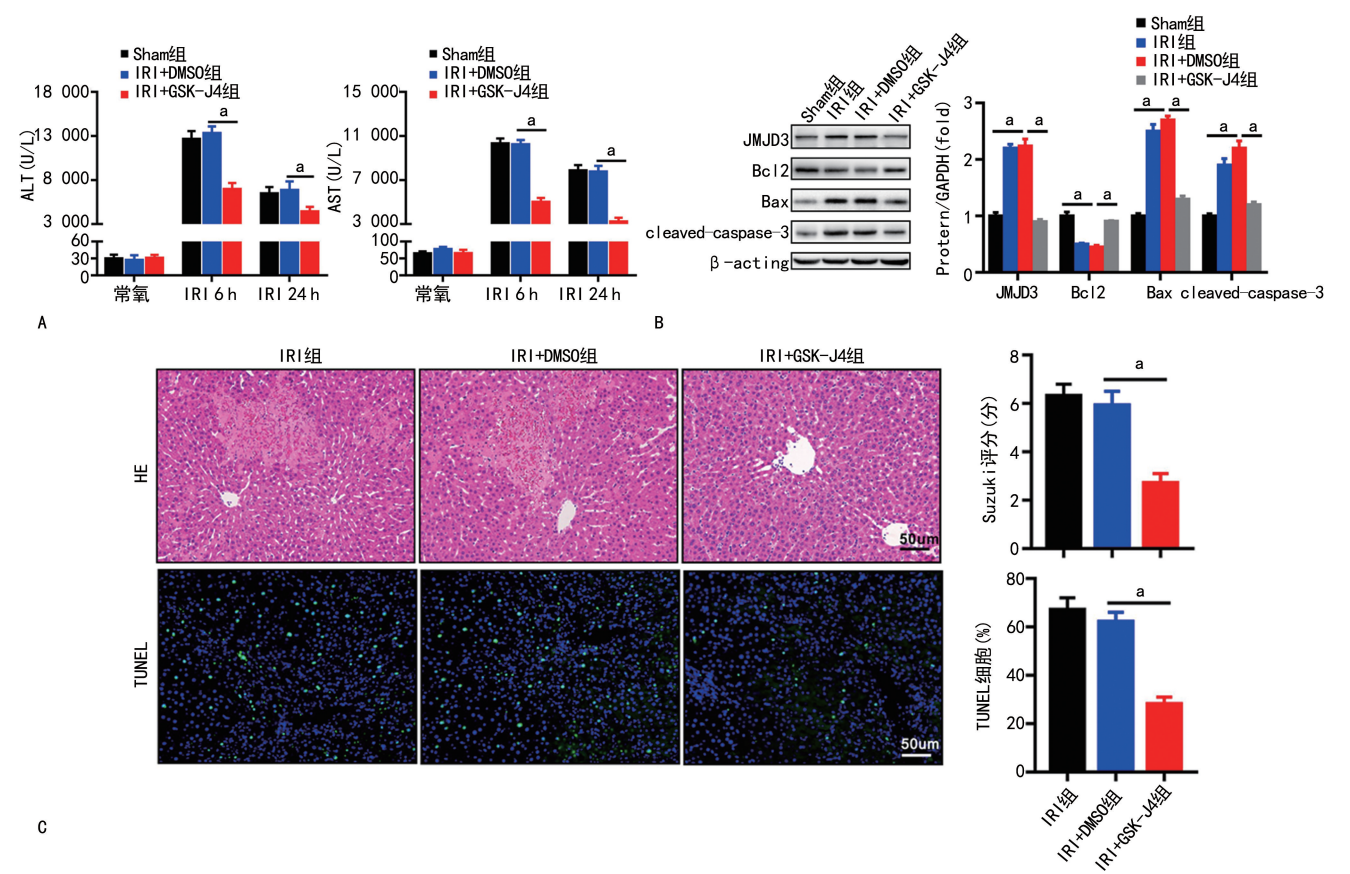
A: Western blot 检测 ShRNA 沉默 JMJD3 后的蛋白水平;B: CCK-8 检测试剂盒检测 AML-12 的细胞活性;C: LDH 检测试剂盒检测细胞毒性;D: Western blot 检测 AML-12 中 Bcl2、Bax 及 cleaved-Caspase-3 蛋白水平的变化;^a: $P<0.05$ 。

图 2 沉默 JMJD3 对缺氧复氧损伤导致的肝细胞凋亡的影响



A: 流式细胞仪检测缺氧复氧损伤处理 AML-12 后,细胞的凋亡变化;B: Western blot 检测 JNK、p-JNK、p53 及 p-p53 的蛋白水平变化;^a: $P<0.05$ 。

图 3 抑制 JNK 对缺氧复氧损伤导致的肝细胞凋亡的影响



A: IRI 0、6、24 h 后血清 ALT、AST 变化水平; B: Western blot 检测肝脏组织 JMJD3、Bcl2、Bax 及 cleaved-Caspase-3 的蛋白水平; C: HE 染色检测组织病理变化及组织损伤评分, TUNEL 检测肝脏细胞凋亡情况 (HE/TUNEL, $\times 200$); ^a: $P < 0.05$ 。

图 4 抑制 JMJD3 对 IRI 导致的肝细胞凋亡及肝脏损伤的影响

2.4 抑制 JMJD3 对 IRI 导致的肝细胞凋亡及肝脏损伤的影响

对血清 ALT、AST 的检测结果显示, IRI 6、24 h 血清 ALT、AST 水平明显升高, 而 IRI+GSK-J4 组血清 ALT、AST 水平明显降低。Western blot 结果也表明与 IRI+DMSO 组比较, IRI+GSK-J4 组肝脏组织中 JMJD3、Bax 和 cleaved-Caspase-3 的蛋白水平明显降低, Bcl2 明显增加。HE 染色发现, IRI 6 h 能明显导致肝小叶结构紊乱、组织坏死、炎性细胞浸润和肝细胞空泡化。与 IRI 组和 IRI+DMSO 组比较, IRI+GSK-J4 组病理组织改变明显减轻, 肝脏组织损伤评分明显降低。TUNEL 检测细胞凋亡的也发现抑制 IRI+GSK-J4 组肝细胞凋亡明显减轻, 见图 4。

3 讨论

肝脏 IRI 是影响肝移植和肝切除等肝脏手术预后的重要因素。目前对肝脏 IRI 的发生机制仍不明确, 探索 IRI 发生机制对肝移植、肝切除等有重要意义。本研究发现, 小鼠 IRI 能明显导致肝脏损伤及肝功能异常, 同时上调了肝细胞 JMJD3 的蛋白表达。在体外实验也发现缺氧复氧损伤导致肝细胞凋亡, 上调 JMJD3 的表达。沉默 JMJD3 能提高细胞活性, 对肝细胞具有保护作用。抑制 JMJD3 能减轻小鼠肝脏 IRI 和肝细胞凋亡, 而凋亡相关的信号通路 JNK-p53 调控了 JMJD3 的表达。

组蛋白是构成核小体的核心成分, 而核小体是染色质的基本组成单元, 组蛋白甲基化、去甲基化、乙酰化、去乙酰化等表观遗传修饰能调控基因的表达。组蛋白主要分为 4 种, 为 H2A、H2B、H3 和 H4, 其中 H3 的表观遗传修饰最为广泛, 例如 H3 的第 4 位 H3K4me3 与基因表达激活相关, 而 H3K9me3 和 H3K27me3 与基因表达抑制相关^[8-9]。目前发现 2 种 H3K27me3 特异性去甲基化酶, 分别是 JMJD3 和 UTX。研究发现 JMJD3 能通过解除前体巨噬细胞 HoxA7 及 HoxA11 基因的 H3K27me3, 调控前体巨噬细胞分化、成熟^[10]。JMJD3 通过去除 Rorc 基因 H3K27me3 介导 CD4⁺ T 淋巴细胞向 Th17 淋巴细胞的分化^[11]。最新的研究发现, 肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 处理成骨细胞能导致 JMJD3 的表达水平增加, JMJD3 直接激活促凋亡基因 RASSF5, 进而诱导成骨细胞凋亡^[12]。ZHANG 等^[7]研究发现 JMJD3 能直接作用于 Bax 和 Caspase-3 基因启动子区的 H3K27me3, 促进神经元细胞凋亡。在本研究中也发现, 小鼠 IRI 能导致肝脏 JMJD3 蛋白水平增加, 免疫组织化学结果显示肝细胞中 JMJD3 的表达明显增加。缺氧复氧损伤能诱导细胞凋亡和炎症反应, 广泛用于探索肝脏 IRI^[13]。本课题组在体外实验中也证实缺氧复氧损伤能诱导肝细胞凋亡, 促进 JMJD3 的表达, 沉默 JMJD3 后, 细胞活性增加, 细胞凋亡明显降低。因此, JMJD3

参与调控肝细胞的凋亡。

JNK 是丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)超家族的一员, JNK 信号通路参与细胞增殖、细胞分化及细胞凋亡的过程^[14]。p53 是一个广泛报道的抑癌基因, 能诱导癌细胞凋亡^[15]。p53 既能通过激活 Fas 诱导凋亡, 同时 p53 也能直接调控 Bax 进而诱导凋亡^[16]。WILLIAMS 等^[17]研究发现 JMJD3 能以一种依赖 p53 的方式结合到与调节细胞周期、应激反应和凋亡相关的基因, 并激活这些基因的转录。WU 等^[18]研究报道 JNK-p53 信号通路在诱导肝脏 IRI 中发挥作用。本研究也发现缺氧复氧损伤能导致 p-JNK、p-p53 的增加, 抑制 JNK 能明显降低 p-JNK、p-p53 和 JMJD3 的表达, 而沉默 JMJD3 对 p-JNK、p53 和 p-p53 几乎无影响, 说明 JMJD3 是 JNK-p53 信号通路的下游分子。缺氧复氧损伤通过 JNK-p53-JMJD3 信号通路诱导肝细胞凋亡。本研究组采用 JMJD3 的特异性抑制剂 GSK-J4 对小鼠进行预处理, Western blot 和 TUNEL 均证实抑制 JMJD3 能减轻肝细胞凋亡, 同时降低血清 ALT、AST 水平, 改善肝功能。

综上所述, 本研究组发现肝脏 IRI 能通过 JNK-p53-JMJD3 信号通路诱导肝细胞凋亡导致肝脏损伤, 而抑制 JMJD3 能减轻凋亡并改善肝功能。因此, JMJD3 可能是治疗 IRI 的新的靶点。但对于 JNK-p53 调控 JMJD3 及 JMJD3 调控细胞凋亡的具体分子机制需要进一步研究。

参考文献

- [1] KAGEYAMA S, NAKAMURA K, FUJII T, et al. Recombinant relaxin protects liver transplants from ischemia damage by hepatocyte glucocorticoid receptor: from bench-to-bedside [J]. *Hepatology*, 2018, 68(1): 258-273.
- [2] ZHAI Y, PETROWSKY H, HONG J C, et al. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation — from bench to bedside [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(2): 79-89.
- [3] LAI X, GONG J, WANG W, et al. Acetyl-3-aminooethyl salicylate ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury and liver graft survival through a high-mobility group box 1/Toll-like receptor 4-dependent mechanism [J]. *Liver Transpl*, 2019, 25(8): 1220-1232.
- [4] GUO J, ZHANG T, GU J, et al. Oleic acid protects against hepatic ischemia and reperfusion injury in mice by inhibiting AKT/mTOR pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4842592.
- [5] BRAL M, PAWLICK R, MARFIL-GARZA B, et al. Pan-caspase inhibitor F573 mitigates liver ischemia reperfusion injury in a murine model [J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0224567.
- [6] HONG S, CHO Y W, YU L R, et al. Identification of JMJC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(47): 18439-18444.
- [7] ZHANG H, WANG J, HUANG J, et al. Inhibiting Jumoji domain containing protein 3 (JMJD3) prevent neuronal apoptosis from stroke [J]. *Exp Neurol*, 2018, 308: 132-142.
- [8] KRUIDENIER L, CHUNG C W, CHENG Z, et al. A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response [J]. *Nature*, 2012, 488(7411): 404-408.
- [9] PAN M R, HSU M C, CHEN L T, et al. Orchestration of H3K27 methylation: mechanisms and therapeutic implication [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75(2): 209-223.
- [10] DE SANTA F, TOTARO M G, PROSPERINI E, et al. The histone H3 lysine-27 demethylase JMJD3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing [J]. *Cell*, 2007, 130(6): 1083-1094.
- [11] LIU Z, CAO W, XU L, et al. The histone H3 lysine-27 demethylase JMJD3 plays a critical role in specific regulation of Th17 cell differentiation [J]. *J Mol Cell Biol*, 2015, 7(6): 505-516.
- [12] SUN H Y, YANG D, MI J, et al. Histone demethylase JMJD3 modulates osteoblast apoptosis induced by tumor necrosis factor- α through directly targeting RASSF5 [J/OL]. *Connect Tissue Res*. [2020-01-13]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31092054/>.
- [13] ZHOU J, QIU T, WANG T, et al. USP4 deficiency exacerbates hepatic ischaemia/reperfusion injury via TAK1 signalling [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(2): 335-349.
- [14] HA J, KANG E, SEO J, et al. Phosphorylation dynamics of JNK signaling: effects of dual-specificity phosphatases (DUSPs) on the JNK pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(24): 6157.
- [15] PITOLLI C, WANG Y, CANDI E, et al. p53-mediated tumor suppression: DNA-damage response and alternative mechanisms [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(12): 1983. (下转第 3001 页)

- al. Hypoxia inducible factors in the tumor microenvironment as therapeutic targets of cancer stem cells[J]. *Life Sci*,2019,237:116952.
- [5] GARVALOV B K,ACKER T. Implications of oxygen homeostasis for tumor biology and treatment[J]. *Adv Exp Med Biol*,2016,903:169-185.
- [6] BEFANI C,LIAKOS P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis[J]. *J Cell Physiol*,2018,233(12):9087-9098.
- [7] 李娜,王洪兴,张洁,等. siRNA 干扰缺氧诱导因子-2 α 对乳腺癌细胞增殖能力的影响[J]. *临床与实验病理学杂志*,2014,30(1):6-9.
- [8] XIANG L,LIU Z H,HUAN Q,et al. Hypoxia-inducible factor-2 α is associated with ABCG2 expression,histology-grade and Ki67 expression in breast invasive ductal carcinoma[J]. *Diagn Pathol*,2017,7:32.
- [9] XIANG L,SU P,XIA S,et al. ABCG2 is associated with HER-2 Expression,lymph node metastasis and clinical stage in breast invasive ductal carcinoma[J]. *Diagn Pathol*,2011,6:90.
- [10] STIEHL D P,BORDOLI M R,ABREU-RODRÍGUEZ I,et al. Non-canonical HIF-2 α function drives autonomous breast cancer cell growth via an AREG-EGFR/ErbB4 autocrine loop[J]. *Oncogene*,2018,31(18):2283-2297.
- [11] BEFANI C,LIAKOS P. The role of hypoxia-inducible factor-2 alpha in angiogenesis[J]. *J Cell Physiol*,2018,233(12):9087-9098.
- [12] NICOLAS S,ABDELLATEF S,HADDAD M A. Hypoxia and EGF stimulation regulate VEGF expression in human glioblastoma multiforme (GBM) cells by differential regulation of the PI3K/Rho-GTPase and MAPK pathways[J]. *Cells*,2019,8(11):E1397.
- [13] LIANG X,DING Y,LIN F,et al. Overexpression of ERBB4 rejuvenates aged mesenchymal stem cell and enhances angiogenesis via PI3K/AKT and MAPK/ERK pathway[J]. *FASEB J*,2018,33(3):4559-4570.
- [14] PETIT A M,RAK J,HUNG M C,et al. Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo:angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors[J]. *Am J Pathol*,2017,151(6):1523-1530.
- [15] NAGANE M,COUFAL F,LIN H. A common mutant epidermal growth factor receptor confers enhanced tumorigenicity on human glioblastoma cells by increasing proliferation and reducing apoptosis[J]. *Cancer Res*,2016,56(21):5079-5086.
- [16] STEINBACH J P,KLUMPP A,WOLBURG H. Inhibition of epidermal growth factor receptor signaling protects human malignant glioma cells from hypoxia-induced cell death[J]. *Cancer Res*,2015,64(5):1575-1578.

(收稿日期:2020-03-08 修回日期:2020-05-12)

(上接第 2996 页)

- [16] RAY P,GUHA D,CHAKRABORTY J,et al. Crocetin exploits p53-induced death domain (PIDD) and FAS-associated death domain (FADD) proteins to induce apoptosis in colorectal cancer[J]. *Sci Rep*,2016,6:32979.
- [17] WILLIAMS K,CHRISTENSEN J,RAPPSILBER J,et al. The histone lysine demethylase JMJD3/KDM6B is recruited to p53 bound promoters and enhancer elements in a p53 dependent manner[J]. *PLoS One*,2014,9(5):e96545.
- [18] WU H,BAI H,DUAN S,et al. Downregulating serine hydroxymethyltransferase 2 deteriorates hepatic ischemia-reperfusion injury through ROS/JNK/P53 signaling in mice[J]. *Biomed Res Int*,2019,2019:2712185.

(收稿日期:2020-03-15 修回日期:2020-05-11)