

## · 论著 ·

HIF-1 $\alpha$  介导线粒体功能调控糖尿病心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究王雪梅<sup>1,2</sup> 刘芬<sup>2</sup> 曹莹<sup>1</sup> 邢远<sup>1</sup> 汪洁英<sup>1</sup> 潘涛<sup>1</sup>

(1. 西安医学院公共卫生学院, 陕西 西安 710021; 2. 新疆医科大学第一附属医院动物疾病模型研究重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830054)

**【摘要】目的** 研究缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) 对高糖作用下缺血再灌注 (IR) 损伤的心肌细胞凋亡和氧化应激, 及其信号通路下游因子的调控作用。**方法** 二甲基乙二酰基甘氨酸激活 HIF-1 $\alpha$  对高糖作用下 IR 心肌细胞损伤的干预。实验分四组: 对照组 (细胞常规培养)、高糖+缺氧复氧组 (25 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养 24 h, 缺氧 2 h, 复氧 8 h)、HIF-1 $\alpha$  处理组 (高糖, 缺氧加复氧, 缺氧前 3 h 用 100  $\mu$ mol/L 的二甲基乙二酰基甘氨酸处理)、二甲基亚砜 (DMSO) 对照组 (高糖, 缺氧加复氧, 缺氧前 3 h 用 100  $\mu$ mol/L 的 DMSO 处理)。流式细胞术测定细胞凋亡率, CCK-8 法分析细胞活性; ELISA 法检测细胞培养上清液中超氧化物歧化酶活性和丙二醛的表达; ATP 含量试剂盒检测各组细胞 ATP 含量; Western Blot 法检测过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )、核呼吸因子 1, 以及能量代谢相关的 p-AMPK、AMPK 蛋白表达, HIF-1 $\alpha$  核蛋白表达。**结果** 高糖合并 IR 损伤增加心肌细胞的凋亡 ( $P < 0.01$ ), 降低心肌细胞活力 ( $P < 0.01$ ), HIF-1 $\alpha$  表达激活抑制心肌细胞的凋亡 ( $P < 0.05$ ) 和活力降低 ( $P < 0.05$ )。高糖合并 IR 损伤增加心肌细胞的氧化应激水平, HIF-1 $\alpha$  表达激活抑制心肌细胞的氧化应激。和 DMSO 对照组相比, HIF-1 $\alpha$  处理组的超氧化物歧化酶的表达显著增加 [ $(11.56 \pm 0.72)$  U/mL vs  $(7.79 \pm 0.90)$  U/mL,  $P < 0.05$ ], 丙二醛的表达显著降低 [ $(0.69 \pm 0.07)$  nmol/mL vs  $(0.96 \pm 0.11)$  nmol/mL,  $P < 0.001$ ]。高糖+缺氧复氧组的应激降低了细胞的 ATP 含量, HIF-1 $\alpha$  表达激活减轻了这种损伤。和 DMSO 对照组相比, HIF-1 $\alpha$  处理组的 ATP 含量显著增加 [ $(5.41 \pm 0.23)$   $\mu$ mol/g vs  $(3.10 \pm 0.42)$   $\mu$ mol/g,  $P < 0.05$ ]。低氧条件下, HIF-1 $\alpha$  核蛋白表达增加 ( $P < 0.001$ ), 低氧激活 p-AMPK 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ), 线粒体氧化磷酸化的激活因子 PGC-1 $\alpha$  ( $P < 0.01$ )、转录因子核呼吸因子 1 ( $P < 0.01$ ) 的表达均显著上调。和 DMSO 组相比, HIF-1 $\alpha$  处理组 HIF-1 $\alpha$  的表达显著增加 ( $P < 0.05$ )、PGC-1 $\alpha$  表达显著增加 ( $P < 0.05$ )。**结论** HIF-1 $\alpha$  在糖尿病心肌 IR 损伤中通过提高 PGC-1 $\alpha$  的表达, 提高线粒体的能量代谢水平, 降低心肌的氧化应激损伤和凋亡。

**【关键词】** 糖尿病心肌; 缺血再灌注; 低氧诱导因子 1 $\alpha$ ; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子 1 $\alpha$ **【DOI】**10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.10.021HIF-1 $\alpha$  Mediates the Regulation of Mitochondrial Function on Diabetic Myocardial Ischemia Reperfusion InjuryWANG Xuemei<sup>1,2</sup>, LIU Fen<sup>2</sup>, CAO Ying<sup>1</sup>, XING Yuan<sup>1</sup>, WANG Jieying<sup>1</sup>, PAN Tao<sup>1</sup>

(1. Department of Public Health, Xi'an Medical University, Xi'an 710021, Shaanxi, China; 2. Xinjiang Key Laboratory of Medical Animal Model Research, The First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, Xinjiang, China)

**【Abstract】Objective** To study the effects of hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) on apoptosis and oxidative stress of myocardial cells induced by ischemia reperfusion injury under high glucose condition, and the regulation of downstream factors of the signaling pathway.  
**Methods** The intervention of HIF-1 $\alpha$  was activated by dimethylallyl glycine (DMOG) on myocardial cell injury induced by high glucose and ischemia reperfusion. The experiment was divided into four groups: control group (conventional cell culture), high glucose + hypoxia reoxygenation group (DMEM medium culture of 25 mmol/L glucose for 24 h, hypoxia for 2 h, reoxygenation for 8 h), HIF-1 $\alpha$  treatment group (high glucose, hypoxia reoxygenation, DMOG treatment of 100  $\mu$ mol/L for 3 h before hypoxia), Dimethyl sulfoxide (DMSO) control group (high glucose, hypoxia reoxygenation, DMSO treatment of 100  $\mu$ mol/L for 3 h before hypoxia). Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate, CCK-8 was used to analyze the cell activity, ELISA was used to detect the activity of SOD and the expression of MDA in the

**基金项目:** 国家自然科学基金地区基金项目 (81760083); 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81900408); 陕西省教育厅重点科学研究计划项目 (20JS137); 西安医学院国家基金培育项目 (2018GJFY01)

**通信作者:** 王雪梅, E-mail: wxuemei1983@sina.com

supernatant of cell culture, ATP content kit was used to detect the content of ATP in each group, Western Blot detected the protein expression of peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ), transcription factor NRF-1, energy metabolism related factor AMPK, p-AMPK and HIF-1 $\alpha$  nuclear proteins. **Results** The high glucose with ischemia reperfusion injury increased the apoptosis of cardiomyocytes ( $P < 0.01$ ), and decreased the viability of cardiomyocytes ( $P < 0.01$ ). Activation of HIF-1 $\alpha$  expression inhibited the apoptosis of cardiomyocytes ( $P < 0.05$ ) and the decrease of the viability of cardiomyocytes ( $P < 0.05$ ). The high glucose with ischemia reperfusion injury increased the oxidative stress of cardiomyocytes, and the activation of HIF-1 $\alpha$  inhibited the oxidative stress of cardiomyocytes. Compared with DMSO control group, the activity of SOD in HIF-1 $\alpha$  treatment group increased significantly [ $(11.56 \pm 0.72)$  U/mL vs  $(7.79 \pm 0.90)$  U/mL,  $P < 0.05$ ], and the expression of MDA decreased significantly [ $(0.69 \pm 0.07)$  nmol/mL vs  $(0.96 \pm 0.11)$  nmol/mL,  $P < 0.001$ ]. The stress of high glucose+hypoxia reoxygenation reduced the ATP content of cells, and HIF-1 $\alpha$  relieved the injury. Compared with DMSO control group, ATP content of HIF-1 $\alpha$  treatment group increased significantly [ $(5.41 \pm 0.23)$   $\mu$ mol/g vs  $(3.10 \pm 0.42)$   $\mu$ mol/g,  $P < 0.05$ ]. Under hypoxia, the expression of HIF-1 $\alpha$  nuclear protein increased ( $P < 0.001$ ), the expression of p-AMPK protein increased ( $P < 0.01$ ), the expression of mitochondrial oxidative phosphorylation activator PGC-1 $\alpha$  increased ( $P < 0.01$ ), and transcription factor NRF-1 increased ( $P < 0.01$ ). Compared with DMSO group, the expression of HIF-1 $\alpha$  and PGC-1 $\alpha$  in HIF-1 $\alpha$  treatment group increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** HIF-1 $\alpha$  can increase the expression of PGC-1 $\alpha$ , improve the energy metabolism level of mitochondria, and reduce the oxidative stress injury and apoptosis of myocardium.

**【Key words】** Diabetic myocardium; Ischemia reperfusion; Hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$ ; Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$

全球每年有超过 2.3 亿人接受各类手术,患者在围手术期因既往心血管疾病、出血、低灌注和麻醉等原因导致心肌缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤,后果严重并且常见<sup>[1-2]</sup>。据中国心血管病报告,2017 年中国心脑血管疾病的高风险人群约为 2.9 亿,其中糖尿病患者率达 11.6%<sup>[3]</sup>。糖尿病所致心肌能量代谢紊乱是糖尿病患者围手术期与心脏直接相关的重大并发症发生率和死亡率居高不下的主要原因。如何保护糖尿病手术患者免受心肌 IR 损伤,有效降低糖尿病患者围手术期并发症的发生率和死亡率,是当前亟待解决的重大问题。心肌能量代谢紊乱是导致糖尿病心肌对抗 IR 损伤能力下降和易损性增加的关键<sup>[4]</sup>。

线粒体是机体细胞进行氧化磷酸化并产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)的场所,由位于线粒体内膜氧化磷酸化的电子传递链和 ATP 合成酶产生 ATP,并以此方式将能量储存在细胞内,以提供机体的各个细胞、组织和器官发挥功能所需的能量<sup>[5]</sup>。过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅助激活因子-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ )是一种重要的激活因子,核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, NRF-1)是一种转录因子,PGC-1 $\alpha$  和 NRF-1 参与调控核基因编码的线粒体蛋白表达,进而影响线粒体氧化磷酸化、蛋白转运及 DNA 的转录和复制等过程<sup>[6-7]</sup>。

研究证实,缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )是调控心肌能量代谢通路和启动内源性保护机制的始动因子,在调控心肌能量代谢中有着非常重要的作用<sup>[8]</sup>。研究发现,糖尿病心肌的 HIF-

1 $\alpha$  信号通路受损,糖尿病心肌发生的心肌保护作用被弱化<sup>[9-10]</sup>。因此逆转受损的 HIF-1 $\alpha$ 、提高心肌内源性抗损伤能力是糖尿病心肌对抗 IR 损伤的重要手段。AMP 激活的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)是生物能量代谢调节的关键分子,发挥着重要作用<sup>[11-12]</sup>。然而,心肌遭受 IR 损伤时,特别是糖尿病心肌状态下,HIF-1 $\alpha$  在心肌细胞线粒体功能调控中的作用机制目前仍不清楚。缺氧时,HIF-1 $\alpha$  亚基稳定调节一系列低氧敏感基因的表达,促进组织细胞存活,并被证实有利于心肌抵御 IR 损伤,但 HIF-1 $\alpha$  在常氧状态下极不稳定,易被泛素-蛋白酶途径迅速水解。二甲基乙二酰基甘氨酸(dimethyloxalylglycine, DMOG)是人工合成的小分子脯氨酰羟化酶抑制剂,属于酮戊二酸类似物,可通过与内源性的 2-酮戊二酸竞争从而抑制脯氨酰羟化酶,能稳定常规状态下细胞中 HIF-1 $\alpha$  的表达。本研究拟在细胞水平制备糖尿病心肌细胞 IR 损伤细胞模型,通过 DMOG 作用于心肌细胞稳定 HIF-1 $\alpha$  的表达,探讨 HIF-1 $\alpha$  的表达变化在糖尿病缺氧心肌抗氧化应激和凋亡中的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料和仪器

脯氨酸羟化酶抑制剂 DMOG(美国 Selleck),低糖 DMEM 培养基(美国 HyClone),胎牛血清(美国 Gibco),Annexin V-PI 试剂盒(德国 Roche),细胞计数 CCK-8 试剂盒(日本 Dojindo),丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(中国南京建成生物有限公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒(中国南京建成生物有限公司),ATP 测试盒(中国南京建成生物有限公司),胰蛋白酶(美

国 ScienCell), 双联抗生素(青霉素、链霉素)(美国 HyClone), 细胞培养瓶/培养皿(美国 Corning), 二甲基亚砜(DMSO)(美国 Invitrogen), 核蛋白提取试剂盒(北京索来宝), 细胞蛋白定量试剂盒(美国 Pierce), 蛋白抗体:HIF-1 $\alpha$ 、Lamin A、PGC-1 $\alpha$ 、NRF-1、p-AMPK、t-AMPK(美国 ABCAM)和 GAPDH(美国 Cell Signaling Technology), Western Blot 二抗试剂盒(北京中杉), ECL 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)。大鼠 2~3 d 乳鼠(西安交通大学实验动物中心)。仪器:CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> 三气培养箱(美国 Thermo Scientific)、5% CO<sub>2</sub>-95% N<sub>2</sub> 气罐、酶标仪(美国 Thermo Scientific)。

## 1.2 糖尿病心肌细胞 IR 损伤模型建立和分组

### 1.2.1 分离乳鼠细胞

分离乳鼠心肌细胞,取大鼠 2~3 d 乳鼠 10 只,皮肤消毒,胸部十字剪,挤出心脏。剪取心尖,即左心室部位。抗生素洗 3~5 min,轻压挤血。洗 3 次,剪碎为 1 mm<sup>3</sup> 的小块。胰蛋白酶消化一次约 5 min,浓度 0.08%~0.125% 的胰酶,吹打吸取细胞悬液,按照 1:1 的比例添加到含血清的生长液中,终止反应。未消化完全的心肌组织继续加入胰酶消化,重复上述步骤 5 次。高糖 DMEM 洗 3 遍细胞,每次洗后 1 000 r/min 离心 5 min。最后一次离心后生长液混悬,移至培养瓶。以  $5 \times 10^5$  密度种板。细胞于 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度环境培养,采取差速贴壁分离法以去除心肌成纤维细胞,根据贴壁速度分离心肌细胞与成纤维细胞。差速贴壁 2 h 后吸取上清液即为纯化乳鼠心肌细胞,接种心肌细胞于合适培养皿中,培养 24 h 后换液,以后隔日换液;前 3 d 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 5-溴脱氧尿嘧啶核苷,以抑制成纤维细胞的增殖,并继续培养。得到的心肌细胞用于实验,48 h 换液后开始正式实验。

### 1.2.2 实验分组

实验分组,随机分为 4 组( $n=3$ ):对照组(CON)、高糖+缺氧复氧组(HG+H/R)、HIF-1 $\alpha$  处理组(HIF-1 $\alpha$ )和 DMSO 对照组(DMSO)。缺血缺氧处理前,将需缺氧的细胞培养皿内培养基弃去,磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗 1 遍后,加入适量 PBS 溶液。复氧时将缺氧的细胞取出,弃去 PBS 液体,更换为新鲜培养基。CON 组用含 5.5 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养 24 h; HG+H/R 组用含 25 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养 24 h,模拟体外糖尿病模型,然后缺血缺氧 2 h,复血复氧 8 h,制备糖尿病心肌细胞 IR 损伤模型; HIF-1 $\alpha$  处理组用含 25 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养基培养 24 h,缺血缺氧前 3 h 用 100  $\mu$ mol/L 的 DMOG 共培养细胞,接下来缺血缺氧 2 h,复血复氧 8 h; DMSO 对照组, 25 mmol/L

葡萄糖的 DMEM 培养基培养 24 h,缺血缺氧前 3 h 用 1% 的 DMSO 共培养细胞,接下来缺血缺氧 2 h,复血复氧 8 h,见图 1。

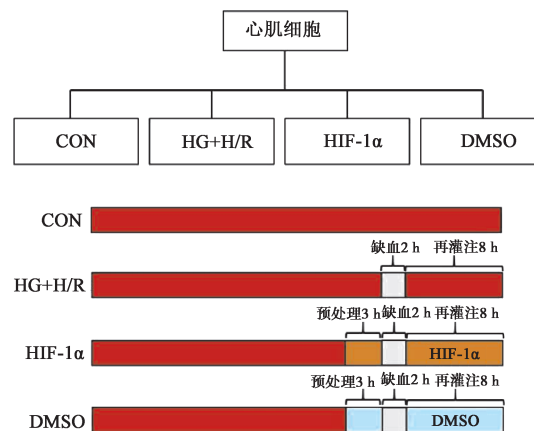


图 1 实验分组示意图

### 1.3 流式细胞术检测细胞凋亡

用高糖处理心肌细胞 24 h,然后常规培养或 IR 损伤处理后,从培养皿中取出,用 PBS 清洗两次,胰酶消化,1000 r/min 离心 5 min。将细胞重新悬浮在 100  $\mu$ L Annexin-V-FLUOS 标记溶液中,在 15~25℃ 中孵育 10~15 min。然后添加 0.5 mL 培养缓冲液,流式细胞术检测细胞凋亡情况。激发波长 488 nm,发射波长 530 nm。结果判别依据 Annexin V-FITC 阴性和碘化丙啶(propidium iodide, PI)阴性的细胞是活细胞,Annexin V-FITC 阳性和 PI 阴性的细胞是早期凋亡细胞,Annexin V-FITC 阳性和 PI 阳性的是晚期凋亡细胞或死细胞。右下角象限代表早期凋亡细胞,重复实验三次。

### 1.4 细胞活力测定

细胞计数 CCK-8 试剂盒分析用于检测细胞活性。每组取约  $1 \times 10^6$  个细胞,将细胞悬液混匀铺入 96 孔细胞培养板,于 12 h 时间点, CCK-8 溶液(10  $\mu$ L/孔)直接加入细胞悬液中,在 37℃ 下孵育 2 h,使用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度值。所有实验均独立进行,重复实验三次。

### 1.5 ELISA 法检测心肌细胞上清液中的氧化应激指标 SOD 和 MDA 的表达

细胞培养干预后收集细胞上清液,低温离心,严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,ELISA 法测定血清 SOD 和 MDA 含量。取细胞上清液 100  $\mu$ L,按照试剂盒说明书操作,分别于 450 nm 和 532 nm 处测定吸光度,根据标准曲线计算含量。

### 1.6 试剂盒检测细胞内 ATP 含量

实验干预结束后收集细胞,用预冷 PBS 液清洗三遍,加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液后得到样品悬液。按照 ATP 含量测试试剂盒说明书,使用比色法

测定线粒体 ATP 含量。测定结果以 nmol/g 表示。

### 1.7 Western Blot 法检测 HIF-1 $\alpha$ 核蛋白和线粒体功能相关蛋白的表达

用蛋白裂解液提取细胞总蛋白,核蛋白提取试剂盒提取核蛋白。BCA 蛋白定量法进行蛋白定量,SDS-PAGE 每孔中加入 30  $\mu$ g 蛋白样品进行电泳。加入一抗、二抗通过洗膜、显色后,用 BioRad 成像仪扫描显色的硝酸纤维素膜,应用 Quality One 图像分析系统进行光密度值测定分析,总蛋白以 GAPDH 蛋白作为参照,最后将所得数据通过 Graphpad 作图软件进行绘图。相关蛋白相对分子质量的大小:HIF-1 $\alpha$  相对分子质量为  $1.2 \times 10^5$ , Lamin A 为核蛋白内参,相对分子质量  $6.8 \times 10^4$ , PGC-1 $\alpha$  相对分子质量为  $9.1 \times 10^4$ , NRF-1 相对分子质量为  $5.4 \times 10^4$ , AMPK、p-AMPK 相对分子质量为  $6.3 \times 10^4$ , GAPDH 为蛋白内参,相对分子质量为  $3.7 \times 10^4$ 。

### 1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析。计量资

料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间均数比较用非配对  $t$  检验分析,多组均数的比较采用单因素方差分析,两组间比较视方差齐性检验结果进行不同的选择(以 0.05 作为检验水准进行误差方差的齐性 Levene's 检验:当方差齐时,选择 LSD 检验;当方差不齐时,选择秩和检验)。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 HIF-1 $\alpha$ 减缓高糖 IR 损伤导致的心肌细胞凋亡

应用高糖和 IR 干预各组细胞后,心肌细胞暴露于高糖培养基 24 h,IR 损伤后,直接测定心肌细胞的凋亡率。CON、HG+H/R、HIF-1 $\alpha$  和 DMSO 的细胞凋亡率分别是  $4.67\% \pm 0.92\%$ 、 $25.73\% \pm 3.00\%$ 、 $15.85\% \pm 1.97\%$  和  $25.60\% \pm 1.74\%$ ,各组比较其差异有统计学意义,结果表明应用高糖干预细胞,IR 损伤后,其存活率显著下降( $P < 0.05$ )。其中,激活 HIF-1 $\alpha$  处理后,细胞存活率显著高于 DMSO 对照组,而 HG+H/R 组细胞显著低于对照组( $P < 0.01$ ),见图 2 和表 1。

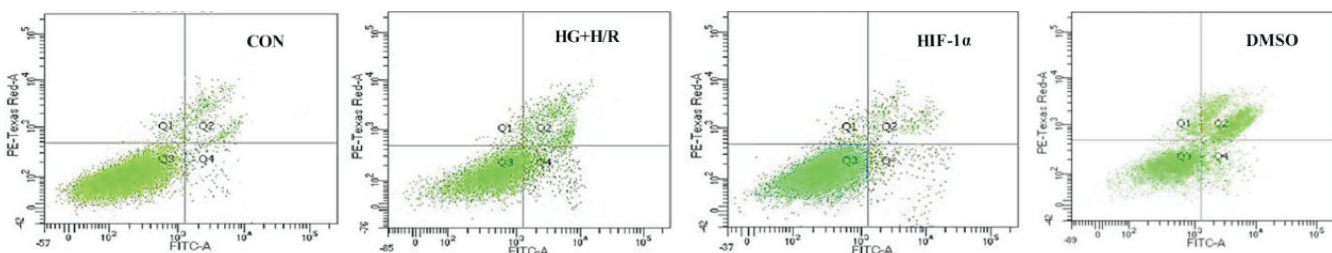


图 2 流式细胞术分析 Annexin V-FITC/PI 标记的凋亡细胞

表 1 心肌细胞凋亡率 (%)

分组	CON	HG+H/R	HIF-1 $\alpha$	DMSO
细胞凋亡率	$4.67 \pm 0.92$	$25.73 \pm 3.00^{**}$	$15.85 \pm 1.97$	$25.60 \pm 1.74^*$

注: \* 表示 HIF-1 $\alpha$  和 DMSO 相比,  $P < 0.05$ ; \*\* 表示 HG+H/R 和 CON 相比,  $P < 0.01$ 。

应用高糖和 IR 干预各组细胞后,心肌细胞暴露于高糖培养基 24 h,IR 损伤后,测定 12 h 时间点的存活率。CON、HG+H/R、HIF-1 $\alpha$  和 DMSO 的细胞存活率分别是  $97.02\% \pm 1.53\%$ 、 $54.00\% \pm 5.12\%$ 、 $75.00\% \pm 5.13\%$  和  $52.67\% \pm 5.24\%$ ,各组比较其差异有统计学

意义,结果表明应用高糖干预细胞,IR 损伤后,其存活率显著下降。其中,激活 HIF-1 $\alpha$  处理后,细胞存活率显著高于 DMSO ( $P < 0.05$ ),而 HG+H/R 细胞显著低于 CON ( $P < 0.01$ ),见表 2。

表 2 心肌细胞存活率 (%)

分组	CON	HG+H/R	HIF-1 $\alpha$	DMSO
细胞存活率	$97.02 \pm 1.53$	$54.00 \pm 5.12^{**}$	$75.00 \pm 5.13$	$52.67 \pm 5.24^*$

注: \* 表示 HIF-1 $\alpha$  和 DMSO 相比,  $P < 0.05$ ; \*\* 表示 HG+H/R 和 CON 相比,  $P < 0.01$ 。

应用高糖和 IR 干预各组细胞后,心肌细胞暴露于高糖培养基 24 h,IR 损伤后,测定 12 h 时间点的存活率。CON、HG+H/R、HIF-1 $\alpha$  和 DMSO 的细胞存活率分别是  $97.02\% \pm 1.53\%$ 、 $54.00\% \pm 5.12\%$ 、

$75.00\% \pm 5.13\%$  和  $52.67\% \pm 5.24\%$ ,各组比较其差异有统计学意义,结果表明应用高糖干预细胞,IR 损伤后,其存活率显著下降。其中,激活 HIF-1 $\alpha$  处理后,细胞存活率显著高于 DMSO ( $P < 0.05$ ),而 HG+

H/R 细胞显著低于 CON ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

## 2.2 高糖 IR 损伤增加心肌细胞的氧化应激水平

和 CON 相比较, 高糖+缺氧复氧处理后, HG+H/R 的 SOD 的表达显著降低 [ $(7.12 \pm 0.84)$  U/mL vs  $(10.31 \pm 1.08)$  U/mL,  $P < 0.05$ ]; 和 DMSO 相比, HIF-1 $\alpha$  的 SOD 表达显著增加 [ $(11.56 \pm 0.72)$  U/mL vs  $(7.79 \pm 0.90)$  U/mL,  $P < 0.05$ ]。和 CON 相比较, 高糖+缺氧复氧处理后, HG+H/R 的 MDA 的表达显著增加 [ $(0.90 \pm 0.06)$  nmol/mL vs  $(0.53 \pm 0.14)$  nmol/mL,  $P < 0.05$ ]; 和 DMSO 相比, HIF-1 $\alpha$  的 MDA 的表达显著降低 [ $(0.69 \pm 0.07)$  nmol/mL vs  $(0.96 \pm 0.11)$  nmol/mL,  $P < 0.01$ ]。见表 3。

表 3 ELISA 法检测细胞上清液中 SOD 和 MDA 的表达

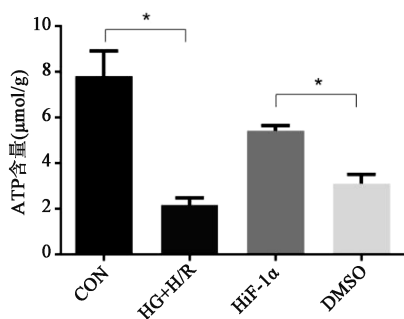
分组	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)
CON	$10.31 \pm 1.08$	$0.53 \pm 0.14$
HG+H/R	$7.12 \pm 0.84^*$	$0.90 \pm 0.06^*$
HIF-1 $\alpha$	$11.56 \pm 0.72^*$	$0.69 \pm 0.07^{**}$
DMSO	$7.79 \pm 0.90$	$0.96 \pm 0.11$

注: \* 分别表示 HG+H/R 和 CON 相比, HIF-1 $\alpha$  和 DMSO 相比,  $P < 0.05$ ; \*\* 表示 HIF-1 $\alpha$  和 DMSO 相比,  $P < 0.01$ 。

## 2.3 细胞内 ATP 含量的变化

结果显示, 高糖+缺氧复氧的应激降低了细胞的 ATP 含量, HIF-1 $\alpha$  减轻了这种损伤。

和 CON 相比, HG+H/R 的 ATP 含量显著降低 [ $(2.16 \pm 0.31)$  vs  $(7.80 \pm 1.10)$ ,  $P < 0.05$ ]; 和 DMSO 相比, HIF-1 $\alpha$  的 ATP 含量显著增加 [ $(5.41 \pm 0.23)$  vs  $(3.10 \pm 0.42)$ ,  $P < 0.05$ ]。



注: \* 表示  $P < 0.05$ 。

图 3 心肌细胞线粒体 ATP 含量

## 2.4 HIF-1 $\alpha$ 表达提高线粒体能量代谢水平

研究发现, 和对照组相比, 高糖+缺氧复氧的应激激活了细胞核内 HIF-1 $\alpha$  的表达 ( $P < 0.001$ ), p-AMPK 的表达显著上调 ( $P < 0.01$ ), 线粒体氧化磷酸化的激活因子 PGC-1 $\alpha$  表达显著上调 ( $P < 0.01$ ), 转录因子 NRF-1 表达显著上调 ( $P < 0.01$ )。和 DMSO 相比, HIF-1 $\alpha$  的细胞经 DMOG 共培养作用后, HIF-1 $\alpha$  的表达显著上调 ( $P <$

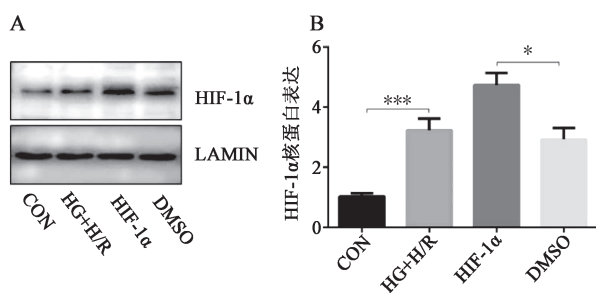
$0.05$ )、PGC-1 $\alpha$  表达显著上调 ( $P < 0.05$ ), 见图 4、5 和 6。即 HIF-1 $\alpha$  在糖尿病心肌缺血损伤中可能通过提高 PGC-1 $\alpha$  和 NRF-1 的表达, 提高线粒体的能量代谢水平, 降低心肌的氧化应激损伤和凋亡。

## 3 讨论

本研究结果显示, 高糖 IR 损伤增加心肌细胞的凋亡, 细胞活力降低, 活化 HIF-1 $\alpha$  抑制心肌细胞的凋亡和细胞活力降低, 抑制心肌细胞的氧化应激。高糖+缺氧复氧的应激降低细胞的 ATP 含量, HIF-1 $\alpha$  减轻了这种损伤。低氧条件下, HIF-1 $\alpha$  核蛋白表达增加, p-AMPK 蛋白表达, 线粒体氧化磷酸化的激活因子 PGC-1 $\alpha$  和转录因子 NRF-1 的蛋白表达均上调。即 HIF-1 $\alpha$  在糖尿病心肌 IR 损伤中通过提高 p-AMPK、PGC-1 $\alpha$  和 NRF-1 的表达, 提高线粒体的能量代谢水平, 降低心肌的氧化应激损伤和凋亡。

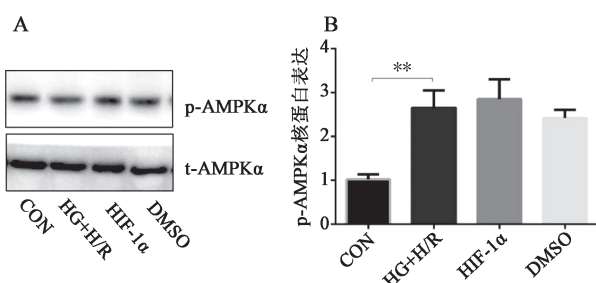
HIF-1 $\alpha$  信号通路是介导细胞反应的重要信号系统, HIF-1 $\alpha$  作为缺氧条件下重建心肌细胞代谢途径和启动内源性保护机制的始动因子, 在心肌细胞外信号传导、抗应激反应、细胞存活和能量代谢等方面发挥关键作用<sup>[13]</sup>。健康心肌在缺氧状态下, 上调 HIF-1 $\alpha$  是机体启动防御机制的基础<sup>[14]</sup>。HIF-1 是由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基构成的异源二聚体, 其中  $\alpha$  亚基是低氧调节的主要亚单位, HIF-1 $\alpha$  的表达和转录活性在 mRNA、蛋白及转录激活等不同层次均受细胞内氧浓度和各种细胞内外信号的精确调控<sup>[15]</sup>。有氧条件下胞浆内的 HIF-1 $\alpha$  蛋白易被羟基化, 继而被 E3 泛素连接酶复合体泛素化后被迅速降解, 从而阻止 HIF 介导的靶基因转录; 而低氧水平时脯氨酸羟化酶和 HIF 抑制因子活性受抑制, 使 HIF-1 $\alpha$  降解受阻, 导致 HIF-1 $\alpha$  大量堆积并移位到细胞核内, 与 HIF-1 $\beta$  形成异源二聚体后生成有活性的 HIF-1 并与低氧反应元件结合, 促进下游多种低氧敏感基因如血管内皮生长因子、红细胞生成素、诱导型一氧化氮合酶和血红素加氧酶-1 的表达上调。促进新生血管的形成以改善心肌缺血状态, 同时具有抗氧化应激、抗炎症和抗凋亡作用保护缺血心肌<sup>[16-17]</sup>。氧作为线粒体呼吸电子传递链的受体, 心肌对缺氧适应的关键是将氧化磷酸化的代谢途径转移到无氧糖酵解的 ATP 产能途径<sup>[18]</sup>。而 HIF-1 $\alpha$  的转录失活和心肌能量代谢紊乱是导致心肌 IR 易损性增加的关键, HIF-1 $\alpha$  是抗心肌 IR 损伤的内源性关键靶标<sup>[19]</sup>。在本研究中, 高糖条件下, IR 损伤导致心肌细胞的 HIF-1 $\alpha$  表达增加和 ATP 含量下降, 而 HIF-1 $\alpha$  的稳定剂 DMOG 诱导 HIF-1 $\alpha$  的表达增加, 进一步提高 p-AMPK 表达和 ATP 含量, 拮抗氧化应激和凋亡。





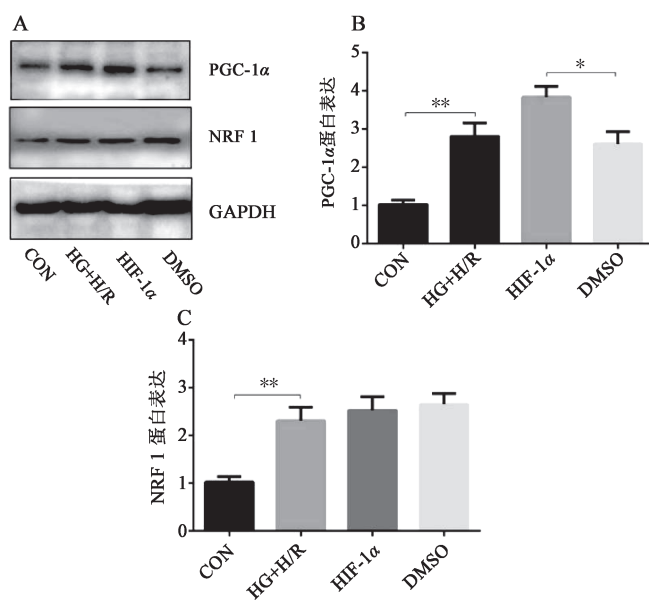
注:LAMIN:核纤层蛋白; \* 表示  $P < 0.05$ ; \*\*\* 表示  $P < 0.001$ 。

图4 HIF-1α的核蛋白表达( $n=3$ )



注: \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

图5 p-AMPKα的蛋白表达( $n=3$ )



注:GADPH:甘油醛-3-磷酸脱氢酶; \* 表示  $P < 0.05$ ; \*\* 表示  $P < 0.01$ 。

图6 PGC-1α和NRF-1的蛋白表达( $n=3$ )

低氧条件下,HIF-1α核蛋白表达增加,p-AMPK表达增加,PGC-1α、转录因子NRF-1的表达均上调。可推断HIF-1α通过调控糖代谢关键酶的表达启动糖酵解途径,同时诱导AMPK通路促进能量代谢,稳定线粒体功能,提升心肌内源性抗损伤能力对抗IR损伤<sup>[20-21]</sup>。PGC-1α是一种能与转录因子或其他协同激活因子相互作用以提高靶基因转录效率的营养缺陷型

转录因子,调节多种生物过程,涉及代谢、氧化应激、炎症和细胞凋亡,对于整个机体的线粒体生物合成及功能调控具有极为重要的作用<sup>[22]</sup>。有研究表明,主动脉平滑肌细胞中,上调PGC-1α可增强端粒功能,减少DNA损伤<sup>[23]</sup>。此外,PGC-1α激活剂吡格列酮可预防应激诱导的内皮细胞凋亡<sup>[24]</sup>。PGC-1α的表达在动脉粥样硬化中被严重抑制,活性氧的积累和细胞凋亡增加,提示PGC-1α参与调节活性氧的累积和细胞凋亡,与氧化应激及线粒体损伤密切相关<sup>[25-26]</sup>。与野生型小鼠相比,糖尿病小鼠活性氧合成增加,存在NRF-1和NRF-2的改变,线粒体功能损伤<sup>[27]</sup>。有研究表明,PGC-1α对NRFs的基因表达具有强大的诱导作用,可通过NRFs调节氧化磷酸化成分的协同表达,促进了线粒体转录因子A的激活,后者是线粒体生物合成的重要转录激活因子。因此,PGC-1α能促进NRFs的基因转录,从而协调机体在不同能量供需状态时的线粒体呼吸链功能<sup>[28]</sup>。综上所述,HIF-1α在糖尿病心肌IR损伤中通过提高PGC-1α和NRF-1的表达,提高线粒体的能量代谢水平,降低心肌的氧化应激损伤和凋亡。本研究的创新性在于,提出HIF-1α通过调控PGC-1α信号通路轴向调控能量代谢-线粒体功能的心肌内源性保护机制,探究了HIF-1α缺氧感知信号系统与AMPK能量感应信号系统如何相互协同,促进心肌对抗IR损伤。这为糖尿病患者IR损伤的临床治疗提供了可能的治疗靶标。

## 参考文献

- [1] Hall TM, Gordon C, Roy R, et al. Delayed coronary reperfusion is ineffective at impeding the dynamic increase in cardiac efferent sympathetic nerve activity following myocardial ischemia[J]. Basic Res Cardiol, 2016, 111(3):3.
- [2] Myat A, Redwood SR, Gersh BJ, et al. Diabetes, incretin hormones and cardioprotection[J]. Heart, 2014, 100(19):1550-1561.
- [3] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等.《中国心血管病报告 2017》概要[J]. 中国循环杂志, 2018, 33(1):1-8.
- [4] Liu L, Simon B, Shi J, et al. Impact of diabetes mellitus on risk of cardiovascular disease and all-cause mortality: evidence on health outcomes and antidiabetic treatment in United States adults[J]. World J Diabetes, 2016, 7(18):449-461.
- [5] Wang Y, Wang W, Wang N, et al. Mitochondrial oxidative stress promotes atherosclerosis and neutrophil extracellular traps in aged mice[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(8):e99-e107.
- [6] Kadlec AO, Chabowski DS, Ait-Aissa K, et al. Role of PGC-1α in vascular regulation: implications for atherosclerosis[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016, 36(8):1467-1474.
- [7] Ping Z, Zhang LF, Cui YJ, et al. The protective effects of salidroside from exhaustive exercise-induced heart injury by enhancing the PGC-1α-NRF1/NRF2 pathway and mitochondrial respiratory function in rats[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015:876825.

(下转第 1095 页)

- 心血管病杂志,2018,46(1):10-25.
- [2] 吴寿岭,阮春雨,李冬青,等. 高血压前期人群中代谢综合征发生情况[J]. 中华高血压杂志,2010,18(4):335-338.
- [3] Kones R, Rumana U. Prevention of cardiovascular disease: updating the immensity of the challenge and male of risk factors[J]. *Hosp Pract*,2014,42(1):92-100.
- [4] 国家“十五”攻关“冠心病、脑卒中综合危险度评估及干预方案的研究”课题组. 国人缺血性心血管病发病危险的评估方法及简易评估工具的开发研究[J]. 中华心血管病杂志,2003,31(12):16-24.
- [5] Feliciano-Alfonso JE, Mendivil CO, Ariza ID, et al. Cardiovascular risk factors and metabolic syndrome in a population of young students from the National University of Colombia[J]. *Rev Assoc Med Bras* (1992), 2010, 56(3):293-298.
- [6] Figueroa-Colon R, Franklin FA, Lee JY, et al. Feasibility of a clinic-based hypocaloric dietary intervention implemented in a school setting for obese children[J]. *Obes Res*,1996,4(5):419-429.
- [7] Genovesi S, Pieruzzi F, Giussani M, et al. Analysis of heart period and arterial pressure variability in childhood hypertension: key role of baroreflex impairment [J]. *Hypertension*,2008,51(5):1289-1294.
- [8] Guo X, Zou L, Zhang X, et al. Prehypertension: a meta-analysis of the epidemiology, risk factors, and predictors of progression[J]. *Tex Heart Inst J*, 2011,38(6):643-652.
- [9] 李思林,谢志国,彭谋峰,等. 体检人群高血压前期并发糖脂代谢异常的调查分析[J]. 河北医药,2019,41(4):142-145.
- [10] Elmer PJ, Obarzanek E, Vollmer WM, et al. Effects of comprehensive lifestyle modification on diet, weight, physical fitness, and blood pressure control: 18-month results of a randomized trial[J]. *Ann Intern Med*,2006,144(7):485-495.
- [11] Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, et al. Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH) diet. DASH-Sodium Collaborative Research Group[J]. *N Engl J Med*,2001,344(1):3-10.
- [12] Appel LJ, Sacks FM, Carey VJ, et al. Effects of protein, monounsaturated fat, and carbohydrate intake on blood pressure and serum lipids: results of the OmniHeart randomized trial[J]. *JAMA*,2005,294(19):2455-2464.

收稿时间:2019-12-07

(上接第 1090 页)

- [8] Thiele RH. Subcellular energetics and metabolism: potential therapeutic applications[J]. *Anesth Analg*,2017,124(6):1872-1885.
- [9] Thangarajah H, Vial IN, Grogan RH, et al. HIF-1 $\alpha$  dysfunction in diabetes [J]. *Cell Cycle*,2010,9(1):75-79.
- [10] Bento CF, Pereira P. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 and the loss of the cellular response to hypoxia in diabetes[J]. *Diabetologia*,2011,54(8):1946-1956.
- [11] Miki T, Itoh T, Sunaga D, et al. Effects of diabetes on myocardial infarct size and cardioprotection by preconditioning and postconditioning [J]. *Cardiovasc Diabetol*,2012,11:67.
- [12] Drenger B, Ostrovsky IA, Barak M, et al. Diabetes blockade of sevoflurane postconditioning is not restored by insulin in the rat heart: phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3- and phosphatidylinositol 3-kinase-mediated inhibition[J]. *Anesthesiology*,2011,114(6):1364-1372.
- [13] Badalzadeh R, Mokhtari B, Yavari R. Contribution of apoptosis in myocardial reperfusion injury and loss of cardioprotection in diabetes mellitus[J]. *J Physiol Sci*,2015,65(3):201-215.
- [14] Cai Z, Luo W, Zhan H, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2013,110(43):17462-17467.
- [15] Yang L, Xie P, Wu J, et al. Sevoflurane postconditioning improves myocardial mitochondrial respiratory function and reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by up-regulating HIF-1[J]. *Am J Transl Res*,2016,8(10):4415-4424.
- [16] Yu J, Maimaitili Y, Xie P, et al. High glucose concentration abrogates sevoflurane postconditioning cardioprotection by advancing mitochondrial fission but dynamin-related protein 1 inhibitor restores these effects[J]. *Acta Physiol (Oxf)*,2017,220(1):83-98.
- [17] Wu J, Yang L, Xie P, et al. Cobalt chloride upregulates impaired HIF-1 $\alpha$  expression to restore sevoflurane postconditioning dependent myocardial protection in diabetic rats[J]. *Front Physiol*,2017,8:395.
- [18] Xie P, Yang L, Talaiti A, et al. Deferoxamine-activated hypoxia-inducible factor-1 restores cardioprotective effects of sevoflurane postconditioning in diabetic rats [J]. *Acta Physiol (Oxf)*,2017,221(2):98-114.
- [19] Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease[J]. *Annu Rev Physiol*,2014,76:39-56.
- [20] Alers S, Löffler AS, Wesselborg S, et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks[J]. *Mol Cell Biol*, 2012,32(1):2-11.
- [21] Xie Z, He C, Zou MH. AMP-activated protein kinase modulates cardiac autophagy in diabetic cardiomyopathy [J]. *Autophagy*, 2011,7(10):1254-1255.
- [22] Ugucioni G, Hood DA. The importance of PGC-1 $\alpha$  in contractile activity-induced mitochondrial adaptations[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*,2011,300(2):E361-E371.
- [23] Shao D, Liu Y, Liu X, et al. PGC-1 beta-regulated mitochondrial biogenesis and function in myotubes is mediated by NRF-1 and ERR  $\alpha$ [J]. *Mitochondrion*, 2010,10(5):516-527.
- [24] Venditti P, Bari A, di Stefano L, et al. Involvement of PGC-1, NRF-1, and NRF-2 in metabolic response by rat liver to hormonal and environmental signals[J]. *Mol Cell Endocrinol*,2009,305(1-2):22-29.
- [25] Zhang Y, Wang C, Jin Y, et al. Activating the PGC-1 $\alpha$ /TERT pathway by catalpol ameliorates atherosclerosis via modulating ROS production, DNA damage, and telomere function: implications on mitochondria and telomere link [J]. *Oxid Med Cell Longev*,2018,2018:2876350.
- [26] Song SB, Hwang ES. A rise in ATP, ROS, and mitochondrial content upon glucose withdrawal correlates with a dysregulated mitochondria turnover mediated by the activation of the protein deacetylase SIRT1[J]. *Cells*,2018,8(1):11.
- [27] Choi GE, Oh JY, Lee HJ, et al. Glucocorticoid-mediated ER-mitochondria contacts reduce AMPA receptor and mitochondria trafficking into cell terminus via microtubule destabilization[J]. *Cell Death Dis*,2018,9(11):1137.
- [28] Hennuyer N, Duplan I, Paquet C, et al. The novel selective PPAR $\alpha$  modulator (SPPARM $\alpha$ ) pemafibrate improves dyslipidemia, enhances reverse cholesterol transport and decreases inflammation and atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 2016,249:200-208.

收稿时间:2020-04-25