

网络出版时间: 2025-03-26 10:46:16 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250325.1728.006>

# HSPA1A 对缺氧环境下 H9c2 心肌细胞凋亡损伤的影响及机制研究

李小玲<sup>1</sup> 钟小兰<sup>2</sup>(新疆医科大学第二附属医院<sup>1</sup> 药学部、<sup>2</sup> 心血管内科, 乌鲁木齐 830063)

**摘要** 目的 探究热休克蛋白 70 ku 蛋白 1A(HSPA1A)在缺氧环境下对大鼠心肌细胞 H9c2 炎症水平与凋亡损伤的影响,并分析其作用机制。方法 将 H9c2 细胞分别进行常氧(Nor)和缺氧(Hyp)处理后,RT-qPCR法和 Western blot 法检测细胞中 HSPA1A 表达变化。将常 H9c2 细胞分为 Nor 组(常氧培养)、sh-HSPA1A+Nor 组(细胞转染 HSPA1A shRNA 质粒,常氧培养)、Hyp 组(缺氧培养细胞)、sh-HSPA1A+Hyp 组(细胞转染 HSPA1A shRNA 质粒,缺氧培养),RT-qPCR 法和 Western blot 法检测各组 H9c2 细胞中 HSPA1A 表达水平,倒置显微镜观察各组 H9c2 细胞形态,CCK-8 法检测各组 H9c2 细胞活性,ELISA 检测各组 H9c2 细胞上清液中炎症因子肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-6、IL-1 $\beta$ 含量及心肌损伤标志物乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)活性,Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组 H9c2 细胞凋亡率,Western blot 法检测各组 H9c2 细胞中 TNF 受体关联因子 2( TRAF2)/核因子  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)通路相关蛋白表达水平。结果 与 Nor 组比较,缺氧诱导后的 Hyp 组 H9c2 细胞中 HSPA1A mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量显著上调( $P<0.05$ )。与 Nor 组比较,Hyp 组 H9c2 细胞数目明显减少,部分细胞出现皱缩且排列紊乱,细胞活性显著下降( $P<0.05$ ),上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量及 LDH、CK 活性显著升高( $P<0.05$ )。细胞凋亡率显著增加( $P<0.05$ )。TRAF2 蛋白相对表达量、p65 磷酸化水平和核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$ (I $\kappa$ B $\alpha$ )磷酸化水平显著上调( $P<0.05$ );与 Hyp 组比较,sh-HSPA1A+Hyp 组 H9c2 细胞形态得到改善,细胞排列较为密集,细胞活性显著升高( $P<0.05$ ),上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 含量减少,LDH 和 CK 活性显著下降( $P<0.05$ ),细胞凋亡率显著减少( $P<0.05$ ),同时细胞中 TRAF2 蛋白相对表达量、p65 磷酸化水平和 I $\kappa$ B $\alpha$ 磷酸化水平也显著下调( $P<0.05$ )。结论 缺氧诱导大鼠心肌细胞 H9c2 中 HSPA1A 表达升高,而抑制其表达能够改善缺氧诱导的 H9c2 细胞炎症反应并减少凋亡损伤,该作用机制可能与其调控 TRAF2/NF- $\kappa$ B 通路有关。

**关键词** 心肌细胞;缺氧;热休克蛋白 70 ku 蛋白 1A;炎症;凋亡;TNF 受体关联因子 2;核因子  $\kappa$ B

中图分类号 R 54

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2025)04-0634-08

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.04.007

急性心肌梗死是一种常见的心血管危重症,其特征是发作急、病死率高和残疾率高,约占世界心血管死亡人数的 50%<sup>[1]</sup>。在急性心肌梗死期间,冠状动脉急性闭塞会剥夺心肌中的氧气和营养物质,导致心功能障碍,包括肥大和心肌重塑,最终导致心力衰竭<sup>[2]</sup>。心肌梗死主要是由于心肌细胞凋亡导致心肌细胞损伤,由于心肌细胞是终末分化的细胞,几乎没有再生潜力,心肌一旦受损将会很难恢复。因此,揭示影响心肌细胞损伤的靶点和潜在分子机制,对于开发新的有效心肌梗死治疗方案具有重要意义。

热休克蛋白 70(heat shock protein 70,HSP70)是一种参与细胞应激保护的热休克蛋白,该家族成员主要有 HSPA1A、HSPA5、HSPA8、HSPA9,其中 HSPA1A 是没有内含子且编码一个 70 ku 的热休克蛋白,在病毒、氧化应激、肿瘤及其他一些刺激下其表达增高<sup>[3]</sup>。已有研究<sup>[4]</sup>表明,HSPA1A 在心肌缺血再灌注诱导的急性心肌梗死大鼠心肌组织和缺氧/复氧心肌细胞中均上调表达,并通过激活核因子  $\kappa$ B(nuclear transcription factor- $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B)促进急性心肌梗死大鼠的心肌损伤和炎症反应。但靶向抑制 HSPA1A 能否改善急性心肌梗死后心肌细胞炎症及凋亡损伤尚不可知。因此,该研究通过缺氧诱导大鼠心肌细胞 H9c2 建立体外细胞模型,分析 HSPA1A 在缺氧环境下 H9c2 细胞中的表达,并探讨抑制 HSPA1A 对 H9c2 细胞炎症反应及凋亡损伤的调控作用及机制。

2024-12-08 接收

基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金项目(编号:2022D01C269)

作者简介:李小玲,女,副主任药师;

钟小兰,女,主任医师,通信作者,E-mail: 18799190138@139.com

## 1 材料与方 法

**1.1 主要材料与试剂** 大鼠心肌细胞 H9c2 购自武汉普诺赛生命科技有限公司, DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司, 胎牛血清购自上海联迈生物工程有限公司, Lipofectamine 2000、青-链霉素双抗液和 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, 通用反转录试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司, 荧光定量检测 2×T5 Fast qPCR Mix 购自北京擎科生物科技股份有限公司, RIPA 裂解液购自上海爱必信生物科技有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 CCK-8 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, 聚偏二氟乙烯膜和 ECL 购自沈阳万类生物科技有限公司, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (interleukin, IL)-6、IL-1 $\beta$  检测试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司, 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 和肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 检测试剂盒购自武汉益普生物科技有限公司, Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自武汉金开瑞生物工程有限公司。抗体 HSPA1A、TNF 受体关联因子 2 (TNF receptor-associated factor 2, TRAF2)、磷酸化 p65 (phosphorylated p65, p-p65)、p65、磷酸化核因子  $\kappa$ B 抑制蛋白  $\alpha$  (phosphorylated-inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B alpha, p-I $\kappa$ B $\alpha$ )、I $\kappa$ B $\alpha$ 、GAPDH 及辣根过氧化物酶标记二抗购自英国 Abcam 公司。引物由上海生工生物工程公司合成, HSPA1A shRNA 质粒载体由上海生工生物工程公司设计构建。

## 1.2 方 法

**1.2.1 H9c2 细胞缺氧处理** 大鼠心肌细胞 H9c2 放置于 DMEM 培养基并补充含有 10% 胎牛血清和 1% 青-链霉素双抗液, 在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。每隔 2 d 进行一次传代, 取对数生长期的细胞进行实验。将 H9c2 分为常氧 (normoxia, Nor) 组和缺氧 (hypoxia, Hyp) 组, Nor 组在含 21% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、74% N<sub>2</sub> 的 37 °C 培养箱中培养 48 h, Hyp 组在含 1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>、94% N<sub>2</sub> 的 37 °C 缺氧培养箱中培养 24 h。

**1.2.2 RT-qPCR 法检测 H9c2 细胞中 HSPA1A mRNA 表达水平** 使用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒提取 H9c2 细胞的总 RNA, 电泳分析 RNA 完整性, 超微量分光光度计检测 RNA 纯度。取适量总 RNA, 根据反转录试剂盒说明书对 RNA 进行反转录操作, 反应获得 cDNA, 置于 -20 °C 中保存。通过荧光定

量反应进行循环扩增, 参照试剂盒说明书配置反应体系, 在检测系统上设置反应条件为: 95 °C 15 min (进行 1 次循环), 95 °C 15 s、58 °C 30 s、72 °C 30 s (共进行 40 个循环)。扩增结束后, 以  $\beta$ -actin 作为内参, 根据 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> 法计算目的基因相对表达量。引物序列为: HSPA1A 上游引物 5'-TTGCACGTGGGCTTTATCTTC-3', 下游引物 5'-GCCCAGGGGAGAGTCCAAA-3';  $\beta$ -actin 上游引物 5'-CTGAGAGGGAAATCGTGCCT-3', 下游引物 5'-CCA-CAGGATTCCATACCCAAGA-3'。

**1.2.3 Western blot 法检测 H9c2 细胞中 HSPA1A 蛋白及 TRAF2/NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达水平** 收集 H9c2 细胞, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法进行蛋白定量。蛋白质煮沸变性后, 进行 10% SDS-PAGE 电泳分离, 切胶后, 转移至聚偏二氟乙烯膜上。利用 5% 脱脂奶粉封闭液封闭 2 h, 加入一抗 HSPA1A (1 : 1 000)、TRAF2 (1 : 1 000)、p-p65 (1 : 1 000)、p65 (1 : 1 000)、p-I $\kappa$ B $\alpha$  (1 : 1 000)、I $\kappa$ B $\alpha$  (1 : 1 000) 及 GAPDH (1 : 1 000), 4 °C 过夜孵育。次日, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 5 000), 室温孵育 2 h。经 ECL 显色后, 化学发光成像仪观察条带, 分析目的蛋白相对表达量。

**1.2.4 H9c2 细胞转染与处理** 取 H9c2 细胞培养于 24 孔板, 控制每孔密度为 5×10<sup>4</sup> 个, 当细胞汇合至 60% 时进行转染。将 1  $\mu$ g HSPA1A shRNA 质粒稀释于 50  $\mu$ l Opti-MEM 培养基中, 再取 1  $\mu$ l Lipofectamine 2000 脂质体转染试剂稀释于 50  $\mu$ l Opti-MEM 培养基中; 将上述两管液体混合, 室温孵育 20 min 后, 将其加入含细胞的 24 孔板中, 37 °C 培养箱孵育 48 h 后, 收集细胞。实验分为 4 组, 具体分组与处理如下: ① Nor 组, 常氧环境下培养 H9c2 细胞; ② sh-HSPA1A+Nor 组, 将 HSPA1A shRNA 质粒转染至 H9c2 细胞, 并于常氧环境下培养; ③ Hyp 组, 缺氧环境下培养 H9c2 细胞; ④ sh-HSPA1A+Hyp 组, 将 HSPA1A shRNA 质粒转染至 H9c2 细胞, 并于缺氧环境下培养。24 h 后收集 4 组 H9c2 细胞, qPCR 法和 Western blot 法检测细胞中 HSPA1A 表达水平, 并通过倒置显微镜观察细胞形态, 再进行后续实验检测。

**1.2.5 CCK-8 法检测 H9c2 细胞活性** 将 H9c2 细胞按照每孔为 1×10<sup>4</sup> 个的密度接种在 96 孔板上, 根据分组情况进行对应处理。24 h 后, 向每孔加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 试剂, 37 °C 培养箱孵育 2 h, 采用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度 (optical density,

OD) 值。

**1.2.6 ELISA 检测 H9c2 细胞炎症因子及心肌损伤标志物** H9c2 细胞按照分组处理后, 留取细胞上清液, 按照 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、LDH 和 CK 试剂盒说明书, 酶标仪检测 OD 值, 制作标准曲线, 计算各组上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量及 LDH、CK 活性。

**1.2.7 流式细胞术检测 H9c2 细胞凋亡** H9c2 细胞按照分组处理后, 胰酶消化, 预冷的 PBS 漂洗并重悬。将细胞悬液与 10  $\mu$ l Annexin V-FITC 试剂混匀, 室温避光孵育 15 min, 再加入 10  $\mu$ l PI 混匀, 室温避光孵育 10 min, 流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**1.3 统计学处理** 实验数据通过 SPSS 23.0 软件进行分析, 计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。独立样本 *t* 检验和单因素方差分析进行数据比较,  $P<0.05$  为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 8.30 软件绘制统计图。

## 2 结果

### 2.1 缺氧处理后 H9c2 细胞中 HSPA1A 表达变化

不同处理后的 2 组 H9c2 细胞中 HSPA1A mRNA 及

蛋白相对表达量差异均有统计学意义( $t=47.809, P<0.001; t=24.551, P<0.001$ )。与 Nor 组比较, Hyp 组 H9c2 细胞中 HSPA1A mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量均显著上调( $P<0.05$ )。见图 1。

**2.2 转染后的 H9c2 细胞中 HSPA1A 表达水平比较** 转染后的 4 组 H9c2 细胞中 HSPA1A mRNA 及蛋白相对表达量差异均有统计学意义( $F=65.341, P<0.001; F=43.958, P<0.001$ )。与 Nor 组比较, sh-HSPA1A+Nor 组 H9c2 细胞中 HSPA1A mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量显著下调( $P<0.05$ ); 与 Hyp 组比较, sh-HSPA1A+Hyp 组 H9c2 细胞中 HSPA1A mRNA 相对表达量和蛋白相对表达量也均显著下调( $P<0.05$ )。见图 2。

**2.3 各组 H9c2 细胞增殖活性比较** H9c2 细胞经过不同干预后, 在倒置显微镜下观察其形态, Nor 组和 sh-HSPA1A+Nor 组 H9c2 细胞大小均匀, 排列较为整齐; Hyp 组 H9c2 细胞数目明显减少, 部分细胞出现皱缩, 排列紊乱; 与 Hyp 组相比, sh-HSPA1A+Hyp 组 H9c2 细胞形态得到改善, 细胞排列较为密集。见图 3。

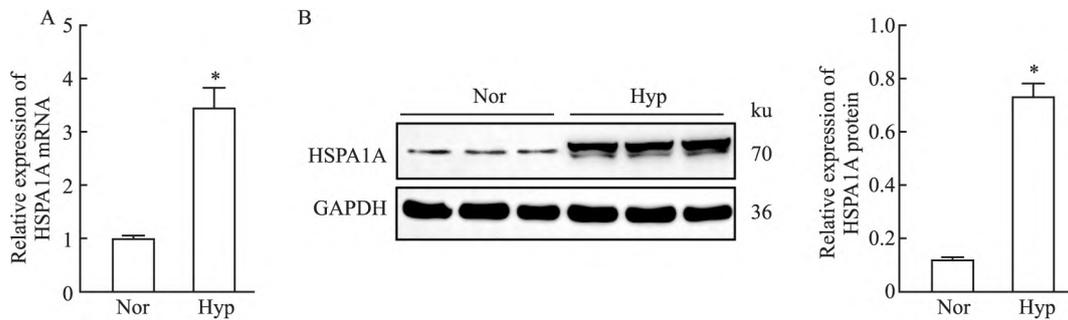


图 1 缺氧下 H9c2 细胞 HSPA1A 表达水平

Fig.1 The expression level of HSPA1A in H9c2 cells under hypoxia

A: The expression of HSPA1A mRNA was detected by RT-qPCR; B: Western blot detection of HSPA1A protein expression; \*  $P<0.05$  vs Nor group.

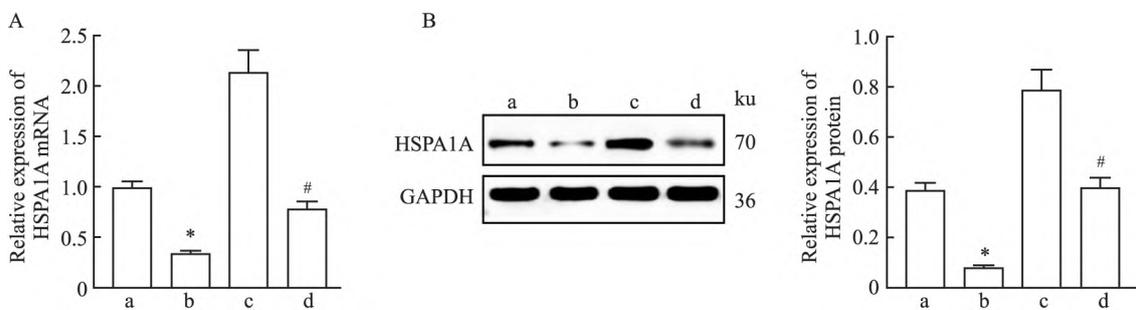


图 2 转染后 H9c2 细胞 HSPA1A 表达水平

Fig.2 The expression level of HSPA1A in H9c2 cells after transfection

A: The expression of HSPA1A mRNA was detected by RT-qPCR; B: Western blot detection of HSPA1A protein expression; a: Nor group; b: sh-HSPA1A+Nor group; c: Hyp group; d: sh-HSPA1A+Hyp group; \*  $P<0.05$  vs Nor group; #  $P<0.05$  vs Hyp group.

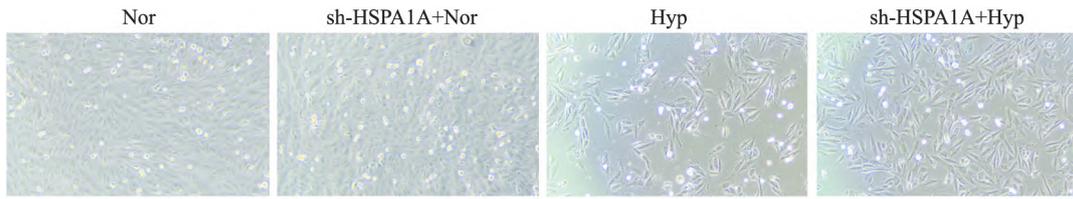


图3 各组 H9c2 细胞形态观察 ×100

Fig.3 Morphologic observation of H9c2 cells in each group ×100

在相同时间点下的 4 组 H9c2 细胞活性差异均有统计学意义 ( $F_{24h} = 67.982, P < 0.001; F_{48h} = 112.434, P < 0.001; F_{72h} = 135.765, P < 0.001$ )。与 Nor 组比较, Hyp 组 H9c2 细胞在诱导 24、48 和 72 h 后, 细胞活性显著下降 ( $P < 0.05$ )。sh-HSPA1A+Nor 组 H9c2 细胞活性较 Nor 组未发生显著变化; 与 Hyp 组比较, sh-HSPA1A+Hyp 组 H9c2 细胞在诱导 24、48 和 72 h 后, 细胞活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

**2.4 各组 H9c2 细胞炎症因子水平比较** 4 组 H9c2 细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量差异均有统计学意义 ( $F = 239.026, P < 0.001; F = 354.983, P < 0.001; F = 286.517, P < 0.001$ )。与 Nor 组比较, Hyp 组 H9c2 细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量显著升高 ( $P < 0.05$ )。sh-HSPA1A+Nor 组以上炎症因子含量均未发生显著变化; 与 Hyp 组比较, sh-HSPA1A+Hyp 组 H9c2 细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量显著减少 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

**2.5 各组 H9c2 细胞 LDH 和 CK 活性比较** 4 组 H9c2 细胞上清液中 LDH 和 CK 活性差异均有统计学意义 ( $F = 423.656, P < 0.001; F = 587.742, P < 0.001$ )。与 Nor 组比较, Hyp 组 H9c2 细胞上清液

中 LDH 和 CK 活性显著升高 ( $P < 0.05$ )。sh-HSPA1A+Nor 组 LDH 和 CK 活性均未发生显著变化 ( $P > 0.05$ )。与 Hyp 组比较, sh-HSPA1A+Hyp 组 H9c2 细胞上清液中 LDH 和 CK 活性显著下降 ( $P < 0.05$ )。见图 6。

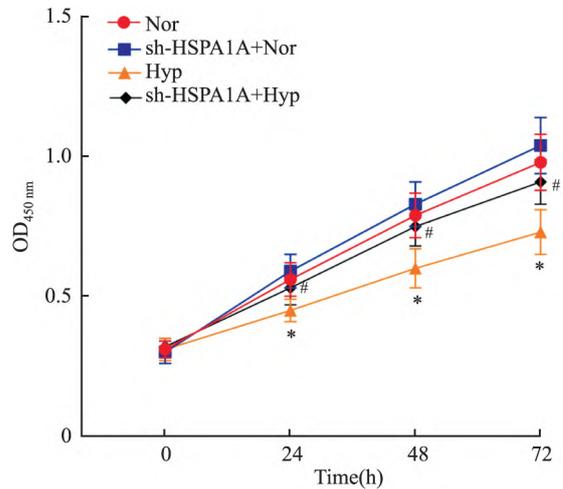


图4 各组 H9c2 细胞活性

Fig.4 Activity of H9c2 cells in each group

\*  $P < 0.05$  vs Nor group; #  $P < 0.05$  vs Hyp group.

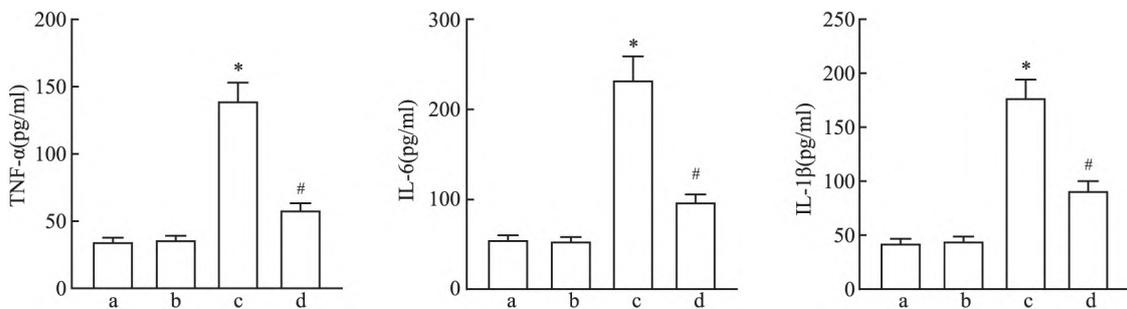


图5 各组 H9c2 细胞 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 IL-1 $\beta$  含量

Fig.5 Contents of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in H9c2 cells in each group

a: Nor group; b: sh-HSPA1A+Nor group; c: Hyp group; d: sh-HSPA1A+Hyp group; \*  $P < 0.05$  vs Nor group; #  $P < 0.05$  vs Hyp group.

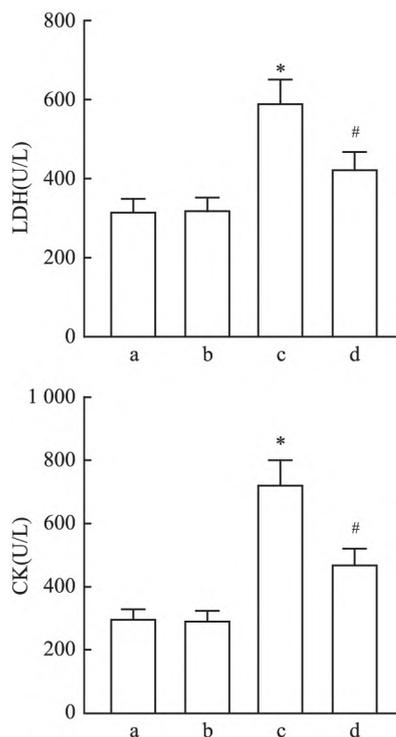


图6 各组 H9c2 细胞 LDH 和 CK 活性

Fig.6 Activity of LDH and CK of H9c2 cells in each group

a: Nor group; b: sh-HSPA1A + Nor group; c: Hyp group; d: sh-HSPA1A + Hyp group; \*  $P < 0.05$  vs Nor group; #  $P < 0.05$  vs Hyp group.

**2.6 各组 H9c2 细胞凋亡率比较** 4 组 H9c2 细胞凋亡率差异有统计学意义 ( $F = 153.071, P < 0.001$ )。与 Nor 组比较, Hyp 组 H9c2 细胞凋亡率显著增加

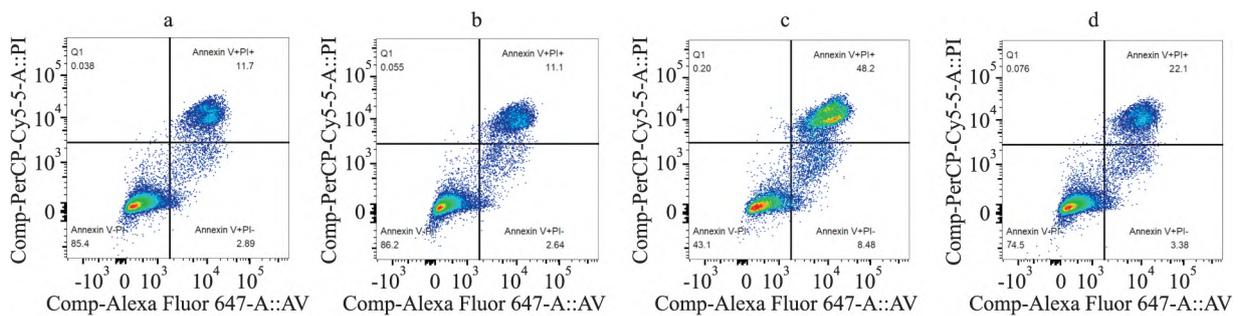


图7 各组 H9c2 细胞凋亡率

Fig.7 Apoptosis rate of H9c2 cells in each group

a: Nor group; b: sh-HSPA1A + Nor group; c: Hyp group; d: sh-HSPA1A + Hyp group; \*  $P < 0.05$  vs Nor group; #  $P < 0.05$  vs Hyp group.

( $P < 0.05$ ) ,sh-HSPA1A+Nor 组凋亡率未发生显著变化; 而 sh-HSPA1A+Hyp 组 H9c2 细胞凋亡率较 Hyp 组显著减少 ( $P < 0.05$ )。见图 7。

**2.7 各组 H9c2 细胞中 TRAF2/NF- $\kappa$ B 通路相关蛋白表达比较** 4 组 H9c2 细胞中 TRAF2 蛋白相对表达量、p65 磷酸化水平和 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平差异均有统计学意义 ( $F = 67.890, P < 0.001$ ;  $F = 46.573, P < 0.001$ ;  $F = 43.325, P < 0.001$ )。与 Nor 组比较, Hyp 组 H9c2 细胞中 TRAF2 蛋白相对表达量、p65 磷酸化水平和 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平显著上调 ( $P < 0.05$ ) ,sh-HSPA1A+Nor 组以上蛋白表达量均未发生显著变化; 与 Hyp 组比较, sh-HSPA1A+Hyp 组 H9c2 细胞中 TRAF2 蛋白相对表达量、p65 磷酸化水平和 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平显著下调 ( $P < 0.05$ )。见图 8。

### 3 讨论

急性心肌梗死伴有多种病理特征,如心肌细胞凋亡和心肌重塑。心肌细胞凋亡是心肌梗死后心肌损伤的主要原因。一系列病理因素可诱发心肌细胞凋亡,包括缺氧、钙超负荷和酸中毒等<sup>[5]</sup>。在这些病理因素中,缺氧是导致心肌细胞凋亡的重要因素。因此,探讨心肌梗死后缺氧调节心肌细胞凋亡的机制,可以为更深入地了解、预防和治疗心肌梗死提供重要的分子基础。HSP70 与多种心血管疾病的发生

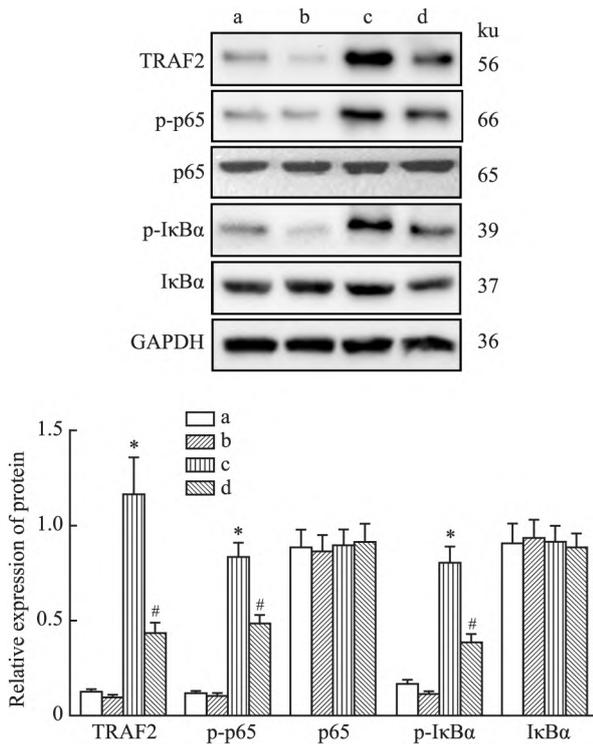


图8 各组 H9c2 细胞中 TRAF2/NF-κB 通路相关蛋白表达

Fig.8 The expression of TRAF2/NF-κB pathway-related proteins in H9c2 cells of each group

a: Nor group; b: sh-HSPA1A + Nor group; c: Hyp group; d: sh-HSPA1A + Hyp group; \*  $P < 0.05$  vs Nor group; #  $P < 0.05$  vs Hyp group.

发展有关。例如,通过远程缺血预处理大鼠血浆中分离的外泌体能够改善结扎左冠状动脉诱导的心肌梗死大鼠心脏功能和心脏重塑,该作用机制与靶向 HSP70 抑制心肌细胞凋亡有关<sup>[6]</sup>;与预后良好的老年慢性心力衰竭患者相比,预后不良的老年慢性心力衰竭患者 HSP70-2 基因+1267A/C 基因型、等位基因差异有统计学意义,说明 HSP70-2 基因+1267A/C 多态性是老年慢性心力衰竭患者预后的影响因素<sup>[7]</sup>;此外,HSPA1A 在横向主动脉收缩小鼠中高表达,可调控心脏肥大相关基因、相关非编码 RNA 以及免疫和炎症反应相关基因的表达,并调控心脏肥大发展中转录调控相关基因的选择性剪接,研究<sup>[8]</sup>表明 HSPA1A 与心脏肥大有关。该研究表明,经过缺氧诱导的 H9c2 细胞中 HSPA1A 表达水平显著上调,由此推测,HSPA1A 可能参与调控急性心肌梗死过程。

有研究<sup>[9]</sup>表明,急性心肌梗死伴有炎症反应。心肌梗死后,立即触发炎症反应,这是心肌损伤恢复至稳态的关键决定因素。虽然炎症细胞浸润可以清

除坏死的心肌细胞和细胞外基质片段以促进损伤恢复过程,但持续的炎症和免疫浸润会直接导致心肌凋亡,进而损害心脏功能<sup>[10]</sup>。多种内源性炎症细胞因子表达增加可导致心肌功能障碍。在缺氧环境下,由于细胞炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  的分泌增加,促进炎症反应,诱导心肌细胞凋亡<sup>[11]</sup>。该研究结果显示,缺氧诱导后 H9c2 细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  含量升高;通过转染 HSPA1A shRNA 质粒抑制 H9c2 细胞中 HSPA1A 表达后再经缺氧诱导后细胞上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  含量减少。LDH 是广泛存在于人体内并与能量代谢过程密切相关的一种重要酶。心肌损伤过程中,心肌细胞膜受损,释放出大量的 LDH。CK 是一种参与能量转运和三磷酸腺苷再生的重要激酶,主要存在于细胞质和线粒体中,心肌细胞损伤导致 CK 活性增加<sup>[12]</sup>。在该研究中,缺氧环境下 H9c2 细胞 LDH 和 CK 活性均升高,细胞凋亡率增加;而在缺氧环境下抑制 H9c2 细胞中 HSPA1A 表达后,LDH 和 CK 活性下降,细胞凋亡率减少。以上结果表明,抑制 HSPA1A 表达能够减少缺氧环境下 H9c2 细胞炎症因子的释放,改善细胞凋亡及损伤。

TRAF2 是肿瘤坏死因子受体相关因子家族的成员,作为细胞间重要的信号传导蛋白,其能够与肿瘤坏死因子受体结合并招募 I $\kappa$ B 激酶复合体,导致 I $\kappa$ B 蛋白的磷酸化,磷酸化后的 I $\kappa$ B 降解同时释放 NF- $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B 转位到细胞核内,启动一系列与炎症和细胞凋亡相关基因的转录,从而在炎症反应、细胞增殖与存活中发挥关键作用<sup>[13]</sup>。TRAF2/NF- $\kappa$ B 信号通路与多种疾病的发生进展密切相关,因此成为了潜在的治疗靶点。桑根酮 C 通过调控 TRAF2 表达来抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,减少猪蓝耳病毒的复制,从而有效地保护细胞免受该病毒感染和损伤<sup>[14]</sup>。黄芩素处理能够抑制去氧肾上腺素诱导的心脏肥大,该作用机制与其抑制 TRAF2/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活有关<sup>[15]</sup>。急性心肌梗死大鼠经过天麻素干预后,肌醇依赖性激酶 1 $\alpha$ /TRAF2/NF- $\kappa$ B 通路被抑制,减轻了大鼠心肌组织损伤及炎症反应,改善了大鼠心功能<sup>[16]</sup>。该研究结果显示,缺氧环境下 H9c2 细胞中 TRAF2 蛋白相对表达量、p65 磷酸化水平和 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平上调,抑制 HSPA1A 表达并在缺氧环境下诱导的 H9c2 细胞中 TRAF2 蛋白相对表达量、p65 磷酸化水平和 I $\kappa$ B $\alpha$  磷酸化水平均

下调,提示抑制 HSPA1A 表达可能通过抑制 TRAF2/NF- $\kappa$ B 信号通路改善缺氧诱导的 H9c2 细胞损伤。

综上所述,HSPA1A 在缺氧环境诱导的大鼠心肌细胞 H9c2 中表达升高,抑制其表达能够改善缺氧诱导的细胞损伤,提高细胞活性,降低 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  含量及 LDH、CK 活性,减少细胞凋亡,其作用机制可能与抑制 TRAF2/NF- $\kappa$ B 通路的激活有关。但尚未进行动物水平的实验验证,后续该课题组将对此进行进一步的研究。

### 参考文献

- [1] 马良,米合尔古丽·吐尔逊太,刘敏敏,等.合并高血压对急性心肌梗死发病昼夜节律的影响[J].安徽医科大学学报,2022,57(6):982-6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.026.
- [1] Ma L, Miheerguli T R X T, Liu M M, et al. The effect of hypertension on the circadian rhythm of acute myocardial infarction [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2022, 57(6): 982-6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.026.
- [2] Galli M, Niccoli G, De Maria G, et al. Coronary microvascular obstruction and dysfunction in patients with acute myocardial infarction [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21(5): 283-98. doi: 10.1038/s41569-023-00953-4.
- [3] Smulders L, Altman R, Briseno C, et al. Phosphatidylinositol monophosphates regulate the membrane localization of HSPA1A, a stress-inducible 70-kDa heat shock protein [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(6): 856. doi: 10.3390/biom12060856.
- [4] 刘超群,梁丽艳,刘顺民,等. HSPA1A 受 HOTAIR/miR-590-3p 轴调控促进 I/R 诱导的心肌梗死大鼠体内 NF- $\kappa$ B 介导的炎症反应[J].东南大学学报(医学版),2023,42(5):696-705. doi: 10.3969/j.issn.1671-6264.2023.05.007.
- [4] Liu C Q, Liang L Y, Liu S M, et al. HSPA1A promotes NF- $\kappa$ B-mediated inflammatory response in rats with myocardial infarction induced by ischemia/reperfusion *via* HOTAIR/miR-590-3p axis [J]. *J Southeast Univ Med Sci Ed*, 2023, 42(5): 696-705. doi: 10.3969/j.issn.1671-6264.2023.05.007.
- [5] Sun J, Wang R, Chao T, et al. Long noncoding RNAs involved in cardiomyocyte apoptosis triggered by different stressors [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2022, 15(3): 588-603. doi: 10.1007/s12265-021-10186-w.
- [6] Chen Q, Huang M, Wu J, et al. Exosomes isolated from the plasma of remote ischemic conditioning rats improved cardiac function and angiogenesis after myocardial infarction through targeting Hsp70 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(4): 3682-93. doi: 10.18632/aging.102837.
- [7] 刘力华,刘娟.超声心动图参数及 HSP70 基因多态性与老年慢性心力衰竭预后的相关性分析[J].中国医药导刊,2023,25(1):45-50. doi: 10.3969/j.issn.1009-0959.2023.01.009.
- [7] Liu L H, Liu J. Correlation analysis of echocardiographic parameters and HSP70 gene polymorphism with the prognosis of chronic heart failure in the elderly [J]. *Chin J Med Guide*, 2023, 25(1): 45-50. doi: 10.3969/j.issn.1009-0959.2023.01.009.
- [8] Li S, Yang P. Relationship between HSPA1A-regulated gene expression and alternative splicing in mouse cardiomyocytes and cardiac hypertrophy [J]. *J Thorac Dis*, 2021, 13(9): 5517-33. doi: 10.21037/jtd-21-1222.
- [9] Matter M A, Paneni F, Libby P, et al. Inflammation in acute myocardial infarction: the good, the bad and the ugly [J]. *Eur Heart J*, 2024, 45(2): 89-103. doi: 10.1093/eurheartj/ehad486.
- [10] Vargas I, Grabau R P, Chen J, et al. Simultaneous inhibition of thrombosis and inflammation is beneficial in treating acute myocardial infarction [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(8): 7333. doi: 10.3390/ijms24087333.
- [11] Wang J, Chen X, Huang W. microRNA-369 attenuates hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis and inflammation *via* targeting TRPV3 [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2021, 54(3): e10550. doi: 10.1590/1414-431X202010550.
- [12] Huang J, Wei S, Jiang C, et al. Involvement of abnormal gut microbiota composition and function in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2022, 12: 808837. doi: 10.3389/fcimb.2022.808837.
- [13] Dhingra R, Rabinovich-Nikitin I, Rothman S, et al. Proteasomal degradation of TRAF2 mediates mitochondrial dysfunction in doxorubicin-cardiomyopathy [J]. *Circulation*, 2022, 146(12): 934-54. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.121.058411.
- [14] Liu X, Zhu Y, Wang D, et al. The natural compound Sanggenon C inhibits PRRSV infection by regulating the TRAF2/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Vet Res*, 2023, 54(1): 114. doi: 10.1186/s13567-023-01245-y.
- [15] Shi X, Hu Y, Jiang Y, et al. Scutellarein protects against cardiac hypertrophy *via* suppressing TRAF2/NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(3): 2085-95. doi: 10.1007/s11033-021-07026-0.
- [16] 李小玲,钟小兰,方志敏,等.天麻素经 IRE1 $\alpha$ /TRAF2/NF- $\kappa$ B 通路调控大鼠急性心肌梗死诱导的炎症反应及机制研究[J].河北医药,2023,45(10):1455-9.
- [16] Li X L, Zhong X L, Fang Z M, et al. Regulatory effects of ginsenoside on the inflammatory response induced by acute myocardial infarction in rats and its action mechanism *via* IRE1 $\alpha$ /TRAF2/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Hebei Med J*, 2023, 45(10): 1455-9.

## Effect and mechanism of HSPA1A on apoptosis of H9c2 cardiomyocytes in hypoxic environment

Li Xiaoling<sup>1</sup>, Zhong Xiaolan<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Pharmacy, <sup>2</sup>Dept of Cardiovascular Medicine, The Second Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830063)

**Abstract Objective** To investigate the effects of heat shock protein 70 ku protein 1A (HSPA1A) on H9c2 inflammation and apoptotic injury in rat cardiomyocytes under hypoxia, and to analyze its mechanism. **Methods** H9c2 cells were treated with normal oxygen (Nor) and hypoxia (Hyp), and the expression of HSPA1A was detected by RT-qPCR and Western blot. Normal H9c2 cells were divided into Nor group (normoxia culture), sh-HSPA1A+Nor group (cells transfected with HSPA1A shRNA, normoxia culture), Hyp group (hypoxia culture), sh-HSPA1A+Hyp group (cells transfected with HSPA1A SHRNA, hypoxia culture), the expression level of HSPA1A in H9c2 cells in each group was detected by RT-qPCR and Western blot, the morphology of H9c2 cells in each group was observed by inverted microscope, and the activity of H9c2 cells in each group was detected by CCK-8, the contents of inflammatory factors tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$  and the activities of myocardial injury markers lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) in the supernatant of H9c2 cells were detected by ELISA, apoptosis rate of H9c2 cells in each group was detected by Annexin V-FITC/PI double staining, the expression levels of TNF receptor-associated factor 2 (TRAF2)/nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway-related proteins in H9c2 cells of each group were detected by Western blot. **Results** Compared with Nor group, the relative expression of HSPA1A mRNA and protein in H9c2 cells in Hyp group after hypoxia induction was significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ). Compared with Nor group, the number of H9c2 cells in Hyp group significantly decreased, some cells were wrinkled and disordered, the cell activity significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the contents of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and the activities of LDH and CK in supernatant significantly increased ( $P < 0.05$ ), the cell apoptosis rate significantly increased ( $P < 0.05$ ), the relative expressions of TRAF2 protein and the phosphorylation level of p65 and inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B alpha (I $\kappa$ B $\alpha$ ) were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ); compared with Hyp group, the morphology of H9c2 cells in sh-HSPA1A+Hyp group was improved, the cell arrangement was more dense, the cell activity significantly increased ( $P < 0.05$ ), the contents of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-1 $\beta$  in supernatant decreased, the activities of LDH and CK significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the apoptosis rate significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the relative expressions of TRAF2 protein and the phosphorylation level of p65 and I $\kappa$ B $\alpha$  were also significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of HSPA1A in rat cardiomyocytes H9c2 is increased by hypoxia, and inhibition of HSPA1A expression can improve the hypoxia-induced inflammatory response of H9c2 cells and reduce apoptosis damage, which may be related to the regulation of TRAF2/NF- $\kappa$ B pathway.

**Key words** cardiomyocyte; hypoxia; heat shock protein 70 ku protein 1A; inflammation; apoptosis; TNF receptor-associated factor 2; nuclear factor  $\kappa$ B

**Fund program** Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (No.2022D01C269)

**Corresponding author** Zhong Xiaolan, E-mail: 18799190138@139.com