

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.004

低氧诱导因子 1 α 调控蛋白酶激活受体 1 在低氧诱导心肌细胞凋亡中的作用及机制*

孟庆雯¹, 王晓茜², 朱厚玲¹, 张园园^{1△}

(1. 海南医学院第一附属医院心血管内科, 海南 海口 570100; 2. 海南医学院第一附属医院老年病科, 海南 海口 570100)

摘要:目的 探讨低氧条件下低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)调控蛋白酶激活受体 1(PAR1)在低氧诱导心肌细胞凋亡中的作用及机制。方法 将大鼠心肌细胞系 H9c2 细胞培养在 95% O₂ 及 5% CO₂ 环境中作为常氧组,培养在 1% O₂、94% N₂、5% CO₂ 环境中作为低氧组,并作不同时间梯度;采用四氮唑比色(MTT)法和原位末端转移酶标记(TUNEL)试剂盒法分别检测常氧组和低氧组中 H9c2 细胞活性和细胞凋亡情况;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)和蛋白质印迹(WB)法分别从 mRNA 和蛋白水平上检测 HIF-1 α 和 PAR1 的表达。通过细胞转染 siNC 与 PAR1 siRNA 质粒 24 h 处理 H9c2 细胞,采用 MTT 法和 TUN 试剂盒检测细胞活性和细胞凋亡情况;通过 qRT-PCR 和 WB 法检测常氧组(A 组),常氧 + NC siRNA 组(B 组),低氧 + NC siRNA 组(C 组)和低氧 + PAR1 siRNA 组(D 组)H9c2 细胞中 Bcl-2 与 Bax 的表达;在细胞转染 HIF-1 α siRNA 后再低氧处理 H9c2 细胞,采用 RNA 印迹(NB)法和 WB 法检测 PAR1 蛋白表达水平。结果 与 A 组比较,在低氧环境下,H9c2 细胞活性降低并发生凋亡,HIF-1 α 和 PAR1 稳定高表达;与直接低氧处理组比较,在 H9c2 细胞中敲除 PAR1 后再低氧处理细胞,可明显缓解因低氧诱导的心肌细胞凋亡,提高 H9c2 细胞活力,在 H9c2 细胞中敲除 PAR1 后会使 Bcl-2 表达上调、Bax 表达下调;细胞转染 HIF-1 α siRNA 后再低氧处理 H9c2 细胞时,PAR1 的表达下降,表明 PAR1 受 HIF-1 α 的正调控。结论 低氧条件下诱导 H9c2 心肌细胞的凋亡可能与低氧诱导因子 HIF-1 α 正调控 PAR1 的表达有关,在 H9c2 细胞中敲除 PAR1 对处于低氧环境下心肌细胞的凋亡有阻断作用,可能源于上调 Bcl-2 的表达及降低 Bax 的表达。

关键词:低氧;低氧诱导因子 1 α ;蛋白酶激活受体 1;Bcl-2/Bax;细胞凋亡;作用机制

中图分类号:R972;R965

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)15-0015-07

Role and Mechanism of PAR1 in Hypoxia-Induced Cardiomyocyte Apoptosis Regulated by HIF-1 α

MENG Qingwen¹, WANG Xiaoxian², ZHU Houling¹, ZHANG Yuanyuan¹

(1. Department of Cardiovascular Medicine, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China 570100; 2. Department of Geriatrics, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan, China 570100)

Abstract: **Objective** To investigate the role and mechanism of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) regulation of protease activated receptors1(PAR1) in hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes. **Methods** The rat myocardial cell line H9c2 cells were cultured as normal oxygen(Normoxia) group at 95% O₂ and 5% CO₂, and as Hypoxia group at 1% O₂, 94% N₂ and 5% CO₂, with different time gradients. Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) assay and TdT-mediated-dUTP nick end labeling(TUNEL) in situ assay kit were used to detect the changes of H9c2 cell activity and apoptosis in normoxic group and hypoxic group, respectively. The expressions of HIF-1 α and thrombin receptor PAR1 were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR) and Western Blot(WB) respectively at mRNA and protein levels. H9c2 cells were transfected with siNC and PAR1 siRNA plasmid for 24 h, and changes in cell activity and apoptosis were detected by MTT assay and TUNEL in situ assay kit. The expressions of Bcl-2 and Bax in H9c2 cells of Normox group(group A), Normox + siNC group(group B), Hypoxia + siNC group(group C) and Hypoxia + PAR1 siRNA group(group D) were detected by qRT-PCR and WB. Finally, H9c2 cells were treated with hypoxia after transfection of HIF-1 α siRNA, and PAR1 expression levels were analyzed by NB and WB. **Results** Compared with group A, H9c2 cell activity decreased, and apoptosis occurred in the hypoxic environment. Hypoxic inducer HIF-1 α and thrombin receptor PAR1 were stable and highly expressed. In H9c2 cells, thrombin receptor PAR1 was knocked out and hypoxia-treated cells were then hypoxia-treated. Compared with the direct hypoxia-treated H9c2 cells, MTT and TUNEL in situ assay showed that hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes was alleviated. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western Blot analysis showed that after knocking out the thrombin receptor PAR1 in H9c2 cells, the expression of Bcl-2 was up-regulated, the expression of Bax was down-regulated. Northern Blot and Western Blot analysis showed that the expression of thrombin receptor PAR1 decreased in H9c2 cells after transfection with HIF-1 α siRNA, indicating that PAR1 was positively regulated by HIF-1 α . **Conclusion** Induction of apoptosis of H9c2 cardiomyocytes under hypoxic conditions may be related to the regulation of expression of the thrombin receptor PAR1 by hypoxic inducible factor HIF-1 α positive in H9c2 cells. The knockdown of the thrombin receptor PAR1 in H9c2 cells may block the apoptosis of cardiomyocytes under hypoxic conditions, which may be due to the up-regulation of Bcl-2 expression and the decreased expression of Bax.

Key words: hypoxia; hypoxia inducible factor-1 α ; protease activated receptors 1; Bcl-2/Bax; cell apoptosis; mechanism of action

*基金项目:国家自然科学基金[81960075];2019年海南省自然科学基金[SQ2019MSXM0474];2019年海南省基础与应用基础研究计划(自然科学领域)高层次人才项目[2019RC377]。

第一作者:孟庆雯,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为冠心病、高血压、心衰的诊治及作用机制,(电子信箱)443130019@qq.com。

[△]通信作者:张园园,女,硕士研究生,主治医师,研究方向为动脉瘤及心肌梗死炎症和免疫机制,(电子信箱)zyy500382@163.com。

低氧或缺氧在许多生物学或病理学过程中有至关重要的作用,特别是与缺氧与心肌缺血疾病相关,初期会引起细胞保护性反应,但最终会导致心肌细胞凋亡,严重影响其心脏功能^[1]。细胞暴露于低氧浓度下会引发低氧反应,其生长和生存能力降低,主要由低氧诱导因子 1 (HIF-1) 协调^[2]。低氧诱导因子由 3 种 α 亚基 (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) 和 1 个 β 亚基 [(HIF-1 β , 又称芳基碳氢化合物核转运蛋白 (ARNT)) 构成的异质二聚体^[3]。缺氧条件下, HIF-1 α 与靶基因结构上的低氧反应元件 (HRE 5'-RCGTG-3') 结合,被活化的 HIF-1 α 在靶基因转录起始部位形成一个转录起始复合物,从而调节靶基因的转录^[4]。近年来,有研究表明, HIF-1 α 在低氧条件下有诱导细胞凋亡的功能^[5]。如何减少心肌细胞凋亡已成为保护心肌细胞的一大研究热点,尽管已被证实 HIF-1 α 在低氧条件下心肌细胞中表达被上调^[5-6],但尚未报道 HIF-1 α 与 PAR1 在低氧条件下心肌细胞中的相互作用。

蛋白酶激活受体 (PARs) 是单个 7 跨膜 G 蛋白偶联受体的一个亚家族,包括 PAR1, PAR2, PAR3, PAR4^[7]。其中 PAR1 已被报道在多种细胞中有改变细胞形态和抑制细胞凋亡的作用,如胃癌细胞^[8]、乳腺癌细胞^[9]、结肠癌细胞^[10]、食道癌细胞^[11]、脐静脉内皮细胞^[12]、肺动脉内皮细胞^[13]等。有文献报道, PAR1 和 HIF-1 α 的表达强度在化学治疗 (简称化疗) 前后的乳腺癌组织中呈正相关^[14]。本研究中探讨了低氧条件下 HIF-1 α 和 PAR1 在 H9c2 细胞中的表达, HIF-1 α 和 PAR1 的潜在关系,以及在低氧诱导心肌细胞凋亡中的作用和机制,为心肌缺血的预防及治疗提供了可能的靶点。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与细胞

仪器:细胞培养箱;低温冰箱,均购自美国 Thermo Fisher 公司;垂直电泳系统,蛋白转移系统, ChemiDoc™ XRS+ 型凝胶成像分析系统,均购自美国 BIO-RAD 公司;普通 PCR 仪 96 well, 荧光实时定量 PCR 仪,均购自美国 Applied Biosystems 公司;倒置荧光显微镜,普通光学显微镜,均购自日本 Olympus; M200 PRO 型酶标仪购自奥地利 Tecan Infinite 公司。

试剂:DMEM 培养基 (批号为 12800017), 胎牛血清 (批号为 16000-044), 均购自美国 Gibco 公司;引物由上海生物工程有限责任公司合成;质粒小抽试剂盒 (批号为 D0003), BCA 试剂盒 (批号为 P0011), 均购自 Beyotime 公司; Lipofectamine™ 3000 (美国 Invitrogen 公司, 批号为 L3000-015); Trizol 试剂, RIPA 裂解液, IP Buffer 裂解液, 均购自 Thermo Fisher Scientific 公司; SYBR Premix EX Taq™ II 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司, 批

号为 RR420A); 四氮唑 (MTT, Solarbao, 批号为 M8180); 原位末端转移酶标记 (TUNEL) 试剂盒 (上海 Roche 公司, 批号为 11684817910); 兔抗 HIF-1 α 抗体 (批号为 36169), 兔抗 Bcl-2 抗体 (批号为 3498), 兔抗 Bax 抗体 (批号为 5023), 兔抗 β -actin 抗体 (批号为 8457), 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 兔抗 PAR1 抗体 (美国 Abcam 公司, 批号为 ab32611)。

细胞:大鼠心肌细胞系 H9c2 (中国科学院上海细胞生物研究所)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养 H9c2 细胞, 置 37℃、95% O₂、5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 48 h 全换液 1 次, 保证细胞正常生长所需营养, 待细胞密度长至 90%, 使用 0.25% 胰酶消化进行传代。选取对数生长期的细胞进行试验, 将细胞分为常氧组和低氧组。常氧组将细胞置 37℃、95% O₂、5% CO₂ 培养箱中培养, 低氧组将细胞置 37℃、1% O₂、94% N₂、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 质粒构建

选择 PSUPER 作为载体, 对公司合成的引物进行 1 000 r/min、4℃ 离心 5~10 min, 按管壁上标注的体积加入 Milli-Q 水, 混匀, 4℃ 保存待用, 或直接进行 PCR, 扩增出目的片段, 制备 1% 琼脂糖凝胶, 将目的片段点样并跑胶, 跑胶结束后在紫外灯下进行切胶, 采用 DNA 纯化回收试剂盒进行胶回收, 对胶回收产物进行跑胶验证, 再进行酶切、酶联、转化、质粒抽提, 初步得到 HIF-1 α siRNA 和 PAR1 siRNA 质粒, 再对质粒进行酶切验证, 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶, 验证质粒是否构建成功。

1.2.3 细胞转染

转染前, 对细胞进行全换液, 待细胞密度长至 60% 时进行转染。转染时取 3 个灭菌的 EP 管, 分别加入 500 μ L 无血清的 DMEM, 再加入质粒和 Lipofectamine™ 3000, 混匀, 室温静置 5 min, 将含有 Lipofectamine™ 3000 的无血清 DMEM 均分于已加质粒的 EP 管中, 混匀, 室温静置 20 min, 将 EP 管中的混合液加入 H9c2 心肌细胞培养皿, 在 37℃、95% O₂、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h, 更换新的培养液继续培养, 24 h 后再对细胞进行低氧 (37℃、1% O₂、94% N₂、5% CO₂) 处理。

1.2.4 蛋白质印迹 (WB) 法检测 HIF-1 α 和 PAR1 的蛋白表达

待各处理组细胞长至对数生长期, 用 IP Buffer 裂解液 (含 0.5% NP40 并加入蛋白酶抑制剂) 在 4℃ 摇床裂解细胞 30 min, 14 000 r/min, (4℃) 离心 15 min, 取上清液, 按 Bradford 法进行蛋白质定量, 加入 4 sample

Buffer 混合,沸水浴 10 min,制备 8% 的 SDS-PAGE 胶进行点样电泳(分离胶 80 V、20 min,浓缩胶 100 V、1 h),转膜(100 V、150 min),用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,用 1 TBST 洗 3 次,每次 10 min,一抗包括兔抗 β -actin 抗体(1:2 000),兔抗 HIF-1 α 抗体(1:2 000),兔抗 PAR1 抗体(1:2 000),兔抗 Bcl-2 抗体(1:2 000),兔抗 Bax 抗体(1:2 000),于 4 °C 摇床孵育过夜,次日用 1 TBST 洗 3 次,每次 10 min,室温孵育二抗山羊抗兔 IgG 抗体(1:1 000)1 h,再用 1 TBST 洗 3 次,每次 10 min,显影曝光。用 Image-Pro Plus 图像分析系统对蛋白条带进行分析。

1.2.5 RNA 提取和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)法检测 HIF-1 α 和 PAR1 的 mRNA 表达

采用 TRIzol 提取细胞总 RNA。用 Nanodrop 2000 型超微量分光光度计测量样品总 RNA 浓度,并将每个配对的样品调节至相同浓度。采用 cDNA 逆转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。使用 SYBR Premix EX Taq™ 试剂盒进行 RT-PCR。GAPDH 作为 HIF-1 α ,PAR1,Bcl-2,Bax 的内部参考。使用 FTC-3000p 型实时 PCR 系统完成实验后,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析数据。引物见表 1。

表 1 引物序列

Primer	Sequence(5'-3')
GAPDH	Forward:5'-CATCACTGCCACCCAGAAGACTG-3'
	Reverse:5'-ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTTCAG-3'
HIF-1 α	Forward:5'-CATAAAGTCTGCAACATGGAAGGT-3'
	Reverse:5'-ATTTGATGGGTGAGGAATGGGTT-3'
PAR1	Forward:5'-CCTGTGCGGTCCTTTGCT-3'
	Reverse:5'-CATCCTCTCAGATTCTGGCTGTCT-3'
Bcl-2	Forward:5'-CCGGGAGAACAGGGTATGATAA-3'
	Reverse:5'-CCCACTCGTAGCCCCCTCTG-3'
Bax	Forward:5'-AAACTGGTGCTCAAGGCCCT-3'
	Reverse:5'-AGCAGCCGCTCACGGAG-3'

1.2.6 RNA 印迹(NB)法检测 HIF-1 α 和 PAR1 的 RNA 水平

制备 1% 的琼脂糖凝胶,将提取的总 RNA 进行点样并电泳(120 V、20 min),分离得到的 RNA 胶进行转膜,转移到硝酸纤维素膜上,进行 15 h 转膜,结束后,将膜放在 6×SSC 中浸泡 5 min,以去除膜上残留凝胶。将凝胶置紫外灯下,观察胶块上有无残留的 RNA,膜置 80 °C,真空干烤 1~2 h。烤干后的膜用塑料袋密封,4 °C 保存备用,进行探针标记和杂交,42 °C 杂交 16 h 后,洗膜,显影。

1.2.7 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

分别取出常氧组、低氧组、NC 组和 PAR1 组的 H9c2 心肌细胞爬片,用预冷的 4% 多聚甲醛(PFA)在 4 °C 冰箱中固定 30 min,用 1×PBS(pH=7.4)洗 10 min,加

入含有 0.2% Triton-X-100 的磷酸缓冲液(PBS),冰上孵育 2 min,增加细胞通透性,再加入荧光素 FITC 标记的核苷酸和脱氧核苷酸末端转移酶(TDT)混合液,37 °C 避光孵育 60 min,1×PBS(pH=7.4)洗 3 次,每次 10 min,用抗荧光淬灭封片剂封片,待封片剂干透后将载玻片置 4 °C 冰箱保存,次日在荧光显微镜下观察。

细胞凋亡指数 = 凋亡细胞核百分比 / 细胞核总数

1.2.8 MTT 法检测细胞活力

待 H9c2 心肌细胞长至对数生长期,用 0.25% 胰酶消化细胞,收集于离心管,以 1 000 r/min 离心 5 min,用新的培养液重悬细胞,接种至 96 孔板,接种密度为 1×10^5 ,每孔 100 μ L,待细胞贴壁培养 6 h 后进行后续实验处理,每组做 6 个复孔,待处理结束后,每孔加入 10 μ L MTT 溶液(5 mg/mL),培养 4 h,吸走培养液,每孔再加入 150 μ L 二甲基亚砷(DMSO),放置摇床振荡 10 min,使结晶充分溶解,采用酶联免疫检测仪上光密度(OD)于 490 nm 波长处检测每孔的吸光度,吸光度最好在 0~0.7 范围内。

细胞存活率(%) = (OD_{试验组} / OD_{对照组}) × 100%

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。至少取 3 次独立实验结果,以均数 ± 标准差($\bar{X} \pm s$)表示,两组间比较采用 LSD 法,多组间比较采用单向方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低氧条件下对 H9c2 细胞活力及凋亡的影响

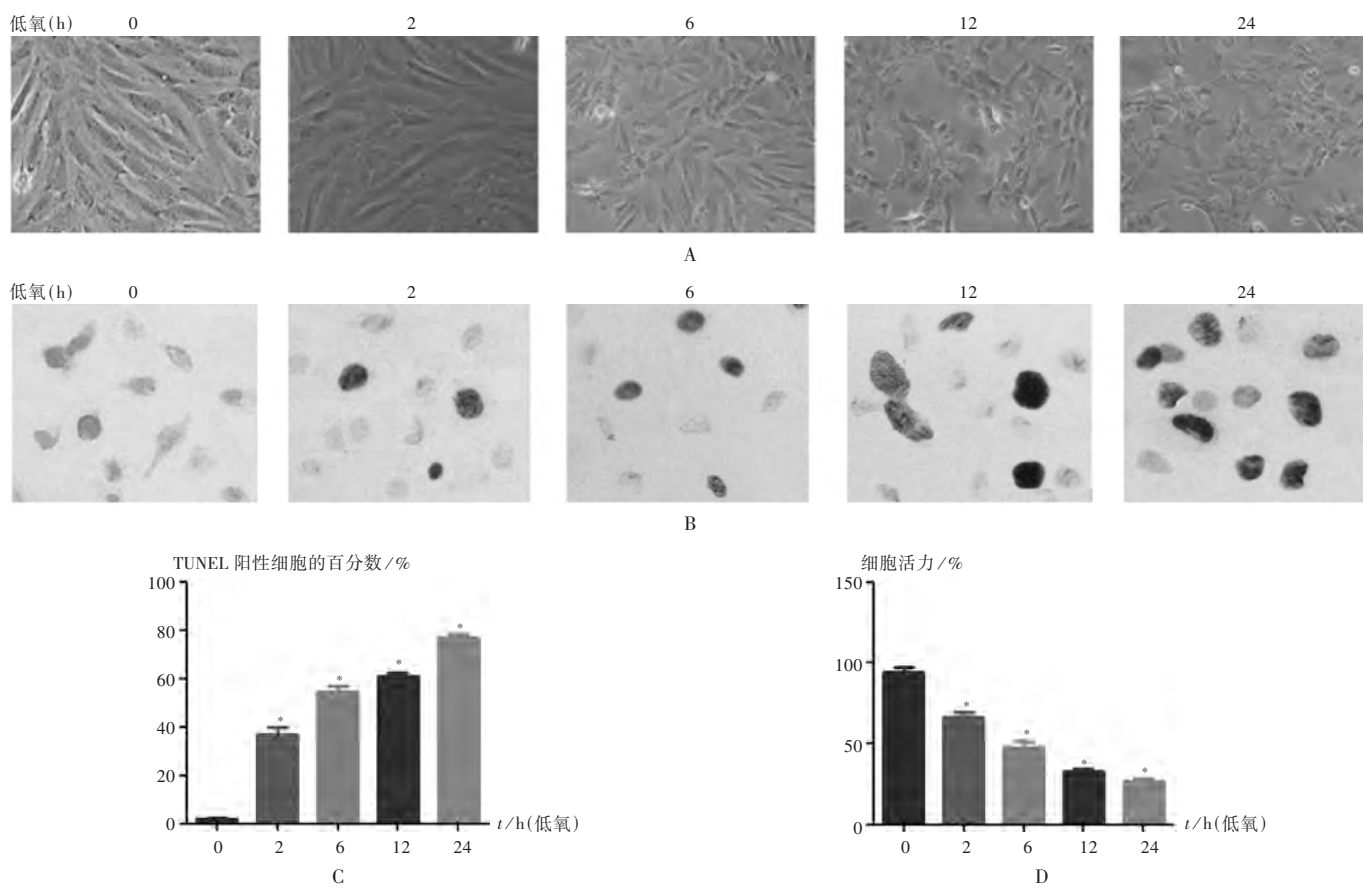
对 H9c2 细胞进行常氧和低氧时间梯度(2,6,12,24 h)处理,通过形态观察发现,与常氧组相比,低氧各组细胞形态缩小、变形,详见图 1 A;TUNEL 染色结果显示,与常氧组相比,低氧各组 H9c2 细胞凋亡随时间梯度逐渐增加,详见图 1 B 和图 1 C;MTT 分析结果显示,与常氧组相比,低氧各组 H9c2 细胞的活力更差,详见图 1 D。可见,低氧降低了 H9c2 细胞的活力,并诱导了 H9c2 细胞的凋亡。

2.2 HIF-1 α 和 PAR1 在低氧条件下 H9c2 细胞中的表达情况

qRT-PCR 结果显示,低氧条件下 H9c2 细胞中 HIF-1 α 和 PAR1 的表达上调,随着低氧时间梯度处理有上升趋势,详见图 2 A。WB 结果与 qRT-PCR 检测结果一致,详见图 2 B 及图 2 C。可见,低氧诱导 HIF-1 α 和 PAR1 的表达。

2.3 敲除 PAR1 对低氧条件下 H9c2 细胞活力及细胞凋亡的影响

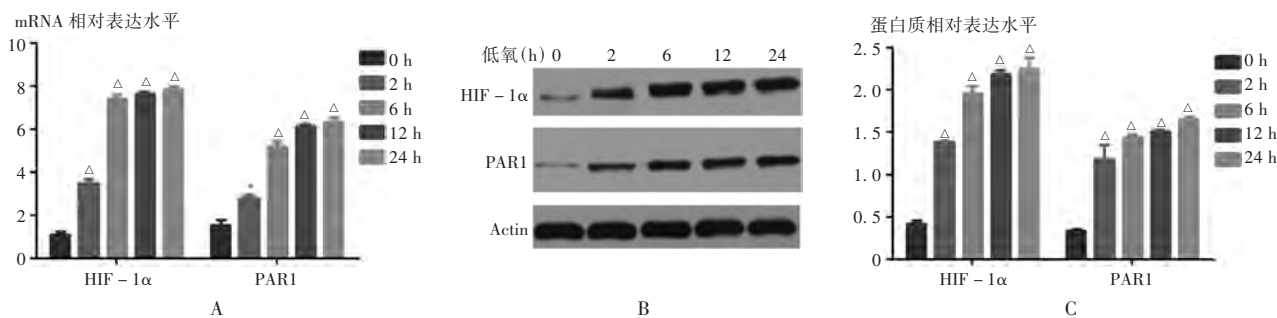
构建 PAR1 siRNA 质粒,将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,初步验证质粒构建成功,详见图 3 A。将构建好



A. 细胞形态 B, C. H9c2 细胞凋亡情况 D. H9c2 细胞活力情况

注:与 0 h 相比, * $P < 0.01$ 。

图 1 低氧条件下 H9c2 细胞活力及生存变化情况



A. qRT-PCR 法 B, C. WB 法

注:与 0 h 相比, * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$ 。

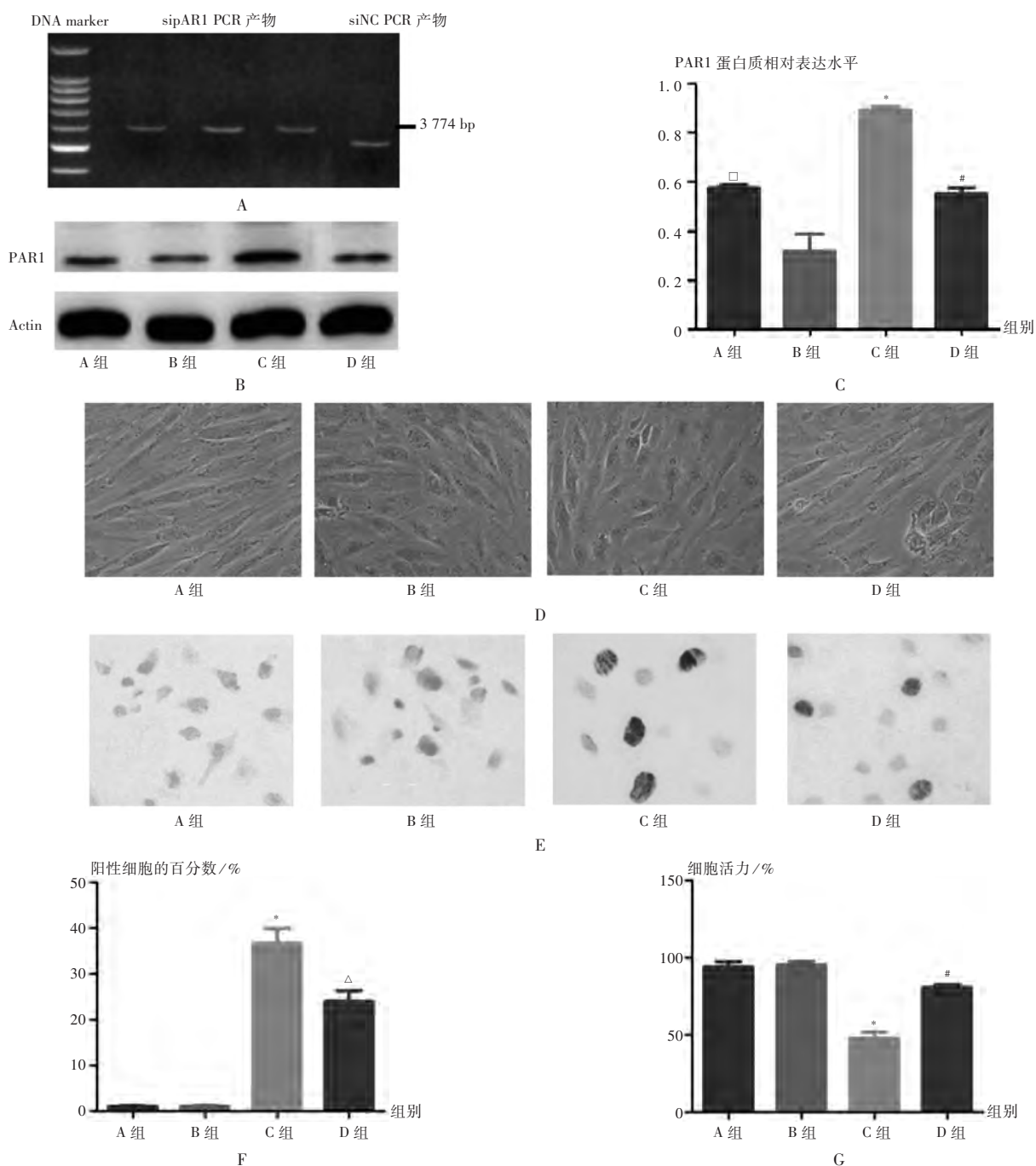
图 2 低氧条件下 H9c2 细胞中 HIF-1α 和 PAR1 的表达情况

的质粒进行细胞转染,将 H9c2 细胞分为 4 组,分别为常氧组(A 组)、常氧 + siNC 组(B 组)、低氧 + siNC 组(C 组)和低氧 + PAR1 siRNA 组(D 组)。WB 结果显示,与 C 组比较,D 组的 PAR1 显著降低,表明细胞转染成功,详见图 3 B 和图 3 C。通过形态观察发现,在 H9c2 细胞中敲除 PAR1 后再低氧处理 H9c2 细胞,相比于直接低氧处理 H9c2 细胞, H9c2 细胞体积明显增大,详见图 3 D。TUNEL 染色结果显示,在 H9c2 细胞中敲除 PAR1 后再低氧处理 H9c2 细胞比直接低氧处理 H9c2 细胞可明显缓解由低氧引起的 H9c2 细胞凋亡,详见图 3 E 和图 3 F。

MTT 结果显示,在 H9c2 细胞中敲除 PAR1 后再低氧处理 H9c2 细胞,比直接低氧处理 H9c2 细胞可明显提高 H9c2 细胞的活力,详见图 3 G。可见,在 H9c2 细胞中敲除 PAR1 可改善由低氧引起的 H9c2 细胞体积的缩小,增强 H9c2 细胞活力,并抑制 H9c2 细胞的凋亡。

2.4 敲除 PAR1 对低氧条件下 H9c2 细胞中 HIF-1α 及 Bcl-2/Bax 表达的影响

低氧条件下会诱导 H9c2 细胞凋亡,而 Bcl-2/Bax 信号通道已被报道可抑制细胞凋亡。为探讨低氧条件下 PAR1 表达对 H9c2 细胞的作用机制,将 siNC 和 PAR1



A. PCR 产物凝胶电泳 B, C. WB 分析细胞转染成功 D. H9c2 细胞形态 E, F. H9c2 细胞凋亡情况 G. H9c2 细胞活力情况
注:与 B 组比较, $\square P < 0.05$, * $P < 0.01$;与 C 组比较, $\triangle P < 0.05$, # $P < 0.01$ 。

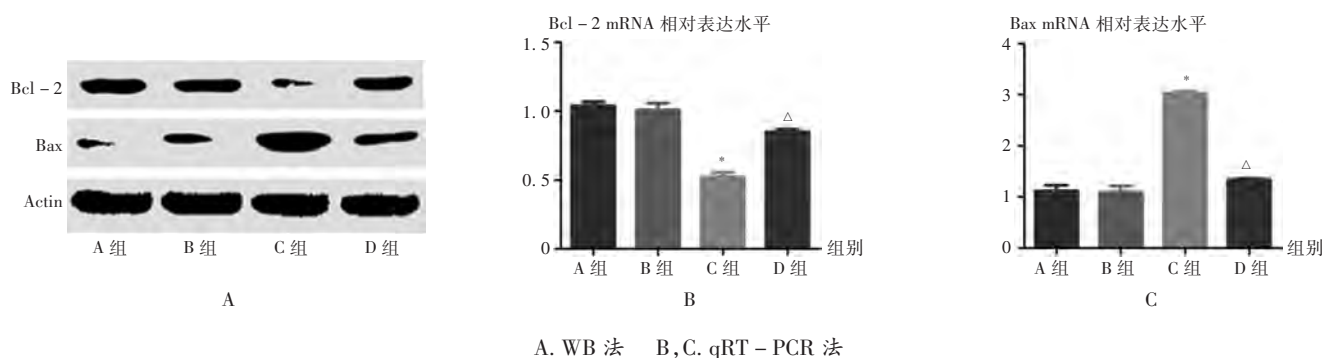
图 3 敲除 PAR1 对低氧条件下 H9c2 细胞形态、细胞凋亡及活力的影响

siRNA 质粒转染至 H9c2 细胞 24 h 后,对细胞进行低氧处理 6 h。通过 WB 法和 qRT-PCR 法检测 Bcl-2 和 Bax 的表达。WB 结果显示,Bcl-2 在低氧时表达下降,敲除 PAR1 后再低氧处理 H9c2 细胞,相比于低氧时增加了 Bcl-2 的表达。而 Bax 在低氧时表达增加,敲除 PAR1 后再低氧处理 H9c2 细胞,相比于低氧时又降低了 Bax 的表达,详见图 4 A。qRT-PCR 结果与 WB 结果一致,与常氧组相比,低氧组 Bcl-2 表达下降,Bax 表达下降上升;与 C 组相比,D 组 Bcl-2 表达被上调,详见

图 4 B。Bax 表达下降被下调,详见图 4 C。结果表明,在低氧条件下,H9c2 细胞中敲除 PAR1 可通过调控 Bcl-2/Bax 的表达比例来抑制细胞的凋亡。

2.5 抑制 HIF-1 α 的表达对低氧条件下引起的 PAR1 上调的影响

将 siNC 和 HIF-1 α siRNA 转染至 H9c2 细胞中 24 h 后再低氧处理细胞 6 h,通过 WB 法和 WB 法检测 HIF-1 α 和 PAR1 在 H9c2 心肌细胞中的表达。结果见图 5 A 和图 5 B,与 C 组相比,低氧 + HIF-1 α siRNA 组(E 组)明



注:与 B 组比较,* $P < 0.01$;与 C 组比较, $^{\Delta}P < 0.01$ 。

图 4 敲除 PAR1 对 HIF-1 α , Bcl-2/Bax 表达的影响

显限制了由缺氧引起的 PAR1 的上调,表明低氧条件下 PAR1 的表达受 HIF-1 α 的正调控。

H9c2 细胞中高表达,且可诱导 H9c2 细胞的凋亡,与文献[23]报道一致。进一步在低氧条件下 H9c2 细胞中感染 HIF-1 α siRNA, WB 和 NB 检测结果显示, HIF-1 α 可正调控 PAR1 的表达,表明 PAR1 可能是 HIF-1 α 的下游。

PAR1 是一种 G 蛋白偶联的跨膜受体,为高亲和力凝血酶受体^[7,24],几乎在所有类型的血管壁细胞中表达,包括内皮细胞、平滑肌细胞、血小板和巨噬细胞,并参与了内皮细胞的凋亡^[25]。本研究中通过 WB 和 RT-PCR 法检测了 PAR1 在低氧条件下 H9c2 细胞中的蛋白和 mRNA 表达水平,结果显示, PAR1 在低氧条件下高表达。同时,当在 H9c2 细胞中敲除 PAR1 后再低氧处理细胞,发现敲除 PAR1 可促进 H9c2 细胞活力和抑制细胞凋亡,并上调 Bcl-2 的表达和下调 Bax 的表达。Bcl-2 基因家族是通过调节细胞的生存或死亡来维持组织的发育及稳态的,是一种新的原癌基因,即细胞凋亡的调节因子^[26],其他主要通过抑制各种凋亡小体来延长细胞的存活^[27]。Bax 是一种加速细胞死亡的同源蛋白,与 Bcl-2 活性相反^[28]。但 Bcl-2 与 Bax 可相互作用,在体内形成异二聚体, Bax 过表达会抑制 Bcl-2 的活性,引起细胞凋亡,两者表达的比例发生变化会直接影响细胞的生存与凋亡^[29],故 Bcl-2/Bax 信号通路是调节抗氧途径细胞凋亡的变阻器^[30]。本研究结果显示, H9c2 细胞中敲除 PAR1 可影响 Bcl-2 与 Bax 表达的比例,进而诱导 H9c2 细胞的凋亡。

综上所述,低氧条件下, HIF-1 α 通过正调控 PAR1 的表达,进而改变 Bcl-2/Bax 的表达比例,诱导 H9c2 细胞凋亡。本研究结果为低氧条件下细胞凋亡引起的心肌缺血提供了可能的治疗靶点。

参考文献:

- [1] JOPLING C, SUNE G, FAUCHERRE A, et al. Hypoxia Induces Myocardial Regeneration in Zebrafish[J]. Circulation, 2012, 126(25):3017-3027.

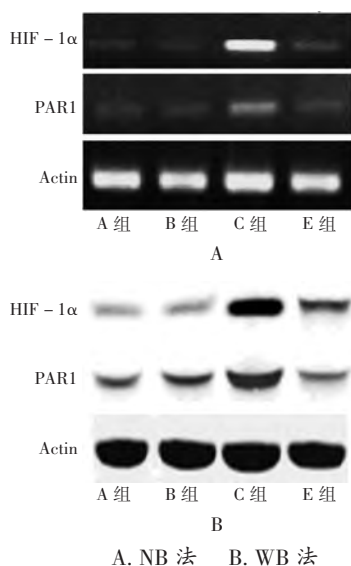


图 5 敲除 HIF-1 α 限制缺氧引起的 PAR1 的上调

3 讨论

缺氧常被用来解释心脏功能的改变,特别是在心肌缺血的患者中,缺氧是一种常见现象^[15]。多数研究表明,缺氧导致心肌缺血的致病机制非常复杂,如在轻度或中度缺氧时,大脑的能量供应几乎未受到损害,严重缺氧时会产生细胞毒性,引起细胞凋亡或死亡^[16]。细胞凋亡主要是由于外源性死亡受体途径或线粒体途径介导发生^[17]。因此,深入了解细胞凋亡在缺氧条件下的调控机制,可为心肌缺血的治疗提供更具体的方法。

HIF-1 α 是缺氧条件下参与血管生成、糖酵解代谢和细胞增殖/存活过程中调控多个基因转录的关键蛋白^[18],是一种氧依赖性被细胞内泛素蛋白酶降解的蛋白质^[19]。其只在缺氧条件下稳定表达, HIF-1 α 积累和 HIF-1 β 形成二聚体,二聚体激活启动子区中含有缺氧反应元件(HREs)的下游基因^[20]。HIF-1 α 在常氧时不表达,在低氧条件下高表达,且 HIF-1 α 表达的上调可促进细胞的凋亡^[21-22]。本研究结果显示, HIF-1 α 在低氧条件下

- [2] CARMELIET P, DOR Y, HERBERT J, et al. Role of HIF - 1 α in hypoxia - mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. *Nature*, 1998, 394(6692): 485 - 490.
- [3] WANG GL, SEMENZA GL. Purification and Characterization of Hypoxia - inducible Factor 1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(3): 1230 - 1237.
- [4] KE Q, COSTA M. Hypoxia - Inducible Factor - 1 (HIF - 1)[J]. *Molecular Pharmacology*, 2006, 70(5): 1469 - 1480.
- [5] GREIJER AE, DER WALL EV. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF - 1) in hypoxia induced apoptosis[J]. *Journal of Clinical Pathology*, 2004, 57(10): 1009 - 1014.
- [6] CARMELIET P, DOR Y, HERBERT J, et al. Role of HIF - 1 α in hypoxia - mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis[J]. *Nature*, 1998, 394(6692): 485 - 490.
- [7] MACFARLANE SR, SEATTER MJ, KANKE T, et al. Proteinase - Activated Receptors[J]. *Pharmacological Reviews*, 2001, 53(2): 245 - 282.
- [8] FUJIMOTO D, HIRONO Y, GOI T, et al. The activation of proteinase - activated receptor - 1 (PAR1) promotes gastric cancer cell alteration of cellular morphology related to cell motility and invasion[J]. *International Journal of Oncology*, 2013, 42(2): 565 - 573.
- [9] RAY T, PAL A. PAR - 1 mediated apoptosis of breast cancer cells by V. cholerae hemagglutinin protease[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(5): 609 - 620.
- [10] RAY T, KAR D, PAL A, et al. Molecular targeting of breast and colon cancer cells by PAR1 mediated apoptosis through a novel pro - apoptotic peptide[J]. *Apoptosis*, 2018: 679 - 694.
- [11] SIMAN LI, JIANG P, XIANG Y, et al. Protease - activated receptor(PAR) 1, PAR2 and PAR4 expressions in esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Zoological Research*, 2014, 35(5): 420 - 425.
- [12] NIESSEN F, SCHAFFNER F, FURLANFREGUIA C, et al. Dendritic cell PAR1 - S1P3 signalling couples coagulation and inflammation[J]. *Nature*, 2008, 452(7187): 654 - 658.
- [13] BENITOSANZ S, ROYO JL, BARROSO E, et al. Identification of the first recurrent PAR1 deletion in Léri - Weill dyschondrosteosis and idiopathic short stature reveals the presence of a novel SHOX enhancer[J]. *Journal of Medical Genetics*, 2012, 49(7): 442 - 450.
- [14] 史俊峰, 周洪伟, 刘慧敏, 等. PAR - 1 和 HIF - 1 α 在乳腺癌新辅助化疗中的表达及其临床意义[J]. *江苏医药*, 2010, 13: 1526 - 1528.
- [15] GIBSON GE, PULSINELLI WA, BLASS JP, et al. Brain dysfunction in mild to moderate hypoxia[J]. *The American Journal of Medicine*, 1981, 70(6): 1247 - 1254.
- [16] DUAN J, JIAO H, KAIZERMAN JA, et al. Potent and highly selective hypoxia - activated achiral phosphoramidate mustards as anticancer drugs[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2008, 51(8): 2412 - 2420.
- [17] ELMORE SA. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death[J]. *Toxicologic Pathology*, 2007, 35(4): 495 - 516.
- [18] BLANCHER C, HARRIS AL. The molecular basis of the hypoxia response pathway: Tumour hypoxia as a therapy target[J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 1998, 17(2): 187 - 194.
- [19] TANG J, MA Z, HUANG G, et al. Downregulation of HIF - 1 α sensitizes U251 glioma cells to the temozolomide (TMZ) treatment[J]. *Experimental Cell Research*, 2016, 343(2): 148 - 158.
- [20] LEE JW, BAE SH, JEONG JW, et al. Hypoxia - inducible factor (HIF - 1) α : its protein stability and biological functions[J]. *Experimental and Molecular Medicine*, 2004, 36(1): 1 - 12.
- [21] DHANI NC, FYLES A, HEDLEY DW, et al. The Clinical Significance of Hypoxia in Human Cancers[J]. *Seminars in Nuclear Medicine*, 2015, 45(2): 110 - 121.
- [22] VAUPEL P, MAYER A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome[J]. *Cancer and Metastasis Reviews*, 2007, 26(2): 225 - 239.
- [23] MALHOTRA R, TYSON DW, ROSEVEAR HM, et al. Hypoxia - inducible factor - 1 α is a critical mediator of hypoxia induced apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK - 2 cells[J]. *BMC Cardiovascular Disorders*, 2008, 8(1): 9.
- [24] CONNOLLY AJ, SUH DY, HUNT TK, et al. Mice lacking the thrombin receptor, PAR1, have normal skin wound healing[J]. *American Journal of Pathology*, 1997, 151(5): 1199 - 1204.
- [25] ZHANG S, LIU Y, WANG Z, et al. PAR1 - mediated c - Jun activation promotes heat stress induced early stage apoptosis of human umbilical vein endothelial cells[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2017, 15(5): 2595 - 2603.
- [26] ADAMS JM, CORY S. The Bcl - 2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1322 - 1326.
- [27] YIN X, OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ, et al. BH1 and BH2 domains of Bcl - 2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax[J]. *Nature*, 1994, 369(6478): 321 - 323.
- [28] BENTLEY P, PEPPER C, HOY T, et al. Bcl - 2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with *in vitro* apoptosis and clinical responsiveness - reply[J]. *British Journal of Cancer*, 1998, 78(4): 553 - 554.
- [29] KORSMEYER SJ, SHUTTER JR, VEIS DJ, et al. Bcl - 2/Bax: A rheostat that regulates an anti - oxidant pathway and cell death[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 1993, 4(6): 327 - 332.
- [30] OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ, et al. Bcl - 2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. *Cell*, 1993, 74(4): 609 - 619.

(收稿日期: 2020 - 01 - 14)