

# 低温对氧糖剥夺 / 复糖复氧损伤后心肌细胞凋亡和自噬的影响及机制

梁震<sup>1</sup> 杨颂<sup>2</sup> 张炉英<sup>1</sup> 邵瑞<sup>1</sup> 王兴圣<sup>1</sup> 安乐<sup>1</sup> 杭晨晨<sup>1</sup> 唐子人<sup>1</sup>

<sup>1</sup>首都医科大学附属北京朝阳医院急诊科, 北京 100020; <sup>2</sup>北京怀柔医院急诊科, 北京 101400

梁震现在北京市密云区医院重症医学科, 北京 101500

通信作者: 唐子人, Email: tangziren1970@126.com

**【摘要】目的** 建立心肌细胞氧糖剥夺 / 复糖复氧 (OGD/R) 模型, 模拟心搏骤停致心肌缺血再灌注损伤, 探讨低温对心肌细胞保护作用的潜在机制。**方法** 取对数生长期 H9C2 心肌细胞, 结合预实验结果选择最佳氧糖剥夺 (OGD) 及复糖复氧时间, 建立 OGD/R 模型。将细胞分为 4 组: 空白对照组不进行 OGD, 37 °C 常温培养 24 h; OGD 组进行 OGD 12 h, 不给予复糖复氧; OGD/R 常温组进行 OGD 12 h 后, 37 °C 下分别给予复糖复氧 4、8、12 h; OGD/R 低温组进行 OGD 12 h 后, 34 °C 下分别给予复糖复氧 4、8、12 h。采用台盼蓝染色法检测细胞存活率; 应用流式细胞仪分析线粒体膜电位 ( $\Delta\Psi_m$ ) 变化; 采用蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测凋亡相关蛋白 [活化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 / 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (cleaved caspase-3/caspase-3) 比值]、自噬相关蛋白 [微管相关蛋白 1 轻链 3B- II / I (LC3B- II / I)、p62]、PTEN 诱导激酶 1/E3 泛素连接酶 (PINK1/Parkin) 通路蛋白 (PINK1、Parkin) 和线粒体外膜孔道蛋白 [电压依赖性阴离子通道 3 (VDAC3)] 的表达。**结果** 与空白对照组比较, OGD 组及 OGD/R 各组细胞存活率均下降, cleaved caspase-3/caspase-3、LC3B- II / I 比值和 VDAC3 蛋白表达均升高, 说明 OGD 和 OGD/R 均可引起细胞凋亡, 诱导细胞自噬增强; OGD/R 可导致  $\Delta\Psi_m$  下降, PINK1/Parkin 通路蛋白表达上调。说明复糖复氧可加重 OGD 造成的心肌细胞损伤, 其机制可能与 PINK1/Parkin 通路有关。在 OGD/R 各组中, 与常温状态比较, 低温状态各时间点心肌细胞存活率均升高 [4 h: (65.46 ± 0.81)% 比 (60.26 ± 0.71)%, 8 h: (72.76 ± 0.23)% 比 (62.93 ± 0.37)%, 12 h: (77.72 ± 0.43)% 比 (70.75 ± 0.61)%, 均  $P < 0.05$ ], 12 h  $\Delta\Psi_m$  下降减少 (JC-1 绿色荧光 / 红色荧光强度比值: 0.120 ± 0.005 比 0.250 ± 0.011,  $P < 0.05$ ), 8 h、12 h cleaved caspase-3/caspase-3 比值下降 (8 h: 0.96 ± 0.06 比 1.08 ± 0.07, 12 h: 0.91 ± 0.06 比 1.23 ± 0.08, 均  $P < 0.05$ ), 8 h、12 h LC3B- II / I 比值升高 (8 h: 1.40 ± 0.08 比 1.16 ± 0.08, 12 h: 1.51 ± 0.11 比 1.12 ± 0.07, 均  $P < 0.05$ ), 12 h p62 表达升高 (p62/GAPDH: 0.90 ± 0.04 比 0.75 ± 0.03,  $P < 0.05$ ), 12 h VDAC3 蛋白表达降低 (VDAC3/ $\beta$ -actin: 0.93 ± 0.04 比 1.07 ± 0.04,  $P < 0.05$ ), 12 h PINK1 和 Parkin 的蛋白表达均升高 [PINK1 蛋白 (PINK1/GAPDH): 0.98 ± 0.06 比 0.80 ± 0.05, Parkin 蛋白 (Parkin/GAPDH): 1.13 ± 0.08 比 0.99 ± 0.05, 均  $P < 0.05$ ]。在温度影响方面, VDAC3 蛋白表达与自噬蛋白表达趋势相反, 而 PINK1、Parkin 蛋白表达趋势则与之一致。**结论** 低温可减轻 OGD/R 损伤后心肌细胞凋亡, 调节自噬水平, 这一过程可能与调节 VDAC3 及 PINK1/Parkin 通路相关。VDAC3 可能参与低温保护 OGD/R 损伤后心肌细胞, 减轻心肌细胞损伤。

**【关键词】** 低温; 电压依赖性阴离子通道蛋白 3; 心肌细胞; 氧糖剥夺 / 复糖复氧; 自噬; 凋亡

**基金项目:** 国家自然科学基金 (82072136); 北京市医院管理中心“登峰”人才培养计划项目 (DFL20240302)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20241217-00607

## Effect and mechanism of hypothermia on apoptosis and autophagy of cardiomyocytes after oxygen-glucose deprivation/restoration injury

Liang Zhen<sup>1</sup>, Yang Song<sup>2</sup>, Zhang Luying<sup>1</sup>, Shao Rui<sup>1</sup>, Wang Xingsheng<sup>1</sup>, An Le<sup>1</sup>, Hang Chenchen<sup>1</sup>, Tang Ziren<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Emergency Medicine, Beijing Chao-Yang Hospital, Capital Medical University, Beijing 100020, China;

<sup>2</sup>Department of Emergency Medicine, Beijing Huairou Hospital, Beijing 101400, China

Liang Zhen is working on the Department of Intensive Care Unit, Beijing Miyun District Hospital, Beijing 101500, China

Corresponding author: Tang Ziren, Email: tangziren1970@126.com

**【Abstract】Objective** To establish an oxygen-glucose deprivation/restoration (OGD/R) model of cardiomyocytes to simulate myocardial ischemia reperfusion injury induced by cardiac arrest, and to explore the potential mechanism of hypothermia protective effect on cardiomyocytes. **Methods** H9C2 cardiomyocytes in logarithmic growth phase were selected to establish the OGD/R model by selecting the most appropriate oxygen-glucose deprivation (OGD) and reoxygenation time combined with the results of the preliminary experiment. The cells were divided into four groups: blank control group without OGD treatment, 37 °C room temperature culture. The OGD group was subjected to OGD for 12 hours without restoration of glucose and oxygen. The OGD/R with normal temperature groups were subjected to OGD for 12 hours followed by reoxygenation for 4, 8, and 12 hours at 37 °C, respectively. The OGD/R hypothermia groups were subjected to OGD for 12 hours followed by reoxygenation for 4, 8, and 12 hours at 34 °C, respectively. Trypan blue staining was used to detect cell viability. Flow cytometry was used to analyze the change in mitochondrial

membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). Western blotting was used to detect the protein expression of apoptosis-related protein (cleaved caspase-3/caspase-3 ratio), autophagy-related proteins [microtubule-associated protein 1 light chain 3B- II / I (LC3B- II / I), p62] and PTEN-induced kinase 1/E3 ubiquitin ligase (PINK1/Parkin) pathway proteins (PINK1, Parkin) and mitochondrial outer membrane pore protein [voltage-dependent anion channel 3 (VDAC3)] were detected. **Results** Compared with the blank control group, the cell survival rate was significantly decreased in the OGD group and OGD/R groups, and the cleaved caspase-3/caspase-3 ratio, LC3B- II / I ratio and the protein expression of VDAC3 were increased, indicating that OGD and OGD/R could cause cell apoptosis and induce autophagy. In addition, OGD/R resulted in a decrease in  $\Delta\Psi_m$  and up-regulation of PINK1/Parkin pathway proteins. These results suggested that reoxygenation could aggravate myocardial cell injury induced by OGD, and the mechanism might be related to the PINK1/Parkin pathway. In the OGD/R groups, compared with normothermia, the survival rate of cardiomyocytes in hypothermia was increased at each time point [4 hours: (65.46 ± 0.81)% vs. (60.26 ± 0.71)%, 8 hours: (72.76 ± 0.23)% vs. (62.93 ± 0.37)%, 12 hours: (77.72 ± 0.43)% vs. (70.75 ± 0.61)%, all  $P < 0.05$ ], the decreased- $\Delta\Psi_m$  lowered at 12 hours (green/red fluorescence intensity ratio of JC-1: 0.120 ± 0.005 vs. 0.250 ± 0.011,  $P < 0.05$ ), cleaved caspase-3/caspase-3 ratio decreased at 8 hours and 12 hours (8 hours: 0.96 ± 0.06 vs. 1.08 ± 0.07, 12 hours: 0.91 ± 0.06 vs. 1.23 ± 0.08, both  $P < 0.05$ ), the LC3B- II / I ratio was increased at 8 hours and 12 hours (8 hours: 1.40 ± 0.08 vs. 1.16 ± 0.08, 12 hours: 1.51 ± 0.11 vs. 1.12 ± 0.07, both  $P < 0.05$ ), the p62 expression was increased at 12 hours (p62/GAPDH: 0.90 ± 0.04 vs. 0.75 ± 0.03,  $P < 0.05$ ), the protein expression of VDAC3 was decreased at 12 hours (VDAC3/ $\beta$ -actin: 0.93 ± 0.04 vs. 1.07 ± 0.04,  $P < 0.05$ ), the protein expressions of PINK1 and Parkin were increased at 12 hours [PINK1 protein (PINK1/GAPDH): 0.98 ± 0.06 vs. 0.80 ± 0.05, Parkin protein (Parkin/GAPDH): 1.13 ± 0.08 vs. 0.99 ± 0.05, both  $P < 0.05$ ]. In terms of temperature influence, the expression trend of VDAC3 protein was opposite to that of autophagy proteins, while the expression trends of PINK1 and Parkin proteins were consistent with it. **Conclusions** Hypothermia can alleviate OGD/R-induced cardiomyocyte apoptosis and regulate the level of autophagy, which may be related to the regulation of VDAC3 and PINK1/Parkin pathways. VDAC3 may be involved in the hypothermic protection of cardiomyocytes after OGD/R injury and reduce the injury of cardiomyocytes.

**【Key words】** Hypothermia; Voltage-dependent anion channel 3; Cardiomyocyte; Oxygen-glucose deprivation/reoxygenation; Autophagy; Apoptosis

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (82072136); Beijing Hospitals Authority's Ascent Planning Project (DFL20240302)

DOI: 10.3760/ema.j.cn121430-20241217-00607

心搏骤停是严重危害人类健康的急危重症之一,病死率高,约 1/3 的患者死于心搏骤停后心肌功能障碍<sup>[1]</sup>。研究表明,低温可改善心搏骤停后心肌功能障碍<sup>[2-4]</sup>。细胞凋亡是引起心肌损伤的重要机制<sup>[5]</sup>。以往研究证实低温可抑制心肌细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。自噬是细胞通过溶酶体将受损细胞器及大分子物质降解再利用的过程<sup>[8]</sup>,自噬激活可减轻心肌缺血损伤,但低温对自噬的影响尚存在争议<sup>[9-10]</sup>。PTEN 诱导激酶 1/E3 泛素连接酶 (PTEN-induced kinase 1/E3 ubiquitin ligase, PINK1/Parkin) 通路在维持线粒体稳态中起到重要作用。线粒体受损时,PINK1/Parkin 通路活化,触发线粒体自噬,清除受损线粒体<sup>[11-12]</sup>。低温对这一过程是否产生影响,目前尚不明确。

电压依赖性阴离子通道 3 (voltage-dependent anion channel 3, VDAC3) 是位于线粒体外膜上的孔道蛋白,在细胞凋亡过程中起到重要作用<sup>[13]</sup>。研究表明,低温可增强小胶质细胞 VDAC3 泛素化,减少 VDAC3 表达,减轻神经元损伤<sup>[14]</sup>。低温减轻心肌缺血再灌注损伤的作用靶点是否与 VDAC3 相关尚未可知。本研究采用 H9C2 心肌细胞建立氧糖剥夺/复糖复氧 (oxygen-glucose deprivation/restoration, OGD/R) 模型,模拟心搏骤停致心肌缺血再灌注损伤,探讨低温对

心肌细胞凋亡、自噬及线粒体的影响,为低温减轻心搏骤停后心肌功能障碍提供可能的治疗靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 H9C2 心肌细胞 OGD/R 模型建立:** H9C2 心肌细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。取对数生长期 H9C2 心肌细胞,胰酶消化后收集细胞,接种于直径 6 cm 的培养皿中,每皿  $0.5 \times 10^6$  个细胞,24 h 后更换为无糖无血清培养基,置于缺氧小室中,充入 5%  $\text{CO}_2$  和 95%  $\text{N}_2$  预混气体 4 min,夹闭进出口,放入 37 °C 培养箱培养。细胞经氧糖剥夺 (oxygen-glucose deprivation, OGD) 处理后收集上清液,更换为完全培养基,离心后加入相应培养皿中,在 21% 氧浓度的培养箱中继续孵育,进行复糖复氧处理。本实验通过首都医科大学附属北京朝阳医院动物福利与伦理工作委员会科研课题审查 (审批号: 2020-动-315)

**1.2 细胞分组及处理:** 根据预实验结果,选定最佳 OGD 时间为 12 h,最佳复糖复氧时间为 4、8、12 h。将 H9C2 心肌细胞分为 4 组:空白对照组不进行 OGD 处理,37 °C 常温培养 24 h; OGD 组进行 OGD 处理 12 h,不给予复糖复氧处理; OGD/R 常温组进行 OGD 处理 12 h 后,于 37 °C 常温状态下分别给予复糖复氧处理 4、8、12 h; OGD/R 低温组进行 OGD 处理 12 h

后,于 34 ℃ 低温状态下分别给予复糖复氧处理 4、8、12 h。

**1.3 细胞存活率测定:**细胞经洗涤、胰酶消化、重悬后,充分混匀;取 20 μL 重悬液置于 1.5 mL 小离心管中,加入 0.2% 台盼蓝 20 μL,充分混匀;取 20 μL 重悬液至细胞计数板中,应用细胞分析仪检测存活率。

**1.4 线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, ΔΨ<sub>m</sub>)检测:**收集细胞,加入 10 μL JC-1 探针,37 ℃ 孵育 20 min;400×g 4 ℃ 离心 5 min,预冷 Hank 平衡盐溶液(Hank balanced salt solution, HBSS)洗涤细胞 2 次;用 500 μL HBSS 重悬细胞,40 μm 细胞网筛过滤细胞,制成单细胞悬液,应用流式细胞仪分析 ΔΨ<sub>m</sub> 的变化。正常情况下,ΔΨ<sub>m</sub> 较高,JC-1 在基质中汇聚产生红色荧光;细胞损伤后,ΔΨ<sub>m</sub> 较低,JC-1 以单体形式存在,产生绿色荧光。通过绿色荧光与红色荧光的强度比值判断 ΔΨ<sub>m</sub> 变化情况,比值增加代表 ΔΨ<sub>m</sub> 下降。

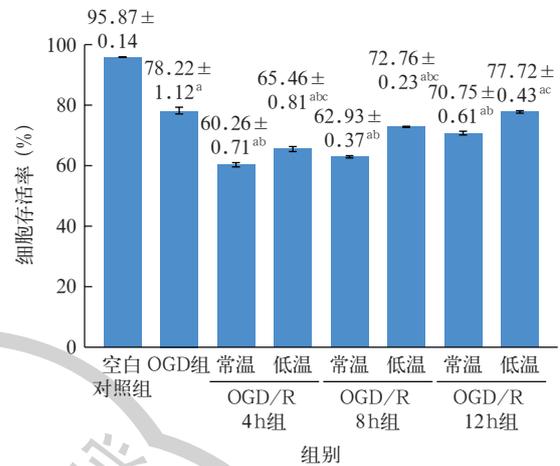
**1.5 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测蛋白表达:**收集细胞,提取总蛋白并定量,计算样品上样体积,加入 5× 上样缓冲液,100 ℃ 金属浴 10 min 使其变性,制作蛋白样品。通过 Western blotting 检测凋亡相关蛋白[天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)及活化水平(cleaved caspase-3)、自噬相关蛋白[微管相关蛋白 1 轻链 3B- II / I(microtubule-associated protein 1 light chain 3B- II / I, LC3B- II / I)、p62]、PINK1、Parkin、线粒体外膜孔道蛋白(VDAC3)的表达。应用凝胶成像系统 Image J 软件分析条带的灰度值,以目的蛋白与内参 β-肌动蛋白(β-actin)或 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)的灰度值比值作为目的蛋白表达量。

**1.6 统计学处理:**采用 GraphPad Prism 9.5 软件进行统计分析。所有数据均符合正态分布,以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。检验水准  $\alpha$  值取双侧 0.05。

## 2 结果

**2.1 低温可提高 OGD/R 损伤心肌细胞存活率(图 1):**与空白对照组相比,OGD 组及 OGD/R 各组细胞存活率均下降(均  $P < 0.05$ ),表明 OGD 及 OGD/R 均能引起心肌细胞损伤。与 OGD 组相比,OGD/R 4 h、8 h 组常温 and 低温状态及 OGD/R 12 h 组常温状态细胞存活率均下降(均  $P < 0.05$ ),表明复糖复氧可加重 OGD 造成的心肌细胞损伤;但 OGD/R 各组低温状态细胞

存活率均高于常温状态(均  $P < 0.05$ ),表明低温可减轻 OGD/R 引起的心肌细胞损伤,提高细胞存活率。

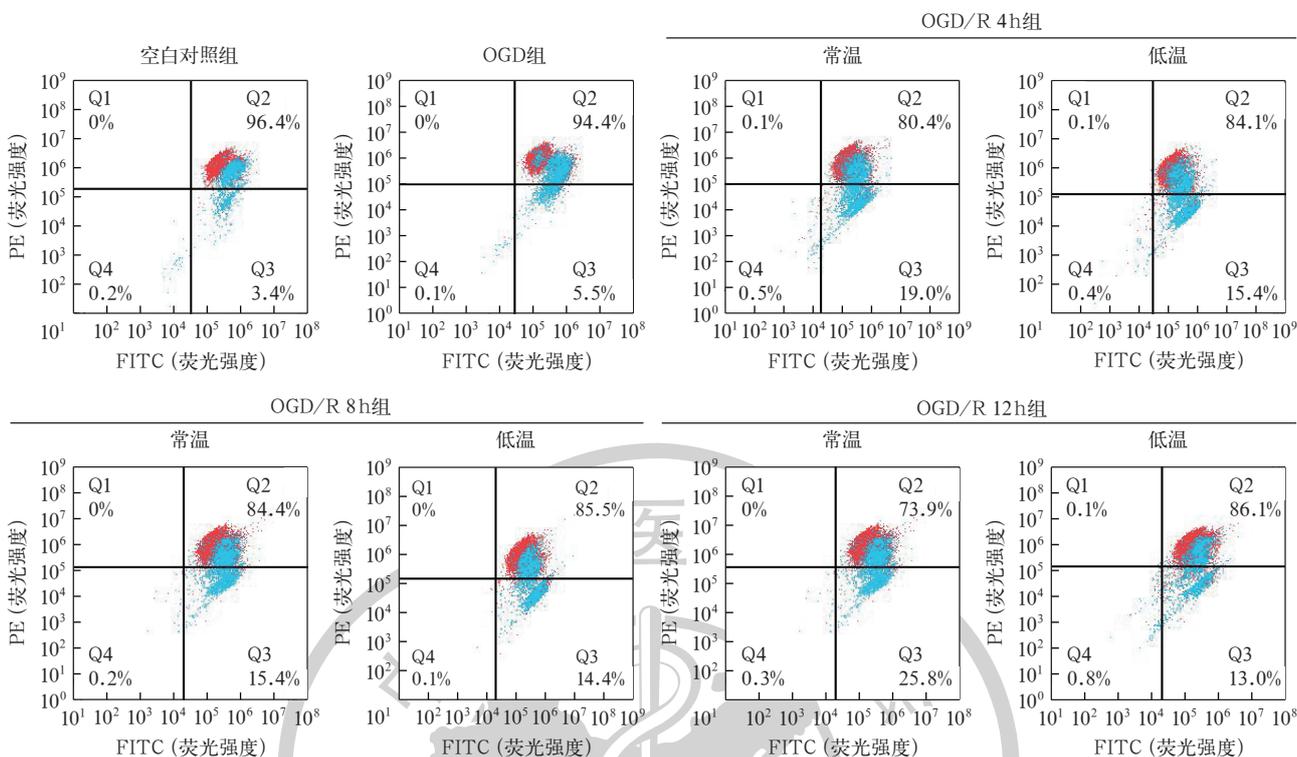


注:OGD 为氧糖剥夺,OGD/R 为氧糖剥夺/复糖复氧;与空白对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 OGD 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与本组常温状态比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$

图 1 各组 H9C2 心肌细胞存活率比较

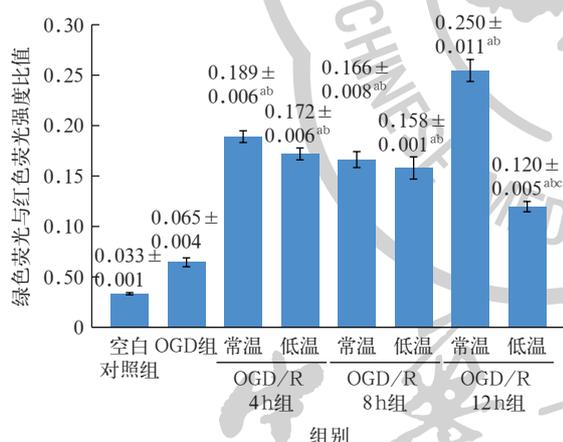
**2.2 低温可减少 OGD/R 损伤心肌细胞 ΔΨ<sub>m</sub> 下降(图 2~3):**与空白对照组相比,OGD 组细胞 ΔΨ<sub>m</sub> 无明显变化。与空白对照组和 OGD 组相比,OGD/R 各组绿色荧光与红色荧光强度比值均升高(均  $P < 0.05$ ),表明 OGD/R 可使 H9C2 心肌细胞 ΔΨ<sub>m</sub> 下降。与 OGD/R 12 h 组常温状态相比,低温状态绿色荧光与红色荧光强度比值下降( $P < 0.05$ ),表明低温 12 h 可有效减少 OGD/R 引起的细胞 ΔΨ<sub>m</sub> 下降;OGD/R 4 h 和 8 h 组低温与常温状态差异虽然没有统计学意义,但绿色荧光与红色荧光强度比值仍有下降趋势,表明低温 4 h 和 8 h 也可使细胞 ΔΨ<sub>m</sub> 下降程度呈减少趋势。说明低温能够减少 OGD/R 引起的心肌细胞 ΔΨ<sub>m</sub> 下降,减轻线粒体损伤。

**2.3 低温可减少 OGD/R 损伤心肌细胞凋亡相关蛋白表达(图 4):**与空白对照组相比,OGD 组及 OGD/R 各组细胞 cleaved caspase-3/caspase-3 比值均升高(均  $P < 0.05$ ),常温状态随复糖复氧时间延长呈进行性升高趋势,表明 OGD 及 OGD/R 均可引起心肌细胞凋亡,且常温状态细胞凋亡呈时间依赖性。与 OGD 组相比,OGD/R 各组常温状态细胞 cleaved caspase-3/caspase-3 比值均升高(均  $P < 0.05$ ),而低温状态差异无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),表明复糖复氧后常温状态可使细胞凋亡水平升高,而低温状态细胞凋亡未见增加。与 OGD/R 8 h、12 h 组常温状态相比,低温状态细胞 cleaved caspase-3/caspase-3 比值降低(均  $P < 0.05$ ),表明低温可减轻 OGD/R 损伤心肌细胞凋亡。



注：OGD 为氧糖剥夺，OGD/R 为氧糖剥夺 / 复糖复氧， $\Delta\Psi_m$  为线粒体膜电位，FITC 为异硫氰酸荧光素，PE 为藻红蛋白

图 2 各流式细胞仪检测各组 H9C2 心肌细胞  $\Delta\Psi_m$



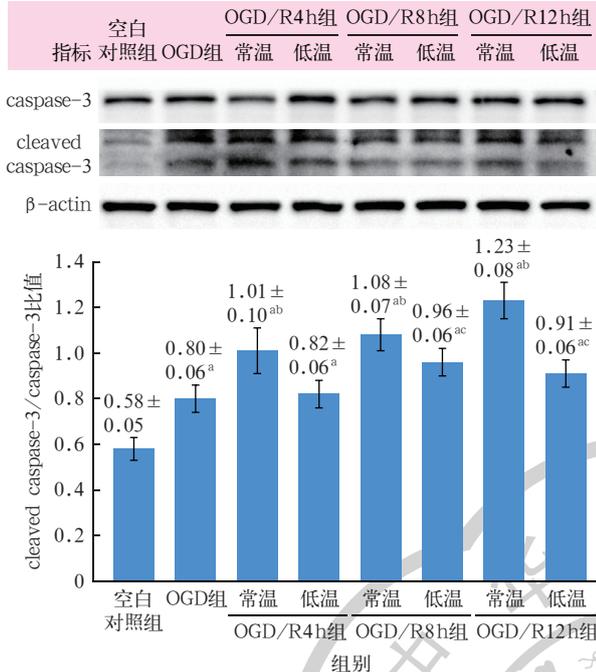
注：OGD 为氧糖剥夺，OGD/R 为氧糖剥夺 / 复糖复氧， $\Delta\Psi_m$  为线粒体膜电位；与空白对照组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与 OGD 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$ ；与本组常温状态比较，<sup>c</sup> $P < 0.05$ ；通过绿色荧光与红色荧光强度比值判断  $\Delta\Psi_m$  变化，比值增加代表  $\Delta\Psi_m$  下降

图 3 各组 H9C2 心肌细胞  $\Delta\Psi_m$  变化比较

**2.4 低温可调节 OGD/R 损伤心肌细胞自噬**(图 5；表 1)：与空白对照组相比，OGD 组及 OGD/R 各组细胞 LC3B- II / I 比值均升高，表明 OGD 及 OGD/R 均可使心肌细胞自噬增强。随复糖复氧时间延长，OGD/R 组常温状态细胞 LC3B- II / I 比值逐渐降低，说明自噬增强趋势减弱；而低温状态 LC3B- II / I 比值逐渐升高，表明自噬增强趋势逐渐增加。与 OGD/R 4 h 组常温状态相比，低温状态细胞 LC3B- II / I 比

值呈下降趋势，但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，而 8 h、12 h 组细胞 LC3B- II / I 比值升高 (均  $P < 0.05$ )。表明低温状态 4 h 可使自噬减弱，8 h、12 h 可使自噬增强，提示低温对细胞自噬有调节作用。与空白对照组相比，OGD 组细胞 p62 蛋白表达下降 ( $P < 0.05$ )；与 OGD 组相比，OGD/R 各组细胞 p62 蛋白表达均升高 (均  $P < 0.05$ )。OGD/R 各组低温状态 p62 蛋白表达较常温状态呈升高趋势，12 h 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.5 低温可以调节 OGD/R 损伤心肌细胞 VDAC3、PINK1、Parkin 蛋白表达**(图 6；表 2)：与空白对照组相比，OGD 组及 OGD/R 各组细胞 VDAC3 蛋白表达均升高 (均  $P < 0.05$ )；OGD/R 4 h 组低温状态较常温状态呈升高趋势，但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，而 8 h 和 12 h 组较常温状态呈下降趋势，且 12 h 组差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。表明低温可调节细胞 VDAC3 表达。与空白对照组相比，OGD 组 PINK1、Parkin 蛋白表达均升高 (均  $P < 0.05$ )。OGD/R 4 h 组低温状态较常温状态呈下降趋势，但差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )，而 8 h、12 h 组较常温状态呈升高趋势，且 12 h 组差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。表明低温亦可调节 PINK1、Parkin 的表达，且在温度影响方面，与自噬蛋白表达趋势一致。



注: Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, OGD 为氧糖剥夺, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复糖复氧, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, cleaved caspase-3 为活化 caspase-3,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白; 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 OGD 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与本组常温状态比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$

图 4 Western blotting 检测各组 H9C2 心肌细胞凋亡相关蛋白表达



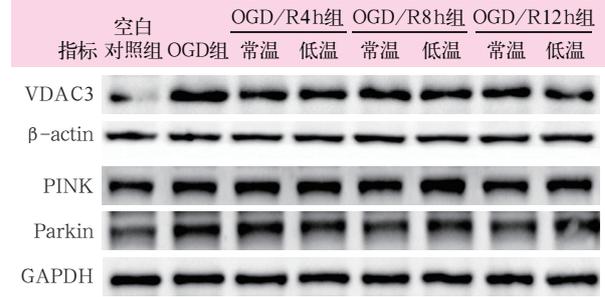
注: Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, OGD 为氧糖剥夺, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复糖复氧, LC3B 为微管相关蛋白 1 轻链 3B, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 5 Western blotting 检测各组 H9C2 心肌细胞自噬相关蛋白表达

**表 1 各组 H9C2 心肌细胞自噬相关蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	LC3B- II / I 比值	p62 蛋白 (p62/GAPDH)
空白对照组	0.95 ± 0.04 (8)	0.94 ± 0.08 (6)
OGD 组	1.44 ± 0.07 (8) <sup>a</sup>	0.58 ± 0.04 (6) <sup>a</sup>
OGD/R 4 h 组		
常温	1.41 ± 0.07 (8) <sup>a</sup>	0.92 ± 0.06 (6) <sup>b</sup>
低温	1.31 ± 0.12 (8) <sup>a</sup>	1.03 ± 0.03 (6) <sup>b</sup>
OGD/R 8 h 组		
常温	1.16 ± 0.08 (8) <sup>b</sup>	0.98 ± 0.04 (6) <sup>b</sup>
低温	1.40 ± 0.08 (8) <sup>ac</sup>	1.09 ± 0.05 (6) <sup>ab</sup>
OGD/R 12 h 组		
常温	1.12 ± 0.07 (8) <sup>b</sup>	0.75 ± 0.03 (6) <sup>ab</sup>
低温	1.51 ± 0.11 (8) <sup>ac</sup>	0.90 ± 0.04 (6) <sup>bc</sup>

注: OGD 为氧糖剥夺, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复糖复氧, LC3B 为微管相关蛋白 1 轻链 3B, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 OGD 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与本组常温状态比较, <sup>c</sup> $P < 0.05$ ; 括号内为样本量



注: Western blotting 为蛋白质免疫印迹试验, OGD 为氧糖剥夺, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复糖复氧, VDAC3 为电压依赖性阴离子通道 3, PINK1 为 PTEN 诱导激酶 1, Parkin 为 E3 泛素连接酶,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 6 Western blotting 检测各组 H9C2 心肌细胞 VDAC3、PINK1、Parkin 蛋白表达

**表 2 各组 H9C2 心肌细胞 VDAC3、PINK1、Parkin 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	VDAC3 蛋白 (VDAC3/ $\beta$ -actin)	PINK1 蛋白 (PINK1/GAPDH)	Parkin 蛋白 (Parkin/GAPDH)
空白对照组	0.82 ± 0.04 (14)	0.82 ± 0.04 (7)	0.85 ± 0.03 (10)
OGD 组	1.00 ± 0.04 (14) <sup>a</sup>	1.07 ± 0.06 (7) <sup>a</sup>	1.02 ± 0.05 (10) <sup>a</sup>
OGD/R 4 h 组			
常温	1.00 ± 0.03 (14) <sup>a</sup>	0.88 ± 0.05 (7)	1.06 ± 0.06 (10) <sup>a</sup>
低温	1.01 ± 0.04 (14) <sup>a</sup>	0.84 ± 0.05 (7)	0.97 ± 0.04 (10) <sup>a</sup>
OGD/R 8 h 组			
常温	1.04 ± 0.02 (14) <sup>a</sup>	0.93 ± 0.05 (7)	0.94 ± 0.04 (10)
低温	1.00 ± 0.05 (14) <sup>a</sup>	0.99 ± 0.04 (7)	0.99 ± 0.04 (10) <sup>a</sup>
OGD/R 12 h 组			
常温	1.07 ± 0.04 (14) <sup>a</sup>	0.80 ± 0.05 (7)	0.99 ± 0.05 (10) <sup>a</sup>
低温	0.93 ± 0.04 (14) <sup>ab</sup>	0.98 ± 0.06 (7) <sup>b</sup>	1.13 ± 0.08 (10) <sup>ab</sup>

注: OGD 为氧糖剥夺, OGD/R 为氧糖剥夺 / 复糖复氧, VDAC3 为电压依赖性阴离子通道 3, PINK1 为 PTEN 诱导激酶 1, Parkin 为 E3 泛素连接酶,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; 与空白对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与本组常温状态比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 括号内为样本量

### 3 讨论

心搏骤停后多项机制可引起心功能障碍, 涉及活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生增多、钙超载、炎症反应激活、儿茶酚胺释放与应用、血管内皮损伤、微血栓形成等<sup>[15-17]</sup>。研究表明, 低温可通过多种机制途径改善心搏骤停后的心脏功能<sup>[18]</sup>。

本研究采用 OGD/R 模型模拟心肌缺血再灌注损伤。在以往研究中, 心肌细胞 OGD/R 模型的 OGD 及复糖复氧时间均不相同<sup>[19-21]</sup>, 可能与研究目标及探索机制不同有关。心肌细胞相对于其他细胞 (如神经细胞) 对 OGD/R 具有更好的耐受性。本研究中对 OGD 及复糖复氧时间进行了预实验, 最终选择 OGD 12 h 及复糖复氧 4、8、12 h 进行后续机制研究。结果显示, OGD 组及 OGD/R 各组细胞存活率均下降, 以 OGD/R 各组更低, 表明心肌细胞缺血再灌注损伤模型建立成功; 低温可以减轻细胞凋亡, 减轻

$\Delta\psi_m$  下降,调节自噬和VDAC3表达,这一过程可能是通过影响 PINK1/Parkin 通路调控的。

细胞凋亡是一种不消耗能量且不产生炎症反应的程序性死亡,是细胞死亡重要形式之一。有研究者分别采用原代心肌细胞和大鼠缺血再灌注损伤模型证实了低温可通过不同途径抑制细胞凋亡<sup>[6-7]</sup>。本研究也证实,低温可减少 OGD/R 损伤导致的细胞存活率降低。 $\Delta\psi_m$  下降是细胞凋亡的早期标志性事件<sup>[22]</sup>。本研究中,OGD 后未发现  $\Delta\psi_m$  下降增多,复糖复氧后则下降增多,而低温处理可减少 OGD/R 损伤引起的  $\Delta\psi_m$  下降,同时可减少凋亡蛋白活化,证实低温可减少 OGD/R 损伤后心肌细胞凋亡,明确了低温对缺血再灌注损伤心肌细胞的保护作用。

在通常情况下,自噬被认为是机体的一种自我保护机制,但自噬机制破坏或过度自噬会导致细胞死亡<sup>[23]</sup>。LC3B 是一种重要的自噬体膜蛋白,当自噬发生时,胞质 LC3B- I 与磷脂酰乙醇胺结合形成 LC3B- II,定位到自噬体膜上,LC3B- II / I 能反映自噬水平,LC3B- II 也可作为自噬体形成的标志物<sup>[24]</sup>。p62 是重要的自噬选择性受体,能结合 LC3B 和被泛素化的自噬底物形成自噬小体,之后与溶酶体结合形成自噬溶酶体被清除。p62 积累可能是自噬抑制或自噬降解缺陷的标志物<sup>[25]</sup>,也可能是自噬体和溶酶体显著增多后代偿性增加及降解滞后导致的<sup>[26]</sup>。自噬在心肌缺血再灌注的病理过程中同时发挥着有益和有害的双重作用<sup>[10, 27]</sup>。在心肌缺血阶段,低 ATP 水平激活腺苷一磷酸依赖的蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)<sup>[28]</sup>,通过恢复 ATP 产生来维持能量平衡,缺氧可通过激活缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 诱导自噬激活,此时线粒体自噬的主要作用可能是维持能量的产生<sup>[10]</sup>,发挥保护作用。再灌注期间,Beclin-1 蛋白及增加的 ROS、钙超载等发挥作用,诱导自噬进一步增加,导致自噬过度,使细胞内蛋白或细胞器清除过多,最终造成细胞功能障碍。也有研究者认为,在再灌注期间,自噬体清除受损,导致细胞内“过度自噬”的假象,对细胞产生有害作用<sup>[27, 29]</sup>。有研究者分别采用家猪和大鼠缺血再灌注损伤模型证实低温可通过激活自噬减少心肌梗死面积,抑制细胞凋亡<sup>[30-31]</sup>; Cheng 等<sup>[32]</sup>则发现低温可减轻自噬,减少心肌细胞死亡。目前自噬对心肌缺血再灌注损伤的作用及低温对缺血再灌注损伤后心肌细胞自噬的影响仍不明确。

在本研究中,经 OGD/R 处理的 H9C2 心肌细胞 LC3B- II / I 比值增高,表明自噬激活,低温状态 4 h LC3B- II / I 比值有下降趋势,表明低温使自噬激活受到抑制,而 8 h 和 12 h LC3B- II / I 比值升高程度大于相应常温状态,表明低温使自噬体数量进一步增多,自噬被激活;低温状态 p62 蛋白表达亦增高,可能是由于再灌注早期自噬进一步激活导致过度自噬,大量细胞器被自身消化,加重心肌细胞损伤,而低温能调控自噬水平,减少自噬体与自噬溶酶体结合,抑制细胞器自身消化,对心肌细胞起保护作用,此时 p62 表达增加与自噬抑制导致 p62 清除减少有关;随着再灌注时间延长,自噬抑制使受损细胞器不能被清除导致细胞损伤时,低温使自噬大量激活,导致自噬体及溶酶体数量增多,此时 p62 表达增高与 p62 代偿性增多及 p62 清除具有滞后性有关。可以推断,低温对心肌细胞缺血再灌注损伤期间自噬的影响可能更趋向于调节自噬平衡:当自噬被过度激活引起细胞损伤时,低温可减少过度自噬,类似于本研究中 OGD/R 后低温状态 4 h 与常温状态 4 h 差异虽然没有统计学意义,但低温状态自噬趋势下降,细胞损伤减轻;当自噬减弱不能清除受损的细胞器引起细胞损伤时,低温可激活自噬,减轻细胞损伤和凋亡,正如本研究中 OGD/R 后常温状态 8 h 和 12 h 与低温状态相比虽然自噬有下降趋势,但细胞损伤和凋亡越来越重,低温状态自噬增强,但减轻了细胞损伤和凋亡。因此考虑自噬作为一种平衡细胞内环境的形式而存在,低温可发挥调节自噬平衡的作用。

VDAC 参与细胞凋亡<sup>[13]</sup>,可招募 Parkin 至受损线粒体,在线粒体自噬中起重要作用<sup>[33]</sup>。VDAC3 是 VDAC 亚型,具有温度调控功能<sup>[34]</sup>。本课题组既往研究显示,低温可增强小胶质细胞 VDAC3 泛素化,减少 VDAC3 表达,减轻神经元损伤<sup>[14]</sup>。本研究显示,低温可调节 VDAC3 表达,减轻心肌细胞损伤。因此,VDAC3 可能参与低温对心肌细胞的保护作用。

研究表明,心肌细胞损伤后,线粒体受损,线粒体外膜 PINK1 增加,招募 Parkin 至线粒体外膜<sup>[35]</sup>;线粒体外膜 VDAC3 亦可同时招募 Parkin 至线粒体外膜<sup>[33]</sup>。VDAC3 作为线粒体膜蛋白可被泛素标记,自噬体包裹泛素标记的线粒体,形成自噬体,与溶酶体结合而被清除。本研究证实,低温可调节 VDAC3、PINK1、Parkin 蛋白的表达,可能与调节自噬及通过 PINK1/Parkin 通路使 VDAC3 泛素化有关,其具体机制及通路仍需进一步探索。

综上所述,本研究从细胞及蛋白水平证实低温可提高 OGD/R 损伤心肌细胞存活率,减少  $\Delta\psi_m$  下降和心肌细胞凋亡,并且可调节自噬。这一过程可能与调节 VDAC3 及 PINK1/Parkin 通路相关,VDAC3 可能参与低温对 OGD/R 损伤心肌细胞的保护作用,但具体作用通路及对基因表达的影响尚未明确。未来将继续探讨低温调节 VDAC3 和自噬对心肌细胞产生保护作用的具体通路,并实施动物实验验证。

**利益冲突** 所有作者声明不存在利益冲突

**作者贡献声明** 梁震: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析; 杨颂: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、对文章的知识性内容作批评性审阅; 张焱英: 实施研究、采集数据、分析/解释数据; 邵瑞: 酝酿和设计实验,对文章的知识性内容作批评性审阅,行政、技术或材料支持; 王兴圣: 实施研究,获取研究经费,行政、技术或材料支持; 安乐: 对文章的知识性内容作批评性审阅、指导、支持性贡献; 杭晨晨: 对文章的知识性内容作批评性审阅,行政、技术或材料支持、支持性贡献; 唐子人: 酝酿和设计实验,分析/解释数据,对文章的知识性内容作批评性审阅,获取研究经费,行政、技术或材料支持,指导,支持性贡献

## 参考文献

- Xu TY, Tang WC, Ristagno G, et al. Postresuscitation myocardial diastolic dysfunction following prolonged ventricular fibrillation and cardiopulmonary resuscitation[J]. Crit Care Med, 2008, 36(1): 188-192. DOI: 10.1097/01.CCM.0000295595.72955.7C.
- Krech J, Tong G, Wowro S, et al. Moderate therapeutic hypothermia induces multimodal protective effects in oxygen-glucose deprivation/reperfusion injured cardiomyocytes[J]. Mitochondrion, 2017, 35: 1-10. DOI: 10.1016/j.mito.2017.04.001.
- 邹洋洋, 陈立旻, 华天凤, 等. 血管内降温治疗对复苏后综合征的保护作用及机制研究[J]. 中华危重病急救医学, 2018, 30(9): 888-893. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.09.013.
- 李银平, 范振兴, 秦俭, 等. 不同时机轻度低温干预对心室纤颤兔复苏后心脏的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(3): 185-189. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.03.006.
- 姚震, 焦解歌, 冯建章, 等. 心肌缺血-再灌注损伤与细胞凋亡关系的实验研究[J]. 海南医学院学报, 2000, 6(3): 129-133. DOI: 10.3969/j.issn.1007-1237.2000.03.001.
- Xue QQ, Zhang QR, Guo ZZ, et al. Therapeutic hypothermia inhibits hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis via the miR-483-3p/Cdk9 axis[J]. J Am Heart Assoc, 2023, 12(4): e026160. DOI: 10.1161/JAHA.122.026160.
- Gao RJ, Zhao HY, Wang XY, et al. Mild hypothermia therapy lowers the inflammatory level and apoptosis rate of myocardial cells of rats with myocardial ischemia-reperfusion injury via the NLRP3 inflammasome pathway[J]. Comput Math Methods Med, 2021, 2021: 6415275. DOI: 10.1155/2021/6415275.
- Ryter SW, Mizumura K, Choi AM. The impact of autophagy on cell death modalities[J]. Int J Cell Biol, 2014, 2014: 502676. DOI: 10.1155/2014/502676.
- Dong Y, Chen HW, Gao JL, et al. Molecular machinery and interplay of apoptosis and autophagy in coronary heart disease[J]. J Mol Cell Cardiol, 2019, 136: 27-41. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.09.001.
- Matsui Y, Takagi H, Qu XP, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy[J]. Circ Res, 2007, 100(6): 914-922. DOI: 10.1161/01.RES.0000261924.76669.36.
- Tanaka K. The PINK1-Parkin axis: an overview[J]. Neurosci Res, 2020, 159: 9-15. DOI: 10.1016/j.neures.2020.01.006.
- Bayne AN, Trempe JF. Mechanisms of PINK1, ubiquitin and Parkin interactions in mitochondrial quality control and beyond[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(23): 4589-4611. DOI: 10.1007/s00018-019-03203-4.
- Tsujimoto Y, Shimizu S. The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis[J]. Biochimie, 2002, 84(2-3): 187-193. DOI: 10.1016/s0300-9084(02)01370-6.
- Zhao S, Xiao P, Cui H, et al. Hypothermia-induced ubiquitination of voltage-dependent anion channel 3 protects BV2 microglia cells from cytotoxicity following oxygen-glucose deprivation/recovery[J]. Front Mol Neurosci, 2020, 13: 100. DOI: 10.3389/fnmol.2020.00100.
- Bagheri F, Khori V, Alizadeh AM, et al. Reactive oxygen species-mediated cardiac-reperfusion injury: mechanisms and therapies[J]. Life Sci, 2016, 165: 43-55. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.09.013.
- Wu MY, Yiang GT, Liao WT, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1650-1667. DOI: 10.1159/000489241.
- Chalkias A, Xanthos T. Pathophysiology and pathogenesis of post-resuscitation myocardial stunning[J]. Heart Fail Rev, 2012, 17(1): 117-128. DOI: 10.1007/s10741-011-9255-1.
- 梁震, 杨颂, 王涛, 等. 心搏骤停后目标温度管理对心功能保护机制的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2023, 35(7): 773-776. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230217-00095.
- Sun L, Zhao M, Yang Y, et al. Acetylcholine attenuates hypoxia/reoxygenation injury by inducing mitophagy through PINK1/Parkin signal pathway in H9c2 cells[J]. J Cell Physiol, 2016, 231(5): 1171-1181. DOI: 10.1002/jcp.25215.
- Ji WQ, Wei SJ, Hao PP, et al. Aldehyde dehydrogenase 2 has cardioprotective effects on myocardial ischaemia/reperfusion injury via suppressing mitophagy[J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 101. DOI: 10.3389/fphar.2016.00101.
- Luo CX, Zhang YH, Guo H, et al. Ferulic acid attenuates hypoxia/reoxygenation injury by suppressing mitophagy through the PINK1/Parkin signaling pathway in H9c2 cells[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 103. DOI: 10.3389/fphar.2020.00103.
- Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion[J]. Biochem J, 1995, 307(Pt 1): 93-98. DOI: 10.1042/bj3070093.
- Liu SZ, Yao SJ, Yang H, et al. Autophagy: regulator of cell death[J]. Cell Death Dis, 2023, 14(10): 648. DOI: 10.1038/s41419-023-06154-8.
- Tanida I, Waguri S. Measurement of autophagy in cells and tissues[J]. Methods Mol Biol, 2010, 648: 193-214. DOI: 10.1007/978-1-60761-756-3\_13.
- Björkoy G, Lamark T, Pankiv S, et al. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1[J]. Methods Enzymol, 2009, 452: 181-197. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)03612-4.
- 吕晓希, 胡卓伟. 自噬流的检测方法[J]. 药理学报, 2016, 51(1): 45-51. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2015-0877.
- Ma S, Wang YB, Chen YD, et al. The role of the autophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(2): 271-276. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.05.010.
- 阮培森, 郑耀, 董卓亚, 等. AMPK 信号通道调节自噬和线粒体稳态的研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2024, 36(4): 425-429. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20230302-00132.
- Gottlieb RA, Mentzer RM. Autophagy during cardiac stress: joys and frustrations of autophagy[J]. Annu Rev Physiol, 2010, 72: 45-59. DOI: 10.1146/annurev-physiol-021909-135757.
- Marek-Iannucci S, Thomas A, Hou J, et al. Myocardial hypothermia increases autophagic flux, mitochondrial mass and myocardial function after ischemia-reperfusion injury[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 10001. DOI: 10.1038/s41598-019-46452-w.
- Tu YL, Guo C, Song FF, et al. Mild hypothermia alleviates diabetes aggravated cerebral ischemic injury via activating autophagy and inhibiting pyroptosis[J]. Brain Res Bull, 2019, 150: 1-12. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2019.05.003.
- Cheng BC, Huang HS, Chao CM, et al. Hypothermia may attenuate ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte death by reducing autophagy[J]. Int J Cardiol, 2013, 168(3): 2064-2069. DOI: 10.1016/j.ijcard.2013.01.162.
- Sun Y, Vashisht AA, Tchiew J, et al. Voltage-dependent anion channels (VDACs) recruit Parkin to defective mitochondria to promote mitochondrial autophagy[J]. J Biol Chem, 2012, 287(48): 40652-40660. DOI: 10.1074/jbc.M112.419721.
- Yang XY, Chen ZW, Xu T, et al. Arabidopsis kinesin KP<sub>1</sub> specifically interacts with VDAC<sub>3</sub>, a mitochondrial protein, and regulates respiration during seed germination at low temperature[J]. Plant Cell, 2011, 23(3): 1093-1106. DOI: 10.1105/tpc.110.082420.
- Springer W, Kahle PJ. Regulation of PINK1-Parkin-mediated mitophagy[J]. Autophagy, 2011, 7(3): 266-278. DOI: 10.4161/auto.7.3.14348.

(收稿日期: 2024-12-17)

(本文编辑: 孙茜 张耘菲)