

· 论著 · 脏器损害与并发症 ·

线粒体转录因子 A 和细胞色素 c 氧化酶途径对肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 调节大鼠缺氧心肌细胞能量生成的作用及机制



向飞 薛冬冬 罗佳 胡建红 原莉莉 贾杰只 黄跃生

陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038

黄跃生现在深圳市人民医院 南方科技大学第一附属医院 暨南大学第二临床医学院 创面修复科,创面修复研究所 518020

通信作者:黄跃生,Email:yshuang1958@163.com

【摘要】目的 探讨线粒体转录因子 A(TFAM)和细胞色素 c 氧化酶(COX)途径在肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1(TRAP1)调节大鼠缺氧心肌细胞能量生成中的作用及机制。**方法** 取 135 只 1~3 d 龄 SD 大鼠乳鼠,分离培养心肌细胞。(1)取细胞,按随机数字表法(分组方法下同)分为常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧+TRAP1 过表达对照组、缺氧+TRAP1 过表达组,每组 1 瓶。常氧空白对照组细胞常规培养;缺氧空白对照组细胞常规培养后缺氧 6 h;缺氧+TRAP1 过表达对照组、缺氧+TRAP1 过表达组细胞常规培养后,分别加入 TRAP1 过表达空病毒载体、TRAP1 过表达腺病毒载体病毒悬液转染 48 h 后缺氧 6 h。蛋白质印迹法检测各组细胞 TFAM 蛋白表达。(2)取细胞,分为常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧+TRAP1 过表达对照组、缺氧+TRAP1 过表达组、缺氧+TRAP1 过表达+TFAM 干扰对照组、缺氧+TRAP1 过表达+TFAM 干扰组,每组 1 孔,前 4 组细胞处理同实验(1)对应组别。缺氧+TRAP1 过表达+TFAM 干扰对照组、缺氧+TRAP1 过表达+TFAM 干扰组细胞分别加入 TFAM 干扰空病毒载体、TFAM 干扰腺病毒载体病毒悬液转染 48 h,其他处理同缺氧+TRAP1 过表达组。采用 ATP 检测试剂盒及酶标仪检测细胞内 ATP 含量,采用 COX 活性检测试剂盒及酶标仪检测细胞内 COX 活性。(3)取细胞,分为常氧空白对照组、常氧+叠氮化钠组、缺氧空白对照组、缺氧+叠氮化钠组,每组 1 孔,常氧空白对照组和缺氧空白对照组细胞处理同实验(1)对应组别。常氧+叠氮化钠组细胞实验前 30 min 加入 32 nmol 叠氮化钠,缺氧+叠氮化钠组细胞缺氧前 30 min 加入 32 nmol 叠氮化钠后缺氧 6 h,同前检测 ATP 含量。以上实验均重复 3 次。对数据进行单因素方差分析、LSD 检验。**结果** (1)与常氧空白对照组比较,缺氧空白对照组细胞 TFAM 蛋白表达量明显下降($P < 0.01$)。与缺氧空白对照组和缺氧+TRAP1 过表达对照组比较,缺氧+TRAP1 过表达组细胞 TFAM 蛋白表达量明显升高($P < 0.01$)。(2)与常氧空白对照组(0.552 ± 0.041 、 1.99 ± 0.15)比较,缺氧空白对照组细胞 COX 活性(0.270 ± 0.044)和 ATP 含量(1.09 ± 0.11)均明显降低($P < 0.01$)。与缺氧空白对照组和缺氧+TRAP1 过表达对照组(0.269 ± 0.042 、 1.17 ± 0.12)比较,缺氧+TRAP1 过表达组和缺氧+TRAP1 过表达+TFAM 干扰对照组细胞 COX 活性(0.412 ± 0.032 、 0.404 ± 0.016)和 ATP 含量(1.75 ± 0.06 、 1.69 ± 0.07)均明显升高($P < 0.01$)。与缺氧+TRAP1 过表达组和缺氧+TRAP1 过表达+TFAM 干扰对照组比较,缺氧+TRAP1 过表达+TFAM 干扰组细胞 COX 活性(0.261 ± 0.036)和 ATP 含量(1.23 ± 0.07)均明显降低($P < 0.01$)。(3)与常氧空白对照组比较,常氧+叠氮化钠组和缺氧空白对照组细胞 ATP 含量明显降低($P < 0.01$)。与缺氧空白对照组比较,缺氧+叠氮化钠组细胞 ATP 含量明显降低($P < 0.01$)。**结论** TRAP1 能够通过上调 TFAM 表达来提高 COX 活性,最终减轻缺氧导致的大鼠心肌细胞能量生成受损。

【关键词】 肌细胞,心脏; 缺氧; 腺苷三磷酸; 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1; 线粒体转录因子 A; 细胞色素 c 氧化酶

基金项目:国家自然科学基金(81571898)

DOI:10.3760/cma.j.cn501120-20200430-00247

Effects and mechanism of mitochondrial transcription factor A and cytochrome c oxidase pathway in the energy production of hypoxic cardiomyocytes of rats regulated by tumor necrosis factor receptor associated protein 1

Xiang Fei, Xue Dongdong, Luo Jia, Hu Jianhong, Yuan Lili, Jia Jiezhong, Huang Yuesheng

State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burn Research, the First Affiliated Hospital of Army Medical University (the Third Military Medical University), Chongqing 400038, China

Huang Yuesheng is now working at Department of Wound Repair, Institute of Wound Repair, Shenzhen People's Hospital, the First Affiliated Hospital of Southern University of Science and Technology, the Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, China

Corresponding author: Huang Yuesheng, Email: yshuang1958@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects and mechanism of mitochondrial transcription factor A (TFAM) and cytochrome c oxidase (COX) pathway in the energy production of hypoxic cardiomyocytes of rats regulated by tumor necrosis factor receptor associated protein 1 (TRAP1). **Methods** The cardiomyocytes were isolated from 135 neonatal Sprague-Dawley rats (aged 1–3 d) and cultured for the following experiments. (1) Cells were collected and divided into normoxia blank control (NBC) group, hypoxia blank control (HBC) group, hypoxia + TRAP1 over-expression control (HTOC) group, and hypoxia + TRAP1 over-expression (HTO) group according to the random number table (the same grouping method below), with 1 bottle in each group. Cells in NBC group were cultured routinely, cells in HBC group were cultured in hypoxic condition for 6 hours after routine culture, cells in HTOC and HTO groups were respectively added with TRAP1 over-expression empty virus vector and TRAP1 over-expression adenovirus vector virus suspension for transfection for 48 hours after routine culture and then cultured in hypoxic condition for 6 hours. The protein expression of TFAM of cells in each group was detected by Western blotting. (2) Cells were collected and divided into NBC, HBC, HTOC, HTO, HTO + TFAM interference control (HTOTIC), and HTO + TFAM interference (HTOTI) groups, with 1 well in each group. Cells in the former 4 groups were dealt with the same methods as the corresponding groups in experiment (1). Cells in HTOTIC and HTOTI groups were respectively added with TFAM interference empty virus vector and TFAM interference adenovirus vector virus suspension for transfection for 48 hours, and the other processing methods were the same as those in HTO group. The content of ATP of cells in each group was determined by ATP determination kit and microplate reader, and the COX activity of cells in each group was determined by COX activity assay kit and microplate reader. (3) Cells were collected and divided into NBC group, normoxia + sodium azide (NSA) group, HBC group, and hypoxia + sodium azide (HSA) group, with 1 well in each group. Cells in NBC and HBC groups were respectively dealt with the same methods as the corresponding groups in experiment (1). Cells in NSA and HSA groups were respectively added with 32 nmol sodium azide at 30 min before experiment or hypoxia, and then cells in HSA group were cultured in hypoxic condition for 6 hours. The content of ATP was determined by the same method as above. The above three experiments were repeated for three times. Data were statistically analyzed with one-way analysis of variance and least significant difference test. **Results** (1) Compared with that in NBC group, the protein expression of TFAM of cells in HBC group was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with that in HBC group or HTOC group, the protein expression of TFAM of cells in HTO group was significantly increased ($P < 0.01$). (2) Compared with 0.552 ± 0.041 and 1.99 ± 0.15 in NBC group, the COX activity (0.270 ± 0.044) and ATP content (1.09 ± 0.11) of cells in HBC group were significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with 0.269 ± 0.042 and 1.17 ± 0.12 in HBC group and those in HTOC group, the COX activity (0.412 ± 0.032 and 0.404 ± 0.016) and ATP content (1.75 ± 0.06 and 1.69 ± 0.07) of cells in HTO and HTOTIC groups were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with those in HTO and HTOTIC groups, the COX activity (0.261 ± 0.036) and ATP content (1.23 ± 0.07) of cells in HTOTI group were significantly decreased ($P < 0.01$). (3) Compared with that in NBC group, the ATP content of cells in NSA and NBC groups was significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with that in HBC group, the ATP content of cells in HSA group was significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusions** TRAP1 can increase the COX activity of cardiomyocytes by raising the expression of TFAM, and finally alleviate the impairment in energy production of cardiomyocytes caused by hypoxia.

[Key words] Myocytes, cardiac; Anoxia; Adenosine triphosphate; Tumor necrosis factor receptor associated protein 1; Mitochondrial transcription factor A; Cytochrome c oxidase

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81571898)

DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200430-00247

严重烧伤后机体的缺血缺氧直接导致了烧伤早期的心肌损害,而这种心肌损害不仅能引起心功能不全,还可诱发或加重烧伤休克。研究表明,缺氧是烧伤早期心肌损害的重要致病因素^[1]。线粒体是细胞的核心细胞器,缺氧导致的线粒体依赖的凋亡途径激活以及能量生成障碍共同导致了线粒体功能受损并最终引起细胞死亡^[2-3]。TNF 受体相关蛋白 1 (TRAP1)属于热休克蛋白 90 (HSP90)家族,分子量约为 75×10^3 ,因此也被称为 HSP75,其作为分子伴侣在维持线粒体功能方面发挥着重要作用^[4-5]。笔者团队前期在心肌细胞的研究中证实,缺氧能够上调 TRAP1 的表达,而 TRAP1 通过作用于细胞色素 c 氧化酶 (COX) 来调控能量生成,但其具体机制尚不明确^[6]。COX 由线粒体编码的 3 个亚基和细胞核编码的 10 个亚基共同组成,其中线粒体编码的 3 个亚基组成了 COX 的核心结构^[7-8]。线粒体转录因子 A (TFAM) 是线粒体基因编码、复制过程中的重要调控子^[9-10]。TFAM 通过蛋白转运系统进入到线粒体基质,与线粒体 DNA 结合后,才能启动线粒体基因编码蛋白质的合成^[11-12]。

本研究拟探讨 TRAP1 能否通过调控 TFAM 表达来调节心肌细胞 COX 活性,进而影响细胞能量生成,从而进一步丰富 TRAP1 调控缺氧心肌细胞能量生成的理论基础。

1 材料与方法

本研究遵循陆军军医大学和国家有关实验动物管理和使用的规定。

1.1 主要材料来源

135 只健康清洁级 1~3 d 龄 SD 大鼠乳鼠(雌雄不拘)购自陆军军医大学实验动物中心,许可证号:SYXK(渝)2017-002。人胚胎肾细胞 293A (HEK-293A)由本实验室保存。DMEM/F12 培养基(以下简称培养基)、胎牛血清购自美国 HyClone 公司,兔抗大鼠 TFAM 单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体购自美国 Abcam 公司,TRAP1 过表达腺病毒载体、TFAM 干扰腺病毒载体、TRAP1 过表达空病毒载体及 TFAM 干扰空病毒载体购自北京鼎国生物科技有限公司,ATP 检测试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,COX 活性检测试剂盒、叠氮化钠购自美国 Sigma 公司。Verioskan Flash 型多功能酶标仪和细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.2 心肌细胞培养

取 135 只大鼠乳鼠,按照本课题组建立的胰酶消化法^[13]分离培养原代心肌细胞,培养 24~48 h 后用于后续实验。

1.3 缺氧环境构建

心肌细胞在缺氧前加入无血清培养基,然后置于 37 °C 细胞培养箱中,调节气体比例至培养箱中氮气体积分数为 94%、氧气体积分数为 1%、二氧化碳体积分数为 5%,形成缺氧环境。

1.4 TRAP1 过表达腺病毒载体、TFAM 干扰腺病毒载体扩增

将 HEK-293A 细胞按 1×10^5 个/mL 接种于底面积 25 cm² 的细胞培养瓶(下同)中,按照病毒感染复数 (MOI) 10 将 TRAP1 过表达腺病毒载体及 TRAP1 过表达空病毒载体、TFAM 干扰腺病毒载体及 TFAM 干扰空病毒载体加入 HEK-293A 细胞中,当绝大部分细胞出现病变(超过 90% 的细胞坏死变圆,其中 60% 的细胞从瓶壁脱落浮起)时收集病毒悬液。将所收集的病毒悬液再次感染 HEK-293A 细胞,再次收集扩增好的病毒悬液,分装后于 -70 °C 冰箱保存。

1.5 TRAP1 对心肌细胞 TFAM 蛋白表达的影响

将心肌细胞按 1×10^5 个/mL 的浓度接种于细胞培养瓶中,按随机数字表法(分组方法下同)分为常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧 + TRAP1 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 过表达组,每组 1 瓶。常氧空白对照组细胞于含体积分数 10% 胎牛血清的培养基中常规培养,实验前更换无血清培养基培养 12 h。缺氧空白对照组细胞同常氧空白对照组处理,缺氧前 12 h 换用无血清培养基,然后缺氧 6 h。缺氧 + TRAP1 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 过表达组心肌细胞常规培养 24~48 h,分别加入 TRAP1 过表达空病毒载体、TRAP1 过表达腺病毒载体病毒悬液 (MOI 均为 10),转染细胞 48 h,换用无血清培养基培养 12 h,再缺氧 6 h。取各组细胞,按照细胞总蛋白提取试剂盒操作步骤提取总蛋白并定量,行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿法转膜,50 g/L 脱脂奶粉溶液封闭 1 h。加入兔抗大鼠 TFAM 单克隆一抗(稀释比为 1:500)和辣根过氧化物酶标记的小鼠抗大鼠 GAPDH 抗体(稀释比为 1:5 000),4 °C 孵育过夜。次日以含吐温 20 的三羟甲基氨基甲烷盐缓冲液洗膜 3 次(下同),每次 15 min,然后用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(稀释比为 1:2 000)室温下孵育 1 h,洗膜后化学发光法显

影,凝胶成像仪成像,Quantity One 软件分析灰度值,结果以目的蛋白与 GAPDH 的灰度值比值表示。本实验重复 3 次。

1.6 抑制 TFAM 表达对过表达 TRAP1 心肌细胞 COX 活性和 ATP 含量的影响

取心肌细胞,按 1×10^5 个/mL 的浓度接种于 6 孔板,分为常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧 + TRAP1 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 过表达组、缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰组,每组 1 孔。前 4 组细胞同 1.5 对应组别进行处理。缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰对照组和缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰组细胞常规培养 24 ~ 48 h,分别加入 TFAM 干扰空病毒载体、TFAM 干扰腺病毒载体病毒悬液(MOI 均为 10),转染 48 h 后,加入 TRAP1 过表达腺病毒载体病毒悬液(MOI 均为 10)转染 48 h,换用无血清培养基培养 12 h,再缺氧 6 h。各组细胞处理完毕后弃去培养基,细胞裂解液裂解细胞,于 4°C 下按 $11\ 000 \times g$ 离心 10 min。取上清液,按 COX 活性检测试剂盒说明书检测 COX 活性,酶标仪测定 550 nm 波长下的吸光度值,带入公式计算 COX 活性。另取细胞,同前进行分组及处理,各组细胞处理完毕后弃去培养基,PBS 漂洗 1 次后提取细胞培养上清液,按 ATP 检测试剂盒说明书操作,制备标准曲线及检测样本,酶标仪测定 560 nm 波长下的吸光度值,带入标准曲线公式计算 ATP 含量。本实验重复 3 次。

1.7 抑制 COX 活性对心肌细胞 ATP 含量的影响

取心肌细胞,按 1×10^5 个/mL 的浓度接种于 6 孔板,分为常氧空白对照组、常氧 + 叠氮化钠组、缺氧空白对照组、缺氧 + 叠氮化钠组,每组 1 孔。常氧空白对照组和缺氧空白对照组细胞处理同 1.5 对应组别。常氧 + 叠氮化钠组细胞实验前 12 h 换用无血清培养基培养,实验前 30 min 加入 32 nmol 叠氮化钠;缺氧 + 叠氮化钠组细胞缺氧前换用无血清培养基培养 12 h,缺氧前 30 min 加入 32 nmol 叠氮化钠,缺氧 6 h。同 1.6 进行 ATP 含量检测。本实验重复 3 次。

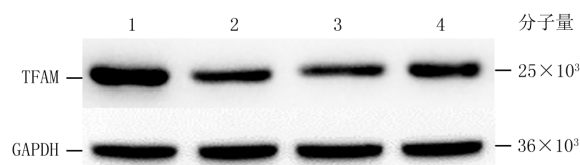
1.8 统计学处理

计量资料数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析,组间总体比较行单因素方差分析,组间两两比较行 LSD 检验(软件自动略去该统计量值)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

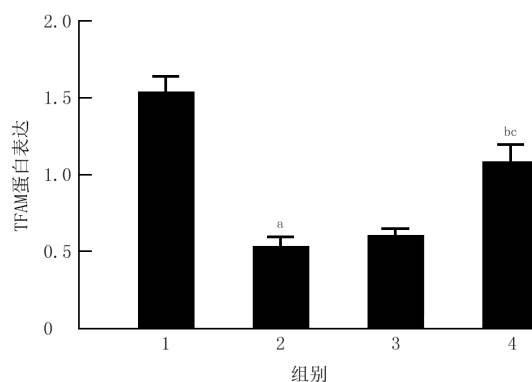
2.1 TRAP1 对缺氧条件下心肌细胞 TFAM 蛋白表达的影响

4 组细胞 TFAM 蛋白表达总体比较,差异有统计学意义($F = 103.182, P < 0.01$)。与常氧空白对照组比较,缺氧空白对照组细胞 TFAM 蛋白表达明显降低($P < 0.01$)。与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达对照组细胞 TFAM 蛋白表达量无明显变化($P = 0.29$),缺氧 + TRAP1 过表达组细胞 TFAM 蛋白表达量明显升高($P < 0.01$)。与缺氧 + TRAP1 过表达对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达组细胞 TFAM 蛋白表达量明显升高($P < 0.01$)。见图 1、2。



注:TFAM 为线粒体转录因子 A,GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶;1.常氧空白对照组,2.缺氧空白对照组,3.缺氧 + 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1(TRAP1)过表达对照组,4.缺氧 + TRAP1 过表达组

图 1 蛋白质印迹法检测常氧 1 组及缺氧 3 组大鼠心肌细胞中 TFAM 的蛋白表达



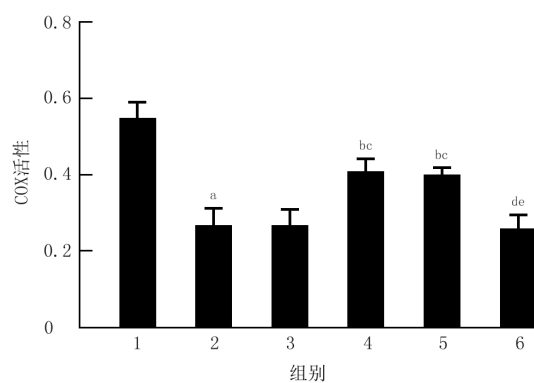
注:1.常氧空白对照组,2.缺氧空白对照组,3.缺氧 + 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1(TRAP1)过表达对照组,4.缺氧 + TRAP1 过表达组;与常氧空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与缺氧空白对照组比较,^b $P < 0.01$;与缺氧 + TRAP1 过表达对照组比较,^c $P < 0.01$

图 2 常氧 1 组及缺氧 3 组大鼠心肌细胞线粒体转录因子 A(TFAM)的蛋白表达($\bar{x} \pm s$,样本数为 3)

2.2 抑制 TFAM 表达对过表达 TRAP1 心肌细胞 COX 活性和 ATP 含量的影响

6 组细胞 COX 活性和 ATP 含量组间总体比较,差异均有统计学意义($F = 27.489, 38.875, P < 0.01$)。与常氧空白对照组比较,缺氧空白对照组细

胞 COX 活性、ATP 含量均明显降低 ($P < 0.01$)。与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达对对照组细胞 COX 活性和 ATP 含量无明显变化 ($P = 0.98, 0.36$)。与缺氧空白对照组和缺氧 + TRAP1 过表达对对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达组和缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰对照组细胞 COX 活性和 ATP 含量均明显升高 ($P < 0.01$)。与缺氧 + TRAP1 过表达组比较,缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰对照组细胞 COX 活性和 ATP 含量无明显变化 ($P = 0.80, 0.44$)。与缺氧 + TRAP1 过表达组和缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰组细胞 COX 活性和 ATP 含量均明显下降 ($P < 0.01$)。见图 3、4。



注:1. 常氧空白对照组,2. 缺氧空白对照组,3. 缺氧 + 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 (TRAP1) 过表达对照组,4. 缺氧 + TRAP1 过表达组,5. 缺氧 + TRAP1 过表达 + 线粒体转录因子 A (TFAM) 干扰对照组,6. 缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰组;与常氧空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与缺氧空白对照组比较,^b $P < 0.01$;与缺氧 + TRAP1 过表达对照组比较,^c $P < 0.01$;与缺氧 + TRAP1 过表达组比较,^d $P < 0.01$;与缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰对照组比较,^e $P < 0.01$

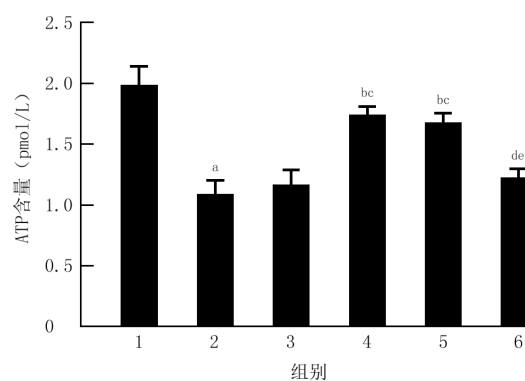
图 3 干扰 TFAM 表达和 TRAP1 过表达后常氧 1 组及缺氧 5 组大鼠心肌细胞中细胞色素 c 氧化酶 (COX) 活性比较 ($\bar{x} \pm s$, 样本数为 3)

2.3 抑制 COX 活性对心肌细胞 ATP 含量的影响

4 组细胞 ATP 含量组间总体比较,差异有统计学意义 ($F = 84.806, P < 0.01$)。与常氧空白对照组比较,常氧 + 叠氮化钠组和缺氧空白对照组细胞 ATP 含量明显降低 ($P < 0.01$)。与缺氧空白对照组比较,缺氧 + 叠氮化钠组细胞 ATP 含量明显降低 ($P < 0.01$)。见图 5。

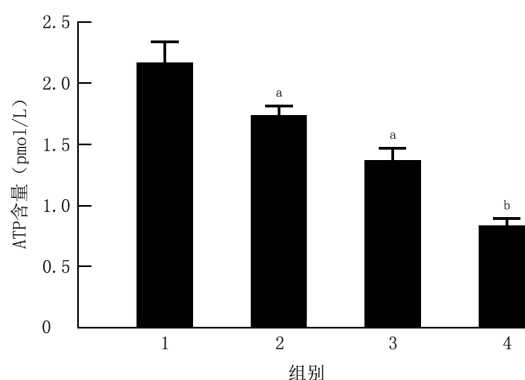
3 讨论

缺氧性损害是临床多种疾病常见的病理生理过



注:1. 常氧空白对照组,2. 缺氧空白对照组,3. 缺氧 + 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 (TRAP1) 过表达对照组,4. 缺氧 + TRAP1 过表达组,5. 缺氧 + TRAP1 过表达 + 线粒体转录因子 A (TFAM) 干扰对照组,6. 缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰组;与常氧空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与缺氧空白对照组比较,^b $P < 0.01$;与缺氧 + TRAP1 过表达对照组比较,^c $P < 0.01$;与缺氧 + TRAP1 过表达组比较,^d $P < 0.01$;与缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰对照组比较,^e $P < 0.01$

图 4 干扰 TFAM 表达和 TRAP1 过表达后常氧 1 组及缺氧 5 组大鼠心肌细胞 ATP 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, 样本数为 3)



注:1. 常氧空白对照组,2. 常氧 + 叠氮化钠组,3. 缺氧空白对照组,4. 缺氧 + 叠氮化钠组;与常氧空白对照组比较,^a $P < 0.01$;与缺氧空白对照组比较,^b $P < 0.01$

图 5 抑制细胞色素 c 氧化酶活性后常氧 2 组及缺氧 2 组大鼠心肌细胞 ATP 含量比较 ($\bar{x} \pm s$, 样本数为 3)

程^[14-15]。缺氧对机体的影响,取决于缺氧发生的程度、持续的时间和机体的功能代谢状态。短时间或者轻度慢性缺氧时,机体通过代偿反应,包括增加无氧酵解和增强利用氧的能力来维持能量供给。然而长时间或者严重缺氧会造成细胞线粒体、溶酶体等细胞器损伤,能量代谢紊乱,最终导致器官功能障碍或 MOF^[16-18]。既往研究表明,缺氧性损害在严重烧伤早期疾病的发生发展过程中起重要作用,并且早期缺氧导致的心肌损害能诱发或者加重烧伤休克,进而影响其他脏器功能^[1]。因此,如何减轻缺氧条

件下心肌细胞的损害对于严重烧伤及其他缺氧性心肌疾病的救治有着重要的意义。

HSP 是广泛存在于细胞内的内源性保护蛋白,在热刺激、缺氧等因素作用下表达增加,从而发挥细胞保护作用。TRAP1 最初作为 TNF1 型受体可能的作用蛋白而被筛选发现,通过互补 DNA 序列分析证明 TRAP1 属于 HSP90 家族;进一步研究表明 TRAP1 既有与 HSP90 相似的地方,但又存在着特殊的功能及作用途径^[19-20]。TRAP1 主要分布于线粒体内膜和膜间隙,但其在内质网、高尔基体、细胞核等细胞器中也有分布^[21]。同沉默信息调节因子 2 相关酶 1 等蛋白在线粒体中的作用研究一样,既往对 TRAP1 作用的研究多集中在肿瘤细胞及其线粒体上,研究结果表明,凋亡诱导剂能够显著抑制 TRAP1 的表达,干扰 TRAP1 基因的表达能够诱导细胞色素 c 释放到胞质,促使肿瘤细胞凋亡;而过表达 TRAP1 则能明显减轻氧化应激导致的细胞损害,维持细胞的功能^[22-27],但其调控心肌细胞能量生成的机制尚不清楚^[6]。TFAM 由细胞核基因编码,在细胞质中合成,通过线粒体蛋白转运系统进入线粒体发挥作用。TFAM 只有进入到线粒体基质直接与线粒体 DNA 结合后,才能启动线粒体基因编码蛋白质的合成。研究者在 TFAM 基因敲除的小鼠模型中观察到线粒体呼吸链亚基的活性降低^[28],这说明 TFAM 是线粒体基因编码的蛋白合成的关键环节^[9,29]。本研究中笔者首先通过蛋白质印迹法验证 TRAP1 能否调控缺氧条件下心肌细胞 TFAM 蛋白表达,结果表明,与常氧空白对照组比较,缺氧空白对照组细胞 TFAM 蛋白表达量明显降低;与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达组细胞 TFAM 蛋白表达量显著升高。说明缺氧能够诱导心肌细胞 TFAM 表达降低,而 TRAP1 表达增加则能正向调控缺氧心肌细胞 TFAM 的蛋白表达。

线粒体呼吸链由 4 个分子量很大的跨膜蛋白复合体(线粒体呼吸链复合体 I、II、III、IV)、泛醌和细胞色素 c 共同构成^[30]。由于呼吸链中需要氧化和电子传递的主要是还原型辅酶 I,而还原型黄素二核苷酸较少,因此可将呼吸链分为主呼吸链和次呼吸链,其中主呼吸链由复合物 I、II、IV 构成,而次呼吸链由复合物 II、III、IV 构成^[31-32]。复合物 IV 又称 COX,位于呼吸链电子传递的终点,在氧化磷酸化的过程中起着重要作用,同时也是呼吸链中最易受到损伤的复合物^[33-34]。线粒体编码的 COX 亚基 I、II、III 构成了 COX 的核心结构,并且 COX 亚基的变

化能够直接影响 COX 的活性^[35-37]。鉴于 TFAM 在调控线粒体编码蛋白合成中的重要作用,本研究在证实 TRAP1 能够正向调节 TFAM 表达的基础上,进一步构建了 TFAM 干扰细胞模型,探讨 TRAP1 能否通过 TFAM 调节细胞 COX 活性和能量生成。结果显示,与常氧空白对照组比较,缺氧空白对照组心肌细胞 COX 活性、能量生成降低;与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达组细胞 COX 活性和能量生成均升高;而与缺氧 + TRAP1 过表达组比较,缺氧 + TRAP1 过表达 + TFAM 干扰组细胞 COX 活性和能量生成降低。说明上调 TRAP1 表达能够改善缺氧导致的心肌细胞能量生成障碍和 COX 活性降低,并且 TFAM 参与了 TRAP1 调节缺氧心肌细胞 COX 活性和能量生成的过程,即抑制 TFAM 表达能够减弱 TRAP1 过表达后对缺氧心肌细胞 COX 活性和 ATP 含量的提高效应。

在此基础上,笔者团队进一步观察抑制 COX 活性对心肌细胞能量生成的影响,结果表明,在常氧和缺氧条件下使用 COX 活性特异性阻断剂叠氮化钠抑制 COX 活性后,心肌细胞能量生成均明显降低。由此证明 TFAM-COX 途径参与了 TRAP1 调控缺氧心肌细胞能量生成的过程,即缺氧条件下,上调心肌细胞 TRAP1 表达能够通过正向调节 TFAM 表达和提高 COX 活性,提高细胞 ATP 含量。

综上,TRAP1 表达增加能够通过提高心肌细胞 TFAM 表达来提高 COX 活性,进而增加缺氧条件下细胞的能量生成。本研究结果丰富了缺氧条件下心肌细胞内源性保护的作用机制,但 TRAP1 作用于 TFAM 的具体机制还需要深入探讨。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 黄跃生. 严重烧伤早期心肌损害机制及临床意义的再认识 [J]. 中华烧伤杂志, 2016, 32(5): 257-259. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.05.001.
- [2] Fuhrmann DC, Brüne B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia [J]. Redox Biol, 2017, 12: 208-215. DOI: 10.1016/j.redox.2017.02.012.
- [3] Brown DA, Perry JB, Allen ME, et al. Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(4): 238-250. DOI: 10.1038/nrcardio.2016.203.
- [4] Ramkumar B, Dharaskar SP, Mounika G, et al. Mitochondrial chaperone, TRAP1 as a potential pharmacological target to combat cancer metabolism [J]. Mitochondrion, 2020, 50: 42-50. DOI: 10.1016/j.mito.2019.09.011.
- [5] Kang BH. TRAP1 regulation of mitochondrial life or death decision in cancer cells and mitochondria-targeted TRAP1 inhibitors [J]. BMB Rep, 2012, 45(1): 1-6. DOI: 10.5483/bmbrep.2012.45.1.1.
- [6] Xiang F, Ma SY, Zhang DX, et al. Tumor necrosis factor recep-

- tor-associated protein 1 improves hypoxia-impaired energy production in cardiomyocytes through increasing activity of cytochrome c oxidase subunit II [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 79: 239-248. DOI: 10.1016/j.biocel.2016.08.041.
- [7] Timón-Gómez A, Nýlvtová E, Abriata LA, et al. Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: recent developments [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 76:163-178. DOI:10.1016/j.semcdb.2017.08.055.
- [8] Wikström M, Krab K, Sharma V. Oxygen activation and energy conservation by cytochrome c oxidase [J]. *Chem Rev*, 2018, 118(5):2469-2490. DOI:10.1021/acs.chemrev.7b00664.
- [9] Kang D, Kim SH, Hamasaki N. Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions [J]. *Mitochondrion*, 2007, 7(1/2): 39-44. DOI: 10.1016/j.mito.2006.11.017.
- [10] Uchiumi T, Kang D. Mitochondrial nucleic acid binding proteins associated with diseases [J]. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 2017, 22:168-179. DOI:10.2741/4479.
- [11] Mishmar D, Levin R, Naeem MM, et al. Higher order organization of the mtDNA: beyond mitochondrial transcription factor A [J]. *Front Genet*, 2019, 10:1285. DOI:10.3389/fgene.2019.01285.
- [12] Farge G, Falkenberg M. Organization of DNA in mammalian mitochondria [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(11):2770. DOI:10.3390/ijms20112770.
- [13] 向飞, 张东霞, 马思远, 等. 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 对大鼠缺氧心肌细胞保护作用的机制 [J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(12): 744-751. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.12.010.
- [14] Abe H, Semba H, Takeda N. The roles of hypoxia signaling in the pathogenesis of cardiovascular diseases [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2017, 24(9):884-894. DOI:10.5551/jat.RV17009.
- [15] Parks SK, Cormerais Y, Pouyssegur J. Hypoxia and cellular metabolism in tumour pathophysiology [J]. *J Physiol*, 2017, 595(8):2439-2450. DOI:10.1113/JP273309.
- [16] West JB. Physiological effects of chronic hypoxia [J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(20): 1965-1971. DOI: 10.1056/NEJMr1612008.
- [17] Pugh CW, Ratcliffe PJ. New horizons in hypoxia signaling pathways [J]. *Exp Cell Res*, 2017, 356(2): 116-121. DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.03.008.
- [18] Fuhrmann DC, Brüne B. Mitochondrial composition and function under the control of hypoxia [J]. *Redox Biol*, 2017, 12:208-215. DOI:10.1016/j.redox.2017.02.012.
- [19] Hoter A, El-Sabban ME, Naim HY. The HSP90 family: structure, regulation, function, and implications in health and disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(9): 2560. DOI: 10.3390/ijms19092560.
- [20] Seo YH. Organelle-specific Hsp90 inhibitors [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(9): 1582-1590. DOI: 10.1007/s12272-015-0636-1.
- [21] Schopf FH, Biebl MM, Buchner J. The HSP90 chaperone machinery [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, 18(6): 345-360. DOI: 10.1038/nrm.2017.20.
- [22] 林治华, 王俊伟, 邓雅庭, 等. SIRT1 与肝细胞癌病理及预后的研究进展及靶向治疗展望 [J]. *重庆理工大学学报(自然科学)*, 2019, 33(7): 221-227. DOI: 10.3969/j.issn.1674-8425(z).2019.07.030.
- [23] Tang BL. Sirt1 and the mitochondria [J]. *Mol Cells*, 2016, 39(2): 87-95. DOI:10.14348/molcells.2016.2318.
- [24] Masgras I, Sanchez-Martin C, Colombo G, et al. The chaperone TRAP1 as a modulator of the mitochondrial adaptations in cancer cells [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 58. DOI: 10.3389/fonc.2017.00058.
- [25] Matassa DS, Agliarulo I, Avolio R, et al. TRAP1 regulation of cancer metabolism: dual role as oncogene or tumor suppressor [J]. *Genes (Basel)*, 2018, 9(4): 195. DOI: 10.3390/genes9040195.
- [26] Avolio R, Matassa DS, Criscuolo D, et al. Modulation of mitochondrial metabolic reprogramming and oxidative stress to overcome chemoresistance in cancer [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(1): 135. DOI: 10.3390/biom10010135.
- [27] Kabakov A, Yakimova A, Matchuk O. Molecular chaperones in cancer stem cells: determinants of stemness and potential targets for antitumor therapy [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 892. DOI: 10.3390/cells9040892.
- [28] Santos JM, Kowluru RA. Impaired transport of mitochondrial transcription factor A (TFAM) and the metabolic memory phenomenon associated with the progression of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2013, 29(3): 204-213. DOI: 10.1002/dmrr.2384.
- [29] Kang I, Chu CT, Kaufman BA. The mitochondrial transcription factor TFAM in neurodegeneration: emerging evidence and mechanisms [J]. *FEBS Lett*, 2018, 592(5): 793-811. DOI: 10.1002/1873-3468.12989.
- [30] Sousa JS, D'Imprima E, Vonck J. Mitochondrial respiratory chain complexes [J]. *Subcell Biochem*, 2018, 87:167-227. DOI: 10.1007/978-981-10-7757-9_7.
- [31] Lobo-Jarne T, Ugalde C. Respiratory chain supercomplexes: structures, function and biogenesis [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2018, 76:179-190. DOI:10.1016/j.semcdb.2017.07.021.
- [32] Guo R, Gu J, Zong S, et al. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain [J]. *Biomed J*, 2018, 41(1): 9-20. DOI:10.1016/j.bj.2017.12.001.
- [33] Kadenbach B, Hüttemann M. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase [J]. *Mitochondrion*, 2015, 24:64-76. DOI:10.1016/j.mito.2015.07.002.
- [34] Sinkler CA, Kalpage H, Shay J, et al. Tissue- and condition-specific isoforms of mammalian cytochrome c oxidase subunits: from function to human disease [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017:1534056. DOI:10.1155/2017/1534056.
- [35] Bourens M, Fontanesi F, Soto IC, et al. Redox and reactive oxygen species regulation of mitochondrial cytochrome C oxidase biogenesis [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2013, 19(16): 1940-1952. DOI: 10.1089/ars.2012.4847.
- [36] Srinivasan S, Avadhani NG. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(6): 1252-1263. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.021.
- [37] Garéñ-Villegas R, Camacho-Villasana Y, Shingú-Vázquez MÁ, et al. The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(26): 10912-10925. DOI: 10.1074/jbc.M116.773077.

(收稿日期:2020-04-30)

本文引用格式

向飞, 薛冬冬, 罗佳, 等. 线粒体转录因子 A 和细胞色素 c 氧化酶途径对肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 调节大鼠缺氧心肌细胞能量生成的作用及机制 [J]. *中华烧伤杂志*, 2020, 36(8): 651-657. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200430-00247.

Xiang F, Xue DD, Luo J, et al. Effects and mechanism of mitochondrial transcription factor A and cytochrome c oxidase pathway in the energy production of hypoxic cardiomyocytes of rats regulated by tumor necrosis factor receptor associated protein 1 [J]. *Chin J Burns*, 2020, 36(8): 651-657. DOI: 10.3760/cma.j.cn501120-20200430-00247.