

· 论著 ·

# 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

向飞 张东霞 马思远 黄跃生



**【摘要】 目的** 探讨肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 (TRAP1) 对大鼠缺氧心肌细胞保护作用的机制。**方法** 取 1~3 d 龄 SD 大鼠乳鼠, 分离培养心肌细胞, 用于以下实验。(1) 取细胞, 按随机数字表法(分组方法下同)分为 TRAP1 组和对照组, 提取细胞总蛋白。TRAP1 组细胞总蛋白加入小鼠抗大鼠 TRAP1 单克隆一抗, 对照组细胞总蛋白加入小鼠来源的同型 IgG, 免疫共沉淀法和蛋白质谱分析检测 TRAP1 可能作用的蛋白。(2) 取细胞, 分为常氧空白对照组、常氧 + TRAP1 干扰对照组、常氧 + TRAP1 干扰组、常氧 + TRAP1 过表达对照组、常氧 + TRAP1 过表达组, 每组 1 孔。常氧空白对照组细胞常规培养, 后 4 组细胞分别加入 TRAP1 RNA 干扰空病毒载体、TRAP1 RNA 干扰腺病毒载体、TRAP1 过表达空病毒载体、TRAP1 过表达腺病毒载体。另取细胞, 分为常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧 + TRAP1 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 干扰组、缺氧 + TRAP1 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 过表达组, 每组 1 孔。各缺氧组细胞同前对应的常氧组细胞处理后, 缺氧 6 h。实时荧光定量 RT-PCR 检测各组细胞中细胞色素 C 氧化酶亚基 II (COX II) mRNA 表达。本实验重复 3 次。(3) 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 + COX II 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰组, 每组 3 孔。前 4 组细胞的处理同(2), 后 2 组细胞分别加入 COX II RNA 干扰空病毒载体、COX II RNA 干扰腺病毒载体转染后, 再分别加入 TRAP1 过表达腺病毒载体。细胞计数试剂盒 8 及酶标仪检测细胞增殖活性, 碘化丙啶和 Hoechst 33342 染色检测细胞死亡率。另取细胞, 分为常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧 + TRAP1 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 干扰组、缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达组, 每组 3 孔, 前 4 组细胞的处理同(2), 后 2 组细胞均加入 TRAP1 RNA 干扰腺病毒载体转染后, 再分别加入 COX II 过表达空病毒载体、COX II 过表达腺病毒载体, 同前检测细胞增殖活性和死亡率。本实验重复 3 次。对数据行单因素方差分析、LSD 检验。**结果** (1) TRAP1 组细胞有 TRAP1 表达, 对照组细胞未见 TRAP1 表达。TRAP1 可能作用的 3 个蛋白是角蛋白、COX II 和预测分子量为  $13 \times 10^3$  的未知蛋白。(2) 与常氧空白对照组比较, 常氧 + TRAP1 干扰对照组、常氧 + TRAP1 过表达对照组细胞 COX II mRNA 表达量无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05), 常氧 + TRAP1 干扰组细胞 COX II mRNA 表达量明显降低 ( $P < 0.01$ ), 常氧 + TRAP1 过表达组细胞 COX II mRNA 表达量明显升高 ( $P < 0.01$ )。缺氧空白对照组细胞 COX II mRNA 表达量较常氧空白对照组明显降低 ( $P < 0.01$ )。与缺氧空白对照组比较, 缺氧 + TRAP1 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 过表达对照组细胞 COX II mRNA 表达量无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05), 缺氧 + TRAP1 干扰组细胞 COX II mRNA 表达量明显下降 ( $P < 0.01$ ), 缺氧 + TRAP1 过表达组细胞 COX II mRNA 表达量明显升高 ( $P < 0.01$ )。(3) 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 + COX II 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰组细胞增殖活性分别为  $0.498 \pm 0.022$ 、 $0.303 \pm 0.018$ 、 $0.313 \pm 0.032$ 、 $0.456 \pm 0.031$ 、 $0.448 \pm 0.034$ 、 $0.335 \pm 0.026$ , 细胞死亡率分别为  $(4.7 \pm 1.5)\%$ 、 $(24.7 \pm 3.1)\%$ 、 $(26.0 \pm 2.7)\%$ 、 $(13.3 \pm 2.5)\%$ 、 $(12.7 \pm 2.1)\%$ 、 $(21.0 \pm 1.7)\%$ 。与常氧空白对照组比较, 缺氧空白对照组细胞增殖活性降低、细胞死亡率增加 ( $P$  值均小于 0.01)。与缺氧空白对照组比较, 缺氧 + TRAP1 过表达对照组细胞增殖活性、细胞死亡率均无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05), 缺氧 + TRAP1 过表达组细胞增殖活性升高、细胞死亡率降低 ( $P$  值均小于 0.01)。与缺氧 + TRAP1 过表达组比较, 缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰对照组细胞增殖活性、细胞死亡率均无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05), 缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰组细胞增殖活性降

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.12.010

作者单位:400038 重庆,第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通信作者:黄跃生,Email:yshuang.tmmu@gmail.com

低、细胞死亡率增加 ( $P$  值均小于 0.01)。(4)常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧 + TRAP1 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 干扰组、缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达组细胞增殖活性分别为  $0.444 \pm 0.025$ 、 $0.275 \pm 0.016$ 、 $0.283 \pm 0.021$ 、 $0.150 \pm 0.009$ 、 $0.135 \pm 0.011$ 、 $0.237 \pm 0.017$ , 细胞死亡率分别为  $(3.7 \pm 0.6)\%$ 、 $(21.0 \pm 2.7)\%$ 、 $(20.3 \pm 3.1)\%$ 、 $(31.7 \pm 2.5)\%$ 、 $(33.3 \pm 3.2)\%$ 、 $(19.3 \pm 1.5)\%$ 。与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 干扰对照组细胞增殖活性、细胞死亡率均无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05)。与缺氧空白对照组和缺氧 + TRAP1 干扰对照组比较,缺氧 + TRAP1 干扰组细胞增殖活性降低、细胞死亡率增加 ( $P$  值均小于 0.01)。与缺氧 + TRAP1 干扰组比较,缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达对照组细胞增殖活性、细胞死亡率均无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05),缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达组细胞增殖活性升高、细胞死亡率降低 ( $P$  值均小于 0.01)。**结论** TRAP1 能够正向调节 COX II mRNA 表达,COX II 是 TRAP1 保护缺氧心肌细胞的下游效应分子。

**【关键词】** 肌细胞,心脏; 缺氧; 细胞增殖; 细胞死亡; 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1; 细胞色素 c 氧化酶亚基 II

**基金项目:**国家自然科学基金(81101426、81571898)

**Mechanism of protective effects of tumor necrosis factor receptor associated protein 1 on hypoxic cardiomyocytes of rats** Xiang Fei, Zhang Dongxia, Ma Siyuan, Huang Yuesheng. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

Corresponding author: Huang Yuesheng, Email: yshuang.tmmu@gmail.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the mechanism of protective effects of tumor necrosis factor receptor associated protein 1 (TRAP1) on hypoxic cardiomyocytes of rats. **Methods** Primary cultured cardiomyocytes were obtained from neonatal Sprague-Dawley rats (aged 1 to 3 days) and then used in the following experiments. (1) Cells were divided into group TRAP1 and control group according to the random number table (the same grouping method below), and then the total protein of cells was extracted. Total protein of cells in group TRAP1 was added with mouse anti-rat TRAP1 monoclonal antibody, while that in control group was added with the same type of IgG from mouse. Co-immunoprecipitation and protein mass spectrography analysis were used to determine the possible proteins interacted with TRAP1. (2) Cells were divided into normoxia blank control group (NBC), normoxia + TRAP1 interference control group (NTIC), normoxia + TRAP1 interference group (NTI), normoxia + TRAP1 over-expression control group (NTOC), and normoxia + TRAP1 over-expression group (NTO), with 1 well in each group. Cells in group NBC were routinely cultured, while cells in the latter four groups were respectively added with TRAP1 RNA interference empty virus vector, TRAP1 RNA interference adenovirus vector, TRAP1 over-expression empty virus vector, and TRAP1 over-expression adenovirus vector. Another batch of cells were divided into group NBC, hypoxic blank control group (HBC), hypoxic + TRAP1 interference control group (HTIC), hypoxic + TRAP1 interference group (HTI), hypoxic + TRAP1 over-expression control group (HTOC), and hypoxic + TRAP1 over-expression group (HTO), with 1 well in each group. Cells in hypoxic groups were under hypoxic condition for 6 hours after being treated as those in the corresponding normoxia groups, respectively. The mRNA expression of cytochrome c oxidase subunit II (COX II) of cells in each group was detected by real time fluorescent quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. Experiments were repeated for three times. (3) Cells were divided into group NBC, group HBC, group HTOC, group HTO, hypoxic + TRAP1 over-expression + COX II interference control group (HTOCIC), and hypoxic + TRAP1 over-expression + COX II interference group (HTOCI), with 3 wells in each group. Cells in the previous 4 groups were treated as those in experiment (2). Cells in group HTOCIC and HTOCI were respectively transfected with COX II RNA interference empty virus vector and COX II RNA interference adenovirus vector, and then both added with TRAP1 over-expression adenovirus vector. The proliferation activity of cells was determined by cell counting kit 8 and microplate reader, and the ratio of death cells was measured by propidium iodide and Hoechst 33342 staining. Another batch of cells were divided into group NBC, group HBC, group HTIC, group HTI, hypoxic + TRAP1 interference + COX II over-expression control group (HTICOC), and hypoxic + TRAP1 interference + COX II over-expression group (HTICO), with 3 wells in each group. Cells in the previous 4 groups were treated as those in experiment (2). Cells in group HTICOC and HTICO were both transfected with TRAP1 RNA interference adenovirus vector, and then respectively added with COX II over-expression empty virus vector and COX II over-expression adenovirus vector. The proliferation activity of cells and the ratio of death cells were detected as before. Experiments were repeated for three times. Data

were processed with one-way analysis of variance and LSD test. **Results** (1) The expression of TRAP1 was found in cells of group TRAP1, while that was not found in cells of control group. The possible proteins interacted with TRAP1 were keratin, COX II, and an unknown protein with predicted molecular weight  $13 \times 10^3$ . (2) Compared with that in group NBC, the mRNA expression of COX II of cells had no significant change in group NTIC and group NTOC (with  $P$  values above 0.05), but significantly decreased in group NTI ( $P < 0.01$ ), and significantly increased in group NTO ( $P < 0.01$ ). Compared with that in group NBC, the mRNA expression of COX II of cells in group HBC was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). Compared with that in group HBC, the mRNA expression of COX II of cells had no significant change in group HTIC and group HTOC (with  $P$  values above 0.05), but significantly decreased in group HTI ( $P < 0.01$ ), and significantly increased in group HTO ( $P < 0.01$ ). (3) The proliferation activity of cells in group NBC, group HBC, group HTOC, group HTO, group HTOCIC, and group HTOCI was respectively  $0.498 \pm 0.022$ ,  $0.303 \pm 0.018$ ,  $0.313 \pm 0.032$ ,  $0.456 \pm 0.031$ ,  $0.448 \pm 0.034$ , and  $0.335 \pm 0.026$ , and the ratios of death cells in above groups were respectively  $(4.7 \pm 1.5)\%$ ,  $(24.7 \pm 3.1)\%$ ,  $(26.0 \pm 2.7)\%$ ,  $(13.3 \pm 2.5)\%$ ,  $(12.7 \pm 2.1)\%$ , and  $(21.0 \pm 1.7)\%$ . Compared with those in group NBC, the proliferation activity of cells in HBC was decreased, while the ratio of death cells was increased (with  $P$  values below 0.01). Compared with those in group HBC, the proliferation activity of cells and the ratio of death cells in group HTOC had no significant change (with  $P$  values above 0.05), while the proliferation activity of cells was increased and the ratio of death cells was decreased in group HTO (with  $P$  values below 0.01). Compared with those in group HTO, the proliferation activity of cells and the ratio of death cells in group HTOCIC had no significant change (with  $P$  values above 0.05), while the proliferation activity of cells was decreased and the ratio of death cells was increased in group HTOCI (with  $P$  values below 0.01). (4) The proliferation activity of cells in group NBC, group HBC, group HTIC, group HTI, group HTICOC, and group HTICO was respectively  $0.444 \pm 0.025$ ,  $0.275 \pm 0.016$ ,  $0.283 \pm 0.021$ ,  $0.150 \pm 0.009$ ,  $0.135 \pm 0.011$ , and  $0.237 \pm 0.017$ , and the ratios of death cells in above groups were respectively  $(3.7 \pm 0.6)\%$ ,  $(21.0 \pm 2.7)\%$ ,  $(20.3 \pm 3.1)\%$ ,  $(31.7 \pm 2.5)\%$ ,  $(33.3 \pm 3.2)\%$ , and  $(19.3 \pm 1.5)\%$ . Compared with those in group HBC, the proliferation activity of cells and the ratio of death cells in group HTIC had no significant change (with  $P$  values above 0.05). Compared with those in group HBC and group HTIC, the proliferation activity of cells was decreased and the ratio of death cells was significantly increased in group HTI (with  $P$  values below 0.01). Compared with those in group HTI, the proliferation activity of cells and the ratio of death cells in group HTICOC had no significant change (with  $P$  values above 0.05), while the proliferation activity of cells was increased and the ratio of death cells was significantly decreased in group HTICO (with  $P$  values below 0.01). **Conclusions** TRAP1 can up-regulate the expression of COX II mRNA, and COX II is one of the downstream effector molecules that TRAP1 mediates its protective effects on hypoxic cardiomyocytes.

**【Key words】** Myocytes, cardiac; Anoxia; Cell proliferation; Cell death; Tumor necrosis factor receptor associated protein 1; Cytochrome c oxidase subunit II

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81101426, 81571898)

严重烧伤后早期心肌即出现损害,研究表明,缺氧不仅在烧伤早期心肌损害的发生过程中有着重要作用,而且也参与了多种心脏疾病的病理生理过程<sup>[1]</sup>。因此,研究缺氧条件下心肌细胞的损害机制,对于阐明严重烧伤等疾病引起心肌损害的发生机制有着重要意义。线粒体是细胞的核心细胞器,不仅负责细胞能量的生成,也参与调控细胞的凋亡,线粒体结构和功能的完好对于维持细胞的正常生理功能有着决定性作用。在缺氧等有害因素刺激下,心肌细胞线粒体的功能极易受到损伤,细胞凋亡途径的激活和能量生成障碍共同导致了细胞的死亡<sup>[2-3]</sup>。

肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 (TRAP1) 又称为热休克蛋白 75,它主要分布于线粒体内膜和膜间隙,在人、大鼠、小鼠、兔和鸡等种属中均有表达,作为分子伴侣在维持线粒体功能方面发挥着重要作

用<sup>[4-5]</sup>。既往 TRAP1 对细胞作用的研究多集中于肿瘤细胞凋亡方面,在心肌细胞中的研究尚少见报道。笔者以往的研究证实,缺氧能够诱导心肌细胞 TRAP1 表达增加,并且上调 TRAP1 表达能显著抑制缺氧导致的细胞活性下降和死亡增加,干扰 TRAP1 表达则加重缺氧诱导的细胞损伤,但其具体机制尚不明确<sup>[6]</sup>。本研究拟就 TRAP1 保护大鼠缺氧心肌细胞的具体机制进行初步探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料来源

健康清洁级 1~3 d 龄 SD 大鼠乳鼠 165 只购自第三军医大学实验动物中心,许可证号:SYXK(渝)2012-0010,人胚肾细胞 HEK-293A 由本实验室保存。DMEM/F12 培养基、FBS 购自美国 Hyclone 公

司,蛋白 A/G 琼脂糖珠购自美国 Santa Cruz 公司,小鼠抗大鼠 TRAP1 单克隆一抗购自美国 BD 公司,辣根氧化物酶(HRP)标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗购自美国 Pierce 公司,考马斯亮蓝 G250 购自美国 Amresco 公司,TRAP1 过表达腺病毒及空病毒载体、TRAP1 RNA 干扰腺病毒及空病毒载体、细胞色素 C 氧化酶亚基 II (COX II) 过表达腺病毒及空病毒载体、COX II RNA 干扰腺病毒及空病毒载体购自北京鼎国生物科技有限公司,COX II 和 GAPDH 引物由北京鼎国生物科技有限公司合成并提供,总 RNA 提取试剂盒购自美国罗氏公司,PCR 试剂盒、一步法互补 DNA 合成试剂盒、RT-PCR 试剂盒购自日本 Toyobo 公司,细胞计数试剂盒 8 (CCK8) 购自日本 Dojindo 公司,碘化丙啶、Hoechst 33342 购自美国 Sigma 公司。6300 型离子阱液质联用仪购自美国 Agilent 公司,厌氧培养盒购自日本 Mitsubishi 公司,真空手套箱购自连云港市春龙实验仪器有限公司,ABI7500 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司,Verioskan Flash 型多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司,荧光显微镜购自德国 Leica 公司。

## 1.2 心肌细胞培养

取乳鼠,按照本实验室建立的胰酶消化法<sup>[7]</sup>分离培养心肌细胞,培养 24~48 h 后用于以下实验。

## 1.3 TRAP1 作用蛋白检测

**1.3.1 免疫共沉淀法提取 TRAP1 作用蛋白** 将心肌细胞按  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于底面积为  $25 \text{ cm}^2$  细胞培养瓶中,按随机数字表法(分组方法下同)分为 TRAP1 组和对照组,提取细胞总蛋白。加入蛋白 A/G 琼脂糖珠,4 °C 摇晃 30 min,4 °C、 $14\,000 \times g$  离心 15 min,留取上清液。TRAP1 组细胞总蛋白加入小鼠抗大鼠 TRAP1 单克隆一抗(每 300 微克蛋白加 1  $\mu\text{g}$  一抗),对照组细胞总蛋白加入小鼠来源的同型 IgG。4 °C 摇晃抗原抗体混合物 2 h。加入蛋白 A/G 琼脂糖珠,4 °C 缓慢摇晃过夜。4 °C、 $14\,000 \times g$  瞬时离心后弃上清液,收集琼脂糖珠-抗原抗体复合物。用预冷的 PBS 洗 3 次, $14\,000 \times g$  瞬时离心后弃上清液,再次收集抗原抗体复合物备用。

**1.3.2 蛋白质印迹法检测 TRAP1 蛋白表达** 将 TRAP1 组和对照组抗原抗体复合物行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿法转膜。50 g/L 脱脂奶粉溶液室温封闭 2 h。加入小鼠抗大鼠 TRAP1 单克隆一抗(稀释比为 1:500),4 °C 过夜。加入 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗(稀释比为 1:2 000),室温孵育 1 h。化学发光,凝胶成像扫描仪显影。

**1.3.3 TRAP1 作用蛋白的质谱分析** 将 TRAP1 组和对照组抗原抗体复合物行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕后将凝胶用含体积分数 40% 无水乙醇和体积分数 10% 冰乙酸的水溶液固定 30 min,去离子水洗涤 4 次,Blue silver 考染液(由考马斯亮蓝 G250 配制)染色,室温过夜。将染色后的凝胶用去离子水漂洗至背景干净,凝胶成像仪扫描成像,选取差异蛋白条带,送离子阱液质联用仪检测,得出可能作用蛋白的结果。

## 1.4 缺氧模型建立

将无血清的 DMEM/F12 培养基(以下简称培养基)和厌氧培养盒置于真空手套箱中,抽真空后充入缺氧混合气体(含体积分数 94% 氮气、体积分数 5% 二氧化碳、体积分数 1% 氧气)至与外界压力相等。平衡培养基至少 12 h 使缺氧气体充分溶于培养基中。将待缺氧的心肌细胞放入充满混合气体的手套箱中,在手套箱中以缺氧培养基替换心肌细胞原有培养基,然后将细胞置于手套箱中的厌氧培养盒予以密封,形成缺氧环境。

## 1.5 TRAP1、COX II 过表达腺病毒载体及其 RNA 干扰腺病毒载体扩增

将 HEK-293A 细胞按  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于细胞培养瓶中,按照病毒感染复数(MOI)10 将 TRAP1 过表达腺病毒载体及空病毒载体加入 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。将病毒悬液再次感染 HEK-293A 细胞,同样收集扩增好的病毒悬液分装于 -70 °C 保存。同前用 TRAP1 RNA 干扰腺病毒载体及空病毒载体、COX II 过表达腺病毒载体和 COX II RNA 干扰腺病毒载体感染 HEK-293A 细胞,并收集病毒悬液,保存备用。

## 1.6 TRAP1 对心肌细胞 COX II mRNA 表达的影响

将细胞按  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 6 孔板,分为常氧空白对照组、常氧 + TRAP1 干扰对照组、常氧 + TRAP1 干扰组、常氧 + TRAP1 过表达对照组、常氧 + TRAP1 过表达组,每组 1 孔。常氧空白对照组细胞于含体积分数 10% FBS 的培养基中常规培养,实验前更换无血清培养基培养 12 h。常氧 + TRAP1 干扰对照组、常氧 + TRAP1 干扰组细胞常规培养 24~48 h,再分别加入 TRAP1 RNA 干扰空病毒载体、TRAP1 RNA 干扰腺病毒载体(MOI 均为 10),转染 96 h 后,换用无血清培养基培养 12 h。常氧 + TRAP1 过表达对照组、常氧 + TRAP1 过表达组细胞

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 (MOI 均为 10), 转染 48 h 后, 换用无血清培养基培养 12 h。

另取细胞, 按  $1 \times 10^5$  个/mL 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 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 干扰组、缺氧 + TRAP1 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 过表达组, 每组 1 孔。缺氧空白对照组细胞同常氧空白对照组处理后, 缺氧前 12 h 换用无血清培养基, 然后缺氧 6 h。缺氧 + TRAP1 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 干扰组、缺氧 + TRAP1 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 过表达组细胞分别同常氧 + TRAP1 干扰对照组、常氧 + TRAP1 干扰组、常氧 + TRAP1 过表达对照组、常氧 + TRAP1 过表达组细胞处理后, 缺氧 6 h。

取各组细胞, 按照 RNA 提取试剂盒操作步骤提取总 RNA, 合成互补 DNA, 反转录产物采用实时荧光定量 RT-PCR 法检测 COX II mRNA 表达。引物序列如下: COX II 上游引物为 5'-ACTAAGACACA-CAAGCAC-3', 下游引物为 5'-TATGTAGGAGT-CAAAGCA-3', 大小为 220 bp; GAPDH 上游引物为 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGAC-3', 下游引物为 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3', 大小为 252 bp。GAPDH RT-PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。COX II RT-PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。以 GAPDH 为内参照, 采用  $\Delta$  循环阈值 (Ct) 法处理结果, 计算各指标 mRNA 的相对表达量, 即  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。以常氧空白对照组 COX II mRNA 表达量为标准, 其他组与之比值为该组 COX II mRNA 表达量的相对值。本实验重复 3 次。

### 1.7 心肌细胞增殖活性

取细胞, 按  $1 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 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 + COX II 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰组, 每组 3 孔, 探讨抑制 COX II 表达调控过表达 TRAP1 对缺氧细胞增殖活性影响的作用。另取细胞, 同前接种, 分为常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧 + TRAP1 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 干扰组、缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达组, 每组 3 孔, 探讨上调 COX II 表达调控干扰 TRAP1 表达对细胞增

殖活性影响的作用。

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 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 干扰组细胞处理同 1.6。缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰组细胞常规培养 24~48 h, 分别加入 COX II RNA 干扰空病毒载体、COX II RNA 干扰腺病毒载体 (MOI 均为 10), 转染 48 h 后, 再分别加入 TRAP1 过表达腺病毒载体 (MOI 均为 10) 转染 48 h, 换无血清培养基培养 12 h, 再缺氧 6 h。缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达组细胞常规培养 24~48 h, 均加入 TRAP1 RNA 干扰腺病毒载体 (MOI 均为 10) 转染 48 h 后, 再分别加入 COX II 过表达空病毒载体、COX II 过表达腺病毒载体 (MOI 均为 10) 转染 48 h, 换无血清培养基培养 12 h, 再缺氧 6 h。

各组细胞处理完毕后弃去培养基, 每孔加入 100  $\mu$ L 培养液和 10  $\mu$ L CCK8 的混合液, 37 °C 避光培养 0.5~1.0 h, 待溶液颜色变成橙红色后, 酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值, 即细胞增殖活性。本实验重复 3 次。

### 1.8 心肌细胞死亡率

取细胞, 按  $1 \times 10^4$  个/mL 接种于 20 mm  $\times$  20 mm 大小的无菌盖玻片上, 分组处理同 1.7, 分别检测细胞死亡率。

各组细胞处理完毕后弃去培养基, PBS 漂洗 3 次后加入 10  $\mu$ g/mL 碘化丙啶和 10  $\mu$ g/mL Hoechst 33342, 室温下避光染色 15 min, 200 倍荧光显微镜下观察细胞数。碘化丙啶染色 (红色) 指示死亡的细胞, Hoechst 33342 染色 (蓝色) 指示总的细胞。每组选择 10 个视野, 每个视野 20 个细胞, 共 200 个细胞统计分析细胞死亡率, 细胞死亡率 = 死亡细胞数  $\div$  总细胞数  $\times$  100%。本实验重复 3 次。

### 1.9 统计学处理

数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析、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 可能作用的蛋白

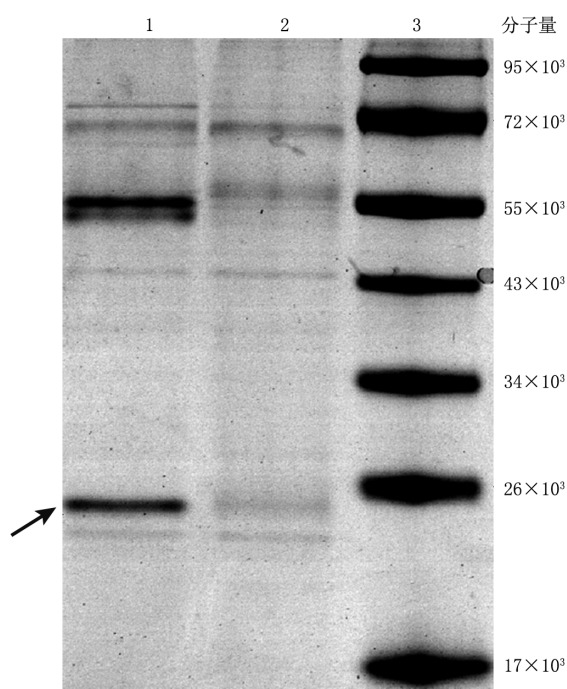
TRAP1 组细胞有 TRAP1 表达, 对照组细胞未见 TRAP1 表达 (图 1)。与对照组比较, TRAP1 组分别在分子量  $55 \times 10^3$ 、 $26 \times 10^3$  附近有明显的条带 (图

2)。对分子量为  $26 \times 10^3$  附近的条带进行蛋白质谱分析,得出 TRAP1 可能作用的 3 个蛋白分别是角蛋白、COX II 和预测分子量为  $13 \times 10^3$  的未知蛋白。



注:1. 对照组,2. TRAP1 组

图 1 蛋白质印迹法检测 2 组大鼠心肌细胞中肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 (TRAP1) 的表达



注:1. 肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 组,2. 对照组,3. marker; 箭头指示送检蛋白条带

图 2 2 组大鼠心肌细胞免疫共沉淀后的蛋白行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

## 2.2 TRAP1 对心肌细胞 COX II mRNA 表达的影响

常氧空白对照组、常氧 + TRAP1 干扰对照组、常氧 + TRAP1 干扰组、常氧 + TRAP1 过表达对照组、常氧 + TRAP1 过表达组细胞 COX II mRNA 表达量分别为  $1.00, 0.96 \pm 0.10, 0.42 \pm 0.05, 1.02 \pm 0.15, 4.11 \pm 0.32$ , 组间总体比较差异明显 ( $F = 117.421, P < 0.01$ )。与常氧空白对照组比,常氧 + TRAP1 干扰对照组、常氧 + TRAP1 过表达对照组细胞 COX II mRNA 表达量无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05),常氧 + TRAP1 干扰组细胞 COX II mRNA 表达量明显降低 ( $P < 0.01$ ),常氧 + TRAP1 过表达组细胞 COX II mRNA 表达量明显升高 ( $P < 0.01$ )。

常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧 +

TRAP1 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 干扰组、缺氧 + TRAP1 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 过表达组细胞的 COX II mRNA 表达量分别为  $1.00, 0.46 \pm 0.08, 0.45 \pm 0.06, 0.16 \pm 0.03, 0.47 \pm 0.05, 3.08 \pm 0.19$ , 组间总体比较差异明显 ( $F = 132.109, P < 0.01$ )。缺氧空白对照组细胞 COX II mRNA 表达量较常氧空白对照组明显降低 ( $P < 0.01$ )。与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 过表达对照组细胞 COX II mRNA 表达量无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05),缺氧 + TRAP1 干扰组细胞 COX II mRNA 表达量明显降低 ( $P < 0.01$ ),缺氧 + TRAP1 过表达组细胞 COX II mRNA 表达量明显升高 ( $P < 0.01$ )。

## 2.3 抑制 COX II 表达调控过表达 TRAP1 对心肌细胞增殖活性和死亡率影响的作用

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 + COX II 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰组细胞增殖活性分别为  $0.498 \pm 0.022, 0.303 \pm 0.018, 0.313 \pm 0.032, 0.456 \pm 0.031, 0.448 \pm 0.034, 0.335 \pm 0.026$ , 细胞死亡率分别为  $(4.7 \pm 1.5)\%, (24.7 \pm 3.1)\%, (26.0 \pm 2.7)\%, (13.3 \pm 2.5)\%, (12.7 \pm 2.1)\%, (21.0 \pm 1.7)\%$ , 组间总体比较差异明显 ( $F$  值分别为 91.542、37.866,  $P$  值均小于 0.01)。

与常氧空白对照组相比较,缺氧空白对照组细胞增殖活性降低、细胞死亡率增加 ( $P$  值均小于 0.01)。与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达对照组细胞增殖活性和死亡率均无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05),缺氧 + TRAP1 过表达组细胞增殖活性升高、细胞死亡率降低 ( $P$  值均小于 0.01)。与缺氧 + TRAP1 过表达组比较,缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰对照组细胞增殖活性、细胞死亡率均无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05),缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰组细胞增殖活性降低、细胞死亡率增加 ( $P$  值均小于 0.01)。

## 2.4 上调 COX II 表达调控干扰 TRAP1 表达对心肌细胞增殖活性和死亡率影响的作用

常氧空白对照组、缺氧空白对照组、缺氧 + TRAP1 干扰对照组、缺氧 + TRAP1 干扰组、缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达对照组、缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达组细胞增殖活性分别为  $0.444 \pm 0.025, 0.275 \pm 0.016, 0.283 \pm 0.021, 0.150 \pm 0.009, 0.135 \pm 0.011, 0.237 \pm 0.017$ , 细胞死亡率分别为

( $3.7 \pm 0.6$ )%、( $21.0 \pm 2.7$ )%、( $20.3 \pm 3.1$ )%、( $31.7 \pm 2.5$ )%、( $33.3 \pm 3.2$ )%、( $19.3 \pm 1.5$ )%，组间总体比较差异明显 ( $F$  值分别为 98.253、57.301,  $P$  值均小于 0.01)。与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 干扰对照组细胞增殖活性、细胞死亡率均无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05)。与缺氧空白对照组和缺氧 + TRAP1 干扰对照组比较,缺氧 + TRAP1 干扰组细胞增殖活性降低、细胞死亡率增加 ( $P$  值均小于 0.01)。与缺氧 + TRAP1 干扰组比较,缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达对照组细胞增殖活性、细胞死亡率均无明显变化 ( $P$  值均大于 0.05),缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达组细胞增殖活性升高,细胞死亡率降低 ( $P$  值均小于 0.01)。

### 3 讨论

TRAP1 因其序列的 N 末端有与热休克蛋白 90 (HSP90) 相似的 ATP 结合位点,并且其 ATP 酶活性能够被 HSP90 特异性抑制剂格尔德霉素抑制<sup>[8]</sup>,所以既往认为其与 HSP90 功能相近。但进一步研究表明与典型的 HSP90 家族相比,TRAP1 不能和 HSP90 经典的伴侣分子 Hop 或 p23 形成稳定的复合物而发挥作用,提示 TRAP1 有着完全不同的作用途径。笔者以往的研究首次证实,上调 TRAP1 表达能显著抑制缺氧导致的线粒体膜电位降低,而阻断线粒体通透性转换孔的开放能够抑制干扰 TRAP1 导致的细胞损伤<sup>[6]</sup>。由此可见线粒体在 TRAP1 调节缺氧心肌细胞损伤过程中发挥着一定的作用,但其具体作用环节和效应分子尚不清楚。

本研究中笔者首先通过免疫共沉淀及蛋白质印迹法证明了 TRAP1 抗体预沉淀蛋白的有效性,在此基础上进一步通过质谱分析显示送检条带的蛋白可能有 3 个,分别为角蛋白、COX II 和预测分子量为  $13 \times 10^3$  未知蛋白。由于角蛋白分子量和预测分子量为  $13 \times 10^3$  的未知蛋白与送检蛋白条带(分子量  $26 \times 10^3$  左右)的分子量相差太远,且考虑可能为杂带,因此将 COX II 作为 TRAP1 可能作用的蛋白进行下一步分析。实时荧光定量 RT-PCR 结果表明,与常氧空白对照组比较,常氧 + TRAP1 过表达组心肌细胞 COX II mRNA 表达量明显升高,而常氧 + TRAP1 干扰组细胞 COX II mRNA 表达量明显降低。同样,与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达组细胞 COX II mRNA 表达量明显升高,而缺氧 + TRAP1 干扰组细胞 COX II mRNA 表达量明显降低。说明常氧及缺氧情况下过表达 TRAP1 均能显著提

高 COX II mRNA 表达量,而下调 TRAP1 表达后 COX II mRNA 表达量也显著降低。由此证明,干预 TRAP1 表达能够影响 COX II 的基因表达。

COX II 是 COX 的一个组成亚基。COX 又称呼呼吸链复合物 IV,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。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,其中线粒体基因编码的 COX I、COX II 和 COX III 组成了 COX 的核心结构<sup>[9]</sup>。研究表明,COX 亚基的变化能够直接影响 COX 的活性,从而干扰电子传递和能量生成<sup>[10]</sup>。在慢性阻塞性肺疾病的小鼠模型中也观察到,疾病组小鼠肺组织细胞 COX II 表达和细胞凋亡比例较正常对照组均显著升高<sup>[11]</sup>,同时 COX II 表达升高能够反馈性减少细胞内活性氧的生成<sup>[12]</sup>。这些均预示着 COX 亚基参与了细胞凋亡和损伤的过程,并且其机制并非通过减少 ATP 生成而实现。

本研究在证实 TRAP1 能作用于 COX II mRNA 表达的基础上,进一步构建了 COX II 过表达和干扰细胞模型,探讨其在 TRAP1 调控心肌细胞缺氧损害中的作用。结果显示,与常氧空白对照组比较,缺氧空白对照组细胞增殖活性降低、细胞死亡率增加;与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 过表达组细胞增殖活性升高、细胞死亡率降低;而与缺氧 + TRAP1 过表达组比,缺氧 + TRAP1 过表达 + COX II 干扰组细胞增殖活性降低、细胞死亡率增加。同样,与缺氧空白对照组比较,缺氧 + TRAP1 干扰组细胞增殖活性降低、细胞死亡率增加;而与缺氧 + TRAP1 干扰组比较,缺氧 + TRAP1 干扰 + COX II 过表达组细胞增殖活性升高、细胞死亡率降低。这表明干扰 COX II 表达阻断了过表达 TRAP1 对缺氧心肌细胞的保护作用,而上调 COX II 则阻断了干扰 TRAP1 表达对缺氧心肌细胞的损害作用。由此证明 COX II 参与了 TRAP1 调控缺氧心肌细胞损伤的过程,是 TRAP1 保护缺氧心肌细胞的下游效应分子。

综上所述,本实验表明 TRAP1 能够作用于 COX II 的 mRNA 表达,并进一步证明 COX II 参与了 TRAP1 保护缺氧心肌细胞的过程。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 COX II 的具体途径及 COX II 保护缺氧心肌细胞的具体机制还需要深入研究探讨。

### 参考文献

- [1] Huang Y, Li Z, Yang Z. Roles of ischemia and hypoxia and the



- molecular pathogenesis of post-burn cardiac shock [J]. Burns, 2003, 29(8):828-833. DOI: 10.1016/S0305-4179(03)00204-3.
- [2] Bernardi P. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? [J]. Front Physiol, 2013, 4:95. DOI: 10.3389/fphys.2013.00095.
- [3] Goto M, Miwa H, Suganuma K, et al. Adaptation of leukemia cells to hypoxic condition through switching the energy metabolism or avoiding the oxidative stress [J]. BMC Cancer, 2014, 14:76. DOI: 10.1186/1471-2407-14-76.
- [4] Kang BH, Plescia J, Dohi T, et al. Regulation of tumor cell mitochondrial homeostasis by an organelle-specific Hsp90 chaperone network [J]. Cell, 2007, 131(2):257-270. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.028.
- [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, Huang YS, Shi XH, et al. Mitochondrial chaperone tumour necrosis factor receptor-associated protein 1 protects cardiomyocytes from hypoxic injury by regulating mitochondrial permeability transition pore opening [J]. FEBS J, 2010, 277(8):1929-1938. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07615.x.
- [7] 兰晓东, 党永明, 李凌霄, 等. 微管解聚对大鼠心肌细胞自主搏动和动作电位的影响及其机制 [J]. 中华烧伤杂志, 2015, 31(3):192-198. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2015.03.009.
- [8] Felts SJ, Owen BA, Nguyen P, et al. The hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties [J]. J Biol Chem, 2000, 275(5):3305-3312. DOI: 10.1074/jbc.275.5.3305.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Zhang H, Chen P, Zeng H, et al. Protective effect of demethylation treatment on cigarette smoke extract-induced mouse emphysema model [J]. J Pharmacol Sci, 2013, 123(2):159-166. DOI: 10.1254/jphs.13072FP.
- [12] Leadsham JE, Sanders G, Giannaki S, et al. Loss of cytochrome c oxidase promotes RAS-dependent ROS production from the ER resident NADPH oxidase, Yno1p, in yeast [J]. Cell Metab, 2013, 18(2):279-286. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.07.005.

(收稿日期:2016-08-18)

(本文编辑:程林)

**本文引用格式**

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.

Xiang F, Zhang DX, Ma SY, et al. Mechanism of protective effects of tumor necrosis factor receptor associated protein 1 on hypoxic cardiomyocytes of rats [J]. Chin J Burns, 2016, 32(12):744-751. DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2016.12.010.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

**本刊投稿格式新规**

根据中华医学会杂志社关于编排格式规范的最新要求,本刊投稿格式修订如下。

**1 标点符号**

撰写文章时,中文部分使用中文的标点符号,英文部分使用英文的标点符号(半角);数字的“小数点”使用英文状态下的标点“.”(半角);文后参考文献中著录符号“,”“.”“:”“( )”“[ ]”应用英文状态下的符号著录。

**2 基金项目**

有英文题名项的文章中基金项目采取双语著录,中、英文分别置于中、英文关键词下。国内部分基金项目名称的中英文对照翻译,可到本刊网站 www.zhssz.org“作者中心”栏目中查看参考。

示例:

(1) 基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2013CB532002)

Fund program: National Key Basic Research Program of China (973 Program) (2013CB532002)

(2) 基金项目:国家自然科学基金(30271269)

Fund program: National Natural Science Foundation of China (30271269)

**3 医学伦理**

当报告以人为研究对象的试验时,作者应该说明其遵循的程序是否符合负责人体试验的委员会(单位性的、地区性的或国家性的)所制订的伦理学标准。需提供该委员会的批准文件(批准文号著录于论文中)及受试对象或其亲属的知情同意书。研究涉及实验动物时,材料与方法中需注明动物许可证号。

示例:

本研究通过医院伦理委员会审批,批号为 XXXXXX。

**4 参考文献**

建议引用高影响力期刊近 3~5 年刊登的相关文献。对有 DOI 编码的文献必须著录其 DOI,列于该条文献末尾。

示例:

[1] 刘欣,申阳,洪葵. 心脏性猝死风险的遗传检测管理 [J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(9):760-764. DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2015.09.003.

本刊编辑部