

李靖,徐东阳,李昌卿,等. 缺氧细胞模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(11): 132-144.

Li J, Xu DY, Li CQ, et al. Research progress on hypoxic cell models [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(11): 132-144.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.11.017

缺氧细胞模型的研究进展

李 靖^{1,2,3#}, 徐东阳^{1#}, 李昌卿¹, 苏梦瑶¹, 王志娟¹, 赵明俊¹, 赵家龙¹,
杨君仪¹, 杨巧蝶¹, 康龙丽^{1,2,3*}

(1. 西藏民族大学医学部基础医学院, 陕西 咸阳 712082; 2. 西藏民族大学高原相关疾病分子遗传机制与干预研究重点实验室, 陕西 咸阳 712082; 3. 西藏民族大学高原环境与疾病相关机理研究高校重点实验室, 陕西 咸阳 712082)

【摘要】 在临床上,许多疾病的发生与发展过程中常伴随着细胞缺氧的现象。缺氧不仅是疾病进展的一个重要标志,而且在推动疾病进程中也扮演着关键角色。因此,改善组织缺氧可能为治疗相关疾病提供新的策略。为了从细胞和分子层面深入研究这类疾病,构建细胞缺氧模型显得尤为重要。目前,常用的缺氧细胞模型主要分为化学性缺氧模型、物理性缺氧模型和糖氧剥夺(oxygen glucose deprivation, OGD)模型。本文将对不同类型的缺氧细胞模型进行综述,探讨在疾病研究中的应用与局限性。

【关键词】 缺氧细胞; 物理缺氧; 化学缺氧; 复氧

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 11-0132-13

Research progress on hypoxic cell models

LI Jing^{1,2,3#}, XU Dongyang^{1#}, LI Changqing¹, SU Mengyao¹, WANG Zhijuan¹, ZHAO Mingjun¹, ZHAO Jialong¹,
YANG Junyi¹, YANG Qiaodie¹, KANG Longli^{1,2,3*}

(1. School of Basic Medicine, Ministry of Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang 712082, China.

2. Key Laboratory for Molecular Genetic Mechanisms and Intervention Research on High Altitude

Disease of Tibet Autonomous Region, Xizang Minzu University, Xianyang 712082. 3. Key Laboratory of

High Altitude Environment and Genes Related to Disease of Tibet Autonomous Region, Xizang Minzu

University, Xianyang 712082)

【Abstract】 Hypoxia is associated with the occurrence and development of many diseases in clinical settings. Cell hypoxia not only serves as a vital marker for disease advancement, but also plays a pivotal role in exacerbating the disease process, and improving tissue hypoxia may thus provide new strategies for the treatment of related diseases. Further investigation of these diseases at the cellular and molecular levels requires the establishment of a cellular hypoxia model. Current extensively employed hypoxic cell models can be categorized primarily into three types: chemical hypoxia, physical hypoxia, and glucose deprivation hypoxia models. This article reviews the various types of hypoxic cell models and scrutinizes their applications and limitations in disease research.

【Keywords】 hypoxic cell; physical hypoxia; chemical hypoxia; reoxygenation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

【基金项目】 西藏民族大学“青年学人培育计划”资助项目(21MDX03); 青藏高原相关疾病分子机制与干预研究重点实验室开放项目(KF2022005); 国家自然科学基金(U20A20395, 82460333); 西藏自治区基地与人才基金(XZ202401JD0031); 藏秦喜马拉雅·人才发展支持计划“高峰学者”(202001)。

【作者简介】 李靖(1989—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 高原病分子机制研究。E-mail: lijing@xзму.edu.cn

徐东阳(2002—), 男, 本科, 研究方向: 缺氧细胞模型研究。E-mail: 1446044291@qq.com [#]共同第一作者

【通信作者】 康龙丽(1964—), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 环境与疾病相关机理研究。E-mail: longli_kang@163.com

缺氧是指因组织氧气供应不足或利用氧气障碍而导致的组织代谢、功能以及形态结构发生异常变化的病理过程。目前,已知的缺氧可分为以下 4 类:低张性缺氧,主要是由于吸入气体中的氧分压过低、肺通气或肺换气功能障碍,或是静脉血混入动脉血所引起;血液性缺氧,由贫血、血红蛋白数量减少或血红蛋白无法有效结合氧,以及与氧的亲合力过高导致氧气不易释放等原因造成;组织性缺氧,是由组织细胞利用氧气的障碍引起;循环性缺氧,则是由组织血流量不足或供氧不足导致。缺氧在全身各系统疾病的发生与发展中起着至关重要的作用,因此,改善组织缺氧可能成为治疗缺氧相关疾病的新途径。细胞是生物体的基本结构和功能单位,细胞缺氧在全身各系统疾病的发生与发展中扮演着重要角色^[1-4]。体外培养细胞因其操作简便、重复性好、检测方便等优点,成为了研究细胞缺氧相关疾病的重要手段。因此,建立细胞缺氧模型成为研究此类疾病的关键方法和基本手段。

1 缺氧细胞概述

1.1 缺氧细胞模型的选择标准

在肿瘤细胞缺氧模型中,常以细胞存活率降低不明显、缺氧相关因子如低氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 表达升高作为判断模型成功的标准,因为这与体内肿瘤细胞的真实环境相符,可以用于研究肿瘤细胞在缺氧状态下的转移与浸润能力。正常组织缺氧模型的判断标准与肿瘤细胞相似。尹春月等^[5]依据这些标准建立了绒毛外滋养细胞 (extravillous trophoblasts, EVT) 的缺氧细胞模型,使其更贴近人类妊娠时的细胞状态。在研究临床药物或中药对细胞的保护作用以及模拟缺氧损伤性疾病时,通常选择细胞存活率在 50%~70% 的条件下进行研究。在诱导细胞增殖的低氧实验中,通常以细胞凋亡率低、增殖旺盛作为判断模型是否成功的标准。在研究低氧相关因子时,常以对细胞生存率影响小、低氧相关基因表达显著增高为标准。

1.2 线粒体细胞呼吸链

在人体内,超过 90% 的氧气在线粒体中被消耗,用于氧化磷酸化反应的最终电子受体,以产生三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP), 为人体提供必要的能量。线粒体细胞呼吸链主要由线粒

体内膜上的 4 种蛋白复合物组成,每个复合物都由多种酶蛋白、金属离子、辅酶或辅基构成。这些复合物之间传递电子并生成质子,最终氧气在复合体 IV 上被还原,并与质子结合形成水。复合物传递电子时会在线粒体基质和线粒体膜间隙之间产生的显著的质子浓度梯度,将沿着浓度梯度经过 ATP 酶返回线粒体基质并驱动 ATP 的生成,为人体各器官的活动提供能量^[6]。当机体遭遇缺氧,或者线粒体细胞呼吸链功能受损,将导致 ATP 生成不足,从而引发疲劳、心功能衰竭等缺氧症状。

1.3 HIF-1 α

HIF-1 α 是人体在缺氧条件下的主要调节因子。在正常氧条件下, HIF-1 α 的氧依赖降解结构域 (oxygen-dependent degradation domain, ODDD) 与脯氨酰羟化酶 (prolyl hydroxylase domain, PHD) 结合, HIF-1 α 被羟基化,随后被 pVHL (von hippel-lindau tumor suppressor protein) 识别并泛素化,最终被蛋白酶体降解^[7]。然而,在缺氧环境中, HIF-1 α 不会被 PHD 羟基化,因此不会降解。此时,位于胞质中的 HIF-1 α 进入细胞核,与缺氧相关因子如低氧诱导因子-1 β (hypoxia-inducible factor-1 β , HIF-1 β) 结合,并与转录辅助激活因子腺病毒 E1A 相关的 300 kDa 蛋白 (adenoviral E1A binding protein of 300 kDa, p300) 和环磷酸腺苷反应元件结合蛋白的结合蛋白 (CREB binding protein, CBP) 相互作用,形成转录复合物^[8]。该复合物促使促红细胞生成素 (erythropoietin, EPO)、VEGF 等基因的表达增加,帮助机体适应低氧环境。

2 缺氧细胞模型

2.1 化学性缺氧

化学性缺氧模型的构建一般通过向培养基中添加特定化学物质来实现,其目的是模拟体内的组织缺氧状态,通过耗尽培养基中的氧气或干扰细胞对氧气的利用来实现。这些化学物质根据其作用机制可分为三类:稳定 HIF-1 α 型缺氧模型诱导剂,如氯化钴 (cobalt chloride, CoCl₂)、去铁胺 (deferrioxamine, DFO) 和二甲基乙二酰基甘氨酸 (dimethylxaloylglycine, DMOG); 氧耗型缺氧模型诱导剂,如连二亚硫酸钠 (sodium dithionite, Na₂S₂O₄); 以及呼吸链阻断型缺氧模型诱导剂,如氰化钠 (sodium cyanide, NaCN) 和叠氮钠 (sodium azide, NaN₃)。其中,CoCl₂ 诱导法因其稳定可靠的

缺氧效果以及不受外部环境影响而被广泛采用。然而,细胞对 CoCl_2 的最适浓度和处理时间仍有待进一步确定。需注意的是,这些常用的缺氧诱导剂可能对细胞和人体都有潜在危害,因此在选择时必须慎重。

2.1.1 CoCl_2

研究显示, Co^{2+} 能够取代 PHD 中的 Fe^{2+} , 导致 PHD 失活并抑制 HIF-1 α 的羟基化, 从而引起 HIF-1 α 的聚集而产生类似细胞缺氧的效应^[9]。此外, Co^{2+} 还能直接抑制羟基化的 HIF-1 α 与 pVHL 的结合, 进一步抑制 HIF- α 的泛素化和降解^[10]。低浓度的 CoCl_2 可能会轻微提高细胞存活率, 但随着浓度的增加, 细胞存活率会逐渐下降。常用的处理时间为 24 h, 浓度通常为 150~400 $\mu\text{mol/L}$ 。通过改变浓度和处理时间, 还可以研究不同程度缺氧对细胞生物行为(如增殖、迁移、侵袭和凋亡)以及某些蛋白表达的影响。 CoCl_2 诱导的缺氧细胞模型在众多研究领域中具有广泛应用, 包括但不限于肿瘤细胞的缺氧微环境、新生儿窒息引起的脑部低氧、脑卒中和糖尿病视网膜病变等疾病的研究, 见表 1。

2.1.2 DFO

在临床治疗中, 去铁胺是慢性铁过载症的一种常用方法。研究发现, 去铁胺能够与 PHD 所必需的辅助因子 Fe^{2+} 结合, 导致 PHD 失活并抑制 HIF-1 α 的羟基化过程, 进而阻止其被降解, 从而在细胞内产生类似缺氧的效应^[17]。与其他缺氧诱导剂不同, 去铁胺对细胞无明显毒害作用, 因此被广泛应用于低氧模拟研究中^[18]。此外, 去铁胺还具备免疫调节和抗氧化等生理功能, 常与组织工程技术及生物材

料结合使用, 以促进骨折愈合、糖尿病创面修复等治疗过程^[19]。去铁胺也是铁死亡途径的抑制剂, 因此在铁死亡相关疾病模型的研究中具有重要意义^[20]。在 DFO 诱导的细胞缺氧实验中, 常用的浓度为 100~150 $\mu\text{mol/L}$, 处理时间通常为 24 h, 主要用来诱导 HIF-1 α 的高表达。然而, DFO 几乎不用于模拟细胞缺氧损伤或临床给药试验, 这可能与其潜在的抗氧化作用有关, 可能会影响实验结果的准确性。DFO 在缺氧实验中的应用见表 2。

2.1.3 DMOG

DMOG 是一种非特异性的 PHD 抑制剂, 其研究显示能够抑制 PHD 的活性, 导致 HIF-1 α 的聚集。值得注意的是, DMOG 产生的缺氧环境与物理性缺氧有所不同, 可能会引起细胞发生除缺氧以外的其他变化^[27]。正因为这一特性, DMOG 在缺氧相关实验中几乎不作为缺氧模拟剂使用, 而更多地被用作 HIF-1 α 的稳定剂, 以研究 HIF-1 α 对疾病的影响, 从而为疾病治疗提供新的策略。例如, 稳定 HIF-1 α 可以减轻肾小管间质损伤后对肾小球的不利影响, 缓解因糖皮质激素过量引起的类固醇性股骨头坏死, 以及减少牙周炎中的骨吸收等^[28-30]。此外, DMOG 也常与组织工程技术和生物材料结合使用, 以促进血管生成和骨损伤的修复^[31-34]。

2.1.4 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 是一种氧结合剂, 能够在短时间内与培养基内的氧气结合, 从而导致细胞的低张性缺氧。研究表明, 这种方法不会损伤细胞膜, 且 2 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液能够维持无氧状态约 1 h, 而 pH 值不会发生变化^[35]。相比之下, 1 mmol/L 的 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$

表 1 CoCl_2 诱导的缺氧细胞模型
Table 1 CoCl_2 induced hypoxic cell model

细胞 Cells	CoCl_2 浓度/($\mu\text{mol/L}$) Concentration of CoCl_2	诱导时间/h Induction period	模拟疾病 Simulate diseases
人类卵巢癌细胞系 SKOV3 ^[11] Human ovarian cancer cells SKOV3	200	24	体内肿瘤细胞缺氧环境 Hypoxic environment of tumor cells in the body
人乳腺癌 MDAMB-231 细胞 ^[12] Human breast cancer MDAMB-231 cells	200	24	
人肝癌 HepG2 细胞 ^[13] Human liver cancer HepG2 cells	150	24	
人脑胶质瘤细胞系 U251 ^[14] Human glioma cells line U251	400	24	新生儿窒息脑内低氧环境 Hypoxic environment in the brain of newborns with asphyxia
小鼠神经胶质瘤 N2a 细胞 ^[15] Mouse neuroblastoma N2a cells	300	24	
人视网膜色素上皮细胞 ^[16] Human retinal color epithelial cells	200	24	糖尿病视网膜病变 Diabetic retinopathy

表 2 DFO 诱导的缺氧细胞模型
Table 2 DFO induced hypoxic cell model

细胞 Cells	DFO 浓度/(μ mol/L) Concentration of DFO	诱导时间/h Induction period	DFO 作为缺氧模拟剂在实验中的应用 Application of DFO as a hypoxia simulator in experiments
小鼠骨样细胞系 MLO-Y4 ^[21] Mouse bone like cells line MLO-Y4	100	12, 24, 48	证明了低氧状态下核因子 κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand, RANKL) 的表达增高 Proved the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand under low oxygen conditions is increased
舌鳞癌 SCC-15 细胞 ^[22] Tongue squamous cells carcinoma SCC-15 cells	100	24	证明了低氧条件下 SOX2 (SRY-like HMG box 2) 和 OCT4 (octamer binding factor 4) 的表达增高 Proved the increased expression of SOX2 and OCT4 under hypoxic conditions
BV2 小胶质细胞 ^[23] BV2 microglia	80	24	缺氧炎症 (hypoxic inflammation, HI) 相关脑损伤 Hypoxic inflammatory related brain injury
ID8 小鼠卵巢癌细胞、人卵巢癌细胞 OVCAR-4 ^[24] ID8 mouse ovarian cancer cells, human ovarian cancer cells OVCAR-4	150	24	证明了 ST6 β -半乳糖苷 α -2, 6-唾液酸转移酶 1 (ST6 β -galactoside α -2, 6sialyltransferase 1, ST6GAL1) 可使 ID8 细胞和 OV4 细胞在低氧条件下更具侵袭性 Proving that ST6GAL1 can make ID8 cells and OV4 cells more invasive under hypoxic conditions
脂肪来源的间充质细胞 ^[25] Adipose-derived stem cells	150, 300	24	证明了低氧可以恢复糖尿病患者脂肪来源的间充质细胞 (adipose-derived stem cells, ADSCs) 的血管生成潜力 It proves that hypoxia can restore the angiogenic potential of ADSCs in diabetic patients
人脐静脉内皮细胞 ^[26] Human umbilical vein endothelial cells	100	48	低氧预处理, 上调 HIF-1 α 表达 Hypoxia pretreatment and upregulation of HIF-1 α express

只能造成约 20 min 的缺氧^[36]。因此, 缺氧的时间会随着浓度的变化而变化。随着 Na₂S₂O₄ 浓度的增加和处理时间的延长, 细胞的存活率会逐渐降低。常用的浓度为 2~5 mmol/L, 处理时间通常为 1~4 h。Na₂S₂O₄ 也常用于构建缺氧/复氧模型, 其中缺氧时浓度通常为 2.5~5 mmol/L, 处理时间为 30 min~4 h, 复氧时只需将含有 Na₂S₂O₄ 的培养基更换为正常培养基, 复氧时间通常为 4~24 h。Na₂S₂O₄ 诱导的缺氧细胞模型在脑缺血性疾病、肝细胞氧化应激、心肌细胞缺血再灌注损伤等疾病的研究中得到了广泛应用, 见表 3。

2.1.5 NaCN 和 NaN₃

研究显示, 氰离子 (CN⁻) 和叠氮离子 (N₃⁻) 一旦进入细胞, 便会抑制复合体 IV (细胞色素 C 氧化酶), 阻断呼吸链中的电子传递, 导致细胞无法利用氧气产生 ATP, 从而引起能量代谢障碍。然而, 这两种物质具有极高的毒性, 对人类和细胞均会造成伤害, 因此应用较为有限。王丽丽等^[43]通过使用 NaCN 和舒芬太尼处理大鼠心肌细胞, 证实了舒芬太尼对心肌细胞的保护作用。饶淑云等^[44]通过在缺糖培养乳鼠心肌细胞中加入 5 mmol/L NaCN, 培养 24 h 后观察到乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase,

LDH)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 表达增高, 成功建立了缺氧细胞模型, 并证明了西红花酸对心肌细胞的保护作用。关付等^[45]使用 1 mmol/L 的 NaN₃ 处理大鼠心肌细胞, 成功建立了缺氧模型。

2.2 物理性缺氧

物理性缺氧的方法包括改变培养环境中气体比例或隔离细胞与外界环境, 类似于体内的低张性缺氧。这种方法更贴近人体内的缺氧环境, 但其缺点包括成本较高和难以精确控制缺氧程度。

2.2.1 混合气体培养法

混合气体培养法涉及将氧气 (O₂)、氮气 (N₂) 和二氧化碳 (CO₂) 按照不同比例预先制备好后通入密闭的培养装置或三气培养箱中。简单的培养装置应包含一个进气口和一个出气口, 以便于控制通气并排出装置内原有的气体。过程中需要监测 O₂ 浓度, 当达到期望值时停止通气, 然后将密封好的装置放入 37℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中进行培养。三气培养箱是最常用且理想的装置, 能够精确控制各气体参数, 设置不同的缺氧条件, 操作简便, 是建立缺氧细胞模型的理想选择。然而, 打开和关闭培养箱后, 气体达到平衡所需时间较长, 可能会导致缺氧环境变化, 且设备成本较高。缺氧条件可

以选择 0%、1%、2%、3%、4%的 O₂,最常用的缺氧条件为 1% O₂、94% N₂、5% CO₂,处理时间可以是 12、24、36、72 h,其中 24 h 是最常用的处理时间,但最佳处理时间会因细胞类型而异。除了建立缺氧细胞模型外,还可以通过改变处理时间来研究不同程度缺氧对细胞的影响。混合气体培养法建立的缺氧细胞模型在细胞凋亡、缺血性脑卒中、肿瘤细胞缺

氧环境等疾病研究中得到了广泛应用,见表 4。

2. 2. 2 液体石蜡覆盖法

液体石蜡由于其不溶于水的特性,对人体无害。研究显示,在培养基表面滴加无菌石蜡,直至完全覆盖培养基表面,可以实现培养基与外界环境的隔绝,使细胞耗尽培养基中的氧气,从而达到缺氧的效果。然而,石蜡可能无法完全覆盖培养基表

表 3 Na₂S₂O₄ 诱导的缺氧细胞模型
Table 3 Na₂S₂O₄ induced hypoxic cell model

细胞 Cells	Na ₂ S ₂ O ₄ 浓度 Concentration of Na ₂ S ₂ O ₄	诱导时间 Induction period	模拟疾病 Simulate diseases
SD 大鼠脊髓神经细胞 ^[37] Spinal cord neurons in SD rats	2 mmol/L	90 min	脊髓损伤 Spinal cord injury
小鼠海马神经元 HT22 细胞 ^[38] HT22 cells in mouse hippocampal neurons	2 mmol/L	缺氧 1 h,复氧 24 h Hypoxia for 1 h, reoxygenation for 24 h	脑缺血性疾病 Cerebral ischemic disease
大鼠肝细胞 BRL-3A ^[39] Rat liver cells BRL-3A	5 mmol/L	缺氧 4 h,复氧 2 h Hypoxia for 4 h, reoxygenation for 2 h	肝细胞氧化应激 Hepatocellular oxidative stress
H9c2 心肌细胞 ^[40] H9c2 myocardial cells	2. 5 mmol/L	缺氧 30 min,复氧 4 h Hypoxia for 30 min, reoxygenation for 4 h	心肌细胞缺血再灌注损伤 Myocardial cell ischemia-reperfusion injury
人神经母细胞瘤细胞株 SH-SY5Y ^[41] Human neuroblastoma cell line SH-SY5Y	5 mmol/L,无糖培养基 5 mmol/L, sugar free culture medium	缺糖缺氧 1 h,复氧 3 h Hypoxia for 1 h, reoxygenation for 3 h	脑缺血性疾病、脑梗死、缺血性脑卒中、慢性脑灌注不足等 Cerebral ischemic disease, cerebral infarction, ischemic stroke, chronic cerebral hypoperfusion, etc.
PC12 细胞 ^[42] PC12 cells	1 mmol/L,无糖 RPMI1640 培养液 1 mmol/L, sugar free RPMI1640 culture medium	2 h	

表 4 混合气体诱导的缺氧模型
Table 4 Hypoxia cell model induced by mixed gases

细胞 Cells	混合气体比例 Mixed gas ratio	缺氧时间/h Hypoxia period	应用范围 Application scope
小鼠 GC-1spg 精原细胞 ^[46] Mouse GC-1spg spermatogonia	3% O ₂ 、5% CO ₂ 、92% N ₂	36	细胞凋亡 Cell apoptosis
小鼠神经干细胞 C17. 2 ^[47] Mouse neural stem cells C17. 2	1% O ₂ 、5% CO ₂ 、94% N ₂	12	缺血性脑卒中 Ischemic stroke
人宫颈癌细胞株 Hela ^[48] Human cervical cancer cells line Hela	1% O ₂ 、5% CO ₂ 、94% N ₂	24	体内肿瘤细胞缺氧环境
人肾小管上皮细胞 ^[49] Human renal tubular epithelial cells	1% O ₂ 、5% CO ₂ 、94% N ₂	24	缺氧-炎症反应促进肾纤维化进展 Hypoxia inflammatory response promotes the progression of renal fibrosis
乳鼠原代心肌细胞 ^[50] Primary myocardial cells of suckling mice	1% O ₂ 、5% CO ₂ 、94% N ₂	24	心肌梗死等心肌缺氧性疾病 Myocardial hypoxia diseases such as myocardial infarction
成纤维细胞 ^[51] Fibroblasts	3% O ₂ 、5% CO ₂ 、92% N ₂	24	瘢痕疙瘩 Keloids
膀胱上皮细胞 ^[52] Bladder epithelial cells	1% O ₂ 、5% CO ₂ 、94% N ₂	12	缺氧加重膀胱纤维化 Hypoxia exacerbates bladder fibrosis
人类乳腺癌细胞系 ^[53] Human breast cancer cells line	1% O ₂ 、5% CO ₂ 、94% N ₂	24	缺氧相关基因表达 Hypoxia related gene expression

面,导致缺氧程度难以控制。此外,石蜡是一种脂性物质,不易清洗,如果清洗不彻底,在显微镜下可能会影响视野。

2. 2. 3 厌氧袋/厌氧罐法

该方法需要使用一个密闭的培养盒、厌氧产气袋和氧气指示剂。其缺氧机制是通过厌氧袋耗尽密闭培养盒中的氧气并产生二氧化碳。操作方法是 将培养皿、厌氧袋和氧气指示剂放入培养罐中,密封培养罐并观察氧气指示剂颜色的变化。厌氧袋/厌氧罐法诱导的缺氧细胞模型在心肌和肝细胞缺血再灌注损伤、组织瓣移植、缺血性中风等疾病的研究中得到了广泛应用,见表 5。

2.3 糖氧剥夺 (oxygen glucose deprivation, OGD) 模型

糖类是人体主要的能源来源,人体摄入的糖类最终会在细胞内被分解成葡萄糖。在有氧条件下,葡萄糖通过糖酵解途径产生丙酮酸,随后丙酮酸进入线粒体参与细胞呼吸链。在体外培养细胞时,培养基通常以葡萄糖作为能源。研究显示,若培养基中缺乏糖分,细胞的呼吸链会中断,导致细胞呼吸停止,从而引起细胞缺氧^[58]。这种情况类似于组织血流量不足时产生的循环性缺氧,因此,OGD 被认为是模拟缺血缺氧性疾病的理想选择。

OGD 的方法包括将正常培养基替换为低糖或无糖培养基,并将细胞置于低氧环境中培养。细胞可以被直接放入低氧环境中,或者在培养基中加入特定化学物质来造成细胞缺氧。最常用的方法是使用无糖培养基,并将细胞置于缺氧环境中,处理时间通常为 12 h。这种缺氧类似于组织性缺氧和低张性缺氧。研究表明,混合气体 OGD 模型更符合脑血流量不足时脑微血管病变和脑神经损伤的微环境改变,因此是研究脑血管病变与脑神经关系的最理想的体外模型^[59]。

化学性 OGD 模型应用较少,最常添加的化学物质包括 CoCl₂ 和 Na₂S₂O₄。该方法主要用于建立缺氧/复氧模型。OGD 缺氧条件通常为 0% O₂、5% CO₂、95% N₂ 和无糖培养基,缺氧时间多在 1.5 ~ 4 h,复氧时间通常为 24 h。OGD 诱导的缺氧细胞模型广泛应用于缺血缺氧性疾病的研究以及模拟缺血再灌注损伤的研究,见表 6。

3 缺氧细胞模型的优缺点比较及选择策略

物理性缺氧方法能够最真实地模拟体内缺氧环境,但需要严格控制缺氧条件,并监测缺氧环境的稳定性,类似于体内的低张性缺氧。化学性缺氧方法能够稳定地造成缺氧效果,不受外界环境的影

表 5 厌氧袋/厌氧罐法诱导的缺氧细胞模型
Table 5 Anaerobic bag/anaerobic tank induced hypoxic cell model

细胞 Cells	缺氧条件 Hypoxic conditions	缺氧时间 Hypoxia period	模拟疾病 Simulate diseases
H9c2 心肌细胞 ^[54] H9c2 myocardial cells	Anaero Pack 厌氧产气袋, Earle's 无糖平衡盐溶液	缺氧 8 h 复氧 12 h	心肌缺血再灌注损伤 Myocardial ischemia-reperfusion injury
	Anaero Pack anaerobic gas bag, Earle's sugar free equilibrium salt solution	Hypoxia for 8 h, reoxygenation for 12 h	
人正常肝细胞 LO2 ^[55] Normal human liver cell LO2	GENbag 厌氧产气袋, 无糖培养基	缺氧 6 h 复氧 2 h	肝细胞缺血再灌注损伤如肝脏切除和肝移植手术、低血容性休克 Hepatocellular ischemia-reperfusion injury, such as liver resection and liver transplantation surgery, hypovolemic shock
	GENbag anaerobic gas bag, sugar free culture medium	Hypoxia for 6 h, reoxygenation for 2 h	
人脐静脉内皮细胞 ^[56] Human umbilical vein endothelial cells	Anaero Pack 厌氧产气袋, 低糖无血清培养基	缺氧 3 h、6 h、9 h 复氧 2 h	组织瓣移植 Tissue flap transplantation
	Anaero Pack anaerobic gas bag, low sugar serum-free culture medium	Hypoxia for 3 h, 6 h, 9 h, reoxygenation for 2 h	
神经元和星形胶质细胞 ^[57] Neurons and astrocytes	Anaero Pack 厌氧产气袋, 无糖平衡盐溶液	缺糖缺氧 1 h, 复氧 24 h	缺血性中风 Ischemic stroke
	Anaero Pack anaerobic gas bag, sugar free equilibrium salt solution	Hypoxia due to sugar deficiency for 1 h, reoxygenation for 24 h	

表 6 OGD 诱导的缺氧模型
Table 6 Hypoxia cell model induced by OGD

细胞 Cells	缺氧条件 Hypoxic conditions	缺氧时间 Hypoxia period	模拟疾病 Simulate diseases
PC12 细胞 ^[60] PC12 cells	0% O ₂ 、5% CO ₂ 、95% N ₂ , 无糖培养基	12 h	脑缺血性疾病、脑梗死、缺血性脑卒中、慢性脑灌注不足等 Cerebral ischemic disease, cerebral infarction, ischemic stroke, chronic cerebral hypoperfusion, etc.
	0% O ₂ , 5% CO ₂ , 95% N ₂ , sugar free culture medium		
BV2 小胶质细胞 ^[61] BV2 microglia	1% O ₂ 、94% N ₂ 、5% CO ₂ , 无糖培养基	8 h	
	1% O ₂ , 94% N ₂ , 5% CO ₂ , sugar free culture medium		
大鼠原代神经星形胶质细胞 ^[62] Primary rat astrocytes	0% O ₂ 、5% CO ₂ 、95% N ₂ , 无糖培养基	12 h	
	0% O ₂ , 5% CO ₂ , 95% N ₂ , sugar free culture medium		
小鼠皮层神经元 ^[63] Mouse cortical neurons	1% O ₂ 、95% N ₂ 、5% CO ₂ , 无糖培养基	缺糖缺氧 90 min, 复氧 24 h	
	1% O ₂ , 94% N ₂ , 5% CO ₂ , sugar free culture medium	Hypoxia due to sugar deficiency for 90 min, reoxygenation for 24 h	
BV2 小胶质细胞 ^[64] BV2 microglia	0% O ₂ 、5% CO ₂ 、95% N ₂ , 无糖培养基	缺糖缺氧 4 h, 复氧 24 h	
	0% O ₂ , 5% CO ₂ , 95% N ₂ , sugar free culture medium	Hypoxia due to sugar deficiency for 4 h, reoxygenation for 24 h	
SH-SY5Y 细胞 ^[65] SH-SY5Y cells	0% O ₂ 、5% CO ₂ 、95% N ₂ , 低糖培养基	缺糖缺氧 4 h, 复氧 12 h	
	0% O ₂ , 5% CO ₂ , 95% N ₂ , low sugar medium	Hypoxia due to sugar deficiency for 4 h, reoxygenation for 12 h	
HT22 细胞、PC12 细胞 ^[66] HT22 cells, PC12 cells	0% O ₂ 、5% CO ₂ 、95% N ₂ , 无糖培养基	缺糖缺氧 2 h, 复氧 24 h	
	0% O ₂ , 5% CO ₂ , 95% N ₂ , sugar free culture medium	Hypoxia due to sugar deficiency for 2 h, reoxygenation for 24 h	
H9c2 心肌细胞 ^[67] H9c2 myocardial cells	0% O ₂ 、5% CO ₂ 、95% N ₂ , 无糖培养基	缺糖缺氧 4 h, 复氧 24 h	
	0% O ₂ , 5% CO ₂ , 95% N ₂ , sugar free culture medium	Hypoxia due to sugar deficiency for 4 h, reoxygenation for 24 h	
H9c2 心肌细胞 ^[68] H9c2 myocardial cells	1% O ₂ 、94% N ₂ 、5% CO ₂ , 低糖培养基	24 h	
	1% O ₂ , 94% N ₂ , 5% CO ₂ , low sugar medium		

响,但可能会对细胞造成一定程度的损伤。此外,CoCl₂、DFO 和 DMOG 通过稳定 HIF-1α 模拟的是细胞缺氧后的状态,并不能模拟细胞缺氧的过程;Na₂S₂O₄ 模拟的是细胞的低张性缺氧;NaCN 和 NaN₃ 通过破坏细胞呼吸链,产生类似于组织性缺氧的效果。

在不同的领域中,对不同的缺氧细胞模型有着不同的选择,下面将从模型角度与实验目的分别展开讨论。

3.1 模型角度

在考虑物理性缺氧时,三气培养箱是最理想的选择,因其能够精确控制气体比例,操作简便。

然而,三气培养箱的价格较高,开启后缺氧条件可能会发生变化,如果实验室条件不允许,厌氧袋和厌氧罐由于体积小、成本低,可以作为一个替代选择。

对于化学性缺氧,CoCl₂ 是推荐的选择,因其应用广泛,并且已被证实可以调节缺氧相关的下游靶标,如葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1) 和 VEGF 的表达,这与物理性缺氧的调节机制相似^[69-70]。但是 Na₂S₂O₄ 更符合研究缺血缺氧性疾病的发病机制,因此 Na₂S₂O₄ 是化学缺氧中研究该类疾病最合适的选择。DFO 因其具有抗氧化等特性,不用于缺氧损伤性疾病的研究。

DMOG 会引起缺氧以外的变化,在缺氧实验中应用较少。NaCN 和 NaN₃ 对人体和细胞都有害,不建议使用。

3.2 实验角度

目前,建立缺氧细胞模型多用于模拟人体内真实的缺氧环境,缺氧损伤性疾病和研究缺氧环境下相关基因的表达。OGD 模型最符合缺血缺氧性疾病和缺血再灌注损伤的发病机制,因此是研究这类

疾病的首选模型。模拟人体真实缺氧环境时,三气培养箱或 CoCl₂ 是最常用的方法。厌氧袋/厌氧罐法或 Na₂S₂O₄ 可作为第二选择。当研究缺氧条件下相关基因的表达时,常选用三气培养箱或 CoCl₂, DFO 是第二选择。

总之,在选择缺氧模型时,应综合考虑研究疾病的发病机制以及实验室的条件。本文对上述缺氧模型进行了总结,具体见表 7。

表 7 缺氧细胞模型原理、优缺点比较及应用情况
Table 7 Principle, advantages and disadvantages comparison, and application of hypoxia cell models

缺氧方法		原理	优点	缺点	应用范围
Hypoxia methods		Principle	Advantage	Shortcoming	Application scope
物理缺氧 Physical hypoxia	混合气体 Mixed gas	改变环境中氧气比例,降低氧分压 Changing the oxygen ratio in the environment and reducing oxygen partial pressure	精确控制各气体的参数,设定不同的缺氧条件 Accurately control the parameters of each gas and set different hypoxia conditions	仪器昂贵,打开后缺氧条件发生变化 Instrument is expensive, and the hypoxia conditions change after opening	常用,可用于癌细胞、心肌细胞等细胞系 Commonly used, can be used for cell lines such as cancer cells and cardiomyocytes
	厌氧罐/厌氧袋 Anaerobic tank/bag	厌氧袋耗尽密闭环境中的氧气并产生二氧化碳 Anaerobic bags deplete oxygen in a closed environment and produce carbon dioxide	实用、体积小、成本低 Practical, small in size, and low in cost	不能精确判断氧气含量,需要实时监测氧气浓度 Unable to accurately determine oxygen content, requires real-time monitoring of oxygen concentration	较常用,可用于心肌细胞、神经系统细胞等细胞系 Commonly used, can be used for cell lines such as myocardial cells and nervous system cells
	液体石蜡 Liquid paraffin	将培养基与外界环境隔开,细胞耗尽培养基中的氧气 Isolate the culture medium from the external environment and deplete the oxygen in the culture medium for cells	安全无毒、成本低 Safe and non-toxic, with low cost	缺氧效果不稳定,不能判断缺氧程度,且难以清洗,影响显微镜下成像 Hypoxia effect is unstable, the degree of hypoxia cannot be determined, and it is difficult to clean, which affects imaging under the microscope	不常用 Not commonly used
	CoCl ₂	置换 PHD 中的 Fe ²⁺ ,使 PHD 失活,从而抑制 HIF-1α 的降解 Replacing Fe ²⁺ in PHD to inactivate PHD and inhibit the degradation of HIF-1α	成本低、不受外界环境影响、缺氧效果稳定 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect	对细胞有毒,不同细胞作用浓度和时间不同 Toxic to cells, with varying concentrations and times of action on different cells	常用,可用于肿瘤细胞、神经系统细胞等细胞系 Commonly used, can be used for cell lines such as tumor cells and nervous system cells
化学缺氧 Chemical hypoxia	DFO	与 Fe ²⁺ 结合,抑制 HIF-1α 的降解 Combining with Fe ²⁺ to inhibit the degradation of HIF-1α	成本低、不受外界环境影响、缺氧效果稳定,对细胞无毒性 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect, and non-toxic to cells	不同细胞作用浓度和时间不同 Different cell action concentrations and times vary	较常用,可用于肿瘤细胞、骨细胞等细胞系 Commonly used, can be used for cell lines such as tumor cells and bone cells
	DMOG	抑制 PHD 的活性,造成 HIF-1α 聚集 Inhibiting the activity of PHD, causing HIF-1α accumulation	成本低、不受外界环境影响、缺氧效果稳定 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect	不同细胞作用浓度和时间不同 Different cell action concentrations and times vary	不常用 Not commonly used

续表7

缺氧方法 Hypoxia methods	原理 Principle	优点 Advantage	缺点 Shortcoming	应用范围 Application scope
NaCN、NaN ₃	抑制细胞色素 C 氧化酶， 阻断呼吸链电子传递 Inhibiting cytochrome C oxidase and blocking respiratory chain electron transfer	成本低、不受外界环境 影响、缺氧效果稳定 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect	剧毒，对人体有害，不同细 胞作用浓度和时间不同 Highly toxic, harmful to the human body, with different cell concentrations and durations of action	不常用 Not commonly used
	耗尽培养基中的氧气 Depleting the oxygen in the culture medium	成本低、不受外界环境 影响、缺氧效果稳定、 速度快 Low cost, unaffected by external environment, stable hypoxia effect, and fast speed	不同细胞作用浓度和时间 不同 Different cell action concentrations and times vary	较常用，主要用于心肌细 胞和神经系统细胞的缺 氧/复氧模型 Commonly used, mainly used for hypoxia/ reoxygenation models of myocardial cells and nervous system cells
缺糖缺氧 Sugar deficiency OGD model and hypoxia	缺糖使呼吸链中断，缺氧 环境造成细胞缺氧 Sugar deficiency disrupts the respiratory chain, and an hypoxic environment causes cellular hypoxia	缺血缺氧性疾病的最 理想模型 Most ideal model for ischemic and hypoxic diseases	操作较复杂 Operation is more complex	常用，主要用于心肌细胞 和神经系统细胞的缺氧/ 复氧模型 Commonly used, mainly used for hypoxia/ reoxygenation models of myocardial cells and nervous system cells

4 小结与展望

建立缺氧细胞模型是研究缺氧性疾病及其他导致组织缺氧的疾病的重要研究手段。众多疾病都会导致组织和细胞缺氧，而缺氧又可能促进疾病的发展。例如，肿瘤细胞因快速增殖而需求大量能量，但在正常条件下，能量供应已无法满足其需求，从而在肿瘤细胞内产生缺氧区域。缺氧会促进HIF-1α的表达，以维持肿瘤细胞的生长，并促进其增殖和转移^[71]。此外，缺氧也会加速各组织器官纤维化的进程^[72-74]。然而，缺氧对人类也有积极作用，如通过诱导HIF-1α表达促进血管生成，进而促进伤口愈合^[75]。

缺氧是一个复杂的过程，不仅仅涉及细胞缺氧，体内多种机制都可能导致组织缺氧。人类的呼吸过程包括肺通气、肺泡内的气体交换、气体在血液中的运输以及组织内的气体交换，任何一个环节的障碍都可能导致缺氧。体外培养细胞无法模拟这些过程，因此与体内实验相结合是必要的。在建立缺氧细胞模型时，应考虑疾病的缺氧类型、发病机制等因素，选择合适的细胞模型，以更好地模拟该疾病。现有的缺氧模型造成缺氧的方式较为单一，缺氧效果不稳定，三气培养箱在使用过程中，培养箱门的开闭会造成箱内氧气含量波动，影响缺氧效果。与化学方法联合，或许能使缺氧环境更加稳

定，如在培养基中加入Na₂S₂O₄耗尽培养基中的O₂，再将细胞放入无氧外环境中。联合应用这些方法是否能取得更好的效果，值得进一步探讨。

在模拟某些疾病时，在缺氧的基础上结合多种机制和条件所建立的细胞模型或许可以更符合细胞造模的需要。刘金学^[76]将心肌细胞置于缺氧环境中并测定培养基的pH值，建造出心肌细胞缺氧酸中毒的模型。心肌细胞酸中毒是心肌缺血缺氧性疾病发生发展中的一个重要环节，建立该类疾病模型时，在检测其细胞存活率的基础上同时检测培养基的pH值会更加符合其发病过程。此外，通过改变椎间盘髓核细胞的培养基渗透压^[77]联合缺氧，会更加符合椎间盘退变的发病机制。

随着西藏旅游业的发展，越来越多的人进入高原，许多人因不适应突然的低氧环境而易发生高原反应，严重者可能出现高原肺水肿（high altitude pulmonary edema, HAPE）和高原脑水肿（high altitude cerebral edema, HACE），这对进入高原人员的安全构成严重威胁。提前做好预防是降低发病率的关键，目前临床防治主要依赖西药对症治疗，但个体差异可能导致不良反应。随着网络药理学等生物信息学科的进步，利用中药活性成分等天然化合物从靶点和相关通路入手防治疾病成为新趋势。HAPE和HACE的发病机制尚未完全明确，且涉及多种分子机制，因此对其研究至关重要。将动

物置于高原环境模拟舱中是建立 HAPE 和 HACE 模型,但这无法很好地从分子层面进行研究。因此,与结合细胞实验相结合,建立缺氧细胞模型可以解决这一问题。

参考文献:

- [1] LODGE K M, VASSALLO A, LIU B, et al. Hypoxia increases the potential for neutrophil-mediated endothelial damage in chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2022, 205(8): 903-916.
- [2] LU J, PENG Y, ZOU J, et al. Hypoxia inducible factor-1 α is a regulator of autophagy in osteoarthritic chondrocytes [J]. *Cartilage*, 2021, 13(2_suppl): 1030S-1040S.
- [3] BAI R, LI Y, JIAN L, et al. The hypoxia-driven crosstalk between tumor and tumor-associated macrophages: mechanisms and clinical treatment strategies [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 177.
- [4] ZHAO H, WONG R J, STEVENSON D K. The impact of hypoxia in early pregnancy on placental cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9675.
- [5] 尹春月, 龙禹. 氯化钴模拟法构建绒毛外滋养细胞缺氧模型 [J]. *现代妇产科进展*, 2023, 32(9): 645-649, 653.
YIN C Y, LONG Y. Construction of a new model for extravillous trophoblast cell hypoxia using cobalt chloride [J]. *Prog Obstet Gynecol*, 2023, 32(9): 645-649, 653.
- [6] 周春燕, 药立波. *生物化学与分子生物学* [M]. 9 版. 北京: 人民卫生出版社, 2018.
ZHOU C Y, YAO L B. *Biochemistry and molecular biology* [M]. 9th edition. Beijing: People's Health Press, 2018.
- [7] OH H M, PARK C W, IVAN M, et al. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein [J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2(7): 423-427.
- [8] KARUPPAGOUNDER S S, RATAN R R. Hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase inhibition: robust new target or another big bust for stroke therapeutics? [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32(7): 1347-1361.
- [9] MUÑOZ-SÁNCHEZ J, CHÁNEZ-CÁRDENAS M E. The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model [J]. *J Appl Toxicol*, 2019, 39(4): 556-570.
- [10] YUAN Y, HILLIARD G, FERGUSON T, et al. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(18): 15911-15916.
- [11] AO Q, SU W, GUO S, et al. SENP1 desensitizes hypoxic ovarian cancer cells to cisplatin by up-regulating HIF-1 α [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16396.
- [12] 郭树鹏, 栾莉莉, 崔志馨, 等. 青箱苷 A 抑制缺氧乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖、迁移和侵袭能力的研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(12): 30-35.
- GUO S P, LUAN L L, CUI Z X, et al. Study on celastrol A inhibiting the abilities of proliferation, migration and invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells during oxygen deprivation [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2023, 25(12): 30-35.
- [13] 韦燕飞, 吕贝贝, 金丽杰, 等. 缺氧条件下白花丹醌对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡与侵袭及 HIF-1 α 表达的影响 [J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(14): 1789-1795.
WEI Y F, LYU B B, JIN L J, et al. Effects of plumbagin on proliferation, apoptosis, invasion and expression of HIF-1 α in hepatocellular HepG2 cells under hypoxia condition [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2022, 39(14): 1789-1795.
- [14] 呼格吉乐, 王婷, 苏慧敏. EPO 对窒息诱导新生大鼠脑损伤和 CoCl₂ 诱导人脑胶质瘤细胞系 U251 缺氧的改善作用 [J]. *山东医药*, 2023, 63(9): 46-51.
HU G, WANG T, SU H M. Effects of EPO on brain injury after neonatal asphyxia in rats and hypoxia induced by CoCl₂ in human glioma cell line U251 [J]. *Shandong Med J*, 2023, 63(9): 46-51.
- [15] 刘菲, 张昊, 刘博, 等. 氯化钴诱导的 N2a 细胞缺氧损伤模型的机制研究 [J]. *广东药科大学学报*, 2020, 36(2): 249-253.
LIU F, ZHANG H, LIU B, et al. Mechanism of cobalt chloride induced hypoxia on N2a cells [J]. *J Guangdong Pharm Univ*, 2020, 36(2): 249-253.
- [16] 胡晗. 从缺氧-VEGF 途径研究黄芪对人视网膜色素上皮细胞的影响 [D]. 荆州: 长江大学, 2022.
HU H. Study on the effect of *Astragalus membranaceus* on human retinal pigment epithelial cells from hypoxia-VEGF pathway [D]. Jingzhou: Yangtze University, 2022.
- [17] TEVLIN R, LONGAKER M T, WAN D C. Deferoxamine to minimize fibrosis during radiation therapy [J]. *Adv Wound Care*, 2022, 11(10): 548-559.
- [18] ZHANG Y, YAPRYNTSEVA M A, VDOVIN A, et al. Modeling hypoxia facilitates cancer cell survival through downregulation of p53 expression [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 345: 109553.
- [19] ZHU Y, CHANG B, PANG Y, et al. Advances in hypoxia-inducible factor-1 α stabilizer deferoxamine in tissue engineering [J]. *Tissue Eng Part B Rev*, 2023, 29(4): 347-357.
- [20] GUO Z, LIN J, SUN K, et al. Deferoxamine alleviates osteoarthritis by inhibiting chondrocyte ferroptosis and activating the Nrf2 pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 791376.
- [21] 朱杰, 唐燧, 吴倩, 等. 低氧状态下骨细胞参与破骨细胞形成的作用机制研究 [J]. *华西口腔医学杂志*, 2019, 37(5): 463-468.
ZHU J, TANG Y, WU Q, et al. Mechanism of participation of osteocytes in the formation of osteoclasts under hypoxia [J]. *West Chin J Stomatol*, 2019, 37(5): 463-468.
- [22] 王开, 荆得宝, 于素平, 等. 模拟低氧对舌鳞癌 SCC-15 细胞系中 SOX2 和 OCT4 表达的影响 [J]. *第二军医大学学报*, 2017, 38(7): 891-896.
WANG K, JING D B, YU S P, et al. Effect of simulated hypoxia on expression SOX2 and OCT4 of tongue squamous cell

- carcinoma SCC-15cells [J]. Acad J Second Mil Med Univ, 2017, 38(7): 891-896.
- [23] CHEN S, FAN F, ZHANG Y, et al. Metabolites from scutellarin alleviating deferoxamine-induced hypoxia injury in BV2 cells cultured on microfluidic chip combined with a mass spectrometer [J]. Talanta, 2023, 259: 124478.
- [24] JONES R B, SILVA A D, ANKENBAUER K E, et al. Role of the ST6GAL1 sialyltransferase in regulating ovarian cancer cell metabolism [J]. Glycobiology, 2023, 33(8): 626-636.
- [25] TAJALI R, EIDI A, AHMADI TAFTI H, et al. Restoring the angiogenic capacity of the human diabetic adipose-derived mesenchymal stem cells primed with deferoxamine as a hypoxia mimetic agent; role of HIF-1 α [J]. Adv Pharm Bull, 2023, 13(2): 350-360.
- [26] HAO C, YOU J, QIU H, et al. Hypoxic preconditioning improves the survival and pro-angiogenic capacity of transplanted human umbilical cord mesenchymal stem cells *via* HIF-1 α signaling in a rat model of bronchopulmonary dysplasia [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2022, 605: 111-118.
- [27] CHEN R, AHMED M A, FORSYTH N R. Dimethyloxalylglycine (DMOG), a hypoxia mimetic agent, does not replicate a rat pheochromocytoma (PC12) cell biological response to reduced oxygen culture [J]. Biomolecules, 2022, 12(4): 541.
- [28] ZOU J, YANG J, ZHU X, et al. Stabilization of hypoxia-inducible factor ameliorates glomerular injury sensitization after tubulointerstitial injury [J]. Kidney Int, 2021, 99(3): 620-631.
- [29] SHAO W, LI Z, WANG B, et al. Dimethyloxalylglycine attenuates steroid-associated endothelial progenitor cell impairment and osteonecrosis of the femoral head by regulating the HIF-1 α signaling pathway [J]. Biomedicines, 2023, 11(4): 992.
- [30] CHEN M H, WANG Y H, SUN B J, et al. HIF-1 α activator DMOG inhibits alveolar bone resorption in murine periodontitis by regulating macrophage polarization [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 99: 107901.
- [31] ZIPPUSCH S, BESECKE K F W, HELMS F, et al. Chemically induced hypoxia by dimethyloxalylglycine (DMOG)-loaded nanoporous silica nanoparticles supports endothelial tube formation by sustained VEGF release from adipose tissue-derived stem cells [J]. Regen Biomater, 2021, 8(5): rba039.
- [32] CHEN L, HUANG X, CHEN H, et al. Hypoxia-mimicking scaffolds with controlled release of DMOG and PTHrP to promote cartilage regeneration *via* the HIF-1 α /YAP signaling pathway [J]. Int J Biol Macromol, 2023, 226: 716-729.
- [33] LIU Z Q, SHANG L L, GE S H. Immunomodulatory effect of dimethyloxalyl Glycine/nanosilicates-loaded fibrous structure on periodontal bone remodeling [J]. J Dent Sci, 2021, 16(3): 937-947.
- [34] ABU-SHAHBA A G, GEBRAAD A, KAUR S, et al. Proangiogenic hypoxia-mimicking agents attenuate osteogenic potential of adipose stem/stromal cells [J]. Tissue Eng Regen Med, 2020, 17(4): 477-493.
- [35] 许蜀闽, 王培勇, 马红英. 连二亚硫酸钠在建立培养细胞的无氧环境中的应用 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 359-360.
- XU S M, WANG P Y, MA H Y. Preparation of hypoxic surroundings with sodium dithionite for cell culture [J]. Acta Acad Med Mil Tertiae, 2005, 27(4): 359-360.
- [36] ZHAO R Z, JIANG S, RU N Y, et al. Comparison of hypoxic effects induced by chemical and physical hypoxia on cardiomyocytes [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2019, 97(10): 980-988.
- [37] 许瑞卿. 黄连素对体外培养脊髓神经细胞缺氧损伤所诱导自噬的影响 [D]. 银川: 宁夏医科大学, 2021.
- XU R Q. Effect of berberine on autophagy induced by hypoxia injury in cultured spinal cord neurons *in vitro* [D]. Yinchuan: Ningxia Medical University, 2021.
- [38] 王丹, 田春艳, 陈桂生, 等. 连二亚硫酸钠诱导 HT22 细胞缺氧复氧模型的制备 [J]. 宁夏医科大学学报, 2020, 42(10): 983-986.
- WANG D, TIAN C Y, CHEN G S, et al. Preparation of hypoxia-reoxygenation model in HT22 cells induced by sodium bisulfite [J]. J Ningxia Med Univ, 2020, 42(10): 983-986.
- [39] 孙晨, 戈胜, 宁夏青, 等. 连二亚硫酸钠诱导大鼠肝细胞氧化应激模型的建立 [J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(6): 2217-2223.
- SUN C, GE S, NING X Q, et al. Oxidative stress model of BRL-3A cells induced by sodium hydrosulfite [J]. Chin Anim Husb Vet Med, 2023, 50(6): 2217-2223.
- [40] CHU D, ZHANG Z. Trichosanthis pericarpium aqueous extract protects H9c2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury by regulating PI3K/Akt/NO pathway [J]. Molecules, 2018, 23(10): 2409.
- [41] 刘莉娜, 王红梅, 周建明, 等. 连二亚硫酸钠诱导 SY5Y 细胞缺糖缺氧模型及泽泻白术药对的作用观察 [J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18(3): 464-469.
- LIU L N, WANG H M, ZHOU J M, et al. Drug screening against damage of Na₂S₂O₄ induced SH-SY5Y cells by oxygen-glucose deprivation and effect of herb pair of Zexie-Baizhu [J]. Mod Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol, 2016, 18(3): 464-469.
- [42] 高莉, 彭晓明, 霍仕霞, 等. 类叶升麻苷对缺糖缺氧诱导 PC12 细胞损伤的保护作用 [J]. 中成药, 2015, 37(8): 1821-1823.
- GAO L, PENG X M, HUO S X, et al. Protective effect of *Cimicifuga*-like glycoside on PC12 cell injury induced by glucose deficiency and hypoxia [J]. Chin Tradit Pat Med, 2015, 37(8): 1821-1823.
- [43] 王丽丽, 赵建力, 刘保江. 舒芬太尼对培养大鼠乳鼠缺氧心肌细胞损伤保护作用的研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(1): 73-74.
- WANG L L, ZHAO J L, LIU B J. Protective effect of sufentanil on hypoxic myocardial cell injury in cultured neonatal rats [J].

- Chin J Integr Med Cardio /Cerebrovasc Dis, 2010, 8(1): 73-74.
- [44] 饶淑云, 钱之玉. 西红花酸对缺糖缺氧心肌细胞损伤的保护作用 [J]. 中草药, 2004, 35(4): 427-429.
- RAO S Y, QIAN Z Y. Cardioprotective effect of crocetin against low glucose and hypoxia injury in cultured rat cardiac myocytes [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2004, 35(4): 427-429.
- [45] 关付, 于波, 齐国先. 原代培养大鼠心肌细胞化学性缺氧模型的建立 [A]. 中华医学会心血管病学分会第八次全国心血管病学术会议汇编 [C]; 2006.
- GUAN F, YU B, QI G X. Establishment of a model of chemical hypoxia in primary cultured rat cardiomyocytes [A]. The 8th national academic conference on cardiovascular diseases of the cardiovascular branch of the Chinese medical association [C]; 2006.
- [46] 宋诚, 王纪田, 石拴霞, 等. 缺氧条件下 GC-1 细胞凋亡的作用机制研究 [J]. 生命科学研究, 2023, 27(6): 544-550, 564.
- SONG C, WANG J T, SHI S X, et al. Mechanism of apoptosis in GC-1 cells under hypoxic conditions [J]. Life Sci Res, 2023, 27(6): 544-550, 564.
- [47] 包春生, 高玉峰. 黑苏嘎-25 对缺氧诱导的神经干细胞增殖、凋亡及炎症反应的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(22): 5579-5583.
- BAO C S, GAO Y F. Effects of heisuga-25 on proliferation, apoptosis and inflammation of neural stem cells induced by hypoxia [J]. Chin J Gerontol, 2022, 42(22): 5579-5583.
- [48] 付承筑, 王天生, 王柏翔, 等. 缺氧条件下卡拉胶寡糖对肿瘤细胞迁移的影响 [J]. 中国食品添加剂, 2022, 33(9): 41-47.
- FU C Z, WANG T S, WANG B X, et al. Effects of carrageenan oligosaccharides on tumor cell migration under hypoxia [J]. Chin Food Addit, 2022, 33(9): 41-47.
- [49] 周圆, 王蒙, 王凌晨, 等. 肾衰 II 号方抑制 NLRP3 炎症小体改善慢性缺氧诱导 HK-2 细胞损伤的机制 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8): 4443-4448.
- ZHOU Y, WANG M, WANG L C, et al. Mechanism of Shen Shuai II Recipe attenuates chronic hypoxia-induced injury in HK-2 cell by inhibiting NLRP3 inflammasome [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2022, 37(8): 4443-4448.
- [50] 吴连连, 胡安康. 胰岛素样生长因子-1 预处理对原代心肌细胞缺氧损伤的保护作用 [J]. 生物化工, 2022, 8(4): 66-69.
- WU L L, HU A K. Protective effect of insulin-like growth factor-1 pretreatment on hypoxic injury of primary myocardial cells [J]. Biol Chem Eng, 2022, 8(4): 66-69.
- [51] WANG Q, WANG P, QIN Z, et al. Altered glucose metabolism and cell function in keloid fibroblasts under hypoxia [J]. Redox Biol, 2021, 38: 101815.
- [52] LI Q, HONG Y, CHEN J, et al. Hypoxia-induced HIF-1 α expression promotes neurogenic bladder fibrosis via EMT and pyroptosis [J]. Cells, 2022, 11(23): 3836.
- [53] YANG Y, CHEN C, ZUO Q, et al. NARF is a hypoxia-induced coactivator for OCT4-mediated breast cancer stem cell specification [J]. Sci Adv, 2022, 8(49): eabo5000.
- [54] 任萍, 曹俊岭, 林珀吏, 等. 基于分子对接技术探讨木犀草素调控脂氧合酶途径抗 H9c2 心肌细胞缺氧缺糖/复氧复糖损伤的分子机制 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5665-5673.
- REN P, CAO J L, LIN P L, et al. Molecular mechanism of luteolin regulating lipoxygenase pathway against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in H9c2 cardiomyocytes based on molecular docking [J]. Chin J Chin Mater Med, 2021, 46(21): 5665-5673.
- [55] 聂芳, 李可, 王媛, 等. TTC36 蛋白在缺氧复氧诱导的肝脏缺血再灌注损伤中的表达 [J]. 川北医学院学报, 2021, 36(7): 832-835, 845.
- NIE F, LI K, WANG Y, et al. Expression of TTC36 protein in liver ischemia-reperfusion injury induced by hypoxia-reoxygenation [J]. J N Sichuan Med Coll, 2021, 36(7): 832-835, 845.
- [56] 牛其芳, 李德龙, 杨杨, 等. 人血管内皮细胞缺氧复氧损伤细胞模型的建立 [J]. 中国口腔颌面外科杂志, 2019, 17(4): 295-299.
- NIU Q F, LI D L, YANG Y, et al. Establishment of human vascular endothelial hypoxia/reoxygenation injury cell model [J]. Chin J Oral Maxillofac Surg, 2019, 17(4): 295-299.
- [57] LI C, SUI C, WANG W, et al. Baicalin attenuates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced injury by modulating the BDNF-TrkB/PI3K/Akt and MAPK/Erk1/2 signaling axes in neuron-astrocyte cocultures [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 599543.
- [58] LIU Y, LUAN Y, GUO Z, et al. Periostin attenuates oxygen and glucose deprivation-induced death of mouse neural stem cells via inhibition of p38 MAPK activation [J]. Neurosci Lett, 2022, 774: 136526.
- [59] 杨辉, 侯琼琼, 易健, 等. 补脑 I 号联合骨髓间充质干细胞对缺氧缺糖脑微血管内皮细胞损伤 VEGF/ICAM-1 表达的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(9): 5482-5486.
- YANG H, HOU Q Q, YI J, et al. Effects of brain tonic I combined with bone marrow mesenchymal stem cells on the expression of VEGF and ICAM-1 in cerebral microvascular endothelial cells damaged by hypoxia and hypoglycemia [J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(9): 5482-5486.
- [60] 蒋邦治, 唐永刚, 韩志安, 等. LncRNA BDNF-AS 靶向 miR-765 影响缺氧缺糖诱导的 PC12 细胞神经损伤的实验研究 [J]. 河北医药, 2022, 44(20): 3075-3078, 3083.
- JIANG B Z, TANG Y G, HAN Z A, et al. Experimental study of LncRNA BDNF-AS targeting miR-765 to affect PC12 cell nerve damage induced by hypoxia and glucose deprivation [J]. Hebei Med J, 2022, 44(20): 3075-3078, 3083.
- [61] 杨春澜, 孟祥武, 郑龙, 等. 大黄素通过 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻缺糖/缺氧对小胶质细胞的损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(12): 2285-2289.

- YANG C L, MENG X W, ZHENG L, et al. Emodin reduces hypoglycemia/hypoxia-induced injury of microglia by TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(12): 2285–2289.
- [62] 李钰佳, 李定祥, 彭珣, 等. 基于 AMPK/mTOR/ULK1 自噬相关通路探讨左归降糖通脉方对 AGEs 合并缺糖缺氧星形胶质细胞炎性损伤的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(16): 90–99.
- LI Y J, LI D X, PENG X, et al. Effects of Zuogui Glucose Reducing and Tongwei Formula on inflammatory injury of AGEs combined with glucose and hypoxia astrocytes based on AMPK/mTOR/ULK1 autophagy-related pathway [J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(16): 90–99.
- [63] YUAN Y, ZHAI Y, CHEN J, et al. Kaempferol ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced neuronal ferroptosis by activating Nrf2/SLC7A11/GPX4 axis [J]. Biomolecules, 2021, 11(7): 923.
- [64] HU Z, YUAN Y, ZHANG X, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell-derived exosomes attenuate oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced microglial pyroptosis by promoting FOXO3a-dependent mitophagy [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6219715.
- [65] ZENG X, ZHANG Y D, MA R Y, et al. Activated Drp1 regulates p62-mediated autophagic flux and aggravates inflammation in cerebral ischemia-reperfusion *via* the ROS-RIP1/RIP3-exosome axis [J]. Mil Med Res, 2022, 9(1): 25.
- [66] CHEN C, CHEN W, ZHOU X, et al. Hyperbaric oxygen protects HT22 cells and PC12 cells from damage caused by oxygen-glucose deprivation/reperfusion *via* the inhibition of Nrf2/System Xc-/GPX4 axis-mediated ferroptosis [J]. PLoS One, 2022, 17(11): e0276083.
- [67] LIU X J, LV Y F, CUI W Z, et al. Icaritin inhibits hypoxia/reoxygenation-induced ferroptosis of cardiomyocytes *via* regulation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. FEBS Open Bio, 2021, 11(11): 2966–2976.
- [68] 宋海岩, 连辉, 张毅敏, 等. 低氧诱导因子对缺氧缺糖诱导的心肌细胞损伤模型中自噬的调控作用 [J]. 中国临床解剖学杂志, 2018, 36(4): 419–422.
- SONG H Y, LIAN H, ZHANG Y M, et al. The regulation of hypoxic induced factor on autophagy of myocardial cells in oxygen-glucose deprivation model [J]. Chin J Clin Anat, 2018, 36(4): 419–422.
- [69] LOLMÈDE K, DURAND DE SAINT FRONT V, GALITZKY J, et al. Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes [J]. Int J Obes Relat Metab Disord, 2003, 27(10): 1187–1195.
- [70] ZAPATA-MORALES J R, GALICIA-CRUZ O G, FRANCO M, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) protein diminishes sodium glucose transport 1 (SGLT1) and SGLT2 protein expression in renal epithelial tubular cells (LLC-PK1) under hypoxia [J]. J Biol Chem, 2014, 289(1): 346–357.
- [71] JING X, YANG F, SHAO C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 157.
- [72] WANG B, LI Z L, ZHANG Y L, et al. Hypoxia and chronic kidney disease [J]. EBioMedicine, 2022, 77: 103942.
- [73] MOHAMMAD OMAR J, HAI Y, JIN S. Hypoxia-induced factor and its role in liver fibrosis [J]. PeerJ, 2022, 10: e14299.
- [74] BAO Q, ZHANG B, SUO Y, et al. Intermittent hypoxia mediated by TSP1 dependent on STAT3 induces cardiac fibroblast activation and cardiac fibrosis [J]. eLife, 2020, 9: e49923.
- [75] DUSCHER D, NEOFYTOS E, WONG V W, et al. Transdermal deferoxamine prevents pressure-induced diabetic ulcers [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(1): 94–99.
- [76] 刘金学. MiR-126 在缺氧—酸中毒诱导的心肌细胞凋亡和血管内皮炎症中的作用 [D]. 广州: 南方医科大学, 2023.
- LIU J X. Role of miR-126 in myocardial cell apoptosis and vascular endothelial inflammation induced by hypoxia-acidosis [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2023.
- [77] 林文波. 渗透压和 Ca²⁺ 调控椎间盘髓核细胞中 CCN2/CTGF 的表达和机制研究 [D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2019.
- LIN W B. Osmotic pressure and Ca²⁺ regulate the expression and mechanism of CCN2/CTGF in nucleus pulposus cells of intervertebral disc [D]. Shanghai: Chinese People's Liberation Army Navy Military Medical University, 2019.

[收稿日期]2024-04-15