

刘佳, 张小玉, 张依曼, 等. 不同内参蛋白在急性高原缺氧诱导肺损伤中的表达变化及选择 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(3): 90-99, 146.

Liu J, Zhang XY, Zhang YM, et al. Expression changes and selection of different internal control proteins in acute hypoxia-induced lung injury by acute high-altitude [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(3): 90-99, 146.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.03.009

不同内参蛋白在急性高原缺氧诱导肺损伤中的表达变化及选择

刘 佳^{1,2}, 张小玉^{1,2}, 张依曼^{1,2}, 王 飞^{2,3}, 来宝长², 张 俊^{2,5}, 乌仁塔娜⁴,
郑晓晖³, 田红燕¹, 殷 倩^{1,2*}

(1. 西安交通大学第一附属医院周围血管科, 西安 710061; 2. 西安交通大学心血管研究中心, 西安 710061;
3. 西北大学生命科学学院, 陕西省创新药物研究中心, 陕西省生物医药重点实验室, 西安 710069;
4. 青海大学医学院高原医学研究中心, 高原医学应用重点实验室, 西宁 810001;
5. 西安交通大学第一附属医院健康医学科, 西安 710061)

【摘要】 目的 应用免疫印记实验 (Western blot) 评价急性高原缺氧诱导肺损伤模型组织和细胞的内参蛋白变化及选择。**方法** 本文应用 C57BL/6J 小鼠置于低压低氧大舱模拟 6000 m 海拔进行缺氧 8 h、24 h 和 72 h 建立高原肺损伤模型, 苏木素-伊红 (HE) 染色明确高原肺损伤模型的成功建立; Western blot 检测内参蛋白粘着斑蛋白 (vinculin)、 α -微管蛋白 (α -tubulin)、真核翻译起始因子 5 (eukaryotic translation initiation factor 5, EIF5)、 β -肌动蛋白 (β -actin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的表达, 并应用考马斯亮蓝染色检测总蛋白的表达。体外实验应用支气管上皮细胞 (bronchial epithelial cell, BEAS-2B) 和内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 进行缺氧诱导损伤模型的建立, TUNEL 染色明确细胞损伤模型的成功建立; Western blot 检测不同内参蛋白表达, 并应用考马斯亮蓝染色检测总蛋白的表达。**结果** 在成功建立急性高原缺氧 8 h、24 h 和 72 h 模型的基础上, 总蛋白表达量一致, 内参蛋白 vinculin、 α -tubulin、EIF5 和 β -actin 表达量一致, GAPDH 表达量在低压低氧 8 h、24 h 和 72 h 组较常氧组升高, 其中低压低氧 72 h 组表达量较常氧组显著升高。在成功建立 BEAS-2B 和 HUVECs 缺氧 8 h、24 h 和 48 h 的基础上, 总蛋白表达量一致, BEAS-2B 内参蛋白 β -actin 和 GAPDH 和常氧组表达量一致, 在缺氧 24 h 组 vinculin、 α -tubulin、EIF5 较常氧组表达明显下降; HUVECs 内参蛋白 vinculin 和 α -tubulin 和常氧组表达量一致, 在缺氧 8 h 后 EIF5、 β -actin 和 GAPDH 较常氧组表达明显下降, 缺氧 48 h 后表达增高。**结论** 急性高原缺氧诱导肺组织损伤, 进行 Western blot 时内参蛋白 vinculin、 α -tubulin、EIF5 和 β -actin 的表达稳定, 可作为内参选择; 体外应用肺组织最主要的 BEAS-2B 和 HUVECs 等细胞诱导缺氧损伤模型, Western blot 检测内参蛋白 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH 的表达量在缺氧后皆有所变化, 选择总蛋白作为内参更为合适。

【关键词】 高原缺氧; 肺损伤; 内参蛋白; 总蛋白

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 03-0090-10

【基金项目】 西安交通大学第一附属医院院基金 (2023GYZX02, 2018QN-04); 西安交通大学基本科研项目 (xzy012023131)。

【作者简介】 刘佳 (1994—), 女, 本科, 助理实验师, 研究方向: 低氧诱导的心血管损伤。E-mail: liujia20200820@163.com

【通信作者】 殷倩 (1987—), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 缺血及低压低氧诱导心血管损伤的组织修复机制及药物研发。

E-mail: yinqian610@xjtu.edu.cn

Expression changes and selection of different internal control proteins in acute hypoxia-induced lung injury by acute high-altitude

LIU Jia^{1,2}, ZHANG Xiaoyu^{1,2}, ZHANG Yiman^{1,2}, WANG Fei^{2,3}, LAI Baochang², ZHANG Jun^{2,5}, WUREN Tana⁴, ZHENG Xiaohui³, TIAN Hongyan¹, YIN Qian^{1,2*}

- (1. Department of Peripheral Vascular, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China. 2. Cardiovascular Research Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061. 3. the College of Life Sciences, Provincial Center for Research Innovative Drugs, Provincial Key Laboratory of Biomedicine, Northwest University, Xi'an 710069. 4. Key Laboratory of Plateau Medicine of Ministry of Education, Plateau Medicine Research Center, Qinghai University, Qinghai Key Laboratory of Plateau Medicine Application Foundation, Xining 810001. 5. Department of Health Medicine, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061)

【Abstract】 Objective The pathophysiological process of acute high-altitude hypoxia-induced lung injury affects protein expression levels, which are mainly evaluated by Western blot. No systematic study has investigated changes in internal control proteins as calibration loading amounts. **Methods** Lung injury at an altitude of 6000 m was induced in a low-pressure, low-oxygen chamber for 8, 24, and 72 h using C57BL/6J mice. Establishment of the model was confirmed by hematoxylin and eosin staining. Expression levels of various internal control proteins, including vinculin, α -tubulin, eukaryotic translation initiation factor 5 (EIF5), β -actin, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were detected by Western blot, and total protein expression was detected by Coomassie blue staining. Furthermore, the lung injury model *in vitro* was established by using Bronchial epithelial cell (BZAS-2B) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) confirmed by TUNEL staining. Expression levels of internal control proteins were detected by Western blot, and total protein expression was detected by Coomassie Blue staining. **Results** Acute 8, 24, and 72 h hypoxic models were successfully established in lung tissue, demonstrating consistent total protein expression and stable levels of the internal reference proteins vinculin, α -tubulin, EIF5, and β -actin. GAPDH expression was elevated in the HH8 h, HH24 h, and HH72 h groups compared with the normoxia (Nor) group, but only the increase at HH72 h groups was significant. Similarly, 8, 24, and 48 h hypoxic models were successfully established in BEAS-2B cells and HUVECs, with consistent total protein expression. In BEAS-2B cells, expression levels of the internal reference proteins β -actin and GAPDH were consistent with the normoxic control (NC) group, while vinculin, α -tubulin, and EIF5 expression levels were significantly reduced under hypoxic conditions for up to 24 h. In HUVECs, vinculin and α -tubulin expression levels were also consistent with the NC group, while EIF5, β -actin, and GAPDH expression levels were significantly reduced at 8 h and increased at 48 h. **Conclusions** Acute hypoxia induces lung tissue injury, and protein expression levels of the internal reference proteins vinculin, α -tubulin, EIF5, and β -actin are stable, making them suitable internal references for Western blot. Additionally, Western blot detected differential expression levels of the internal reference proteins vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, and GAPDH in BEAS-2B cells and HUVECs, as the most important *in vitro* lung tissue models of hypoxia-induced injury.

【Keywords】 high-altitude hypoxia; lung injury; internal control protein; total protein

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

急性高原环境下由于氧分压降低引发低压缺氧,肺作为氧气/二氧化碳交换的关键器官,其功能状态直接影响着机体的氧合能力。急性高原肺损伤主要有肺血管收缩、肺水肿和炎症反应的形成等表现,不仅加剧了缺氧状态,还可能引

发严重的呼吸功能障碍甚至危及生命^[1-2]。因此,研究急性高原缺氧诱导的肺损伤对于了解高原环境对人体呼吸系统的影响、开发新的预防及治疗策略具有至关重要的意义。

研究急性高原肺损伤通常应用小鼠、大鼠和

高原鼠兔等建立动物模型,同时也可用支气管上皮细胞^[3]、肺泡上皮细胞^[4]、人脐静脉内皮细胞^[5]和肺成纤维细胞等细胞模型。在研究急性高原诱导的肺损伤及其相关分子机制时,研究蛋白质水平的表达变化至关重要,如缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)^[6]、核因子(红细胞衍生 2)相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2 related factor 2, Nrf2)调控的抗氧化因子血红素加氧酶 1(heme oxygenase-1, HO-1)^[7]、凋亡相关蛋白(如 Bax、Bcl-2)^[8]、炎症介质^[2]等在缺氧肺损伤中的蛋白表达改变参与其机制的调控和药物靶点的开发。目前检测蛋白质表达的方法有蛋白免疫印迹(Western blot)、免疫组织化学与免疫荧光、酶联免疫吸附试验(ELISA)、流式细胞术(FCM)及质谱分析(mass spectrometry)等^[9]。Western blot 因其且操作简单、实验费用较低、可重复性强等特点,使其在蛋白质丰度、翻译后变化及蛋白质相互作用等方面有广泛的应用,并用于分析复杂蛋白质样品中的特定靶蛋白^[10]。

在 Western blot 实验中,内参蛋白作为实验上样量的参照标准,也通常用于归一化以校正不均匀的样品上样量,但其表达水平可能因细胞类型和处理而异^[10]。目前常用的内参蛋白有粘着斑蛋白(vinculin)、 α 微管蛋白(α -tubulin)、真核翻译起始因子 5(eukaryotic translation initiation factor 5, EIF5)、 β 肌动蛋白(β -actin)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)等。ZHAO 等^[11]在高原肺损伤研究中选用 GAPDH 作为内参蛋白,CAI 等^[12]在高原肺损伤研究中选用 GAPDH 作为内参蛋白,在 PMVEC 缺氧研究中 α -tubulin 作为内参蛋白。越来越多的研究表明内参蛋白可能在动物和实验模型中差异表达^[13]。目前在高原缺氧环境下由于细胞代谢和信号转导途径的改变,传统内参蛋白 GAPDH 的表达增高 3~4 倍^[14]。然而,目前仍无对急性高原肺损伤中内参蛋白选择的系统研究,因此,本文通过 Western blot 检测不同内参蛋白在急性高原缺氧诱导肺损伤、不同肺细胞缺氧损伤模型中的表达变化,并以总蛋白进行系统校正,以明确在急性高原缺氧诱导肺损伤中内参蛋白选择,为更多的急性高原肺损伤的机制研究和药物开发提供蛋白表达研究的基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

选取 32 只 8 周龄 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠,体质量 20~25 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006]。小鼠饲养期间,恒温在 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度为 40%~60%,明暗交替时间 12 h/12 h,每笼(塑料小鼠笼,长 $\times$ 宽 $\times$ 高:403 mm $\times$ 165 mm $\times$ 175 mm)饲养 3 只小鼠,自由采食和饮水,所有器材、垫料、饲料等均在使用前进行高压灭菌处理,饲养于西安交通大学动物中心 SPF 级屏障[SYXK(陕)2023-004]。所有实验操作符合动物福利、动物实验伦理要求及 3R 原则,并通过西安交通大学生物医学伦理委员会审查批准后施行(XJTUAE2024-1931)。

1.1.2 细胞

BEAS-2A 细胞购自武汉赛奥斯生物科技有限公司,编号 CL-016h;HUVES 细胞由西安交通大学心血管研究中心实验室保存。

1.2 主要试剂与仪器

牛血清白蛋白(MP Biomedicals, FC0077); M199 (Gibco, 31100019); DMEM (Gibco, 2090482); TUNEL(碧云天, C1090); 脱脂奶粉(美国 BD 公司, 232100); 1 $\times$ PBS(Servicebio, G0002); RIPA 裂解液(Servicebio, G2002); 20 $\times$ TBST(Coolaber, SL13271); 青霉素(VWR LIFESCIENCE, 113-98-4); 链霉素(Sigma-Aldrich, V900929); 考马斯亮蓝 G250(沃凯生物, D10828); BCA 蛋白质测定试剂盒(Thermo Pierce, 23225); 多聚甲醛(Coolaber, SL18301-500 mL); 伊红染液(Servicebio, G1005-2); 苏木素染液(Servicebio, G1005-1); anti-vinculin rabbit pAb(Servicebio, GB111328-100); EIF5 抗体(C-14)(Santa Cruz Biotechnology, sc-282); β -actin(C4)(Santa Cruz Biotechnology, sc-47778); Anti-GAPDH mouse mAb(Servicebio, GB12002-100); α -tubulin(DM1A) mouse mAb(Cell Signaling, 3873T); 增强型 ECL 化学发光试剂盒(Vazyme, E411-04); 0.5 mmol/L Tris HCl pH = 6.8(Proandy, 10157-2); 1.5 mol/L Tris HCl pH = 8.8(Proandy, 10152-2); 30% Acr-

Bis(Proandy, 10149-2)。

石蜡切片机(Thermo Fisher Scientific, 美国);全自动数字切片扫描仪(Pannoramic, 匈牙利);荧光显微镜(ZERSS, 德国);低压低氧高原舱(中航风雷, 中国);生物安全柜(Thermo Fisher Scientific, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠急性高原缺氧模型建立

所有实验小鼠采用随机数字表法,将小鼠分组为常氧(normoxia, Nor)组、低压低氧 8 h(hyperoxic-hypoxic 8 h, HH8 h)组、低压低氧 24 h(hyperoxic-hypoxic 24 h, HH24 h)组和低压低氧 72 h(hyperoxic-hypoxic 72 h, HH72 h)组,每组 8 只。将常氧组的 8 只小鼠放在海拔 400 m 的西安交通大学 SPF 级动物实验室饲养,将低压低氧各组的 24 只小鼠放在青海大学高原医学中心低压低氧舱内饲养,模拟海拔为 6000 m。小鼠组织标本采集在海拔 4000 m 低压低氧舱内进行,避免进一步复氧对蛋白表达的影响,步骤如下:称重后用 1%戊巴比妥钠,按照 5 μ L/g 小鼠体质量的剂量,进行腹腔注射麻醉,打开胸腔后剪开左心耳,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 1 $\times$ PBS 灌注右心室,将右肺取出液氮冻存用于 Western blot,左肺置于 4%多聚甲醛中固定留作组织染色。

1.3.2 BEAS-2B 和 HUVECs 进行缺氧损伤模型的建立

BEAS-2B 和 HUVECs 复苏后,进行细胞传代,待细胞融合度达到 80~90%,细胞置于 1% O_2 、5% CO_2 的缺氧舱中,BEAS-2B 分为常氧对照组(normoxic control group, NC group)、缺氧 8 h(hypoxic 8 h, H8 h)、缺氧 24 h(hypoxic 24 h, H24 h),HUVECs 分为常氧对照(normoxic control group, NC)组、缺氧 8 h(hypoxic 8 h, H8 h)、缺氧 24 h(hypoxic 24 h, H24 h)和缺氧 48 h(hypoxic 48 h, H48 h)组,缺氧培养后用 RIPA 裂解液进行裂解,进行 Western blot。

1.3.3 苏木素-伊红(HE)染色

应用肺组织进行梯度脱水、包埋、切片、脱蜡、二甲苯中脱蜡 5 min $\times$ 2 次,无水乙醇 5 min $\times$ 2 次,95%乙醇 2 min $\times$ 2 次,70%乙醇 2 min,50%乙醇 2 min,30%乙醇 2 min,蒸馏水 2 min。苏木素染色 3 min,蒸馏水漂洗洗去浮色,用流水冲洗 5

min,1%盐酸酒精分化 5 s,再次用流水冲洗 5 min。30%乙醇 2 min,50%乙醇 2 min,70%乙醇 2 min,95%乙醇 2 min,伊红染色 3 min,无水乙醇 5 min $\times$ 2 次,二甲苯 5 min $\times$ 2 次,最后用中性树胶封片。

1.3.4 TUNEL 染色

BEAS-2B 和 HUVECs 缺氧结束,应用 1 $\times$ PBS 洗涤细胞 1 次,4%多聚甲醛固定 30 min 后,1 $\times$ PBS 洗涤 1 次。0.3% Triton X-100 室温孵育 5 min 后,1 $\times$ PBS 洗涤两次。参照说明书配制适当量的 TUNEL 检测液,用 TUNEL 检测液覆盖细胞样本,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 90 min 后,1 $\times$ PBS 洗涤 1 次,hoechst 室温孵育 10 min,用 1 $\times$ PBS 洗涤 2 次,最后应用荧光显微镜观察并拍照,Image J 1.64 g 软件进行统计。

1.3.5 Western blot

在 RIPA 裂解液裂解肺组织,研磨仪 60 HZ 研磨 60 s,冰上静置 10 min。在 4 $^{\circ}$ C 以 12 000 r/min 离心分离上清液 15 min,并使用 BSA 作为标准的 BCA 蛋白质测定试剂盒检测总蛋白质浓度。将蛋白样品与 5 $\times$ 上样缓冲液混合,金属浴 96 $^{\circ}$ C 中变性 10 min,后冷却并储存在 -80 $^{\circ}$ C 备用。每个样品上样 40 μ g 用 10% SDS-PAGE 凝胶分离,并在电泳条件下(400 mA, 1.5 h)转移到 PVDF 膜中。其后用 1 $\times$ TBST 洗至 PVDF 膜无色,在含有 5%脱脂奶粉中封闭膜 1 h。4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗 viculin(1:1000 稀释度)、 α -tubulin(1:1000 稀释度)、EIF5(1:2000 稀释度)、 β -actin(1:1000 稀释度)和 GAPDH(1:500 稀释度)。1 $\times$ TBST 洗膜 8 min,共 4 次,室温孵育过氧化物酶偶联兔抗小鼠二抗(1:8000 稀释度)、羊抗兔二抗(1:2000 稀释度)1 h。1 $\times$ TBST 洗膜 8 min,共 4 次,并进行发光及胶片扫描。

1.3.6 考马斯亮蓝染色

每个样品上样 20 μ g(Western blot 对应上样顺序)进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将凝胶置于考马斯亮蓝溶液(0.25% G250,45%甲醇,10%冰乙酸)中室温孵育 60 min,并在脱色溶液(8%冰乙酸,25%甲醇)中脱色过夜,最后应用双蒸水洗涤,并进行图像采集。

1.4 统计学方法

应用 Image J 1.64 g 软件对条带进行定量统

计。所有数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。应用 GraphPad Prism 8.0 进行统计处理。单因素方差分析对低氧不同时间进行统计学评价, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 急性高原缺氧诱导肺损伤模型的建立

HE 染色显示常氧组小鼠肺组织结构完整,肺泡结构清晰、排列整齐,且大小正常,肺泡壁间隔未有增厚,未见炎性细胞浸润。低压低氧损伤 8 h 后,不同时间组肺组织出现不同程度的急性损伤,可观察到肺泡间隔增厚,肺泡腔变小且排列紊乱、结构塌陷,同时可见大量炎性细胞浸润,以低压低氧 24~72 h 损伤程度较为严重(图 1)。

2.2 急性高原缺氧诱导损伤的肺组织中不同内参蛋白 Western blot 分析和总蛋白水平

小鼠于 6000 m 海拔的低压低氧舱 8 h、24 h 和 72 h,4000 m 海拔收集肺组织进行 Western blot。结果显示急性高原诱导损伤的肺组织中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin 和 GAPDH 的蛋白表达水平(图 2)。内参蛋白 vinculin、 α -tubulin、EIF5 和 β -actin 在不同气压低氧条件下表达水平无统计学意义,在低压低氧 72 h 后肺组织中 GAPDH 的蛋白水平较常氧组显著升高($P<0.05$)。进一步,在 Western blot 电泳时对应上样并进行考马斯亮蓝总蛋白染色以校正上样量,结果显示不同急性高原缺氧诱导肺损伤模型的肺组织中总蛋白表达一致。并应用总蛋白对图 2 中各内参蛋白表达量统计的校正。

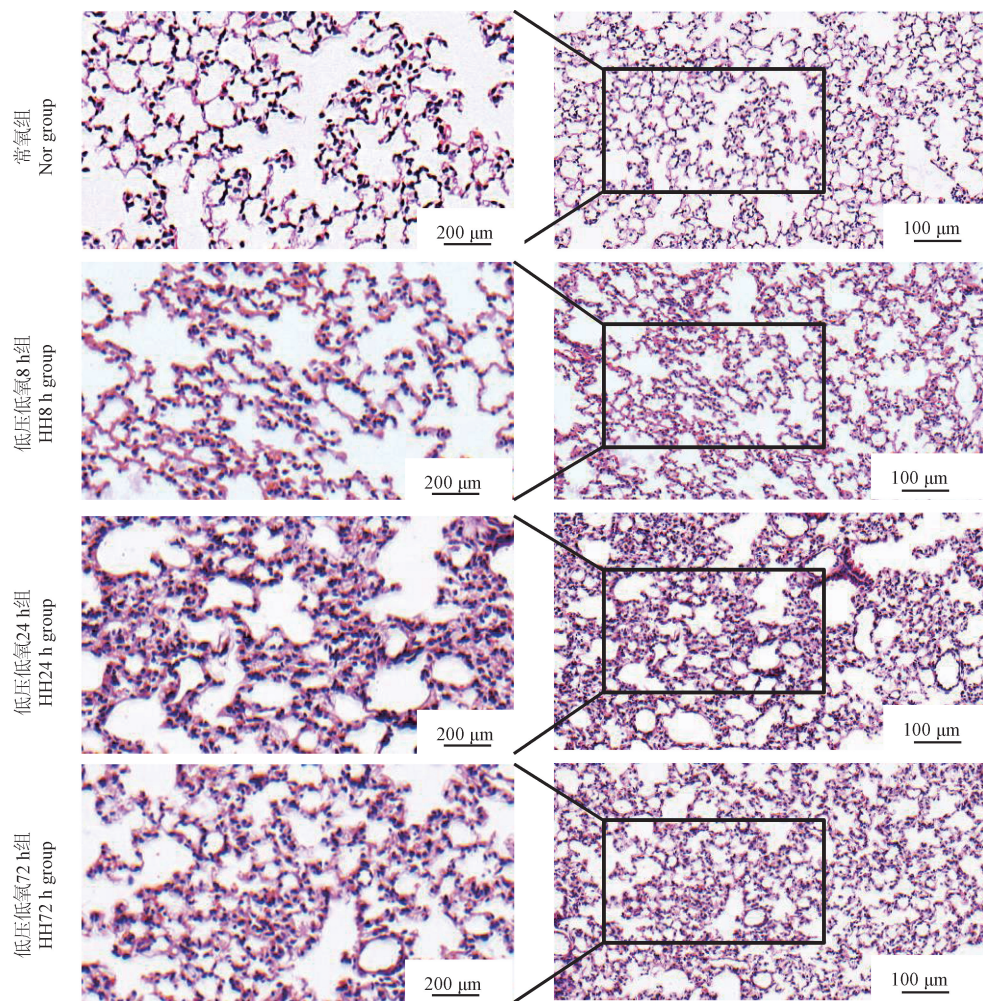
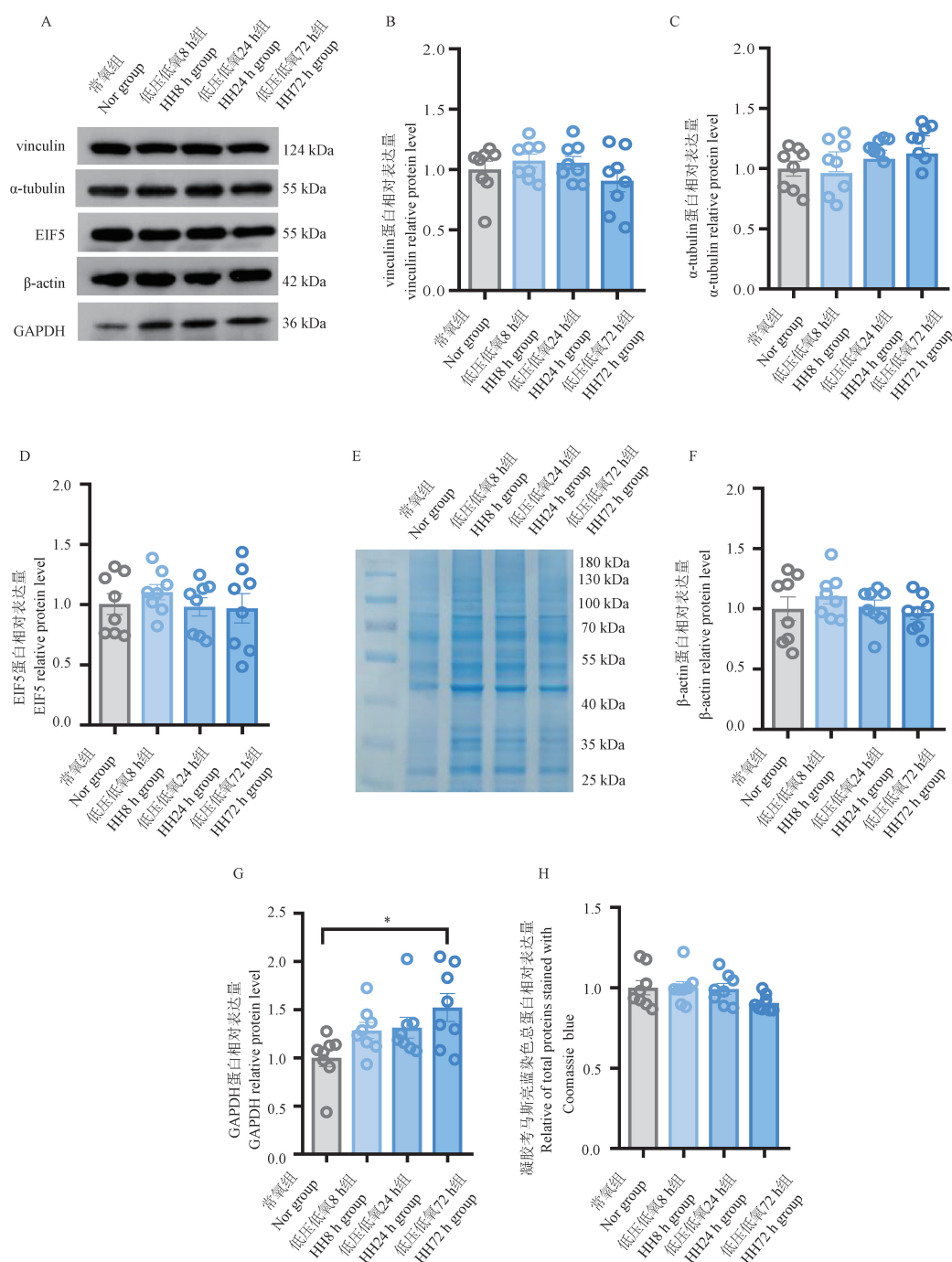


图 1 低压低氧诱导的损伤肺组织 HE 染色

Figure 1 HE staining of lung tissue induced by hypobaric-hypoxia



注:A:Western blot 检测肺组织中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin 和 GAPDH 蛋白表达;B:vinculin 蛋白表达水平;C: α -tubulin 蛋白表达水平;D: EIF5 蛋白表达水平;E:总蛋白凝胶考马斯亮蓝染色图像;F: β -actin 蛋白表达水平;J:GAPDH 蛋白表达水平;H:凝胶考马斯亮蓝染色总蛋白的定量分析。与常氧组相比, * $P < 0.05$ 。

图 2 低压低氧诱导的损伤肺组织中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH 蛋白表达和总蛋白水平

Note. A, Protein expressions of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, and GAPDH in mouse lung tissue under hypobaric-hypoxic conditions were detected by Western blot. B, Relative level of vinculin protein. C, Relative level of α -tubulin protein. D, Relative level of EIF5 protein. E, Image of total proteins stained with Coomassie blue on gel. F, Relative level of GAPDH protein. J, Relative level of β -actin protein. H, Quantitative analysis of total proteins stained with Coomassie brilliant blue on gel. Compared with Nor group, * $P < 0.05$.

Figure 2 Protein expression of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH and total protein in injury lung tissue induced by hypobaric-hypoxia

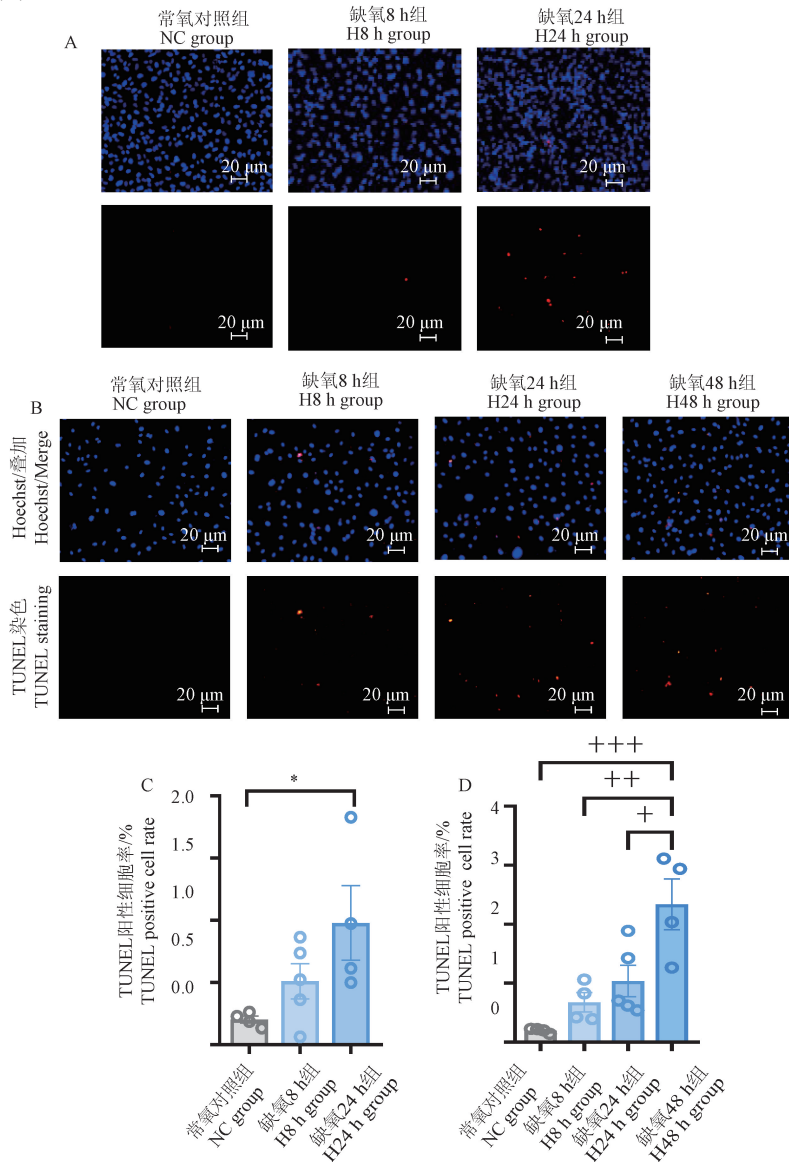
2.3 BEAS-2B 和 HUVCEs 细胞缺氧模型的建立

HUVECs 用 1% O_2 、5% CO_2 条件缺氧 12 h、24 h 和 48 h, BEAS-2B 应用 1% O_2 、5% CO_2 条件缺氧 12 h、24 h 诱导细胞损伤模型, (HUVCEs 单独缺氧), 应用 TUNEL 染色检测细胞凋亡, 结果显示低氧条件下 BEAS-2B 和 HUVCEs 凋亡细胞显著增加 ($P<0.05$), 提示缺氧损伤 BEAS-2B 和

HUVCEs 细胞模型的成功建立(图 3)。

2.4 缺氧诱导损伤 BEAS-2B 和 HUVCEs 细胞模型中不同内参蛋白 Western blot 分析和总蛋白水平

通过 Western blot 检测缺氧诱导损伤 BEAS-2B 和 HUVCEs 细胞模型中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin 和 GAPDH 的蛋白表达水平(图 4)。BEAS-2B 缺氧模型内参蛋白 β -actin 和 GAPDH

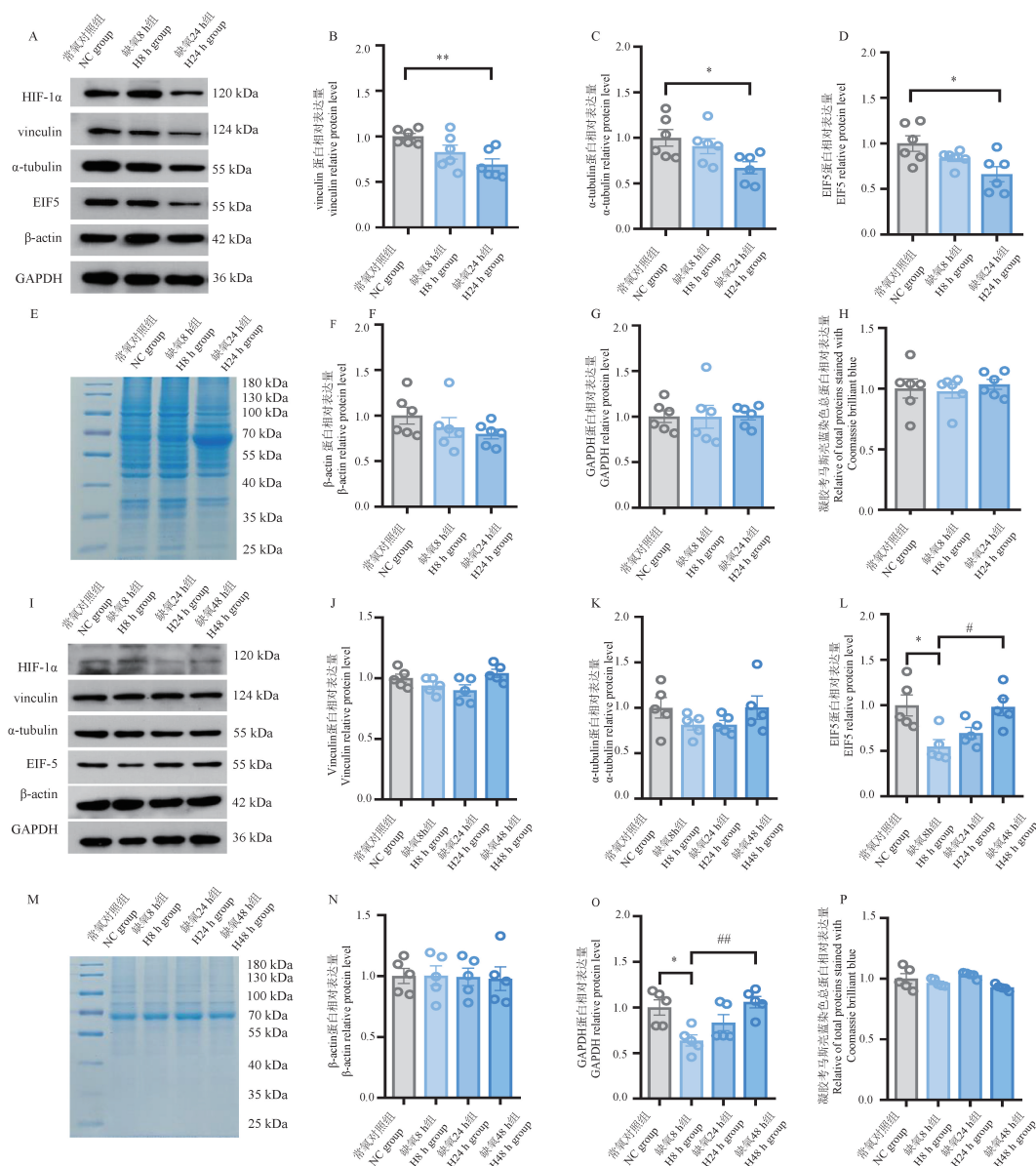


注:A; BEAS-2B 不同时间缺氧后的细胞凋亡 TUNEL 染色; B; HUVCEs 不同时间缺氧后的细胞凋亡 TUNEL 染色; C; BEAS-2B 不同时间缺氧后 TUNEL 阳性细胞率统计结果; D; HUVCEs 不同时间缺氧后 TUNEL 阳性细胞率统计结果。与常氧对照组相比, * $P<0.05$; 与缺氧 48 h 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 3 缺氧诱导 BEAS-2B 和 HUVCEs 细胞损伤模型的建立

Note. A, TUNEL staining of BEAS-2B cells suffering hypoxia at different time point. B, TUNEL staining of HUVCEs suffering hypoxia at different time point. C, TUNEL positive rate of BEAS-2B cells suffering hypoxia at different time point. D, TUNEL positive rate of HUVCEs cells suffering hypoxia at different time point. Compared with NC group, * $P<0.05$. Compared with H48 h group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 3 Establishment of a hypoxia-induced damage model in BEAS-2B and HUVCEs



注:A:Western blot 检测缺氧诱导 BEAS-2B 细胞中蛋白表达;B~D:vinculin、 α -tubulin、EIF5 的蛋白表达统计结果;E:总蛋白凝胶考马斯亮蓝染色图像;F~G: β -actin 和 GAPDH 的蛋白表达统计结果;H:凝胶考马斯亮蓝染色总蛋白的定量分析;I:Western blot 检测缺氧诱导 HUVECS 中蛋白表达;J~L:vinculin、 α -tubulin、EIF5 的蛋白表达统计结果;M:总蛋白凝胶考马斯亮蓝染色图像;N~O: β -actin 和 GAPDH 的蛋白表达统计结果;P:凝胶考马斯亮蓝染色总蛋白的定量分析。与常氧对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与缺氧 8 h 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 4 缺氧诱导的损伤 BEAS-2B 和 HUVCES 中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH 蛋白表达和总蛋白水平
Note. A, Protein expressions in BEAS-2B under hypoxic conditions were detected by Western blot. B~D, Relative level of vinculin, α -tubulin, and EIF5. E, Image of total proteins stained with Coomassie brilliant blue on gel. F~G, Relative level of β -actin, and GAPDH. H, Quantitative analysis of total proteins stained with Coomassie brilliant blue on gel. I, Protein expressions in HUVCES under hypoxic conditions were detected by Western blot. J~L, Relative level of vinculin, α -tubulin, and EIF5. M, Image of total proteins stained with Coomassie brilliant blue on gel. N~O, Relative level of β -actin, and GAPDH. P, Quantitative analysis of total proteins stained with Coomassie blue on gel. Compared with NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with H8 h group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 4 Protein expression of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH and total protein in injury BEAS-2B and HUVCES induced by hypoxia

在缺氧 24 h 内表达稳定;vinculin、 α -tubulin 和 EIF5 在缺氧 24 h 表达水平下降;应用总蛋白进行上样量的校正,在 Western blot 电泳时对应上样并

进行考马斯亮蓝染色,结果显示缺氧诱导 BEAS-2B 损伤模型中总蛋白表达一致。HUVCES 细胞缺氧模型内参蛋白 vinculin、 α -tubulin 和 β -actin

在缺氧 48 h 内表达稳定;EIF5 和 GAPDH 在缺氧 8 h 表达水平下降;同时考马斯亮蓝染色,结果显示缺氧诱导 HUVCES 损伤模型中总蛋白表达结果一致。

3 讨论

高原环境给人类带来极大的挑战,在急进高原过程中机体面临缺氧,从而导致肺部组织受到损伤,严重的急性高原缺氧诱导肺组织损伤可能会危及生命^[15]。因此,深入理解肺损伤在急性高原病中的作用,对于预防和治疗该疾病具有重要的临床意义。本研究旨在确定由于暴露于低压缺氧而诱导的肺损伤后蛋白内参表达的选择。

在研究高原肺损伤机制时,Western blot 检测蛋白表达水平变化最为常用的方法,内参蛋白的选择显得尤为关键。目前主要应用的内参蛋白有 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin 和 GAPDH。vinculin 是一种细胞骨架蛋白,它在细胞-细胞外基质(extracellular matrix, ECM)以及细胞-细胞之间的黏附连接中发挥着关键作用^[16]。 α -tubulin 是微管蛋白家族的一员,它是构成细胞骨架微管的主要成分之一^[17]。EIF5 是蛋白质合成过程中的一个关键因子。它在翻译起始阶段发挥作用,在细胞生物学研究中,EIF5 的表达水平通常是相对稳定的^[18]。 β -actin 是肌动蛋白家族中的一员,是细胞骨架中最丰富的蛋白质之一^[19]。GAPDH 是一种在糖酵解途径中起关键作用的酶^[20]。

为了探讨不同高原缺氧时间对肺组织中内参蛋白表达的影响,本研究参考既往对急性高原缺氧研究中的缺氧时间点,选择小鼠在低压低氧仓急性缺氧 8 h、24 h 和中长期缺氧 72 h^[21]。本研究发现在高原缺氧环境下,vinculin、 α -tubulin、EIF5 和 β -actin 在肺组织中稳定表达,而 GAPDH 表达增加。由于 GAPDH 是一种经典的糖酵解酶,在缺氧后 HIF-1 调节糖酵解相关的多种酶,导致 GAPDH 表达升高^[22]。

在本研究中,还通过肺损伤相关研究常用体外细胞 BEAS-2B 和 HUVECS 缺氧,对其内参蛋白表达变化进行研究。BEAS-2B 细胞在缺氧 48 h,观察发现有大量的细胞死亡,所以缺氧时间只选用缺氧至 24 h。发现 BEAS-2B 在缺氧 24 h 后,其 vinculin、 α -tubulin 和 EIF5 的表达水平下降,这可

能是由于缺氧诱导的细胞内信号转导途径的改变,影响了这些蛋白质的合成、稳定性和功能。缺氧通过 HIF-1,能够调控多种基因的表达,以适应低氧环境^[23]。HIF-1 的激活可能导致细胞骨架重组和蛋白质合成途径的重新编程,从而影响 vinculin 和 α -tubulin 的表达,这两种蛋白质分别是细胞黏附和细胞骨架稳定的关键成分^[24]。同时,EIF5 作为翻译起始因子,其表达的下降可能反映了细胞在缺氧条件下减少蛋白质合成以节省能量的策略^[25]。本论文的中 BEAS-2B 细胞中 GAPDH 在缺氧 24 h,表达未上升。在既往的研究中,SAID 发现在体外研究的小鼠肝癌(Hep-1-6)、人肝细胞癌细胞系(Hep-3-B、HepG2)、人肺腺癌上皮细胞系(A-549)、结肠癌细胞系(HT-29、HCT-116)中未观察到缺氧诱导的对 GAPDH 表达的调节作用^[26]。

本研究对 HUVECS 缺氧,发现在缺氧条件下 vinculin、 α -tubulin 表达稳定,EIF5 和 GAPDH 表达是一个时间依赖性的调控过程,这一过程与细胞对缺氧环境的适应和恢复密切相关。在缺氧后的初期阶段,大约 8 h 后,研究显示 EIF5 和 GAPDH 的表达水平有所下降。EIF5 作为真核翻译起始因子,其表达的下调可能是细胞为了节省能量和减少蛋白质合成而采取的一种适应性策略^[18]。随着时间的推移,到了缺氧后的 72 h,EIF5 和 GAPDH 的表达水平恢复到了与对照组相似的水平。EIF5 的上升可能与细胞恢复蛋白质合成能力有关,这是细胞从缺氧应激中恢复并重建正常功能的重要步骤。同样,GAPDH 作为糖酵解途径中的关键酶,其表达的下降可能反映了细胞在缺氧条件下对能量代谢的重新调整。GAPDH 的增加则可能有助于恢复糖酵解途径的活性,为细胞提供必要的能量和代谢中间产物,以支持细胞的生存和功能恢复^[27]。GRAVEN 等^[22]研究表明 HIF-2 α 调节内皮细胞中 GAPDH 的表达上升。

本研究实验结果证明考马斯亮蓝对总蛋白进行染色相比内参蛋白更好地反映上样量。总蛋白没有因高原导致缺氧的改变而产生明显的差异,总蛋白染色比内参蛋白更准确地表示实际上样量^[28]。因此,建议在急性高原诱导肺损伤的研究中,在选用合适内参蛋白的同时,最好同时

使用总蛋白来校准上样量。GAPDH、EIF5 在高原缺氧后表达变化的机制及其导致的病理生理变化可作为未来的研究方向,同时作为管家蛋白 GAPDH、EIF5 对下游的调控在高原缺氧中发挥的作用也可深入研究。

参考文献:

- [1] LI Y, ZHANG Y, ZHANG Y. Research advances in pathogenesis and prophylactic measures of acute high altitude illness [J]. *Respir Med*, 2018, 145: 145–152.
- [2] EL ALAM S, PENA E, AGUILERA D, et al. Inflammation in pulmonary hypertension and edema induced by hypobaric hypoxia exposure [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (20): 12656.
- [3] CHEN J, ZHU H, CHEN Q, et al. The role of ferroptosis in chronic intermittent hypoxia-induced lung injury [J]. *BMC Pulm Med*, 2022, 22(1): 488.
- [4] GUO B, ZUO Z, DI X, et al. Salidroside attenuates HALI via IL-17A-mediated ferroptosis of alveolar epithelial cells by regulating Act1-TRAF6-p38 MAPK pathway [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20(1): 183.
- [5] MAIMAITAILI N, ZENG Y, JU P, et al. NLRC3 deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension development via IKK/NF- κ B p65/HIF-1 α pathway [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 431(2): 113755.
- [6] SHIMODA L A, SEMENZA G L. HIF and the lung: role of hypoxia-inducible factors in pulmonary development and disease [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2011, 183(2): 152–156.
- [7] AIMAIER S, YANG T, FANG L, et al. Protective effects of the Terminalia bellirica tannin-induced Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats with high-altitude pulmonary hypertension [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2023, 23(1): 150.
- [8] WANG Y, QI Y, WEI X, et al. Hyperbaric oxygen rescues lung cancer cells from chemical hypoxia-induced low differentiation and apoptosis resistance [J]. *Exp Lung Res*, 2018, 44(8/9): 417–423.
- [9] MONTERO-CALLE A, CORONEL R, GARRANZO-ASENSIO M, et al. Proteomics analysis of prefrontal cortex of Alzheimer's disease patients revealed dysregulated proteins in the disease and novel proteins associated with amyloid- β pathology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2023, 80(6): 141.
- [10] BEGUM H, MURUGESAN P, TANGUTUR A D. Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research [J]. *Biotechniques*, 2022, 73(1): 58–69.
- [11] ZHAO Z, HOU B, TANG L, et al. High-altitude hypoxia-induced rat alveolar cell injury by increasing autophagy [J]. *Int J Exp Pathol*, 2022, 103(4): 132–139.
- [12] CAI W, LIU S, LIU Z, et al. Downregulation of lung miR-203a-3p expression by high-altitude hypoxia enhances VEGF/Notch signaling [J]. *Aging*, 2020, 12(5): 4247–4267.
- [13] MUTSAERS C A, WISHART T M, LAMONT D J, et al. Reversible molecular pathology of skeletal muscle in spinal muscular atrophy [J]. *Hum Mol Genet*, 2011, 20(22): 4334–4344.
- [14] ESCOUBET B, PLANÈS C, CLERICI C. Hypoxia increases glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase transcription in rat alveolar epithelial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 266(1): 156–161.
- [15] LUKS A M, SWENSON E R, BÄRTSCH P. Acute high-altitude sickness [J]. *Eur Respir Rev*, 2017, 26 (143): 160096.
- [16] VAN DER STOEL M M, KOTINI M P, SCHOON R M, et al. Vinculin strengthens the endothelial barrier during vascular development [J]. *Vasc Biol*, 2023, 5 (1): e220012.
- [17] MCKENNA E D, SARBANES S L, CUMMINGS S W, et al. The tubulin code, from molecules to health and disease [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2023, 39: 331–361.
- [18] RAM A K, MALLIK M, REDDY R R, et al. Altered proteome in translation initiation fidelity defective eIF5G31R mutant causes oxidative stress and DNA damage [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5033.
- [19] OOSTERHEERT W, KLINK B U, BELYA A, et al. Structural basis of actin filament assembly and aging [J]. *Nature*, 2022, 611(7935): 374–379.
- [20] WANG J, YU X, CAO X, et al. GAPDH A common housekeeping gene with an oncogenic role in pan-cancer [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2023, 21: 4056–4069.
- [21] AHMAD Y, SHARMA N K, AHMAD M F, et al. The proteome of hypobaric induced hypoxic lung: insights from temporal proteomic profiling for biomarker discovery [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 10681.
- [22] GRAVEN K K, BELLUR D, KLAHN B D, et al. HIF-2 α regulates glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression in endothelial cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1626(1/2/3): 10–18.

(下转第 146 页)