

张小玉,张依曼,刘佳,等. 急性高原低氧诱导心肌损伤小鼠模型免疫印迹实验内参蛋白的选择 [J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(5): 684–694.

ZHANG X Y, ZHANG Y M, LIU J, et al. Loading control for Western Blot in myocardial injury models induced by acute high altitude [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(5): 684–694.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.05.007

急性高原低氧诱导心肌损伤小鼠模型免疫印迹 实验内参蛋白的选择

张小玉^{1,2}, 张依曼^{1,2}, 刘佳², 来宝长², 乌仁塔娜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. 青海大学医学院高原医学研究中心, 青海大学高原
医学应用重点实验室, 西宁 810001)

【摘要】 目的 急性高原低氧通过调控蛋白表达诱导心肌细胞损伤, 常用 Western Blot 检测蛋白变化, 但内参蛋白的选择及其变化尚无系统研究。**方法** 本文主要应用低压低氧大舱模拟 6000 m 海拔低氧 24 和 72 h, 苏木素-伊红 (HE) 染色确定心肌损伤模型的成功建立; Western Blot 检测不同内参蛋白 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 表达, 同时应用丽春红 S 染色和考马斯亮蓝染色检测总蛋白的表达; 进一步体外应用成年小鼠心肌细胞 (AMCMs) 建立低氧 12 和 24 h 损伤模型, TUNEL 染色确定细胞损伤模型的建立, Western Blot 检测上述不同内参蛋白表达, 同时应用丽春红 S 染色和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低压低氧 24 和 72 h 模型的基础上, 总蛋白表达量一致; 内参蛋白 vinculin、EIF5、 β -actin、cyclophilin B 和 cofilin 表达量一致; α -tubulin 在低压低氧 24 h 组和平原对照组表达一致, 低压低氧 72 h 组较平原对照组明显下降; 而 GAPDH 在低压低氧 24 h 组和低压低氧 72 h 组表达较平原对照组明显上升。在成功建立低氧 12 和 24 h 诱导 AMCMs 损伤的基础上, 总蛋白表达量一致, 内参蛋白 EIF5 和 β -actin 表达量一致, vinculin、 α -tubulin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 在低氧 12 h 组和低氧 24 h 组较常氧对照组表达升高。**结论** 急性高原低压低氧和体外低氧诱导心肌细胞损伤模型进行 Western Blot 时, EIF5 和 β -actin 可作为合适的内参蛋白选择, 选择总蛋白作为内参更客观。

【关键词】 高原低氧; 心肌细胞损伤; 免疫印迹实验; 内参蛋白

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2025) 05-0684-11

Loading control for Western Blot in myocardial injury models induced by acute high altitude

ZHANG Xiaoyu^{1,2}, ZHANG Yiman^{1,2}, LIU Jia², LAI Baochang²,
WUREN Tana³, TIAN Hongyan¹, YIN Qian^{1,2*}

【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业务费 (xzy012023131)。

Funded by hospital foundation of the Frist Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University (2023GYZX02, 2018QN-04), Basic Scientific Research Fund of Xi'an Jiaotong University (xzy012023131).

【作者简介】 张小玉, 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 低氧诱导的心血管损伤的防治作用及机制。Email: zhangxy_ynu@163.com

【通信作者】 殷倩, 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。

Email: yinqian610@xjtu.edu.cn

(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, China; 3. Research Center of High-Altitude Medicine, School of Medicine, Qinghai University, Key Laboratory for Application of High-Altitude Medicine, Qinghai University, Xining 810001, China)

Corresponding author: YIN Qian. E-mail: yinqian610@xjtu.edu.cn

【Abstract】 Objective The myocardial injury was induced by hypobaric hypoxia through regulating the expression of various proteins. The expression of proteins was mainly detected by western blot, but the selection of internal reference proteins and their variations have not been systematically studied. **Methods** Myocardial injury was induced in a low-pressure, low-oxygen chamber simulating an altitude of 6000 m, for 24 and 72 h. Establishment of the myocardial injury model was confirmed by hematoxylin eosin (HE) staining. Expression levels of internal control proteins, including vinculin, α -tubulin, eukaryotic translation initiation factor-5 (EIF5), β -actin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), cyclophilin B, and cofilin, were detected by Western Blot and total protein expression was detected by Ponceau S and Coomassie Blue staining. An adult mouse cardiomyocytes (AMCMs) injury model was induced by hypoxia for 12 and 24 h and confirmed by terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL staining). Internal control proteins were detected by Western Blot, as in the *in vivo* model, and total protein expression was detected by Ponceau S and Coomassie Blue staining. **Results** A myocardial injury model was established by hypobaric hypoxia for 24 and 72 h, the total protein expression levels remained consistent. The expression of internal control proteins including vinculin, EIF5, β -actin, cyclophilin B, and cofilin was consistent between the control and model groups. Expression levels of α -tubulin were similar in the plain control and 24 h hypobaric hypoxia group, but were significantly lower in the 72 h hypobaric hypoxia group compared with the plain control group. GAPDH expression was significantly higher in the 24 and 72 h hypobaric hypoxia groups than in the plain control group. An AMCM injury model was established by hypoxia for 12 and 24 h. Total protein levels and expression levels of the internal control proteins EIF5 and β -actin were consistent, but vinculin, α -tubulin, GAPDH, cyclophilin B, and cofilin expression levels were higher in both hypoxia groups compared with the normoxic control group. **Conclusions** EIF5 and β -actin may be the suitable loading control proteins for studies of hypobaric hypoxia-induced myocardial injury using Western Blot. Total protein is also a good choice for hypobaric hypoxia studies.

【Keywords】 hypobaric hypoxia; myocardial injury; Western Blot; loading control proteins

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

急性高原低氧是指人体在短时间内进入高海拔地区,由于大气中氧气分压降低,导致机体组织细胞供氧不足的病理生理现象^[1]。这种低氧状态对成年小鼠心肌细胞 (adult mouse cardiomyocytes, AMCMs) 的损伤尤为关键,因为心肌细胞对氧气的依赖性极高,任何程度的低氧都可能导致心肌细胞功能障碍,甚至引发心肌梗死等严重心血管事件^[2]。因此,研究急性高原低氧对心肌细胞的损伤对于理解高原病的病理生理机制、开发预防和治疗策略具有至关重要的意义。

蛋白表达层面的研究对于低氧后心肌细胞损伤的机制与药物探索具有重要的意义,如低氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF)^[3-4]、凋亡

相关蛋白 (如 Bax、Bcl-2)^[4]、炎症介质 (如 TNF- α 、IL-6)^[5] 在低氧心肌损伤进程中发挥重要作用。检测蛋白表达的方法有 Western Blot^[6]、酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[7]、免疫荧光染色^[8]、质谱分析^[9]、单分子荧光^[10]、原位杂交和免疫组化^[11] 等。在这些检测方法中,Western Blot 因其成本低、高灵敏度和特异性而被广泛应用。该技术通过电泳分离蛋白质,将蛋白转印到 NC 膜或 PVDF 膜上,使用特异性抗体检测目标蛋白的存在和表达水平^[12]。Western Blot 的关键步骤之一是选择合适的内参蛋白,以校正样本间上样量的差异,确保实验结果的准确性^[13]。常用的内参包括黏着斑

蛋白(vinculin)、微管蛋白(tubulin)、真核翻译起始因子 5(eukaryotic translation initiation factor 5, EIF5)、肌动蛋白(actin)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、亲环蛋白 B(cyclophilin B)和丝切蛋白(cofilin)等,选择合适的内参蛋白对于标准化目的蛋白的表达水平具有重要意义^[14]。

内参蛋白的选择需要考虑不同条件下内参蛋白的稳定性和可靠性^[15]。低氧对内参蛋白的表达具有一定的影响,已有研究表明在内皮细胞、肝癌细胞或结肠癌细胞中由于低氧会导致 GAPDH 的表达量增高^[16]。而目前针对急性低氧条件下内参蛋白的选择尚未有系统明确的研究。因此,本研究通过 Western Blot 方法检测急性高原不同低氧条件下损伤的心肌细胞中不同内参蛋白的表达水平,并以总蛋白进行系统校正,以明确不同低氧条件下损伤心肌细胞的内参蛋白选择,为更多的急性高原心肌损伤的机制研究和药物开发提供蛋白表达研究的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选取 18 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 ± 2)℃,相对湿度为 40% ~ 60%,光照明暗交替时间 12 h/12 h,每笼(塑料小鼠笼,长 × 宽 × 高:403 mm × 165 mm × 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 级屏障环境【SYXK(陕)2023-004】。所有实验操作符合动物福利和动物实验伦理要求,并通过西安交通大学生物医学伦理委员会审查批准(XJTUAE2024-1931)后施行。

1.1.2 主要试剂与仪器

AMCMs 分离所需耗材和试剂参考团队已发表文章^[17],1 × PBS(Servicebio, G0002),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), cyclophilin B polyclonal antibody(Proteintech, 11607-1-AP), cofilin polyclonal antibody(Proteintech, 10960-1-AP), PIPA 裂解液(Servicebio, G2002),脱脂奶粉(美国 BD 公司, 232100), 20 × TBST buffer(Coolaber, SL13271)增强型 ECL 化学发光检测试剂盒(Vazyme, E411-04),丽春红 S(Solarbio, P8330),考马斯亮蓝 G250(沃凯生物, D10828), BCA 蛋白质测定试剂盒(Thermo Pierce, USA), 0.5 mol/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)。

低压低氧高原舱(中航风雷,中国),生物安全柜(Thermo Fisher Scientific,美国),共聚焦显微镜(NIKON,日本),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)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠急性高原低氧模型建立

将 18 只实验小鼠适应性饲养 3 d 后,随机分为 3 组,分别为平原对照组、低压低氧 24 h 组和低压低氧 72 h 组,每组 6 只。将平原对照组的 6 只小鼠放在海拔 400 m 的西安交通大学清洁级动物实验室饲养,将低压低氧组的 12 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。小鼠组织样本采集在海拔 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 μL/g 小鼠体质量的剂量,腹腔注射进行麻醉,开胸后剪开右心耳,应用 4℃预冷的 1 × PBS 灌注左心室,待肝血液冲洗后变为白色时,收集心脏组织,心底部置于 4%多聚甲醛固定,留作组织染色用,心尖部置于液氮冻存,用于 Western Blot。

1.2.2 AMCMs 分离及低氧模型的建立

采用非 Langendorff 方法分离 AMCMs,将小鼠麻醉后,开胸,暴露心脏,沿脊柱剪断降主动脉和

下腔静脉。EDTA 灌注快速注入右心室。以止血钳夹住主动脉,将心脏剪下,放在 EDTA 缓冲液中。之后依次从左心室灌注 EDTA 灌注液、混合酶消化液到一定程度,将组织撕碎,轻吹分离消化好的细胞,加入终止液终止消化。通过过滤、沉降、梯度复钙、沉降后,以适当密度种于包被层粘连蛋白的培养皿中^[16]。分离好的 AMCMs 置于 1% O₂、5% CO₂ 的低氧舱中,分别低氧 12 和 24 h 后应用 RIPA 裂解液进行裂解,进行 Western Blot。

1.2.3 苏木素-伊红(HE)染色

应用心脏组织切片依次进行:二甲苯中脱蜡 5 min × 2 次,无水乙醇 5 min × 2 次,95% 乙醇 2 min × 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,进而用流水冲洗 5 min,1% 盐酸酒精分化 5 s,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 × 2 次。二甲苯 5 min × 2 次,最后中性树胶封片。

1.2.4 TUNEL 染色

低氧后的 AMCMs,应用 1 × PBS 洗涤细胞 1 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,1 × PBS 洗涤 1 次。0.3% Triton X-100 室温孵育 5 min,1 × PBS 洗涤两次。参照说明书配制适当量的 TUNEL 检测液,应用 50 μL TUNEL 检测液覆盖细胞样本,37 °C 避光孵育 90 min,用 1 × PBS 洗涤 2 次。抗荧光淬灭封片液(含 hoechst)封片,应用荧光显微镜进行观察。

1.2.5 Western Blot

在放射免疫沉淀测定法 RIPA 裂解缓冲液中裂解心脏组织,研磨仪 60 Hz 研磨 60 s,冰上放置 10 min。通过在 4 °C 下以 12 000 r/min 离心分离上清液 15 min,并使用牛血清白蛋白作为标准的 BCA 蛋白质测定试剂盒检测总蛋白质浓度。将蛋白质样品与 5 × 上样缓冲液混合,于金属浴 96 °C 中变性 10 min,然后冷却并储存在 -80 °C 进行进一步研究。每个样品上样 50 μg 用 10% SDS-PAGE 凝胶分离,在电泳条件下(400 mA, 1.5 h)转移到 NC 膜中。在丽春红染液中染色 3 min 并进行图像采集。其后用 1 × TBST 洗至无色,在含有 5% 脱脂奶粉中封闭膜 1 h。4 °C 过夜孵育一抗 vinculin(1:1000 稀释度)、α-tubulin(1:

2000 稀释度)、EIF5(1:5000 稀释度)、β-actin(1:1000 稀释度)和 GAPDH(1:1000 稀释度)。其后 1 × TBST 摇床洗膜 8 min,共 4 次,室温孵育辣根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 × TBST 摇床洗膜 8 min,共 4 次,并进行发光及胶片扫描。

1.2.6 考马斯亮蓝染色

与 Western Blot 对应相同上样量及上样顺序进行 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。

1.3 统计学分析

应用 Image J 1.54 g 对条带灰度值和荧光阳性信号进行定量统计,Western Blot 灰度值归一化处理。所有数据均以平均值 ± 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, $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

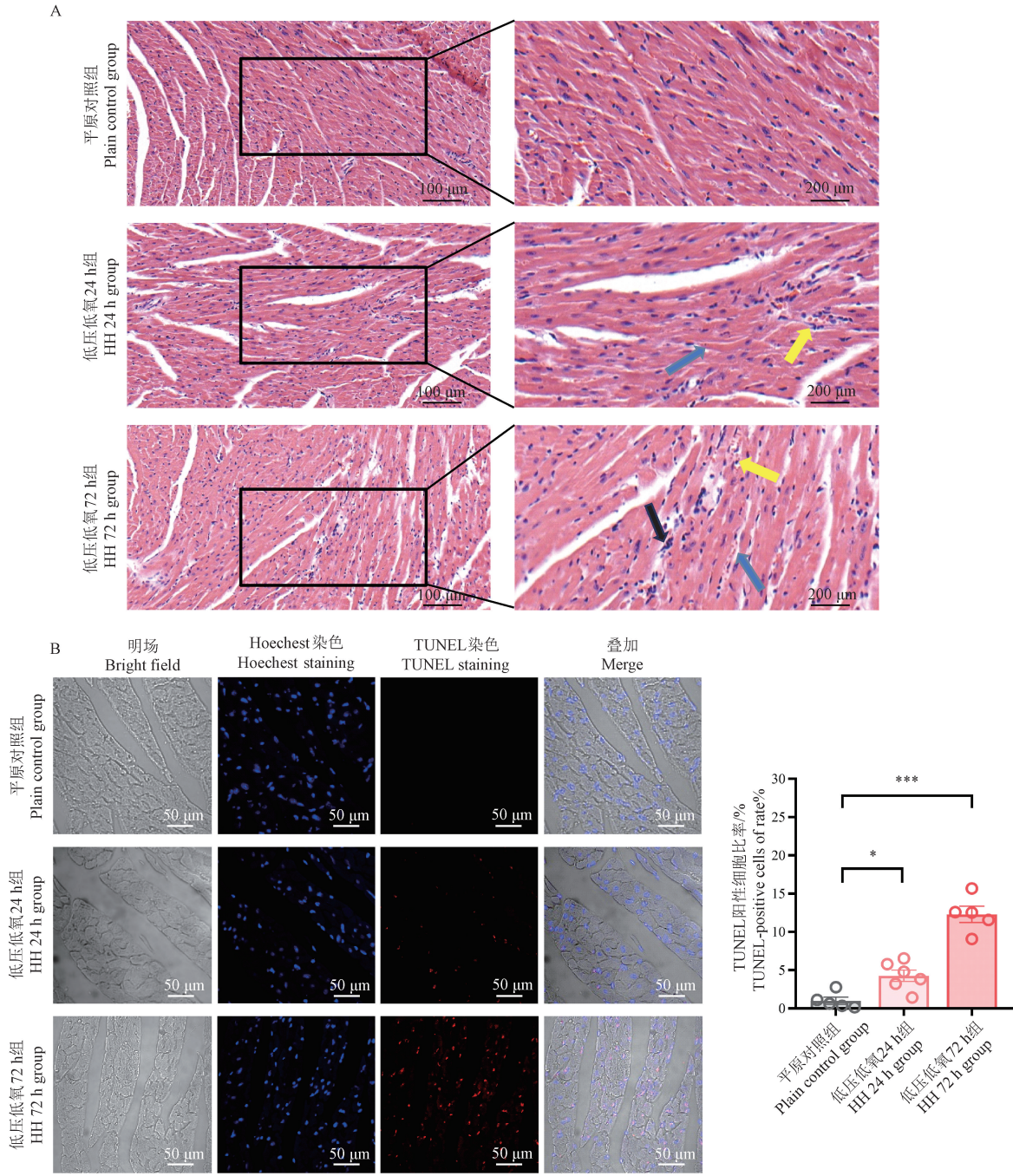
2 结果

2.1 急性高原低氧诱导心肌损伤模型的建立

本部分主要明确 6000 m 海拔诱导 24 和 72 h 可成功建立小鼠心肌细胞损伤模型,应用 HE 染色观察心肌细胞形态、炎症浸润等指标。HE 染色显示低倍镜下和高倍镜下平原对照组小鼠心脏组织结构未见明显异常,心肌细胞染色清楚,细胞核致密,心肌纤维排列整齐;低压低氧 24 h 组和低压低氧 72 h 组低倍镜下可见小鼠心肌间质血管明显充血,横纹不清;高倍镜下可见部分心肌肿胀,胞浆成颗粒样变性,偶见炎性细胞浸润。为进一步验证急性高原低氧诱导心肌损伤模型建立成功,本研究使用 TUNEL 对小鼠心脏组织进行染色,TUNEL 染色显色低压低氧 24 h 组和低压低氧 72 h 组 40 倍镜下可见明显阳性信号,见图 1。

2.2 不同内参的 Western Blot 分析

通过 Western Blot 检测心脏组织中 vinculin、α-tubulin、EIF5、β-actin 和 GAPDH 的蛋白表达水平(图 2A)。内参蛋白 vinculin、EIF5、β-actin、cyclophilin B 和 cofilin 在不同条件下表达水平无



注:A:低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织 HE 染色;蓝色箭头:心肌细胞肿胀;黑色箭头:炎性细胞浸润;黄色箭头:心肌间质血管充血;B:低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织 TUNEL 染色及统计结果;与平原对照组相比, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。(下图同)

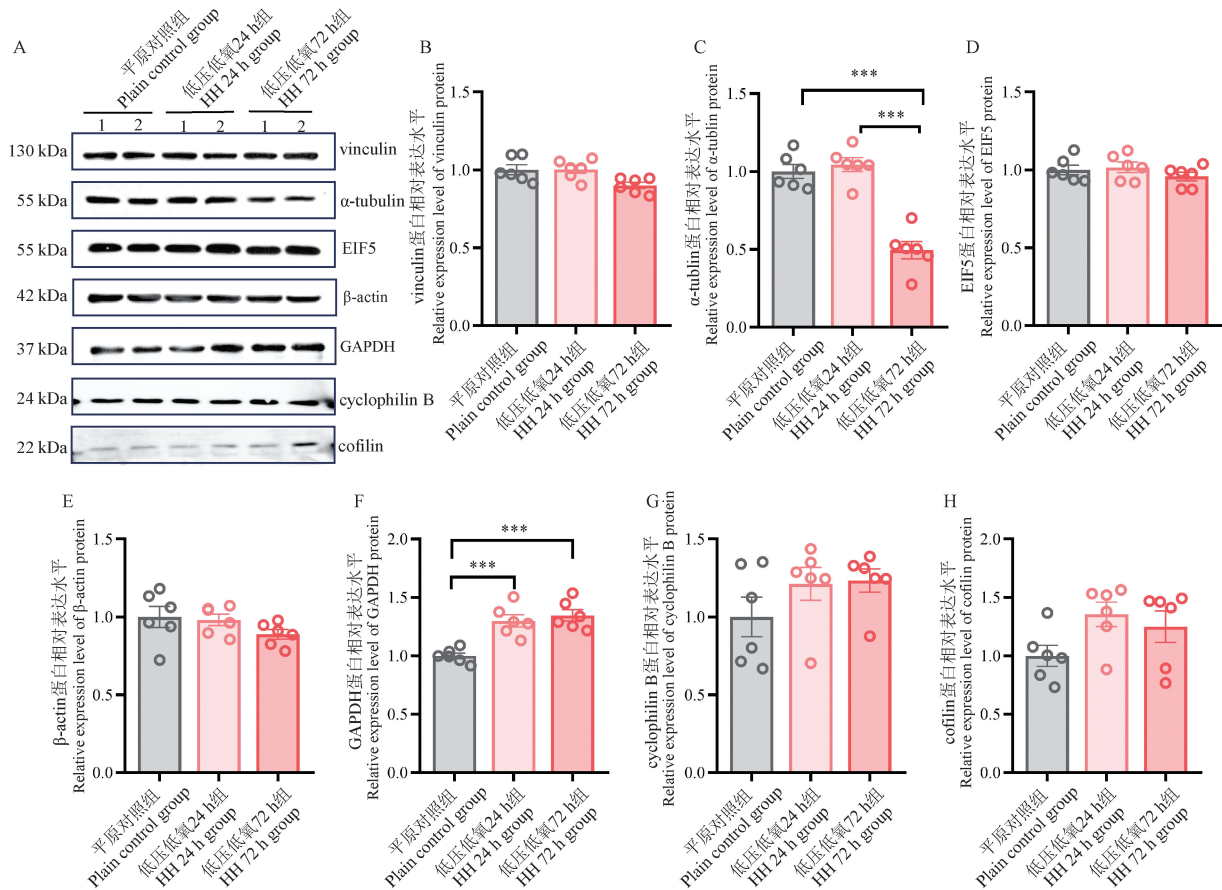
图 1 低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织 HE 和 TUNEL 染色

Note. A. HE staining of mouse heart tissue with injury induced by hypobaric hypoxia. Blue arrows. Swelling of cardiomyocytes. Black arrows. Infiltration of inflammatory cells. Yellow arrows. Vasodilation of myocardial interstitial vessels. B. TUNEL staining and statistical results of mouse heart tissue with injury induced by hypobaric hypoxia. Compared with the plain control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. (The same in the following figures)

Figure 1 HE and TUNEL staining of mouse heart tissue with injury induced by hypobaric hypoxia

显著性差异(图 2B、图 2D ~ 图 2E、图 2G ~ 图 2H),在高原低氧模型中不同低氧时间心脏组

织中 α -tubulin 和 GAPDH 的蛋白水平各不相同。 α -tubulin 在低压低氧 24 h 组和平原对照表达一



注:A:Western Blot 检测小鼠心脏组织中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白表达;1 和 2 为同组两个样本;B:vinculin 蛋白的相对表达水平;C: α -tubulin 蛋白的相对表达水平;D:EIF5 蛋白的相对表达水平;E: β -actin 蛋白的相对表达水平;F:GAPDH 蛋白的相对表达水平;G:cyclophilin B 蛋白的相对表达水平;H:cofilin 蛋白的相对表达水平。

图 2 Western Blot 检测低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白表达

Note. A. Protein expressions of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH, cyclophilin B and cofilin in mouse heart tissue under hypobaric hypoxic conditions were detected by Western Blot. Samples 1 and 2 are biological replicates from the same experimental group. B. Relative expression level of vinculin protein. C. Relative expression level of α -tubulin protein. D. Relative expression level of EIF5 protein. E. Relative expression level of β -actin protein. F. Relative expression level of GAPDH protein. G. Relative expression level of cyclophilin B protein. H. Relative expression level of cofilin protein.

Figure 2 Western Blot test protein expression of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH, cyclophilin B and cofilin in injury mouse heart tissue induced by hypobaric hypoxia

致,低压低氧 72 h 较平原对照的蛋白水平下降(图 2C)。相反,GAPDH 在低压低氧 24 和 72 h 蛋白水平增加(图 2F)。

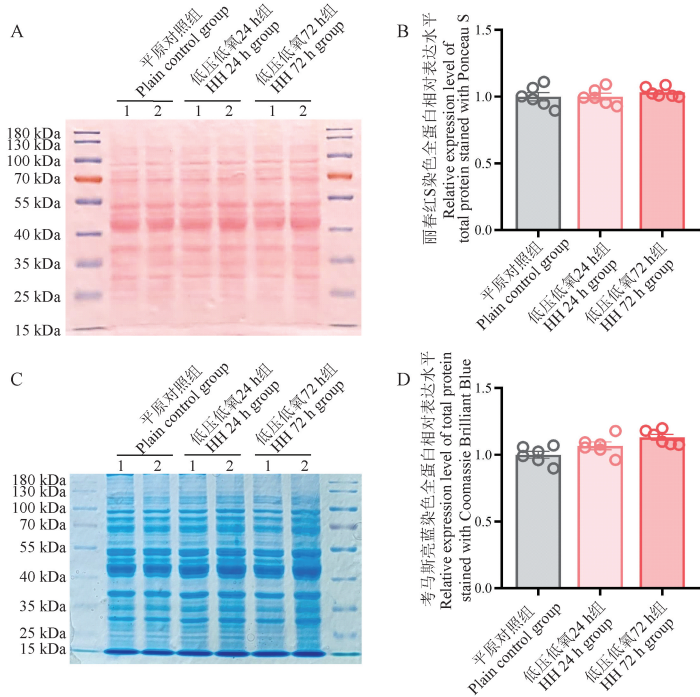
2.3 急性高原低氧诱导心肌损伤模型心脏组织中的总蛋白水平

进一步,应用总蛋白进行上样量的校正,首先在 Western Blot 转膜结束后,应用丽春红对 NC 膜染色(图 3A),统计结果显示总蛋白水平一致(图 3B)。并同时在 Western Blot 电泳时对应跑胶并进行考马斯亮蓝染色(图 3C),结果显示不

同急性高原低氧诱导心肌损伤模型的心脏组织中总蛋白表达一致(图 3D)。

2.4 AMCMs 细胞分离和低氧模型的建立

心肌细胞是心脏组织低氧损伤最易累及的细胞,凋亡是心肌细胞低氧诱导损伤的主要死亡模式,本部分在团队建立 AMCMs 分离方法的基础上,进一步探究低氧诱导 AMCMs 损伤的不同内参选择。首先应用 TUNEL 染色确定心肌细胞低氧损伤模型建立,应用 1% O_2 、5% CO_2 条件低氧 12 和 24 h,TUNEL 染色结果(图 4)显示低氧

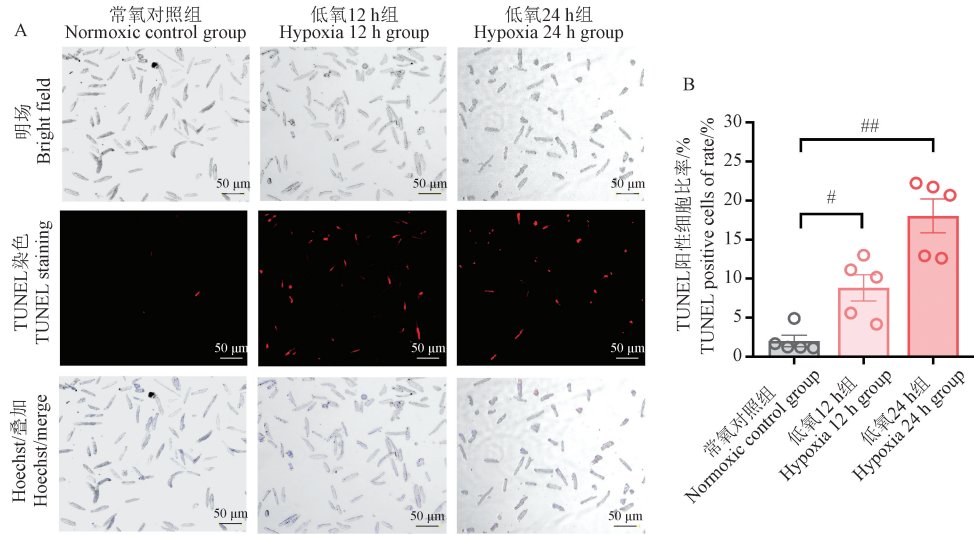


注:A:NC 膜丽春红 S 染色总蛋白图像;B:丽春红染色总蛋白的定量分析;C:总蛋白凝胶考马斯亮蓝染色图像;D:凝胶考马斯亮蓝染色总蛋白的定量分析。

图 3 低压低氧诱导的损伤小鼠心脏组织中总蛋白水平

Note. A. Image of total proteins stained with Ponceau S on nitrocellulose membrane. B. Quantitative analysis of total proteins stained with Ponceau S on nitrocellulose membrane. C. Image of total proteins stained with Coomassie Brilliant Blue on gel. D. Quantitative analysis of total proteins stained with Coomassie Brilliant Blue on gel.

Figure 3 Total protein expression level in injury mouse heart tissue induced by hypobaric hypoxia



注:A:分离培养的 AMCMs 细胞经 TUNEL 染色观察凋亡数目,Hoechst 染色确定细胞总数;B:低氧 12 h 和低氧 24 h 组与常氧对照组 TUNEL 阳性细胞比率;与常氧对照组相比, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ 。(下图同)

图 4 低氧诱导 AMCMs 损伤模型的建立

Note. A. Number of apoptosis cells of isolated and cultured AMCMs was observer by TUNEL staining, and the total number of cells was determined by Hoechst. B. Ratio of TUNEL-positive cells in the hypoxia 12 h and hypoxia 24 h groups compared to the normoxia control group. Compared with the normoxic control group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$. (The same in the following figures)

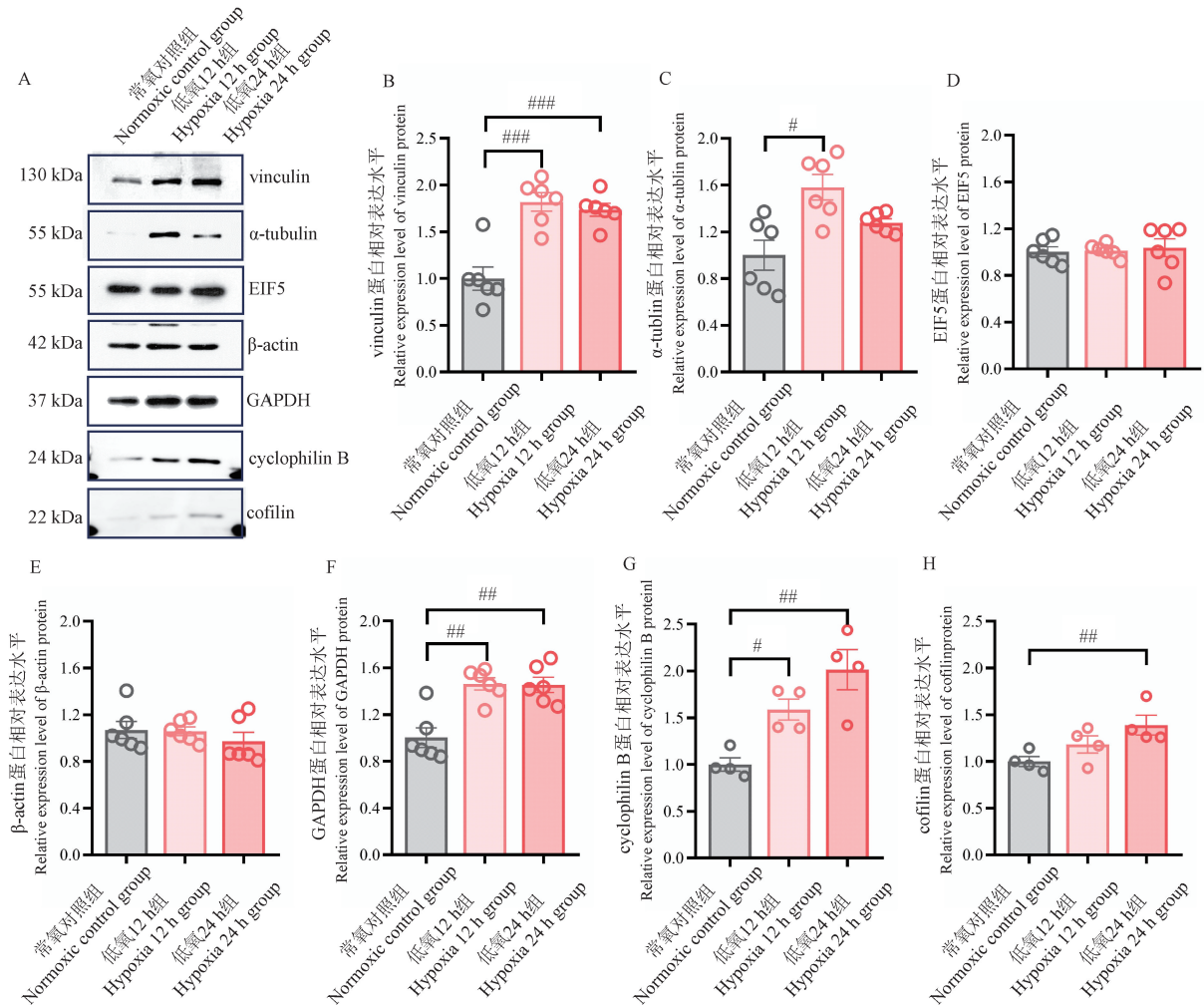
Figure 4 Establishment of a hypoxia-induced damage model in AMCMs

12h 和 24 h 条件下 AMCMs 凋亡细胞比例显著增加,提示低氧损伤心肌细胞模型的成功建立。

2.5 不同内参蛋白的 Western Blot 分析

通过 Western Blot 检测损伤 AMCMs 中不同内参蛋白 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin 和 GAPDH 的蛋白表达变化(图 5A),结果显示内参

蛋白 EIF5 和 β -actin 在不同条件下表达水平无显著性差异性(图 5D,图 5E);在不同低氧时间可诱导 vinculin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白水平上升(图 5B,图 5F ~ 图 5H),而低氧 12 h 可诱导



注:A:Western Blot 检测低氧诱导的损伤 AMCMs 中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白表达;B:vinculin 蛋白的相对表达水平;C: α -tubulin 蛋白的相对表达水平;D:EIF5 蛋白的相对表达水平;E: β -actin 蛋白的相对表达水平;F:GAPDH 蛋白的相对表达水平;G:cyclophilin B 蛋白的相对表达水平;H:cofilin 蛋白的相对表达水平;与常氧对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 5 Western Blot 检测低氧诱导的损伤 AMCMs 中 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin、GAPDH、cyclophilin B 和 cofilin 蛋白表达

Note. A. Protein expressions of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH, cyclophilin B and cofilin in AMCMs under hypoxic induce conditions were detected by Western Blot. B. Relative expression level of vinculin protein. C. Relative expression level of α -tubulin protein. D. Relative expression level of EIF5 protein. E. Relative expression level of β -actin protein. F. Relative expression level of GAPDH protein. G. Relative expression level of cyclophilin B protein. H. Relative expression level of cofilin protein. Compared with the normoxic control group, *** $P < 0.001$.

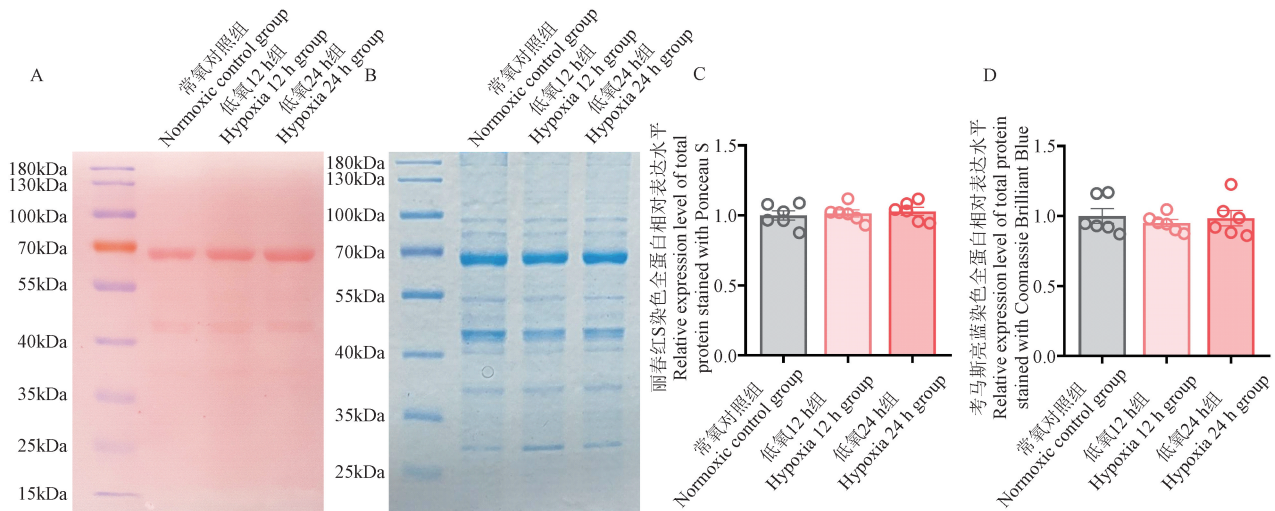
Figure 5 Protein expression of vinculin, α -tubulin, EIF5, β -actin, GAPDH, cyclophilin B and cofilin in injury AMCMs induced by hypoxia

α -tubulin 蛋白水平上升(图 5C)。

2.6 AMCMs 细胞低氧模型中的总蛋白水平

与组织样本一致,在 Western Blot 转膜后应用丽春红对 NC 膜进行染色结果显示总蛋白水平

一致(图 6A,图 6C)。同时,Western Blot 电泳时对应跑胶,并应用考马斯亮蓝对凝胶进行染色,结果显示 AMCMs 细胞低氧模型中总蛋白水平一致(图 6B,图 6D)。



注:A:NC 膜丽春红 S 染色总蛋白图像;B:NC 膜丽春红染色总蛋白的定量分析;C:总蛋白凝胶考马斯亮蓝染色图像;D:凝胶考马斯亮蓝染色总蛋白的定量分析。

图 6 低氧诱导的损伤 AMCMs 中总蛋白表达水平

Note. A. Image of total proteins stained with Ponceau S on nitrocellulose membrane. B. Quantitative analysis of total proteins stained with Ponceau S on nitrocellulose membrane. C. Image of total proteins stained with Coomassie Brilliant Blue on gel. D. Quantitative analysis of total proteins stained with Coomassie Brilliant Blue on gel.

Figure 6 Total protein expression level in injury AMCMs induced by hypoxia

3 讨论

高原低氧是一种常见于高海拔地区的病理生理现象,长期处于高原低氧环境下,人体将面临一系列健康问题,包括低氧引起的心肺负荷增加、脑部损伤、免疫功能下降等^[18]。因此,研究高原低氧的危害不仅有助于揭示高原环境下的生理变化和适应机制,还有助于制定相应的预防和保健措施,保护高原地区居民的身体健康^[19]。低氧诱导的损害主要是由 HIFs 协调,在低氧条件下,HIF-1 α 与 cAMP 反应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)及 p300 等共激活因子相互作用,共同调节靶基因的表达^[20]。这些基因参与细胞代谢、细胞生长/死亡、细胞增殖、糖酵解和免疫反应等多个过程。总体来说,低氧导致蛋白质合成、能量代谢和线粒体呼吸等发生变化^[21]。蛋白作为细胞的基本功能单位,其表达水平的变化可以反映出细胞对高原

低氧的适应能力和损伤程度^[22]。通过蛋白表达研究,可以深入了解高原低氧环境下细胞信号传导、代谢途径等方面的变化,为探讨高原低氧机制提供重要线索^[23]。在蛋白表达研究中,内参蛋白至关重要,主要是作为上样量标准化和校正的参考。

选择合适的内参对于确保研究结果的准确性和可靠性至关重要,有助于避免实验误差和扭曲结果的风险,从而确保研究结论的科学性^[24]。目前应用的内参主要包括 vinculin、 α -tubulin、EIF5、 β -actin 和 GAPDH。Vinculin 是一种重要的肌动蛋白丝(F-actin)结合蛋白,积极参与细胞-基质和细胞-细胞粘附^[25];Tubulin 分为 α 、 β 、 γ 、 δ 、 ϵ 等多种 tubulin,其中 α -tubulin 和 β -tubulin 可以形成异源二聚体,是形成微管的最主要的两种 tubulin^[26];EIF5 蛋白是 43S 前起始复合物(43S PIC)的关键成员^[27];肌动蛋白(actin)是细胞的一种重要骨架蛋白,在不同物种之间高度保守;

GAPDH 是一种重要的糖酵解酶,可催化 3-磷酸甘油醛生成 1,3-二磷酸甘油酸。这 5 个基因通常被用作 Western Blot 的内参蛋白。在高原低氧条件下,不同内参的表达水平可能会受到影响,进而影响心肌细胞功能和代谢。这种变化主要来源于高原低氧环境对细胞内代谢通路和信号传导的影响,导致内参表达水平发生变化。本研究主要探讨此 5 种常用内参在低氧诱导心肌损伤中的变化,旨在为高原低氧心肌细胞的后续研究以及其他相关研究提供内参选择的依据和参考。

已有研究显示,某些常用内参蛋白(vinculin、actin 或 tubulin)在低氧等刺激条件下,其表达水平或稳定性可能发生变化,如 MISRA 等^[28]发现在 A431 细胞低氧未引起 vinculin 或 paxillin 的表达改变;LEMLER 等^[29]发现在新生犊牛中损伤的右心室心肌,与对照组相比,vinculin 的总含量变化不大,微管蛋白含量增加。而在高原低氧中目前无系统研究损伤心肌的内参蛋白的变化,本研究发现在急性高原低氧 72 h 心脏组织中 vinculin 的含量未发生变化,而在 AMCMs 低氧 12 h 后 vinculin 的表达水平升高。心脏组织和 AMCMs 低氧损伤 vinculin 的表达趋势不同,AMCMs 为了适应低氧环境而增强细胞粘附和细胞骨架重组,已有研究发现低氧条件下新生大鼠心肌细胞骨架 vinculin 发生变化,且 92 kDa 胶原酶增加,伴随 92 kDa 胶原酶释放的细胞骨架变化可能代表了心肌细胞的一种防御机制^[30]。而在心脏组织中有其他的细胞,如成纤维细胞、内皮细胞可以参与低氧损伤机制的调控,可能导致出现组织 vinculin 和心肌细胞体外低氧 vinculin 变化不一致。WANG 等^[15]报道称在缺血性心脏组织中,actin 和 tubulin 发生显著变化。本研究发现在急性高原低氧 72 h 心脏组织中 α -tubulin 的表达水平下降;而 AMCMs 低氧 24 h 相比低氧 12 h 中 α -tubulin 表达下降,而与常氧对照无统计学意义。AMCMs 低氧 12 h 可能由代偿机制来应对这种应激。YIN 等^[31]在研究中发现低氧会通过增加泛素-蛋白酶活性来减少 γ -tubulin 的水平。ZHANG 等^[32]也发现 β -tubulin 在低氧/复氧后的 mRNA 和蛋白表达水平下降。这也证明了心脏组织在急性低氧条件下损伤会诱导 α -tubulin 的减少。GRAVEN 等^[33]研究发现低氧调节内皮细胞

中 GAPDH 表达上调。本研究发现在急性高原低氧 72 h 心脏组织中 GAPDH 和 AMCMs 低氧 24 h 的表达水平均增加。由于 GAPDH 是一种经典的糖酵解酶,在低氧后 HIF-1 调节糖酵解相关的多种酶,导致 GAPDH 表达升高^[21]。EIF5 和 β -actin 的表达水平在高原低氧和 AMCMs 低氧中均表达稳定。本研究提示,急性高原低氧诱导心脏组织损伤和低氧诱导 AMCMs 损伤进行 Western Blot 检测时可选择 EIF5 和 β -actin 作为内参。

本研究还通过丽春红 S 对 NC 膜染色和使用考马斯亮蓝凝胶,发现总蛋白的含量在低氧条件下是稳定表达的。因此,使用总蛋白分析提供了一种蛋白质含量的测量方法,该测量避免了使用单个内参蛋白由于低氧导致表达水平的改变,而总蛋白在比较来自不同模型时保持不变。因此,本研究结果建议研究急性高原低氧诱导心脏损伤时可选择 EIF5 和 β -actin 作为内参蛋白,同时样本量充足条件下也可将总蛋白作为上样量校正标准。

参 考 文 献(References)

- [1] MALLET R T, BURTSCHER J, PIALOUX V, et al. Molecular mechanisms of high-altitude acclimatization [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1698.
- [2] 黄岚. 逐梦喜马拉雅 开拓通往生命禁区的心路 [J]. *中华心血管病杂志*, 2021, 49(10): 943-944.
HUANG L. Dreaming of the Himalaya: pioneering a path to the forbidden regions of life [J]. *Chin J Cardiol*, 2021, 49(10): 943-944.
- [3] YUAN X, RUAN W, BOBROW B, et al. Targeting hypoxia-inducible factors: therapeutic opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2024, 23(3): 175-200.
- [4] FENG J, ZHAN J, MA S. LRG1 promotes hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis and autophagy by regulating hypoxia-inducible factor-1 α [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 8897-8907.
- [5] WANG G, WANG J, LI X, et al. Hypoxia and TNF- α synergistically induce expression of IL-6 and IL-8 in human fibroblast-like synoviocytes via enhancing TAK1/NF- κ B/HIF-1 α signaling [J]. *Inflammation*, 2023, 46(3): 912-924.
- [6] PILLAI-KASTOORI L, SCHUTZ-GESCHWENDER A R, HARFORD J A. A systematic approach to quantitative Western blot analysis [J]. *Anal Biochem*, 2020, 593: 113608.
- [7] HAYRAPETYAN H, TRAN T, TELLEZ-CORRALES E, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay: types and

- applications [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2612: 1–17.
- [8] 贾坤, 苏建荣. 细胞中同时检测特定标志物蛋白和基因表达方法的建立 [J]. *中国医药生物技术*, 2021, 16(2): 120–125.
- JIA K, SU J R. Establishment of a technique for simultaneous detection of specific marker proteins and gene expression levels in cells [J]. *Chin Med Biotechnol*, 2021, 16(2): 120–125.
- [9] VALLEJO D D, ROJAS RAMÍREZ C, PARSON K F, et al. Mass spectrometry methods for measuring protein stability [J]. *Chem Rev*, 2022, 122(8): 7690–7719.
- [10] PODE Z, PERI-NAOR R, GEORGESON J M, et al. Protein recognition by a pattern-generating fluorescent molecular probe [J]. *Nat Nanotechnol*, 2017, 12(12): 1161–1168.
- [11] OLIVER A, HAGEN J, YANG S, et al. In situ hybridization (ISH) combined with immunohistochemistry (IHC) for co-detection of eGFR RNA and phosphorylated EGFR protein in lung cancer tissue [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2593: 221–232.
- [12] MEFTAH G H, BAHARI Z, ZAREI MAHMOUDABADI A, et al. Applications of western blot technique: from bench to bedside [J]. *Biochem Mol Biol Educ*, 2021, 49(4): 509–517.
- [13] WU L, HU X, TANG H, et al. Valid application of western blotting [J]. *Mol Biol Rep*, 2014, 41(5): 3517–3520.
- [14] NERIS R L S, DOBLES A M C, GOMES A V. Western blotting using in-gel protein labeling as a normalization control: advantages of stain-free technology [J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2261: 443–456.
- [15] WANG Q, HAN W, MA C, et al. Western blot normalization: time to choose a proper loading control seriously [J]. *Electrophoresis*, 2023, 44(9/10): 854–863.
- [16] ZHANG J Y, ZHANG F, HONG C Q, et al. Critical protein GAPDH and its regulatory mechanisms in cancer cells [J]. *Cancer Biol Med*, 2015, 12(1): 10–22.
- [17] 李笑汝, 姚新叶, 刘佳, 等. 成年小鼠心肌细胞腺病毒转染及低氧/复氧诱导损伤模型的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2024, 32(4): 435–443.
- LI X R, YAO X Y, LIU J, et al. Models of adenoviral transfection and hypoxia/reoxygenation-induced injury in AMCMs of adult mouse cardiomyocytes [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2024, 32(4): 435–443.
- [18] 孔晓婷, 汪元汲, 沈国双, 等. 高原低氧环境对人体的影响及药物干预研究进展 [J]. *现代医药卫生*, 2022, 38(9): 1523–1527.
- KONG X T, WANG Y J, SHEN G S, et al. The effects of high altitude hypoxia on the human body and the progress of drug intervention [J]. *J Mod Med Health*, 2022, 38(9): 1523–1527.
- [19] CHEN X, ZHANG J, LIN Y, et al. Mechanism, prevention and treatment of cognitive impairment caused by high altitude exposure [J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1191058.
- [20] KE Q, COSTA M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 70(5): 1469–1480.
- [21] LUO Z, TIAN M, YANG G, et al. Hypoxia signaling in human health and diseases: implications and prospects for therapeutics [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 218.
- [22] MA Y, HOU J, HUANG D, et al. Expression of protein phosphatase 4 in different tissues under hypoxia [J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2023, 66(3): 577–583.
- [23] KIERANS S J, TAYLOR C T. Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology [J]. *J Physiol*, 2021, 599(1): 23–37.
- [24] JANES K A. An analysis of critical factors for quantitative immunoblotting [J]. *Sci Signal*, 2015, 8(371): rs2.
- [25] BAYS J L, DEMALI K A. Vinculin in cell-cell and cell-matrix adhesions [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(16): 2999–3009.
- [26] LIU N, XIONG Y, REN Y, et al. Proteomic profiling and functional characterization of multiple post-translational modifications of tubulin [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(8): 3292–3304.
- [27] RAM A K, MALLIK M, REDDY R R, et al. Altered proteome in translation initiation fidelity defective eIF5^{G31R} mutant causes oxidative stress and DNA damage [J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 5033.
- [28] MISRA A, PANDEY C, SZE S K, et al. Hypoxia activated EGFR signaling induces epithelial to mesenchymal transition (EMT) [J]. *PLoS One*, 2012, 7(11): e49766.
- [29] LEMLER M S, BIES R D, FRID M G, et al. Myocyte cytoskeletal disorganization and right heart failure in hypoxia-induced neonatal pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279(3): H1365–1376.
- [30] VANWINKLE W B, SNUGGS M, BUJA L M. Hypoxia-induced alterations in cytoskeleton coincide with collagenase expression in cultured neonatal rat cardiomyocytes [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1995, 27(12): 2531–2542.
- [31] YIN C, LUI E S W, JIANG T, et al. Proteolysis of γ -tubulin small complex proteins is mediated by the ubiquitin-proteasome system [J]. *FEBS Lett*, 2021, 595(15): 1987–1996.
- [32] ZHANG X, ZHOU Y, CHANG X, et al. Tongyang Huoxue decoction (TYHX) ameliorating hypoxia/reoxygenation-induced disequilibrium of calcium homeostasis via regulating β -tubulin in rabbit sinoatrial node cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318: 117006.
- [33] GRAVEN K K, TROXLER R F, KORNFELD H, et al. Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(39): 24446–24453.

[收稿日期] 2024-06-11